

Aus dem Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Leiter: Prof. Dr. med. Ulrich Pohl

**Einflüsse von Ischämie/Reperfusion sowie  
Hypoxie/Reoxygenierung auf die endotheliale  
Glykokalyx**

**Dissertation**

**zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin**

**an der Medizinischen Fakultät**

**der Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

vorgelegt von

Jonas Fischer

aus

Stuttgart

2016

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München**

**Berichterstatter:** Prof. Dr. Bernhard F. Becker

**Mitberichterstatter:** Priv. Doz. Dr. Antje Habicht

Prof. Dr. Christian P. Sommerhoff

**Mitbetreuung durch den**

**promovierten Mitarbeiter:** Prof. Dr. med. Thorsten Annecke

**Dekan:** Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

**Tag der mündlichen Prüfung:** 10. November 2016

## Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung.....	7
1.1 Endotheliale Glykokalyx und <i>“endothelial surface layer”</i> .....	7
1.1.1 Aufbau .....	8
1.1.1.1 Glykoproteine.....	9
1.1.1.2 Proteoglykane .....	9
1.1.1.3 Lösliche Komponenten des <i>„endothelial surface layer“</i> .....	10
1.1.2 Funktionen .....	10
1.1.2.1 Revidiertes Prinzip von Starling.....	10
1.1.2.2 Ladung der Barriere.....	12
1.1.2.3 Mechanotransduktion und Regulation des Blutflusses .....	13
1.1.2.4 Gefäßprotektion, Blutgerinnung und Fibrinolyse .....	14
1.1.2.5 Immunologische Interaktionen.....	14
1.1.3 Klinische Bedeutung und Pathophysiologie.....	15
1.2 Ischämie/Reperfusion .....	15
1.2.1 Klinische Auswirkungen.....	16
1.3 Schäden an der Glykokalyx.....	17
1.4 Fragestellungen und Hypothesen .....	18
1.4.1 Fragestellungen .....	18
1.4.2 Hypothese .....	18
1.4.3 Ergänzende Fragestellung und Hypothese.....	18
2. Material und Methoden .....	20
2.1 Modell des isoliert schlagenden Meerschweinchenherzens.....	20
2.1.1 Versuchstiere.....	20
2.1.2 Präparation.....	21

2.1.4 Versuchsaufbau .....	23
2.2 Versuchsprotokoll .....	24
2.2.1 Sauerstoffangebot .....	24
2.2.2 Kontrollgruppe .....	25
2.2.3 Ischämie/Reperfusiongruppe .....	25
2.2.4 Hypoxie/Reoxygenierungsgruppe .....	26
2.2.5 Reaktive Hyperämie .....	27
2.3 Zielparameter .....	27
2.3.1 Koronarfluss und reaktive Hyperämie .....	27
2.3.2 Verhältnis von Transsudat und Effluat .....	27
2.3.3 Kolloidextravasation .....	28
2.3.4 Histaminausschüttung .....	28
2.3.5 Glykokalyxbestandteile .....	28
2.3.6 Laktatausschüttung .....	28
2.3.7 Freisetzung von Purinen .....	29
2.4 Weitere Methoden .....	29
2.4.1 Modifizierte Glykogenbestimmung .....	29
2.4.2 Laktat-, Adenosin- und Inosin-Messungen .....	30
2.4.2.1 Laktat .....	31
2.4.2.2 Adenosin und Inosin .....	31
2.4.3 Messung von Glykokalyxbestandteilen und Histamin .....	32
2.4.3.1 Glykokalyxbestandteile .....	32
2.4.3.2 Histamin .....	33
2.5 Lösungen .....	34
2.5.1 Perfusat .....	34

2.6 Statistische Auswertung.....	35
3. Ergebnisse.....	36
3.1 Tiergewicht.....	36
3.2 Koronarfluss und reaktive Hyperämie .....	36
3.3 Verhältnis von Transsudat und Effluat.....	37
3.4 Kolloidextravasation.....	38
3.5 Histaminfreisetzung .....	39
3.6 Glykokalyxbestandteile .....	40
3.7 Laktatmessung.....	41
3.8 Freisetzung von Purinen.....	42
3.9 Sauerstoffangebot.....	47
4. Diskussion.....	49
4.1 Nachweis der Glykokalyxschädigung .....	49
4.1.1 Transsudat und Effluat .....	49
4.1.2 Kolloidextravasation.....	50
4.1.3 Glykokalyxbestandteile .....	52
4.1.4 Sauerstoffangebot, Laktat und Purinkatabolite.....	52
4.1.5 Übersicht .....	53
4.2 Mechanismen.....	53
4.2.1 Adenosin und Inosin.....	53
4.2.2 Adenosinmetabolismus.....	54
4.2.3 Purinfreisetzung .....	54
4.2.4 Mastzellmechanismus.....	55
4.2.5 Histaminfreisetzung und Tryptase- $\beta$ -Aktivität.....	56
4.2.6 Übersicht .....	57

4.3 Methodenkritik.....	58
4.4 Schlussfolgerung.....	58
5. Zusammenfassung.....	60
6. Quellen .....	62
7. Abbildungsverzeichnis.....	69
8. Tabellenverzeichnis .....	70
9. Abkürzungsverzeichnis .....	71

# 1. Einleitung

Klinisch spielen die pathologischen Abläufe um Ischämie/Reperfusion und Hypoxie/Reoxygenierung in den unterschiedlichsten Fachdisziplinen eine wichtige Rolle, sei es nach Wiederherstellung der Durchblutung eines transplantierten Organs, bei erfolgreicher Intervention nach einem akuten Myokardinfarkt oder nach der Revaskularisierung in der Gefäßchirurgie. Es ist schon länger bekannt, dass dem vaskulären Endothel bei der Vermittlung der pathophysiologischen Abläufe von Ischämie/Reperfusionsschäden eine besondere Bedeutung zukommt (49, 50, 60).

## 1.1 Endotheliale Glykokalyx und *“endothelial surface layer”*

Die endotheliale Glykokalyx ist ein wichtiger Bestandteil der Gefäßwand. Vor ungefähr 70 Jahren ist Danielli (1) erstmals von der Existenz einer proteinreichen, nicht-zellulären Schicht auf der luminalen Seite des Gefäßendothels ausgegangen.

Lange Zeit war keine direkte Visualisierung dieser Schicht möglich, da sie durch ihre Fragilität bei der Präparation häufig zerstört wurde. Rund zwanzig Jahre nach Danielli entwickelten Copley et al. (2) das Konzept einer dünnen molekularen Schicht luminalseitig über dem Endothel. Auf diese konnten sie nur indirekt über die Beobachtung einer nicht am Fluss teilnehmenden Plasmaschicht schließen. 1966 gelang Luft eine direkte elektronenmikroskopische Darstellung der endothelialen Glykokalyx mit einer Ruthenium-Rot-Färbung (3), aber auch hier war nur eine Dicke von wenigen Nanometern zu erkennen.

Erste Hinweise auf eine physiologische Bedeutung der Glykokalyx wurden Ende der 80er Jahre gefunden, als in Kapillaren ein niedrigerer Hämatokritwert als im Gesamtblut gemessen wurde (4). Verursacht wird dies durch einen die zellulären Bestandteile des Blutes ausschließenden Raum zwischen der Gefäßwand und den festen Bestandteilen des fließenden Blutes.

Nach Zerstörung der Glykokalyx mit Heparanase verschwand dieser Raum, und der Hämatokrit in den Kapillaren stieg auf den Wert des Gesamthämatokrits an (5).

Eine erstmalige in vivo Darstellung gelang Vink et al. (6) 1996 mit einem markierten Dextran-Tracer, der von einer Schicht über den Endothelzellen ausgeschlossen wurde, in welcher der Plasmafluss signifikant verlangsamt war. Die gemessene Dicke betrug 0,5  $\mu\text{m}$  und überstieg damit deutlich die Ergebnisse früherer elektronenmikroskopischer Untersuchungen.

Die Gesamtheit dieser dargestellten Schicht wird als „endothelial surface layer“ (ESL) bezeichnet und wird aus der endothelialen Glykokalyx zusammen mit gebundenen Plasmaproteinen gebildet. Der ESL ist die eigentliche physiologisch in Erscheinung tretende Struktur an der Grenze der Gefäßwand mit einer Dicke von einem bis mehreren  $\mu\text{m}$  (8).

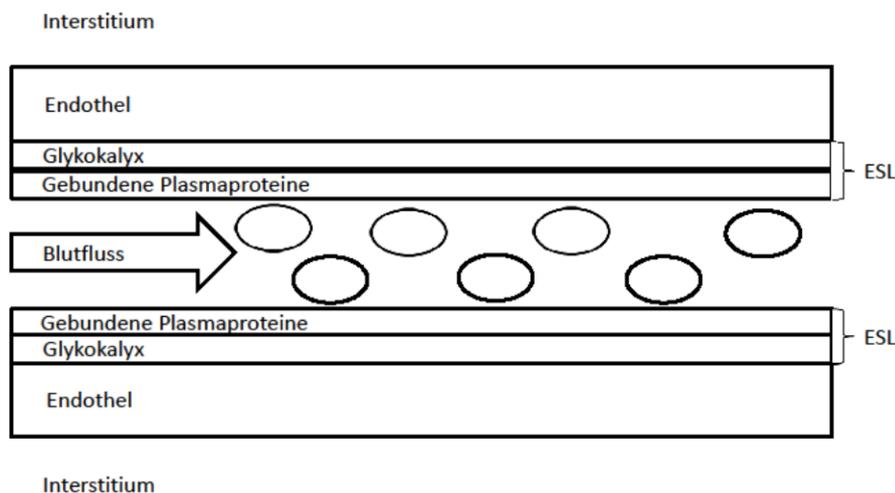


Abb. 1: Endotheliale Glykokalyx und "endothelial surface layer"

### 1.1.1 Aufbau

Die Dicke der endothelialen Glykokalyx und des sich nach Bindung von Plasmaproteinen daraus ergebenden ESL nimmt mit dem Gefäßdurchmesser zu. Die Glykokalyx an sich besteht aus verschiedenen "Rückgratmolekülen", welche an und in die Membran der Endothelzellen gebunden sind, mit einer Dicke im zweistelligen Nanometerbereich. Am Aufbau beteiligt sind vor allem Glykoproteine und Proteoglykane.

Binden nun Plasmaproteine an diese Schicht, entsteht der ESL mit einem verlangsamten Plasmafluss und einer größeren Dicke von 2 bis 3  $\mu\text{m}$  in kleinen Arterien bis hin zu 4,5  $\mu\text{m}$  in der Arteria carotis (10).

#### **1.1.1.1 Glykoproteine**

Glykoproteine bestehen aus einem Protein und einer oder mehreren daran gebundenen Kohlehydratgruppen. Als Teil der Glykokalyx haben sie Verbindung zur endothelialen Zellmembran (9). Die Kohlehydratseitenketten sind mit nur 2 bis 15 Zuckerresten eher kurz und verzweigt (11) und vermitteln unterschiedlichste Funktionen. Zu ihnen gehören Selectine, wie E- und P-Selectine, die zur Vermittlung der Interaktion von Leukozyten mit dem Endothel beitragen (12), Integrine, mit Aufgaben in der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion (13), und immunglobulin-ähnliche Strukturen wie ICAM 1 und 2 (intercellular adhesion molecule), VCAM 1 (vascular cell adhesion molecule) und PECAM 1 (platelets/endothelial cell adhesion molecule), die als Liganden für Integrine auf Leukozyten und Thrombozyten fungieren und die Diapedese der Leukozyten durch das Endothel ermöglichen (9).

#### **1.1.1.2 Proteoglykane**

Glykoproteine, in denen Kohlehydrate und Proteine O-glykosidisch verbunden sind, werden als Proteoglykane bezeichnet (14). Sie bestehen aus einem Kernprotein, an welches verschiedene, charakteristischerweise lange und unverzweigte Seitenketten, wie zum Beispiel Glykosaminoglykane, geknüpft sind. Diese Art des Aufbaus erlaubt eine große Variabilität der Endprodukte, auch kann die Zusammensetzung durch bestimmte Stimuli oder Umgebungsbedingungen verändert werden (15).

In der endothelialen Glykokalyx sind die Kernproteine Syndecan (transmembranäre Domäne) (16) und Glypican (Glycosylphosphatidylinositol-Anker) (17) fest mit der Membran der Endothelzellen verbunden.

Es gibt verschiedene Typen von Glykosaminoglykanseitenketten: Heparansulfat, Chondroitinsulfat, Dermatansulfat und Keratansulfat (18).

Ungefähr 50-90% der Proteoglykane der Glykokalyx machen Heparansulfat-Proteoglykane aus, bei denen eine unterschiedliche Anzahl Heparansulfat-Seitenketten an das Kernprotein gebunden sind (19).

Ein weiteres wichtiges Molekül aus der Familie der Glykosaminoglykane ist die Hyaluronsäure, welche nicht an ein Kernprotein gebunden ist. Die Verbindung zur Zellmembran wird durch den transmembranösen CD44 Rezeptor hergestellt (9). Sie weist erstaunliche Wasserbindungsqualitäten auf und besitzt die Eigenschaft, sich mit anderen Hyaluronsäuremolekülen zu vernetzen (20).

### **1.1.1.3 Lösliche Komponenten des „*endothelial surface layer*“**

Diese stammen entweder aus dem Endothel, wie die löslichen Proteoglykane Versican, Decorin und Biglycan (21), oder aus dem Blutstrom, wie zum Beispiel Albumin (22). Albumin ist als körpereigenes Kolloid wichtig für die korrekte Funktion der Glykokalyx. Es hat großen Anteil an der Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks.

## **1.1.2 Funktionen**

### **1.1.2.1 Revidiertes Prinzip von Starling**

1896 beschrieb Ernest Starling die Balance zwischen den Flüssigkeiten im Gewebe und in den Gefäßen. Die Formel  $F=(P_c-P_i)-\sigma(\pi_p-\pi_i)$  beschreibt die Filtrationskräfte (F), die über das Endothel wirken. Flüssigkeit und Kolloide werden durch einen hohen kolloidosmotischen Druck im Lumen ( $\pi_p$ ) (ergänzt durch einen interstitiellen Druck  $P_i$ ), der gegen einen niedrigen kolloidosmotischen Druck im Interstitium ( $\pi_i$ ) (ergänzt durch einen kapillären Druck  $P_c$ ) gerichtet ist, in den Gefäßen gehalten (25). Ein Reflexionskoeffizient  $\sigma$  berücksichtigt die Permeabilität der Gefäßbarriere für Kolloidmoleküle. Die Glykokalyx wurde, weil unbekannt, von Starling bei seinen Überlegungen noch nicht berücksichtigt (Abbildung 2).

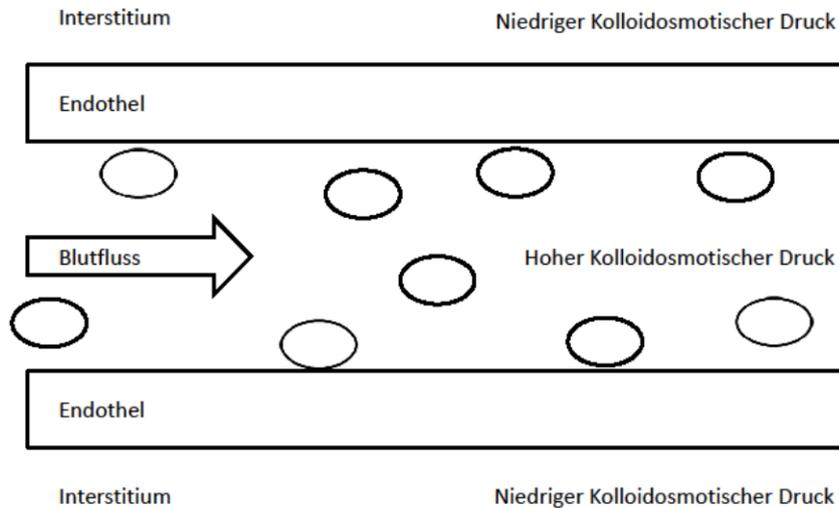


Abb. 2: Klassisches Prinzip von Starling

In den 1980er Jahren wurde erstmals versucht, die Glykokalyx in die Filtrationseigenschaft des Gefäßendothels zu integrieren (26). Dies erschien unabdingbar, da festgestellt wurde, dass die Konzentration der Proteine im Interstitium vieler Organe nahezu mit der Konzentration der Proteine in den Gefäßen übereinstimmt (27). Hieraus würde nach Starlings Modell eine Nettofiltration resultieren, die ungemein höher wäre als die real existierende. Dieser Zustand wird als "low lymph flow paradox" bezeichnet (28).

2004 gelang Adamson et al. (29) die Integration der Glykokalyx in die Gleichung von Ernest Starling, indem sie einen kolloidosmotischen Gradienten, komplett auf luminaler Seite, zwischen der Glykokalyx und dem schmalen Spalt darunter vermuteten (Abbildung 3). Wieder beschreibt die Formel  $F=(P_c-P_g)-\sigma(\pi_p-\pi_g)$  die Filtrationskräfte (F), die über das Endothel wirken, nur bezieht sich der kolloidosmotische Druck  $\pi_g$  (ergänzt durch einen luminal gerichteten Druck  $P_g$ ) nun nicht mehr auf das Interstitium, sondern auf den Bereich zwischen Glykokalyx und der Oberfläche der Endothelzellen der Gefäße (Abbildung 3).

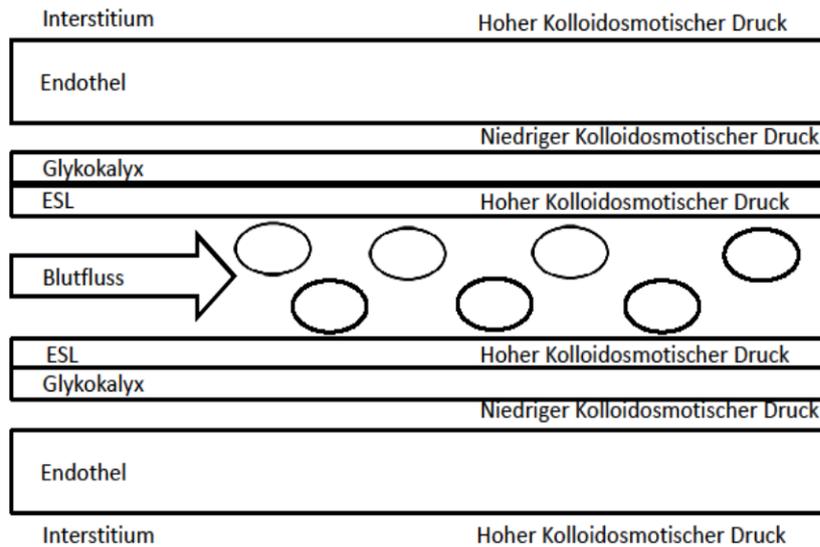


Abb. 3: Revidiertes Prinzip von Starling

Becker und Rehm et al. (27) entwickelten hieraus das „*Double Barrier*“ Konzept. Dieses beschreibt, dass sowohl die Endothelzellen als auch die Glykokalyx, jeweils mit eigener Schrankenfunktion, als Teile der vaskulären Barriere fungieren, die sich gegen den Ausstrom von Flüssigkeiten und Kolloiden stellt.

### 1.1.2.2 Ladung der Barriere

Zur funktionierenden Barriere sind eine intakte Glykokalyx mit sulfatierten Glykosaminoglykaneitenketten und genug Moleküle, die elektrostatisch an die Glykokalyx binden, nötig. Aus der so entstehenden negativen Ladung der Schicht resultieren auch ladungsabhängige Permeabilitätseigenschaften. Da außer der Molekülgröße auch die Ladung derselben beim Durchtritt eine Rolle spielt, führt eine Ladungsneutralisation im Modell zu einem Abnehmen der Barrierefunktion, zu einem vermehrten Durchtritt von Albumin und zu einer Permeabilitätserhöhung für Dextran (31).

### **1.1.2.3 Mechanotransduktion und Regulation des Blutflusses**

Das Endothel ist durch den Kontakt mit dem fließenden Blut verschiedenen Kräften wie Scherspannung und Druck ausgesetzt. Als Reaktion auf Scherbeanspruchung setzt es den Vasodilatator Stickstoffmonoxid (NO) frei (33). Bezüglich der Systeme, die für die Übersetzung von biomechanischen Kräften in biochemische Signale, die sogenannte Mechanotransduktion, verantwortlich sind, gibt es verschiedene Ansichten. Neben den Theorien, dass Scherkräfte direkt auf Proteine der apikalen Endothelmembran wirken oder dass die Signale über Adhäsionskomplexe weitergeleitet werden, vermutet man auch eine Rolle von Glykokalyx-Bestandteilen bei der Vermittlung der durch Scherkräfte induzierten Vasodilatation.

Hinweise darauf gibt die Tatsache, dass nach Verabreichung von Heparanase, welche Heparansulfat-Glykosaminoglykane aus der Glykokalyx abspaltet, eine inadäquate Reaktion auf Scherbeanspruchung und eine verminderte Produktion von NO resultiert (34).

Dass die Transduktion als Resultat der Interaktion von Plasmabestandteilen mit der Glykokalyx gesehen werden kann, wird im Modell eines isoliert schlagenden Herzens mit zellfreier Perfusionslösung durch die Beobachtung unterstützt, dass alleine durch einen Zusatz von Albumin der Koronarfluss bei druck-konstanter Perfusion signifikant erhöht werden konnte (35). Diese Vasodilatation erforderte eine intakte Glykokalyx und NO-Synthase. Albumin konnte sich also in eine physiologisch mit negativen Ladungen versehene Glykokalyx „einklinken“ und so eine größere Scherbelastung induzieren, welche eine Gefäßerweiterung hervorrufen konnte (36).

Auf diesem Wege könnte die ausbleibende Vasodilatation nach Zerstörung der Glykokalyx auch zum "low reflow" Phänomen nach Ischämie/Reperfusion beitragen. Bei diesem kommt es durch die Freisetzung von Entzündungsmediatoren und Adhäsionsmolekülen sowie durch das Anstoßen von Gerinnungskaskaden zum annähernden Sistieren der Kapillardurchblutung mit daraus folgender Mangelversorgung des Gewebes mit Sauerstoff (37).

#### **1.1.2.4 Gefäßprotektion, Blutgerinnung und Fibrinolyse**

Viele Plasmamoleküle können an Proteoglykane und variable Glykosaminoglykan-Seitenketten der Glykokalyx binden. Durch diese Bindungen von Enzymen und ihrer Inhibitoren übernimmt sie eine gefäßprotektive Rolle, indem sie auf die Aktivierung von Gerinnungskaskaden oder die Adhäsion von Leukozyten Einfluss nimmt. Die antikoagulatorischen Eigenschaften stehen in Zusammenhang mit der Bindung von Antithrombin 3, welches Thrombin und aktivierten Faktor X inhibiert, und anderen Molekülen wie „tissue factor pathway inhibitor“ (TFPI) an das Heparansulfat der Glykokalyx (38). Durch diese Bindung erhöht sich die lokale gerinnungshemmende Aktivität (39). Ähnliche Mechanismen existieren auch bei der Fibrinolyse; hier werden Plasminogen und sein Aktivator tPA an das Endothel gebunden (40) und hierdurch vor der Inhibierung geschützt.

Alle diese Wechselwirkungen tragen zur antithrombotischen Eigenschaft eines gesunden Endothels bei (41).

Ebenfalls einen Beitrag zur gefäßprotektiven Rolle der Glykokalyx leistet ihre Fähigkeit, Radikalfänger wie die Superoxiddismutase (SOD) zu binden (42). Dies reduziert den oxidativen Stress und erhält die Bioverfügbarkeit von NO; deshalb behält das Endothel seine Funktion.

#### **1.1.2.5 Immunologische Interaktionen**

Die Glykokalyx beeinflusst Interaktionen zwischen den Bestandteilen des fließenden Blutes und der Gefäßwand. Sie hält die Erythrozyten vom Endothel fern; diese Ausschlusszone kann in vivo beobachtet werden und verschwindet nach Zerstörung der Glykokalyx (6). Eine Kontaktaufnahme ist aber wichtig für die Rekrutierung von Leukozyten zu Entzündungsgebieten (43). Die Glykokalyx birgt Adhäsionsmoleküle wie L-, E- und P-Selectine, Integrine CD 11/ CD 18, ICAM-1 und VCAM-1. Normalerweise schirmen die Glykosaminoglykanketten und die löslichen Komponenten die Adhäsionsmoleküle von der Adhäsion ab. Mit einer Länge von nur etwa 10-30 nm (36, 44) im Vergleich zu einer Dicke der Glykokalyx von 0,2 bis 0,5 µm in Kapillaren (24), 2 bis 3 µm in kleinen Arterien (45) und 4,5 µm in den Karotiden (46) ragen Adhäsionsmoleküle nicht weit genug ins Lumen vor.

Wird die Glykokalyx allerdings beschädigt oder zerstört, können Blutbestandteile mit dem Endothel interagieren (47). Der Vorgang beginnt mit einer Ansammlung von Leukozyten und Annäherung an das Endothel (Margination). Hierauf folgt das Selectin-vermittelte „Rolling“ entlang der Gefäßwand, bis es zu einer Integrin-vermittelten Adhäsion der Leukozyten an die Zellen des Endothels kommt. Die Endothelzellen ziehen sich zusammen, und die Stellen der Verbindungen der Zellen („Tight junctions“) lösen sich. Der parazelluläre Durchtritt der Leukozyten erfolgt durch eine Lücke in der Basalmembran des Endothels, geschaffen durch die Freisetzung von Proteasen (94). So führt das Abspalten von Heparansulfatseitenketten durch Heparanase lokal zu vermehrter Leukozytenadhäsion am Endothel (48), und auch nach einer Ischämie nimmt durch die Schäden während der Reperfusion die Leukozytenadhäsion dramatisch zu (49).

### **1.1.3 Klinische Bedeutung und Pathophysiologie**

In gesunden Gefäßen ist die Glykokalyx entscheidend an der Regulation der Gefäßpermeabilität, der Blutzell-Gefäßwand-Interaktion, der Vermittlung der Wahrnehmung von Scherbeanspruchung und dem Schutz der Gefäßwand beteiligt (9). Diese Eigenschaften gehen durch verschiedenartige Schädigungen verloren, die von geringfügigen Änderungen an der ESL bis zur kompletten Zerstörung der Glykokalyx selbst reichen (36). Auslöser können Ischämie/Reperfusion (50), eine Entzündung durch Sepsis oder chirurgisches Trauma (51), Arteriosklerose (52), Diabetes (53) sowie Hypervolämie (54) sein.

Folgen dieser Veränderungen sind ein kapilläres Leck, Ödeme, Entzündung, Plättchenaggregation und Hyperkoagulation (36). Als gemeinsame Komponente ist in allen Organen eine mikrovaskuläre Dysfunktion zu finden (37).

## **1.2 Ischämie/Reperfusion**

Als Ischämie wird die Sauerstoffunterversorgung von Körpergewebe durch eine fehlende Durchblutung bezeichnet. Diese kann verschiedenste Ursachen haben wie zum Beispiel Embolien oder Abklemmen von Gefäßen bei Operationen.

Gelingt es, die Durchblutung wieder herzustellen, kommt es zur Reperfusion mit dem Ziel, möglichst rasch das Sauerstoffdefizit zu beheben, um so die Gewebefunktionen wieder zu stabilisieren.

Schäden an der Glykokalyx und dem ESL bei Ischämie/Reperfusion konnten in früheren Arbeiten nachgewiesen und mit der Färbe-Ausschluss-Methode in Kapillaren und postkapillären Venolen visualisiert werden (55). Hierbei konnte in Kapillaren eine dem Endothel aufgelagerte Zone dargestellt werden, welche markierte Dextranmoleküle ausschließt (6). Bei Ischämie/Reperfusion zeigte sich in den Kapillaren eine schnelle Halbierung der Zone, die die Färbung nicht aufnahm (56). Zusätzlich kam es zu einem Anschwellen der Endothelzellen und darauffolgender Lösung von der Basalmembran (57). Die eigentlichen Gewebeschäden während der Ischämie werden durch die Reperfusion erst noch verstärkt (37). Vor allem in postkapillären Venolen leiden die Endothelzellen an oxidativem Stress (58), es kommt zu Leukozytenanlagerung (59), und die Gefäßpermeabilität erhöht sich (27).

In diesem Zusammenhang spielt das Shedding, also der Verlust von Glykokalyxbestandteilen, eine große Rolle. Das Shedding kann verschiedenste Auslöser haben wie Ischämie/Reperfusion, Schock oder Sepsis; in der Konsequenz kommt es jedoch zum Ablösen von Syndecan- und Glypican-Kernproteinen mit ihren gebundenen Glykosaminoglykan-Seitenketten und damit zu einer Funktionseinschränkung der Glykokalyx.

### **1.2.1 Klinische Auswirkungen**

Wegen der erst relativ spät gelungenen Visualisierung und damit auch Erforschung der physiologischen Rolle der Glykokalyx ist noch wenig über ihre Relevanz in klinischen Belangen bekannt.

Allerdings gelang der Nachweis einer Glykokalyxschädigung sowohl bei gefäß- als auch bei herzchirurgischen Patienten (60, 61). In diesen Kollektiven wurden nach globaler Ischämie (bei unter hypothermischem Herzstillstand operierten Patienten), beziehungsweise regionaler Ischämie (bei Operationen unter Herz-Lungen-Maschine) die Konzentrationen von Glykokalyxbestandteilen im arteriellen Blut bestimmt. Bei Reperfusion wurde, als Zeichen

des Glykokalyxschadens, ein signifikanter Washout und damit ein Anstieg der Glykokalyxbestandteile Syndecan- und Heparansulfat beobachtet.

### **1.3 Schäden an der Glykokalyx**

Ischämie/Reperfusion führt zu Schäden an der endothelialen Glykokalyx. Diese können anhand einer signifikanten Abnahme der Glykokalyxdicke sowie eines Sheddings von Glykosaminoglykseitenketten beobachtet werden (50).

Zu diesen Schäden können außer freien Radikalen, einer Aktivierung des Komplementsystems und der Expression von TNF- $\alpha$  (96) auch eine Mastzelldegranulation (79) beitragen. Mastzellen sind in den meisten Geweben vorhanden und oft in unmittelbarer Nachbarschaft von Kapillaren und postkapillären Venolen zu finden (80). Sie sind deshalb von besonderem Interesse, weil sie der einzige Zelltyp im menschlichen Herzen sind, in dem Heparanase zu finden ist (81). Dieses Enzym wird benötigt, um Heparansulfat aus der Glykokalyx abzuspalten. Außerdem können Mastzellen bei Stimulation neben Mediatoren wie Leukotriene, Histamin und Serotonin noch eine Vielzahl von Proteasen wie Tryptase und Cathepsin B (67, 68) ausschütten.

Weiterhin spielen Sauerstoffradikale (reactive oxygen species: ROS) eine wichtige Rolle beim Shedding der Glykokalyx nach Ischämie/Reperfusion (55). Eine Reperfusion nach 20minütiger Ischämie führte an Rattenherzen zu Schäden an der Glykokalyx und Bildung von Superoxiden, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikalen (95). Das Enzym Xanthinoxidoreduktase (XOR) katalysiert eine Reaktion, bei der Sauerstoffradikale entstehen, und ist an Heparansulfat der Glykokalyx gebunden. Wird die XOR mit Allopurinol gehemmt, so verhindert dies eine Reduktion der Zone am Rand der Kapillaren, die markierte Dextranmoleküle ausschließt.

Dem gegenüber steht, dass der Schaden durch Ischämie/Reperfusion durch die Infusion von Hyaluronsäure (um die Glykokalyx wiederherzustellen) oder die Gabe von Pertussistoxin reduziert werden kann (50). Letzteres weist darauf hin, dass das Shedding von GAG-Seitenketten G-Protein-vermittelt sein könnte.

## **1.4 Fragestellungen und Hypothesen**

### **1.4.1 Fragestellungen**

Schäden an der endothelialen Glykokalyx und somit auch am Endothel haben Einfluss auf viele verschiedene Krankheitsbilder. Die pathologischen Veränderungen schließen interstitielle Ödeme, vermehrte Leukozyten-Endothel-Interaktionen und erhöhte vaskuläre Permeabilität als Grundphänomene einer Entzündungsantwort mit ein. Es ist bekannt, dass solche Schädigungen als Folge von Ischämie/Reperfusion entstehen können. Jedoch beinhaltet diese Pathologie mehrere Komponenten. Ob der fehlende Sauerstoff, die unterbrochene Perfusion oder die letztendliche Rückkehr des Sauerstoffs für die Schäden verantwortlich sind, ist nicht geklärt.

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurden daher die Auswirkungen einer alleinigen Hypoxie, bei der nur der Sauerstoffgehalt bei erhaltenem Fluss erniedrigt wird, gegenüber einer durch Ischämie/Reperfusion oder im Rahmen einer Reoxygenierung induzierten Glykokalyxschädigung untersucht.

### **1.4.2 Hypothese**

Unsere Hypothese lautet: Hypoxische Perfusion ist ausreichend, um Schäden an der endothelialen Glykokalyx zu initiieren. Zum Shedding ist weder ein komplett unterbrochener Fluss (Ischämie) noch das völlige Fehlen von Sauerstoff (Anoxie) noch die Rückkehr des Sauerstoffs (Reoxygenierung) notwendig.

### **1.4.3 Ergänzende Fragestellung und Hypothese**

In unserer Arbeitsgruppe wurde nachgewiesen, dass eine Degranulation von Gewebemastzellen zu einer ischämie- und reperfusionsinduzierten Schädigung der Glykokalyx beitragen kann (67).

Ergänzend wurde daher die Fragestellung untersucht, inwiefern es während hypoxischer Perfusion zu einer Aktivierung von Mastzellen in unserem Modell kommt.

Unsere hierzu formulierte Hypothese lautete: Es sollte zu einer Aktivierung kommen, weil die Konzentrationen, die die Purine Adenosin und Inosin bei Ischämie und Hypoxie im Interstitium erreichen, hoch genug sind, um die Degranulation der Gewebemastzellen zu bewirken.

## **2. Material und Methoden**

Die Laborversuche zur vorliegenden Arbeit fanden von November 2009 bis Juni 2010 am Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin, vormals Physiologisches Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München (Vorstand Prof. Dr. med. Ulrich Pohl), in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. habil. Dr. rer. nat. Bernhard F. Becker/ Prof. Dr. med. Thorsten Annecke statt.

Die Versuche im Rahmen dieser Doktorarbeit waren Teil eines Gesamtprojektes zur Wirkung von Hypoxie und Ischämie sowie Reperfusion und Reoxygenierung auf die endotheliale Gefäßbarriere und verschiedenen Interventionen zum Schutz derselben.

Teile dieser Doktorarbeit wurden bereits im Rahmen der Vorstellung der Ergebnisse des Gesamtprojektes in peer-reviewed wissenschaftlichen Journalen veröffentlicht (69, 97, 98). Die Zustimmung der wissenschaftlichen Betreuer der Arbeit lag hierzu vor.

### **2.1 Modell des isoliert schlagenden Meerschweinchenherzens**

#### **2.1.1 Versuchstiere**

In unserer Arbeitsgruppe wurde ein spezielles Modell zum Studium der endothelialen Gefäßbarriere und der endothelialen Glykokalyx an einem isoliert schlagenden Meerschweinchenherzen entwickelt. In diesem Modell ist es möglich, das koronarvenöse Effluat dem Transsudat, einer Mischung aus interstitieller und lymphatischer Flüssigkeit, gegenüber zu stellen. Das Verhältnis der beiden Parameter erlaubt eine Aussage über die Nettofiltration – also das Gefäßleck – der koronaren Gefäße.

Die Versuche wurden durch die Regierung von Oberbayern genehmigt (AZ 209.1/211-2531.3-3/99). Die Tiere wurden nach den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes in geeigneten Ställen mit Zugang zu Wasser und Trockenfutter bei einem regelmäßigen 12stündigen Tag-/Nachtrhythmus gehalten. Es wurden männliche Albino-Kurzhaar-Meerschweinchen mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 270 g verwendet.

### **2.1.2 Präparation**

Die Versuchstiere wurden durch einen Nackenschlag mittels eines speziellen springfedergesteuerten Geräts betäubt, und beide Aa. carotides wurden sofort nach Eintritt der Bewusstlosigkeit eröffnet, was den Tod zur Folge hatte. Darauf folgte eine mediane Thorakotomie, das Sternum, Teile der Rippen und die Lungenflügel wurden reseziert. Die Herzaktion wurde schnellstmöglich durch Umspülung des Herzens mit 4°C kalter, 0,9%iger Kochsalzlösung gestoppt, um die ischämiebedingte Schädigung während der notwendigen Präparation möglichst gering zu halten. Unter konstanter Kühlung wurde nun der Perikardbeutel mit einer Pinzette abgezogen. Nach Freipräparation folgte die Kanülierung der Aorta ascendens am Aortenbogen. Über diese wurde innerhalb von maximal 90 Sekunden das angewärmte und oxygenierte Perfusat in Form von Krebs-Henseleit-Puffer mit einem konstanten Druck von 70 cm Wassersäule angeboten. Nach Reperfusion kam es innerhalb weniger Sekunden zu einem Wiedereinsetzen des Herzschlags. Jetzt erfolgte die Lösung und Entnahme der Herzen aus dem Thorax, so dass am frei an der Aortenkanüle hängenden Herzen die Präparation fortgesetzt werden konnte. Die Venen, die in den rechten Vorhof münden (Vv. cavae superior und inferior, V. azygos) und die Venae pulmonales wurden ligiert, womit als einziger Ausfluss für das koronarvenöse Effluat die A. pulmonalis übrig blieb. In diese wurde nun ebenfalls eine Kanüle eingesetzt, um das Effluat auffangen zu können. Zusätzlich wurden die Herzen von einem Heizring umgeben, um sie so vor dem Auskühlen zu schützen (Abbildung 4).

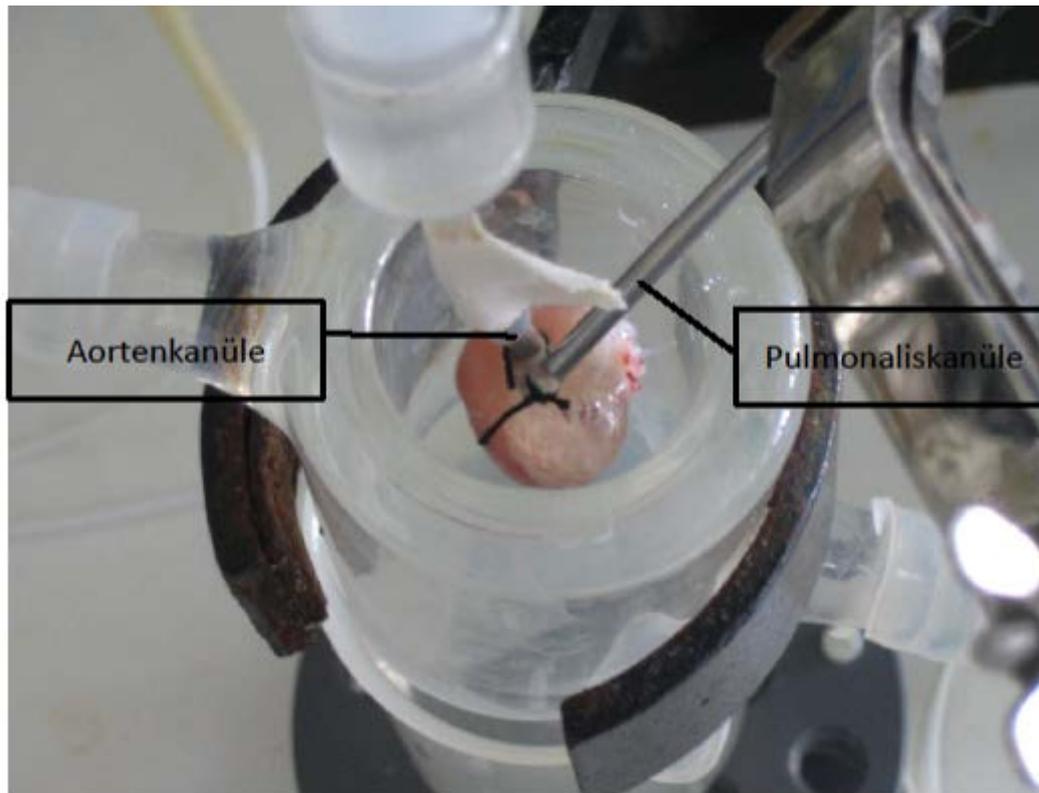


Abb. 4: Ergebnis der Präparation

### 2.1.3 Langendorff-Modell

Die verwendete Methode wurde 1895 von dem Mediziner und Physiologen Oskar Langendorff (1853 – 1908) zur Untersuchung schlagender Säugetierherzen entwickelt. Modifiziert nach H.J. Döring und H. Dehnert (1985) wird sie eingesetzt, um Herzphysiologie und –pathophysiologie zu erforschen.

Unsere Arbeitsgruppe bediente sich seither dieser Methode zur Klärung verschiedenster Sachverhalte. Verwendet wurde das Modell beispielsweise zum Vergleich von Hydroxyethylstärke mit Albumin (27), zum Vergleich kristalloider und kolloidaler Lösungen (32), zur Erforschung der Rolle von Albumin bei der Freisetzung von NO (35) und zur Erforschung des Einflusses von Antithrombin (49), Sevofluran (67), ANP (90) oder TNF- $\alpha$  (91) auf die endotheliale Glykokalyx.

Im Modellpräparat staut sich das Perfusat durch den retrograd gerichteten Druck vor der geschlossenen Aortenklappe und fließt auf physiologischem Weg durch die Koronararterien und das Kapillarbett in die Koronarvenen und schließlich in den Sinus coronarius, welcher im

rechten Vorhof mündet. Getrieben durch die kardiale Pumpfunktion durchfließt das Perfusat von dort die rechte Kammer und verlässt das Herz durch die A. pulmonalis.

#### 2.1.4 Versuchsaufbau

Die Apparatur (Abbildung 5) besteht aus zwei doppelwandigen Perfusatbehältern, in denen der Puffer angewärmt und begast wird. Zwischen den Behältern wird je nach Versuchsgruppe umgeschaltet. Das Perfusat durchfließt danach noch eine Heizspirale, um die Temperatur bei 37°C konstant zu halten, den Flussmesser und eine Luftfalle. Letztere soll verhindern, dass Luftblasen in das nachfolgende Herzpräparat gelangen. Bekanntlich schädigen Luftembolien die Glykokalyx.

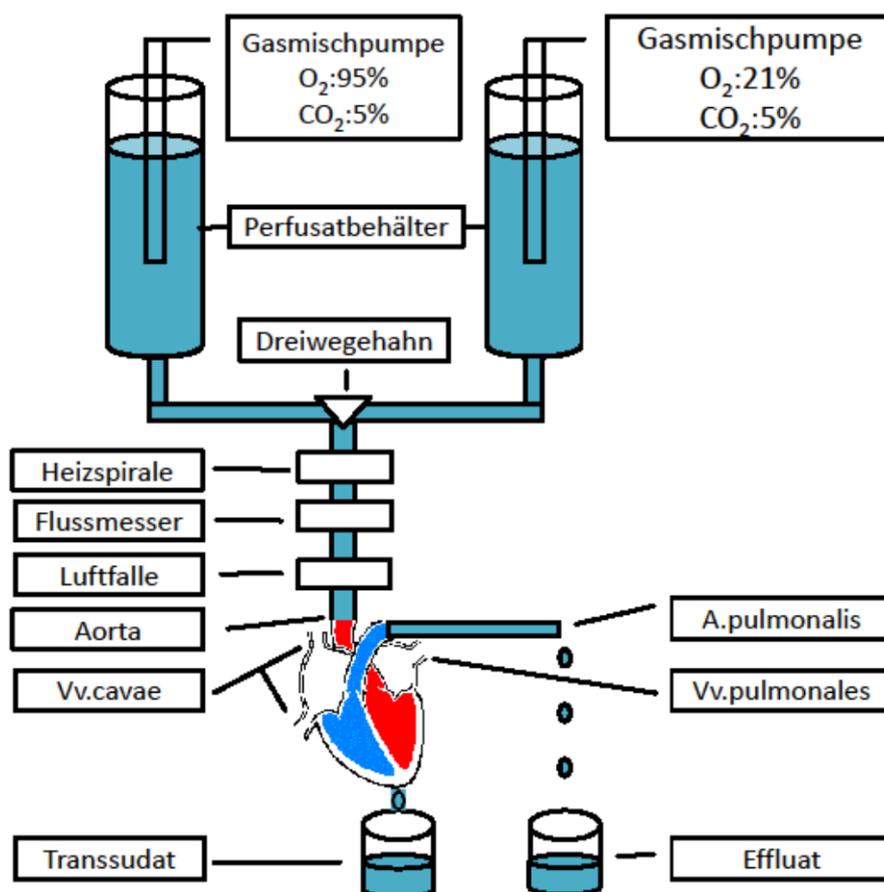


Abb. 5: Schematischer Versuchsaufbau des isoliert schlagenden Meerschweinchenherzens

### **2.1.5 Messparameter**

Erfasst wurde der Koronarfluss (ml/min) mittels Flussmesser (T206, Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, USA) vor der aortalen Kanüle. Gesammelt wurden das koronarvenöse Effluat (ml/min) aus der Kanüle in der A. pulmonalis und das vom Apex abtropfende Transsudat (ml/min), eine Mischung aus interstitieller und lymphatischer Flüssigkeit, die die Nettofiltration ins koronare Gefäßbett – also das Gefäßleck – darstellt. Die erhaltenen Proben wurden sofort gewogen und bei -20°C eingefroren.

## **2.2 Versuchsprotokoll**

An die Präparation schloss sich eine Stabilisierungsphase von 15 min an. Dann erfolgte eine Ausgangsmessung (Baseline E0), in der über 5 min Transsudat und Effluat gesammelt wurden. Ex ante wurde definiert, dass Herzen, deren Transsudation in der Baseline-Messung 7% des Effluats überstiegen, vom Versuch ausgeschlossen wurden; denn derart erhöhte Transsudatwerte weisen auf vorgeschädigte Gefäße oder präparationsbedingte Lecks hin. Danach wurden die Tiere zufällig den drei Versuchsgruppen (bis jeweils n=6) zugeteilt.

### **2.2.1 Sauerstoffangebot**

Im zellfreien Puffer besteht der Sauerstoffgehalt nur aus dem physikalisch gelösten Gas. Dieser wird mittels des Bunsen-Löslichkeitskoeffizienten (0,000 031 ml O<sub>2</sub>/ml Flüssigkeit/mmHg) über das Henry-Gesetz ( $c = a \times p$ ) für 710 mmHg mit 0,023 ml O<sub>2</sub>/ml Flüssigkeit berechnet. Das Sauerstoffangebot kann als das Produkt von Sauerstoffgehalt und Koronarfluss berechnet werden. Anhand dieses Angebots ist sowohl eine Zuordnung zu den Versuchsgruppen als auch eine Überprüfung der für den Versuch geforderten Hypoxie beziehungsweise Normoxie möglich.

### 2.2.2 Kontrollgruppe

Der Versuch wird ohne Intervention durchlaufen (Abbildung 6). Transsudat und Effluat werden jeweils alle 5 Minuten gesammelt und zu den Messzeitpunkten E0 bis E9 gewogen. Das Perfusat wird mit 94,6 % Sauerstoff und 5,4 % Kohlenstoffdioxid begast (bei 37°C, pH 7,40). Durch den physikalisch gelösten Sauerstoff wurde ein Partialdruck (PO<sub>2</sub>) zwischen 500 und 550 mmHg erreicht, was eine ausreichende Oxygenierung der Herzen gewährleistet. Nach 60 Minuten wird dem Perfusat 1% des künstlichen Kolloids Hydroxyethylstärke (HES 130/0,4, Fresenius Kabi, Germany) zugesetzt. Diese zusätzliche Messung dient dazu, am Ende des Versuches die Fähigkeit der vaskulären Barriere zu bestimmen, Kolloide zurück zu halten.

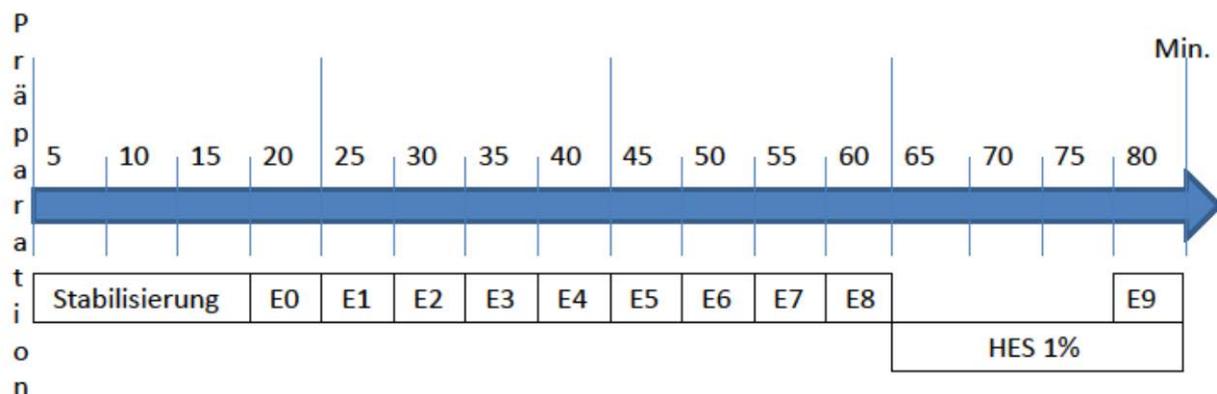


Abb. 6: Protokoll Kontrollgruppe

### 2.2.3 Ischämie/Reperfusiongruppe

Die Perfusion wird nach Stabilisierung und Baseline-Messung durch Abklemmen der aortalen Kanüle für 20 Minuten vollständig gestoppt. Für diesen Zeitraum ergab sich also eine ischämische Situation mit der völligen Einstellung der Durchblutung und Sauerstoffversorgung. Dann erfolgt die 20minütige Reperfusion. Anschließend wird Hydroxyethylstärke für 20 Minuten zugegeben, um den Effekt von Ischämie/Reperfusion auf den Übertritt von Kolloiden ins koronare Gefäßbett zu bestimmen (Abbildung 7).

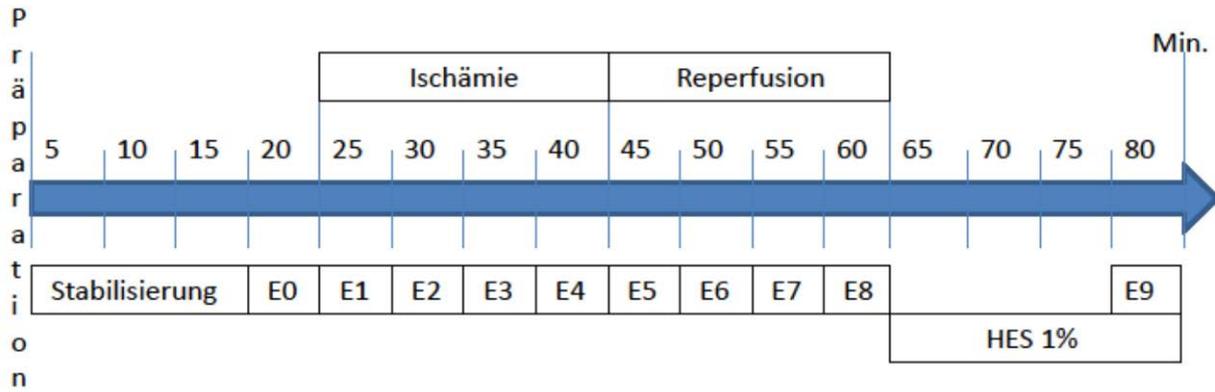


Abb. 7: Protokoll Ischämie/Reperfusionsgruppe

### 2.2.4 Hypoxie/Reoxygenierungsgruppe

Da aufgrund fehlender korpuskulärer Bestandteile im Perfusat der Sauerstoffbedarf nur über den physikalisch gelösten Sauerstoff gedeckt werden kann, entspricht eine Begasung des Perfusats mit Raumluft hypoxischen Bedingungen im Modell. Die Perfusion erfolgt nach Stabilisierung und Baseline-Messung für 20 Minuten mit einem Perfusat, welches mit einem niedrigeren Sauerstoffpartialdruck begast wird (Raumluft = 21% O<sub>2</sub> plus 5,4% CO<sub>2</sub> bei 37°C, pH 7,40). Dies führt zu Sauerstoffpartialdruckwerten (PO<sub>2</sub>) von 135 bis 145 mmHg. Darauf erfolgt eine 20minütige Reoxygenierung mit normoxischem Perfusat (94,6% O<sub>2</sub> plus 5,4% CO<sub>2</sub>). Anschließend wird Hydroxyethylstärke für 20 Minuten zugegeben, um den Effekt von Hypoxie/Reoxygenierung auf den Übertritt von Kolloiden ins koronare Gefäßbett zu bestimmen (Abbildung 8).

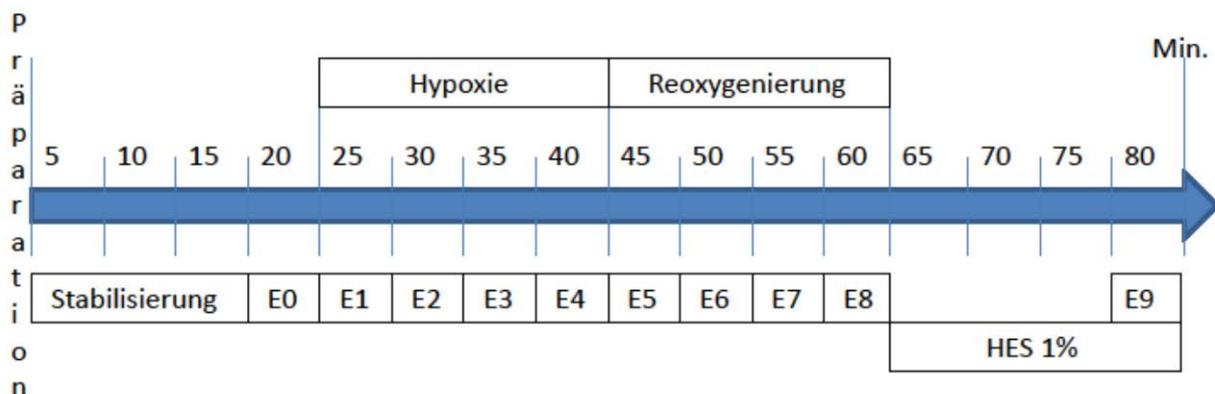


Abb. 8: Protokoll Hypoxie/Reoxygenierungsgruppe

Nach Ende des Versuchs wurden die Herzen aller Versuchsgruppen abgenommen und abgetupft, die Vorhöfe wurden entfernt und das Feuchtgewicht bestimmt. Nach 24stündiger Trocknung bei 60°C wurde das Trockengewicht gemessen. Die Anteile der Glykokalyxbestandteile, von Laktat und von Histamin wurden pro Gramm Trockenherzgewicht ermittelt.

### **2.2.5 Reaktive Hyperämie**

Vor Versuchsende wurde in allen Gruppen nochmals eine kurze stopped-flow Ischämie-Periode von 60 Sekunden durch Abklemmen der aortalen Kanüle durchgeführt, gefolgt von einer letzten Messung über 3 min. Ein Ansteigen des Flusses wird im Sinne einer reaktiven Hyperämie interpretiert. Diese kann als Indikator der endothelialen Funktion herangezogen werden, da sie unter anderem auch durch die Freisetzung von Stickstoffmonoxid aus dem Endothel vermittelt wird (99). Da eine Zerstörung der Glykokalyx auch mit einer verminderten Freisetzung von Stickstoffmonoxid einhergeht (34), hat dies auch Auswirkungen auf eine endothelabhängige Vasodilatation.

## **2.3 Zielparameter**

### **2.3.1 Koronarfluss und reaktive Hyperämie**

Um mögliche Auswirkungen der verschiedenen Interventionen auf den Koronarfluss zu erkennen, wurde dieser kontinuierlich gemessen und dokumentiert. Mittels der reaktiven Hyperämie am Versuchsende sollte die Funktionalität des Endothels überprüft werden.

### **2.3.2 Verhältnis von Transsudat und Effluat**

Der Transsudatfluss zeigt die „Dichtigkeit“ der Herzen an und ist ein Maß für die Nettofiltration im Gefäßbett. Allerdings steigt der basale Transsudatfluss mit zunehmendem Koronarfluss. Um den Parameter vom Koronarfluss unabhängig zu machen, wird das

prozentuale Verhältnis (Ratio) des Transsudats ( $T_x$ ) zum Effluat ( $E_x$ ) zum jeweiligen Zeitpunkt verwendet (Ratio [%] =  $100 \times T_x \text{ [g]} / E_x \text{ [g]}$ ).

### **2.3.3 Kolloidextravasation**

Die Konzentrationen der zugesetzten Hydroxyethylstärke wurden in Transsudat und Effluat gemessen, um über die Konzentrationsveränderungen in den einzelnen Kompartimenten eine Aussage über die Änderung der Permeabilität der Glykokalyx für Kolloide treffen zu können.

### **2.3.4 Histaminausschüttung**

Histamin kann aus Granula der perivaskulären Gewebemastzellen im Myokard freigesetzt werden. Um eine Aktivierung dieser Zellen nachzuweisen, wurden die Konzentrationen im Transsudat bestimmt.

### **2.3.5 Glykokalyxbestandteile**

Als Zeichen der Schädigung wurden die löslichen Glykokalyxbestandteile Syndecan-1 und Heparansulfat im koronarvenösen Effluat bestimmt.

### **2.3.6 Laktatausschüttung**

Laktat wird bei Sauerstoffmangel vom Herzen gebildet und freigesetzt. Die Laktatkonzentrationen steigen abhängig von Dauer und Schwere der metabolischen Unterversorgung an und wurden im Effluat bestimmt.

### **2.3.7 Freisetzung von Purinen**

Zu jedem Messzeitpunkt wurde das Vorhandensein und die Menge der Purine Adenosin und Inosin anhand ihrer Konzentrationen sowohl im Effluat als auch im Transsudat bestimmt. Sie werden im Myokard als Reaktion auf Sauerstoffmangel gebildet.

## **2.4 Weitere Methoden**

### **2.4.1 Modifizierte Glykogenbestimmung**

Zur Bestimmung der Konzentrationen der Hydroxyethylstärke in den Exsudat- und Transsudatproben wurde die modifizierte Methode zur Bestimmung von Glukose-Hydrokolloiden nach Forster et al. (103) eingesetzt. Diese teilt sich in folgende Schritte:

- Hydrolyse (Hydroxyethylstärke wird zu Glucose hydrolysiert)
- Photometrische Nullwertbestimmung (vor Starten der Nachweisreaktion)
- Photometrischer Glukosenachweis (Hexokinase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase)
- Berechnung der Hydroxyethylstärkenkonzentrationen

*Hydrolyse:* Hierzu wurden 0,5 ml der Proben der verschiedenen Messzeitpunkte sowie zur Erhöhung der Messgenauigkeit zwei Standardlösungen mit bekannten HES-Konzentrationen (Standard I: 1,2 g/dl, Standard II: 2,4 g/dl) mittels eines Vortexmischers 15 Sekunden lang gründlich durchmischt und mit 0,25 ml 35%iger Kalilauge versetzt. Anschließend wurden die Proben für 45 min auf 100°C erhitzt. Durch das Erhitzen in Kalilauge werden mögliche vorhandene Proteine zerstört. Nach dem Abkühlen wurden 7,5 ml 100%iges Ethanol hinzugefügt und diese Lösungen über 24 h bei 4°C inkubiert. Hierdurch kommt es zur Ausfällung der Polysaccharide. Im Anschluss wurde zentrifugiert (60 min, 3500 rpm, 4°C; Zentrifuge 3.0R Heraeus) und der Überstand verworfen. Der Niederschlag wurde in 2,5 ml 2 M Salzsäure gelöst und anschließend für 120 min auf 100°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Hydrolysat in 10ml-Messkölbchen überführt und quantitativ mit 2,5 ml 2 M Natriumhydroxidlösung versetzt. Danach wurden die Kölbchen mit Aqua bidest. bis zur 10 ml Marke aufgefüllt.

*Nullwertbestimmung:* Nun wurden 0,5 ml der Lösungen mit 2 ml Gluco-quant Lösung I (Puffer, Adenosintriphosphat, Nikotinamidadenindinucleotidphosphate; Boehringer, Mannheim, Germany) versetzt und in einer Küvette die erste Extinktion (E1) bei 340 nm gemessen (Spectrophotometer, Cary 100 Bio; Varian, Melbourne, Australia).

*Glukosenachweis:* Anschließend wurden 40 µl Gluco-quant Lösung II (Hexokinase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase) zugegeben, und nach 10 min wurde die zweite Extinktion (E2) bestimmt.

*Berechnung:* Die zwei Standardlösungen mit den bekannten HES-Konzentrationen wurden ebenfalls nach dieser Methode behandelt. Hieraus ergaben sich nach  $f = c_{\text{Standard}} / dE_{\text{Standard}}$  zwei Werte für f, deren Mittelwert für die Berechnung verwendet wurde. Da die Extinktionsdifferenz ( $dE = E2 - E1$ ) direkt proportional zur Konzentration der Hydroxyethylstärke (cHES) ist, konnte cHES nach folgender Formel berechnet werden:

$$c_{\text{HES}} = c_{\text{Standard}} * dE_{\text{Probe}} / dE_{\text{Standard}}$$

#### **2.4.2 Laktat-, Adenosin- und Inosin-Messungen**

Die Konzentrationen von Laktat und der Purine Adenosin und Inosin im koronarvenösen Effluat bzw. im Transsudat wurden mittels einer high-performance liquid chromatography (HPLC) und anschließender Spektrophotometrie bestimmt.

Mit dieser Methode ist es möglich, die verschiedenen Bestandteile einer Probe voneinander zu trennen sowie diese über Standardproben zu identifizieren und ihre genaue Konzentration zu bestimmen.

Sie wurde in den 1960er Jahren als Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie („high-pressure liquid chromatography“) entwickelt. Bessere Geräte und Materialien der Trennsäulen prägten dann die Bezeichnung Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie („high-performance liquid chromatography“).

Die zu untersuchende Probe wird mit Hilfe eines Laufmittels (Eluent oder mobile Phase) zur Trennsäule gebracht. In der Trennsäule, die die stationäre Phase enthält, wird ein Druck erzeugt, durch welchen die Probe mitsamt Laufmittel durch die Säule gepumpt wird. Die stationäre Phase besteht meist aus Kieselgel, an dessen Oberfläche funktionelle Gruppen

chemisch gebunden sind. An diesen Gruppen finden die Wechselwirkungen mit den zu trennenden Bestandteilen der Probe statt.

Die verschiedenen Wechselwirkungen (Van-der-Waals-Kräfte, Ionenbindung), bedingt durch die verschiedenen auf dem Kieselgel gebundenen Gruppen, führen dazu, dass die Bestandteile der Probe zu unterschiedlichen Zeiten (den Retentionszeiten) am Ende der Trennsäule erscheinen.

Die einzelnen Bestandteile werden vom UV-Detektor registriert. Das Ergebnis der Untersuchung ist ein Chromatogramm, auf welchem die Anzahl der gemessenen Ausschläge der Anzahl der aufgetrennten Probenbestandteile entspricht. Die Fläche unter der Kurve ist proportional zu deren Konzentration.

#### **2.4.2.1 Laktat**

Zur Messung der Konzentrationen wurden als mobile Phase 10 mM Ammoniumphosphatpuffer mit einem pH von 3,5 verwendet. Die HPLC-Trennsäule enthielt als Kieselgel Nucleosil Carbohydrate mit einer Partikelgröße von 7µm (Macherey-Nagel, Dueren, Germany). Gemäß seiner UV-Absorption wurde Laktat bei einer Wellenlänge von 210 nm bestimmt. Die Retentionszeit betrug 9 Minuten und 24 Sekunden. Die Effluatproben wurden vor der HPLC-Bestimmung angesäuert (500 µl Effluat + 5 µl 4M Perchlorsäure), um eine eventuelle Enzymaktivität zu unterbinden.

#### **2.4.2.2 Adenosin und Inosin**

Im Fall von Adenosin und Inosin wurde zur Messung der Konzentrationen als mobile Phase ein Methanol/Wasser Gemisch (im Verhältnis 60:40) verwendet. Als stationäre Phase wurde in der HPLC-Trennsäule Nucleosil 100 – 5µ C18 (Macherey-Nagel, Dueren, Germany) verwendet. Gemessen wurde die UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 254 nm. Die Retentionszeit betrug für Adenosin 20 Minuten und 12 Sekunden und für Inosin 13 Minuten und 18 Sekunden. Die Effluat- bzw. Transsudatproben wurden vor der HPLC-Bestimmung angesäuert (500 µl Probe + 5 µl 4M Perchlorsäure), um eventuelle Enzymaktivität zu unterbinden.

### **2.4.3 Messung von Glykokalyxbestandteilen und Histamin**

Zur Bestimmung der Konzentrationen der löslichen Glykokalyxbestandteile Syndecan-1 (CD-138) und Heparansulfat wurden Effluatproben während der verschiedenen Interventionen herangezogen (Hypoxie, Reoxygenierung, Reperfusion und Kontrolle). Wegen der sehr geringen Konzentrationen der nachzuweisenden Bestandteile wurden diese Proben mit 3 kDa cut-off ultra-Filtern (Millipore, Carrigtwohill, Ireland) von 4 ml auf 400 µl konzentriert. Die gewonnenen Konzentrate wurden wiederum gewogen und bis zur Messung bei -18 °C tiefgefroren.

#### **2.4.3.1 Glykokalyxbestandteile**

Die Bestimmung wurde durch das Forschungslabor der Klinik für Anästhesiologie am Campus Großhadern durchgeführt. Die Konzentrate wurden mittels „enzyme-linked immunoabsorbent assay“ (ELISA) untersucht.

Diese Methode bezeichnet ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren mittels enzymatischer Farbreaktion.

Für Syndecan-1 wurde ein sCD138-Kit (Diacclone Research, Besançon, France) verwendet. Analog wurde ein ELISA-Kit für Heparansulfat (Seikagaku Corporation, Tokyo, Japan) verwendet. Der Nachweis gelingt in beiden Fällen mittels eines Sandwich-ELISAs, der vor allem angewendet wird, wenn die Konzentration des nachzuweisenden Bestandteils nur gering ist.

Zunächst wird eine Mikrotitrierplatte mit einem ersten spezifischen monoklonalen Antikörper beschichtet. Die Proben werden auf die verschiedenen Probenlöcher der Platte verteilt, und der nachzuweisende Bestandteil bindet an den ersten Antikörper.

Nach der Inkubationsphase (18-24 Stunden für Heparansulfat und eine Stunde für Syndecan-1) wird ein zweiter, sogenannter Detektionsantikörper hinzugefügt. Dieser bindet ebenfalls an den Bestandteil. Damit ist das Bild des Sandwichs vervollständigt.

Eine am Detektionsantikörper gekoppelte Oxidase (das Enzym Streptavidin-Peroxidase) katalysiert bei dem Chromogen Tetramethylbenzidin einen Farbumschlag nach gelb.

Da die Enzymreaktion immer weiter laufen würde, muss die Farbreaktion nach einer definierten Zeitspanne, wenn gute Kontraste sichtbar sind, abgebrochen werden. Dies geschieht durch Zerstörung des Enzyms mittels Zugabe einer Säure.

Die Intensität des Farbumschlags ist proportional zur Konzentration des Bestandteils und kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm erfasst werden. Daher kann das Ergebnis durch Vergleich mit Standards quantifiziert werden. Hierzu sind noch die Untersuchungen mehrerer Standardproben sowie Positiv- und Negativkontrollen nötig, um eine Eichgerade zu erstellen.

#### **2.4.3.2 Histamin**

Die Konzentrationen wurden im Transsudat ebenfalls mittels ELISA-Kit (Spi-Bio, Montigny le Bretonneux, France) bestimmt. Im Unterschied zum oben erklärten Sandwich-ELISA wurde für den Nachweis von Histamin ein kompetitiver ELISA verwendet.

Erneut wird eine Mikrotitrierplatte mit einem ersten monoklonalen spezifischen Antikörper gegen Histamin beschichtet. Darauf wird die zu untersuchende Probe in die Probenlöcher der Platte zugegeben. Zusätzlich wird ein Tracer, bestehend aus Histamin mit gebundener Acetylcholinesterase, hinzugefügt, der den ersten Antikörper überall dort bindet, wo er nicht durch das Histamin aus der Probe gebunden ist. Je mehr Histamin in der Probe vorhanden war, desto weniger Tracer kann gebunden werden. Eine Lösung aus Substrat für die Acetylcholinesterase und Chromogen ergibt eine gelbe Farbreaktion. Der Nachweis erfolgt photometrisch bei einer Wellenlänge von 412 nm. Die Signalstärke der Farbreaktion ist proportional zur gebundenen Menge des Tracers und umgekehrt proportional zur Konzentration des Histamins in der Probe.

Desweiteren sind noch die Untersuchungen mehrerer Standardproben sowie Positiv- und Negativkontrollen nötig, um eine Eichgerade erstellen zu können, anhand derer die Konzentration des Histamins abgelesen werden kann.

## 2.5 Lösungen

### 2.5.1 Perfusat

Modifizierter Krebs-Henseleit-Puffer ist ein Perfusat mit physiologischer Elektrolytzusammensetzung.

<u>Komponente</u>	<u>Summenformel</u>	<u>Konzentration</u>
Natriumchlorid	NaCl	116 mM
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO <sub>3</sub>	23 mM
Kaliumchlorid	KCl	3,6 mM
Kaliumdihydrogenphosphat	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,16 mM
Calciumchlorid	CaCl <sub>2</sub>	1,2 mM
Magnesiumsulfat	MgSO <sub>4</sub>	0,58 mM
Glucose	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	5,4 mM
Natriumpyruvat	C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> O <sub>3</sub> Na	0,3 mM
Insulin	C <sub>254</sub> H <sub>377</sub> N <sub>65</sub> O <sub>75</sub> S <sub>6</sub>	2,8 U/l

Tabelle 1: Elektrolytzusammensetzung des Krebs-Henseleit-Puffers

Die Lösung wurde an jedem Versuchstag frisch angesetzt und in den gewärmten Perfusatbehälter (37 °C) gefüllt. Dort wurde sie durch eine Gasmischpumpe (Fa. Wösthoff, Bochum, Germany) begast. Die Zusammensetzung wurde regelmäßig durch Blutgasanalysen (Rapidpoint<sup>®</sup>, Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn, Germany) überprüft.

Nach 60 Minuten wird auf ein Perfusat umgeschaltet, welches zu einem Sechstel aus 6%iger Hydroxyethylstärke (HES 130/0,4, Fresenius Kabi, Germany) besteht. Hieraus ergibt sich rechnerisch eine 1%ige Konzentration von Hydroxyethylstärke im nun verwendeten Perfusat.

## **2.6 Statistische Auswertung**

Die statistischen Auswertungen wurden mit SigmaStat (Systat Software, Richmond, Virginia, USA) durchgeführt. Die Ergebnisse werden als Medianwerte und Quartilsabstand angegeben.

In Vorversuchen, die in der Arbeitsgruppe durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, dass eine Versuchsanzahl von  $n=6$  ausreicht, um statistisch relevante Auswirkungen festzustellen. Wir gingen wegen der niedrigen Anzahl jedoch von nicht normalverteilten Daten aus, daher konnte ein t-Test nicht angewendet werden. Verwendet wurden stattdessen nicht-parametrische Tests, bei denen keine Annahmen über die Verteilung gemacht werden. Um für die gewonnenen Daten zu prüfen, ob sie aus der gleichen Verteilung stammen, wurde für zwei Gruppen (ohne Ischämiegruppe) ein Mann-Whitney-Test verwendet.

Für den Vergleich dreier Gruppen wurde ein Kruskal-Wallis one-way analysis of variance (ANOVA)-Test verwendet. Auch hierbei ist keine Normalverteilung der Daten gefordert. Angeschlossen wurde ein Student-Newman-Keuls-Test (ein Post-Hoc Test, um zu zeigen, welche Medianwerte genau sich signifikant voneinander unterscheiden). Ab einem Wert  $p < 0,05$  wurden Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen als statistisch signifikant angesehen.

### 3. Ergebnisse

Teile der Ergebnisse dieser Doktorarbeit wurden bereits auf Kongressen vorgestellt und in wissenschaftlichen Fachzeitschriften veröffentlicht (69, 97, 98).

#### 3.1 Tiergewicht

Die Tiere wurden vor Versuchsbeginn gewogen. Ihre Gewichte wiesen zwischen den einzelnen Versuchsgruppen keinen signifikanten Unterschied auf ( $p=0,625$ ).

Versuchsgruppe:	n:	Gewicht:
Kontrolle	6	270, (240 – 320)
Ischämie	6	270, (260 – 270)
Hypoxie	6	275, (270 – 300)

Tabelle 2: Tiergewichte in Gramm, Daten sind als Median und Quartilsabstand (Q1, Q3) in Klammern dargestellt.

#### 3.2 Koronarfluss und reaktive Hyperämie

In der Kontrollgruppe ging der Fluss innerhalb von 40 Minuten kontinuierlich leicht zurück (Tabelle 3).

Bezüglich des basalen Koronarflusses gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen ( $p=0,688$ ).

In den Interventionsgruppen kam es zu einer signifikanten reaktiven Hyperämie, jedoch nur in der ersten Minute der Reperfusion. Danach, mit Fortsetzung der Reoxygenierung beziehungsweise Reperfusion, verringerte sich signifikant die Flussrate des Effluats gegenüber dem Basalwert und dem Wert bei Intervention sowohl in der Ischämie/Reperfusionsgruppe ( $*p<0,05$ ) als auch in der Hypoxie/Reoxygenierungsgruppe ( $+p<0,05$ ).

Versuchsgruppe:	n:	Basalwert:	Bei Ischämie/Hypoxie:	Bei Reperfusion/Reoxygenierung
Kontrolle	6	8,2 (6,4 – 9,0)	7,7 (5,5 – 8,7)	6,3 (5,2 – 6,6)
Ischämie	6	7,1 (6,5 – 8,0)	0,0	5,8 (5,5 – 6,2)*
Hypoxie	6	8,0 (6,8 – 8,1)	8,4 (4,8 – 9,2)	6,0 (3,8 – 7,1)+

Tabelle 3: Koronarfluss (in Millilitern pro Minute), Daten sind als Median und Quartilsabstand (Q1, Q3) in Klammern dargestellt. \* $p < 0,05$  in der Ischämiegruppe für den Koronarfluss bei Reperfusion gegenüber Basalwert und Ischämie; + $p < 0,05$  in der Hypoxiegruppe für den Koronarfluss bei Reoxygenierung gegenüber Basalwert und Hypoxie

### 3.3 Verhältnis von Transsudat und Effluat

Die Stärke des Koronarflusses wirkt sich auf die Flüssigkeitsfiltration aus, indem mehr filtriert wird, je höher der Fluss ist. Deshalb wird die Filtration als Verhältnis von Transsudat zu Effluat ausgedrückt, um einen normierten Wert zu erhalten.

Die basale Transsudatbildung, ohne Intervention, unterschied sich nicht zwischen den Gruppen ( $p=0,205$ ).

Hypoxiegruppe: Während der Hypoxie erhöhte sich die Filtration verglichen mit der Kontrollgruppe signifikant (\* $p < 0,05$ ). Während der Reoxygenierung ging sie wieder etwas zurück, blieb aber signifikant höher als in der Kontrollgruppe (+ $p < 0,05$ ).

Ischämiegruppe: Bei der Reperfusion nach Ischämie erhöhte sich ebenfalls die Filtration signifikant (+ $p < 0,05$ ) gegenüber der Kontrollgruppe.

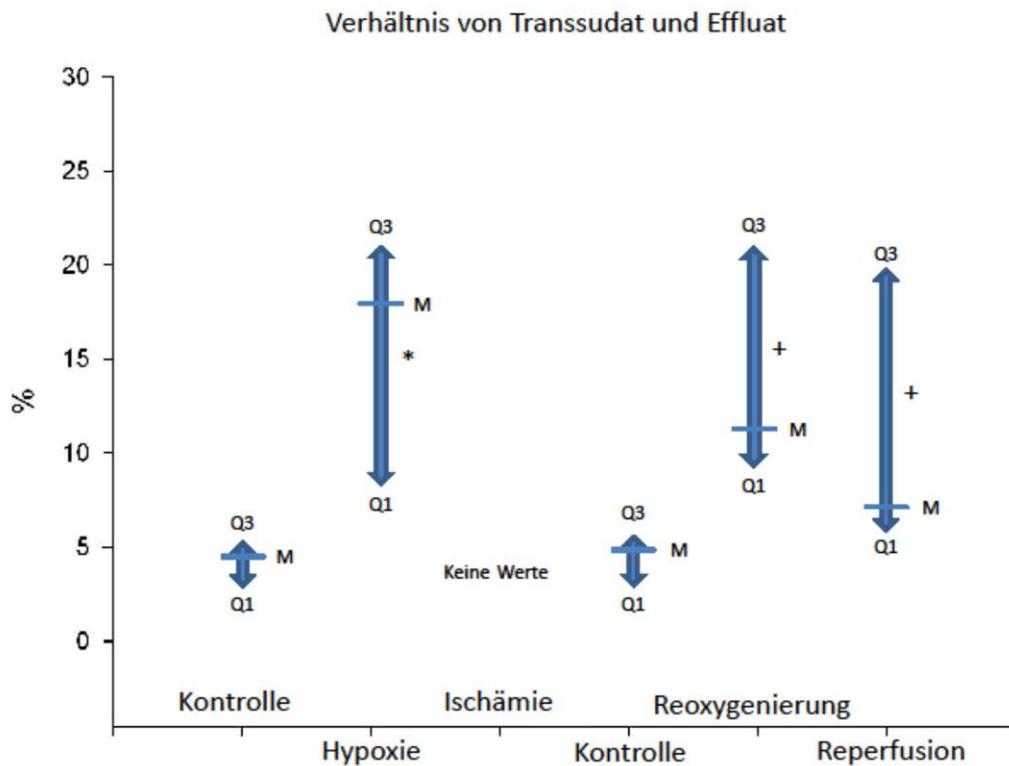


Abb. 9: Das Verhältnis von Transsudat zu Effluat in Prozent, modifiziert nach (97). Die Daten sind als Median (M) und Quartilsabstand (Q1,Q3) dargestellt. \* $p < 0,05$  während Hypoxie gegenüber der Kontrollgruppe; + $p < 0,05$  während Reoxygenierung und Reperfusion gegenüber der Kontrollgruppe.

### 3.4 Kolloidextravasation

Verglichen mit der Kontrollgruppe konnte nur während der Reperfusion nach Ischämie ein signifikant erhöhter Übertritt von Hydroxyethylstärke (HES) ins Transsudat festgestellt werden (\* $p < 0,05$ ). Während Reoxygenierung nach Hypoxie war der im Transsudat gemessene prozentuale Anteil an Hydroxyethylstärke zwar ebenfalls erhöht, dieser Anstieg war jedoch nicht statistisch signifikant.

Versuchsgruppe:	n:	Messung nach Intervention:
Kontrolle	6	6,9 (5,6 – 7,8)
Ischämie	6	16,6 (8,9 – 32,5)*
Hypoxie	6	10,7 (8,9 – 20,2)

Tabelle 4: HES-Übertritt als prozentualer Anteil der im Transsudat im Vergleich zum Effluat freigesetzten Menge. Daten sind als Median und Quartilsabstand (Q1,Q3) in Klammern dargestellt.\* $p < 0,05$  in der Ischämiegruppe gegenüber der Kontrollgruppe.

### 3.5 Histaminfreisetzung

Histamin wird von aktivierten perivaskulären Gewebemastzellen aus Granula ins Interstitium abgegeben. Daher wurden die Histaminmengen im Transsudat gemessen, und zwar jeweils in den Proben E1 bis E4 und E5 bis E8. Daraus ermittelt wurde die Summe der in diesen jeweils 20 min dauernden Perioden ausgewaschenen Mengen. Die Ergebnisse wurden auf das Trockenherzgewicht bezogen (Tabelle 5).

Hypoxiegruppe: Die Histaminmenge im Transsudat zeigte einen signifikanten Anstieg während Hypoxie ( $+p < 0,05$ ), der bei Reoxygenierung wieder zurückging.

Ischämiegruppe: Auch bei Reperfusion nach Ischämie zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Histaminmenge im Transsudat ( $*p < 0,05$ ) im Sinne eines Auswaschens von interstitiellem Histamin.

Versuchsgruppe:	n:	Messung bei Intervention:	Messung bei Reperfusion/Reoxygenierung:
Kontrolle	6	256 (148 – 362)	219 (131 – 355)
Ischämie	6	0	1040 (875 – 1974)*
Hypoxie	6	903 (626 – 2364)+	562 (379 – 895)

Tabelle 5: Abgegebene Menge von Histamin (in Pikogramm pro Gramm Trockenherzgewicht) während 20 min. Daten sind dargestellt als Median und Quartilsabstand (Q1,Q3) in Klammern. \*p<0,05 für die Reperfusion nach Ischämie gegenüber der Kontrollgruppe; +p<0,05 für die Hypoxie gegenüber der Kontrollgruppe.

### 3.6 Glykokalyxbestandteile

Als Bestandteile der endothelialen Glykokalyx wurden Syndecan-1 und Heparansulfat im Effluat bestimmt, und zwar jeweils in den Proben E1 bis E4 und E5 bis E8. Daraus ermittelt wurde die Summe der in diesen jeweils 20 min dauernden Perioden ausgewaschenen Mengen (Tabellen 6 und 7).

Hypoxiegruppe: Während der Hypoxie konnte eine signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöhte Menge von Syndecan-1 im Effluat gemessen werden (+p<0,05). Die Mengenabgabe blieb auch während Reoxygenierung signifikant erhöht (+p<0,05).

Ischämiegruppe: Während Reperfusion war die Menge von Syndecan-1 im Effluat signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht (\*p<0,05).

Versuchsgruppe:	n:	Messung bei Intervention:	Messung bei Reperfusion/Reoxygenierung:
Kontrolle	6	247 (197 – 260)	73 (25 – 171)
Ischämie	6	0	446 (285 – 588)*
Hypoxie	6	982 (824 – 1092)+	695 (319 – 1000)+

Tabelle 6: Abgegebene Menge von Syndecan – 1 (in Nanogramm pro Gramm Trockenherzgewicht) während 20 min. Daten sind als Median und Quartilsabstand (Q1,Q3) in Klammern dargestellt. \*p<0,05 bei Reperfusion gegenüber der Kontrollgruppe; +p<0,05 bei Hypoxie/Reoxygenierung gegenüber der Kontrollgruppe.

Hypoxiegruppe: Die abgegebene Menge von Heparansulfat war gegenüber der Kontrollgruppe tendenziell, jedoch nicht signifikant, erhöht. Bei Reoxygenierung konnte eine signifikante Erhöhung gemessen werden ( $+p<0,05$ ).

Ischämiegruppe: Bei Reperfusion konnte eine gegenüber der Kontrollgruppe signifikante Erhöhung der im Koronareffluat ausgewaschenen Menge von Heparansulfat gemessen werden ( $*p<0,05$ ).

Versuchsgruppe:	n:	Messung bei Intervention:	Messung bei Reperfusion / Reoxygenierung:
Kontrolle	6	1,7 (1,2 – 5,6)	0,5 (0,1 – 0,7)
Ischämie	6	0,0	7,5 (3,0 – 20,7)*
Hypoxie	6	3,7 (3,0 – 8,2)	3,5 (1,7 – 5,6)+

Tabelle 7: Im Koronareffluat abgegebene Menge von Heparansulfat (in Mikrogramm pro Gramm Trockenherzgewicht) während 20 min. Daten sind als Median und Quartilsabstand (Q1,Q3) in Klammern dargestellt.  $*p<0,05$  bei Reperfusion gegenüber der Kontrollgruppe;  $+p<0,05$  bei Reoxygenierung gegenüber der Kontrollgruppe.

### 3.7 Laktatmessung

Gemessen wurden die pro Minute und Gramm Trockenherzgewicht im koronarvenösen Effluat abgegebenen Mengen von Laktat (Abbildung 10).

In der Kontrollgruppe fand sich eine geringe koronarvenöse Abgabe von Laktat, die sich im Versuchsverlauf (40 min) nur tendenziell erhöhte.

Hypoxiegruppe: Während der Hypoxie konnten dramatisch erhöhte Konzentrationen gemessen werden ( $+p<0,05$ ). Diese fielen bei Reoxygenierung dann auf ein niedrigeres, aber gegenüber der Kontrollgruppe immer noch signifikant erhöhtes Niveau ab.

Ischämiegruppe: Der Ischämie folgend konnte direkt nach Reperfusion in der unmittelbaren Auswaschphase eine signifikante Spitzenkonzentration von Laktat gemessen werden ( $*p<0,05$ ).

Jeweils 5 Minuten nach Reperfusion oder Reoxygenierung konnten keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe mehr beobachtet werden.

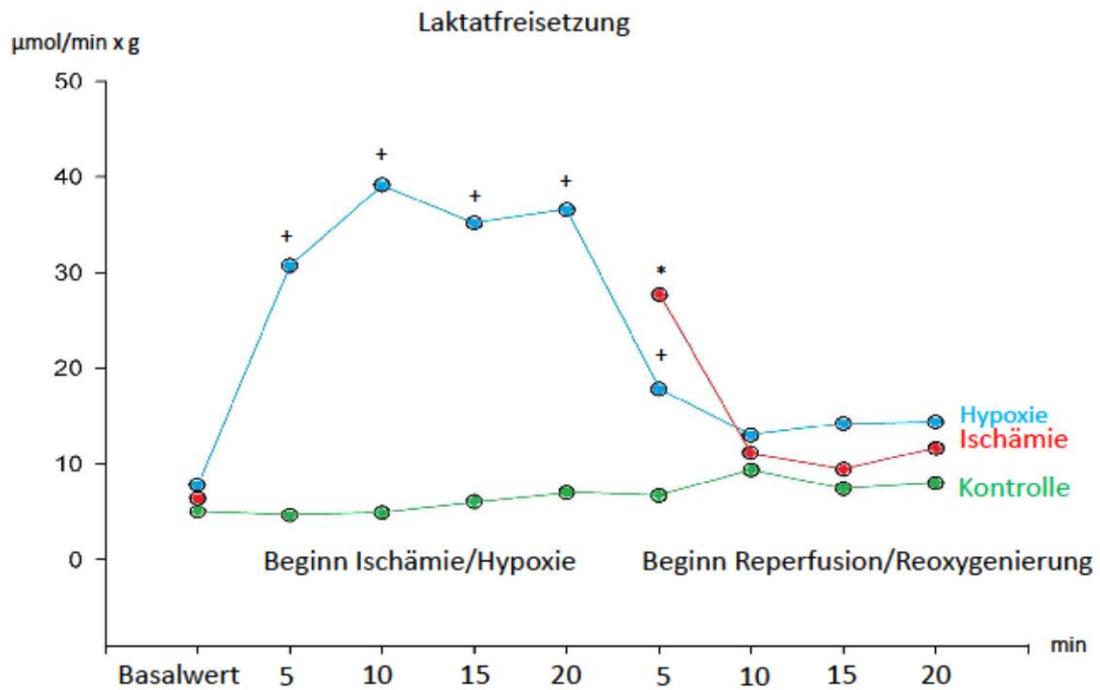


Abb. 10: Laktatfreisetzung (in Mikromol pro Minute und Gramm Trockenherzgewicht), modifiziert nach (97). Daten sind als Median dargestellt. \* $p < 0,05$  in der Ischämiegruppe nach Reperfusion und + $p < 0,05$  in der Hypoxiegruppe bei Hypoxie gegenüber der Kontrollgruppe.

### 3.8 Freisetzung von Purinen

In der Kontrollgruppe konnte im koronarvenösen Effluat während des Versuchsablaufs weder bei den Konzentrationen von Adenosin noch von Inosin eine signifikante Veränderung gegenüber dem Ausgangswert festgestellt werden (Abbildung 11).

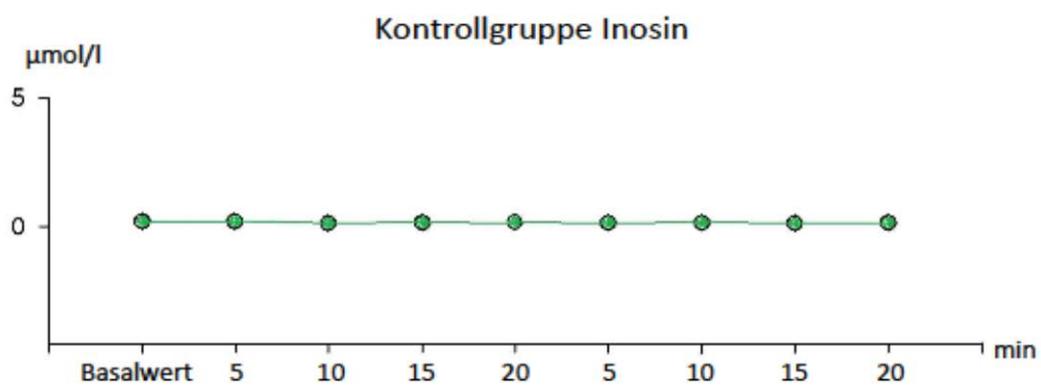
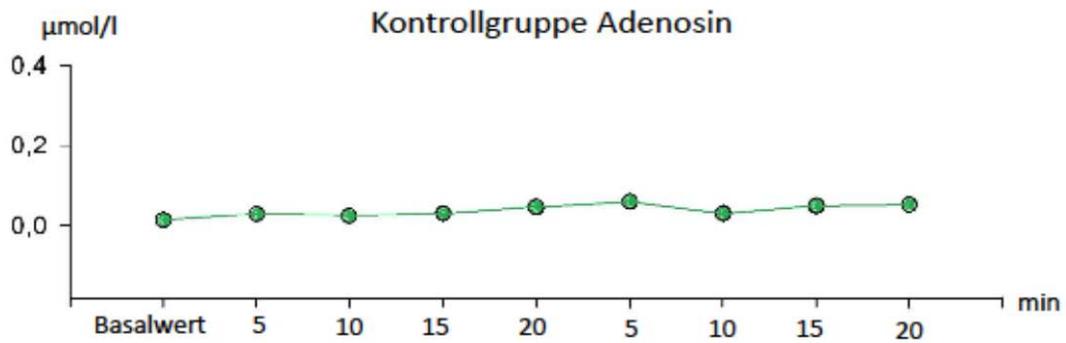


Abb. 11: Adenosin- und Inosinkonzentrationen im koronarvenösen Effluat in der **Kontrollgruppe**, modifiziert nach (97). Daten sind als Median angegeben.

Hypoxiegruppe (Adenosin): Die Konzentrationen von Adenosin stiegen im koronarvenösen Effluat während der Hypoxie rasch an, mit einem signifikanten Maximum nach 10 Minuten ( $*p < 0,05$ ). Zu diesem Zeitpunkt wurden Adenosinkonzentrationen von 1 µmol/l erreicht. In den darauffolgenden Messungen fielen die Konzentrationen im koronarvenösen Effluat wieder ab, blieben aber während der ersten 5 Minuten der Reoxygenierung signifikant erhöht gegenüber der Kontrollgruppe (Abbildung 12).

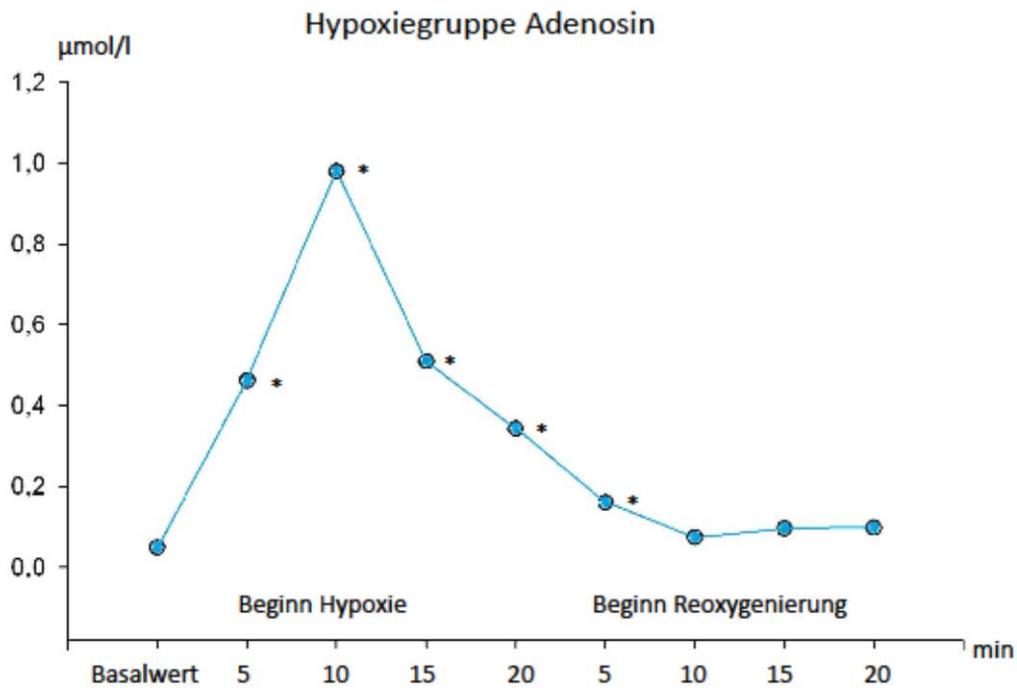


Abb. 12: Adenosinkonzentrationen im koronarvenösen Effluat in der **Hypoxiegruppe**, modifiziert nach (97). Daten sind als Median angegeben. \* $p < 0,05$  gegenüber der Kontrollgruppe.

Ischämiegruppe (Adenosin): Nach Ischämie war ebenfalls während der Reperfusion ein Anstieg der Adenosinkonzentrationen im koronarvenösen Effluat zu verzeichnen, und zwar um etwa das 5fache der Basalrate. Dieser Anstieg war jedoch, obwohl signifikant (\* $p < 0,05$ ), geringer ausgeprägt als während der Hypoxie. Die Spitzenkonzentrationen nach Reperfusion betragen 0,1 µmol/l im Effluat (Abbildung 13).

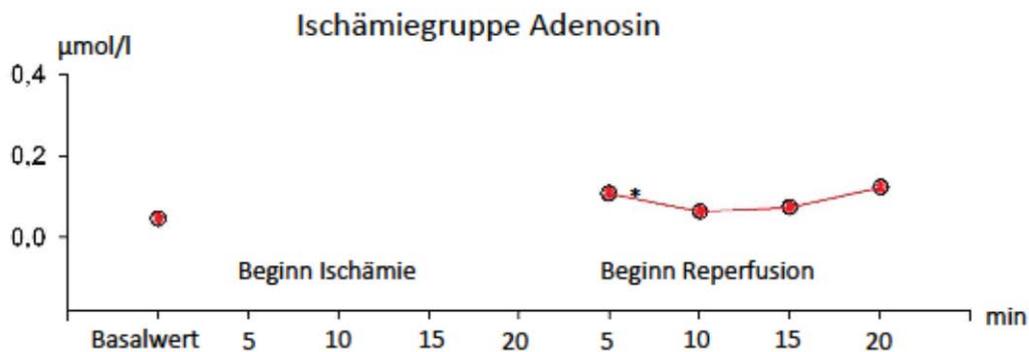


Abb. 13: Adenosinkonzentrationen im koronarvenösen Effluat in der **Ischämiegruppe**, modifiziert nach (97). Daten sind als Median angegeben. \* $p < 0,05$  gegenüber der Kontrollgruppe

Die Spiegel in der interstitiellen Flüssigkeit, dem Transsudat, blieben jedoch unter allen Bedingungen ein bis zwei Zehnerpotenzen niedriger als die gemessenen Konzentrationen im Effluat (69).

Die Konzentrationen von Inosin zeigten einen ähnlichen Kurvenverlauf wie die von Adenosin (Abbildungen 14 und 15), allerdings waren die gemessenen Konzentrationen generell um eine Zehnerpotenz höher.

Ischämiegruppe (Inosin): Der signifikante Anstieg der Konzentrationen bei Reperfusion nach Ischämie war deutlicher ausgeprägt als im Fall von Adenosin (Abbildungen 13 und 14) und führte zu signifikant höheren Werten ( $*p<0,05$ ) als bei Hypoxie (Abbildungen 14 und 15).

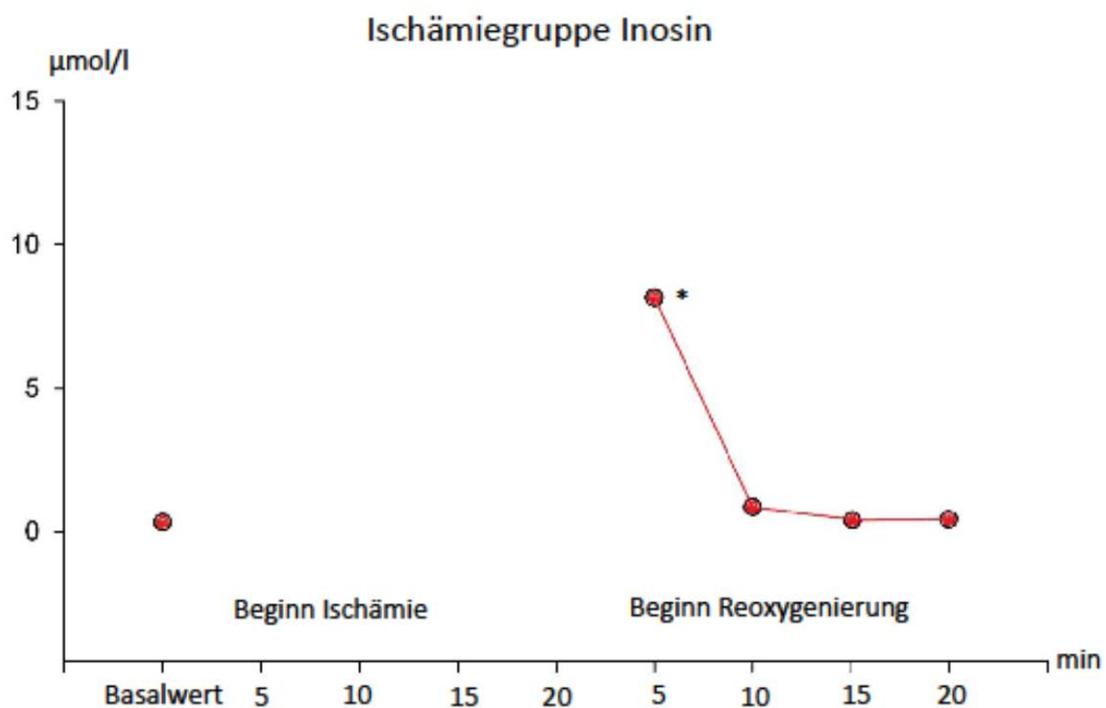


Abb. 14: Inosinkonzentrationen im koronarvenösen Effluat in der **Ischämiegruppe**, modifiziert nach (97). Daten sind als Median angegeben.  $*p<0,05$  gegenüber der Kontroll- und Hypoxiegruppe.

Hypoxiegruppe (Inosin): Während Hypoxie und während Reoxygenierung erreichten die Konzentrationen von Inosin im koronarvenösen Effluat signifikant höhere Werte als in der Kontrollgruppe ( $*p<0,05$ ).

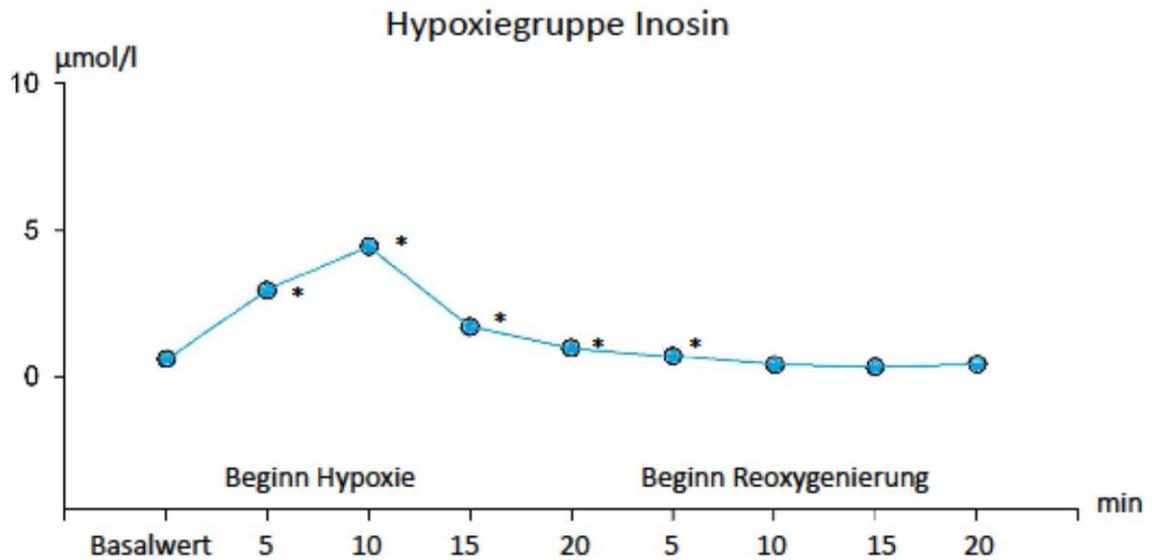


Abb. 15: Inosinkonzentrationen im koronarvenösen Effluat in der [Hypoxiegruppe](#), modifiziert nach (97). Daten sind als Median angegeben. \* $p < 0,05$  gegenüber der Kontrollgruppe.

Ein bedeutsamer Unterschied zu Adenosin fand sich bei der Untersuchung des Transsudats (Abbildung 16). Im Transsudat wurden 10 Minuten nach Beginn der Hypoxie Inosinkonzentrationen von 10 µmol/l gemessen. Diese überstiegen damit signifikant die Spiegel im Effluat (Abbildung 15).

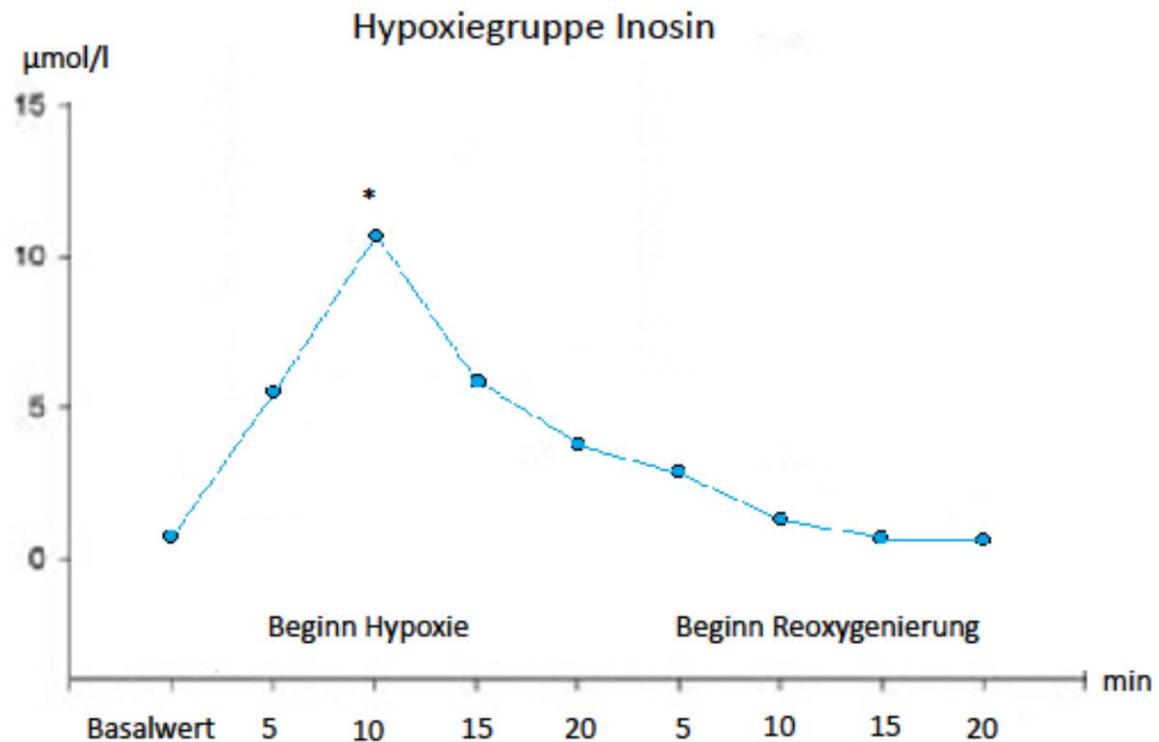


Abb. 16: Inosinkonzentrationen in der interstitiellen Flüssigkeit in der [Hypoxiegruppe](#), modifiziert nach (69). Daten sind als Median angegeben. \* $p < 0,05$  gegenüber dem koronarvenösen Effluat.

### 3.9 Sauerstoffangebot

Das Sauerstoffangebot war zum Zeitpunkt der ersten Messung in allen drei Gruppen gleich (Tabelle 8).

Hypoxiegruppe: Wie beabsichtigt fiel das  $O_2$ -Angebot während der Hypoxie gegenüber der Kontrollgruppe signifikant ab (\* $p < 0,05$ ).

Ischämiegruppe: Naturgemäß war auch während Ischämie gegenüber der Kontrollgruppe ein signifikanter Abfall des  $O_2$ -Angebots zu beobachten (+ $p < 0,05$ ).

Bei Reoxygenierung und Reperfusion war jedoch wieder kein Unterschied zwischen den drei Gruppen zu messen, das heißt, die globale Sauerstoffversorgung des Herzgewebes war wieder hergestellt.

Versuchsgruppe:	n:	Basalwert:	Bei Intervention:	Bei Reperfusion/ Reoxygenierung:
Kontrolle	6	0,16 (0,12 – 0,17)	0,15 (0,10 – 0,17)	0,13 (0,10 – 0,13)
Ischämie	6	0,14 (0,12 – 0,15)	0,00+	0,12 (0,10 – 0,12)
Hypoxie	6	0,15 (0,13 – 0,15)	0,03 (0,02 – 0,04)*	0,13 (0,08 – 0,15)

Tabelle 8: Sauerstoffangebot (in Millilitern pro Minute). Daten sind als Median und Quartilsabstand (Q1,Q3) in Klammern dargestellt.\*p<0,05 und +p<0,05 gegenüber der Kontrollgruppe.

## **4. Diskussion**

Es ist bekannt, dass verschiedenste Pathologien wie entzündliche Stimuli oder Ischämie/Reperfusion die endotheliale Glykokalyx schädigen. Dabei werden diese Schäden durch unterschiedliche Mediatoren wie Zytokine, Enzyme oder Sauerstoffradikale vermittelt. Die genauen Mechanismen dieses Sheddings sowie des physiologischen Auf- und Abbaus der Glykokalyx sind jedoch noch weitgehend unbekannt.

Die Ergebnisse unserer Versuche zeigten während der Hypoxie eine verglichen mit der Kontrollgruppe signifikant erhöhte Nettofiltration. Ähnlich verhielten sich die Ergebnisse bei Reperfusion nach Ischämie.

Bezüglich der Histaminkonzentrationen im Transsudat konnte ein signifikanter Anstieg gegenüber der Kontrollgruppe während der Hypoxie sowie bei Reperfusion nach Ischämie festgestellt werden.

Der Anteil des Glykokalyxbestandteils Syndecan-1 war im Effluat während der Hypoxie signifikant erhöht gegenüber der Kontrollgruppe. Ebenso verhielt sich dies bei Reperfusion nach Ischämie. Während Reoxygenierung und Reperfusion fanden sich auch deutliche Erhöhungen der Heparansulfat-Abgabe aus der Glykokalyx.

Während der hypoxischen Perfusion konnten im koronarvenösen Effluat gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöhte Konzentrationen sowohl von Inosin als auch von Adenosin gemessen werden. Ein ebenfalls signifikanter Anstieg konnte für beide Purine bei Reperfusion nach Ischämie verzeichnet werden.

Desweiteren überstiegen die im Transsudat gemessenen Inosinkonzentrationen signifikant die gemessenen Spiegel im Effluat.

### **4.1 Nachweis der Glykokalyxschädigung**

#### **4.1.1 Transsudat und Effluat**

Die Transsudatbildung wurde sowohl durch eine hypoxische Perfusion als auch bei der auf eine Ischämie folgende Reperfusion signifikant erhöht. Durch die Zerstörung der Glykokalyx

wurde der luminal gerichtete kolloidosmotische Druck, der Flüssigkeit und gelöste Bestandteile im Gefäßsystem hält, beeinträchtigt. Eine beschädigte Glykokalyx kann die aus dem Gefäßlumen strömenden Kolloide nicht mehr binden und so ihrer Aufgabe der selektiven Proteinfiltration nicht mehr nachkommen (27). Im Ergebnis führten beide Interventionen zu einer vergleichbaren Erhöhung der Nettofiltration.

Sowohl bei Hypoxie als auch bei postischämischer Reperfusion stieg der Koronarfluss zunächst an. Diese physiologische Reaktion im Sinne einer reaktiven Hyperämie auf den vom Myokard erlittenen Sauerstoffmangel war zu erwarten und belegt die Güte der hier verwendeten Herzpräparationen. Reaktive Hyperämie wird unter anderem auch durch die Freisetzung von Stickstoffmonoxid aus den Endothelzellen vermittelt (99). Diese Freisetzung kann durch verschiedenste Auslöser, wie zum Beispiel durch eine Erhöhung der Scherbelastung oder ein vermindertes Sauerstoffangebot wie während Ischämie oder Hypoxie getriggert werden (100).

Allerdings beobachteten wir, dass die Koronarflussrate nach anfänglicher Steigerung signifikant zurückging. Dieses Absinken des Flusses nach Intervention lässt sich unter anderem auch auf eine verminderte endothelabhängige Vasodilatation in Folge einer Zerstörung der Glykokalyx mit konsekutiv verminderter Freisetzung von Stickstoffmonoxid zurückführen (34).

#### **4.1.2 Kolloidextravasation**

Die endotheliale Glykokalyx und der dadurch aufgebaute ESL fungieren zusätzlich zu den Endothelzellen als Barriere gegen den Ausstrom von Wasser und Kolloiden.

Um eine ausreichende kolloidosmotische Potenz aufbauen zu können, benötigt die Glykokalyx gebundene Plasmamoleküle (61). Die vaskuläre Permeabilität wird von Kolloiden dahingehend beeinflusst, dass sie an die endotheliale Glykokalyx binden und so dazu beitragen, den ESL zu bilden. Aufgrund ihrer unterschiedlichen chemischen und physikalischen Struktur haben verschiedene Kolloide verschiedene Einflüsse auf die Gefäßpermeabilität.

Die Bindung von Albumin trägt beispielsweise zur Bildung eines leistungsstärkeren ESL bei als die Bindung von Hydroxyethylstärke. Der Effekt von Albumin beruht auf den durch seine Ladung bedingten elektrostatischen Bindungsmöglichkeiten. Die Glykokalyx ist stark negativ geladen. Zwar weist Albumin eine positive Bindungsstelle auf (35), dennoch überwiegen auch am Albuminmolekül bei physiologischem pH negative Ladungen, so dass eine gute Bindungsfähigkeit nicht zu erwarten wäre. Zu berücksichtigen ist nun, dass unter physiologischen Bedingungen eine elektrische Doppelschicht von positiv geladenen Ionen, vorwiegend  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Na}^+$ , an der Glykokalyx besteht. Mit den Ionen dieser Doppelschicht vermag Albumin wesentlich stärker zu interagieren als beispielsweise HES Moleküle; denn letztere sind allenfalls schwach negativ geladen (104).

Der ESL funktioniert wie ein Sieb, das auswärts strömende Flüssigkeit passieren lässt, aber Proteine zurückhält. Daraus resultiert eine hohe Proteindichte im ESL, wohingegen sie im Spalt unterhalb desselben niedrig ist. Zusätzlich verhindert der in Richtung Interstitium gerichtete Flüssigkeitsstrom eine Kolloidbewegung durch Diffusion aus dem Interstitium (32).

Nur bei Reperfusion nach Ischämie traten signifikant erhöhte Konzentrationen von Hydroxyethylstärke (HES) im Transsudat auf. Bei den Herzen der Hypoxiegruppe hingegen war die Filtration von HES zwar tendenziell, aber nicht signifikant erhöht. Die Permeabilität normalisierte sich weiter während der Reoxygenierung. Demzufolge gab es, im Gegensatz zur Ischämiegruppe, bezüglich der Permeabilität von HES am Ende der Reoxygenierung keinen signifikanten Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe. Dies könnte an einem prinzipiell weniger ausgeprägten Schaden durch die Intervention liegen, d. h. an noch vorhandenen Resten der Glykokalyx. Von Ward und Donnelly (85) wurden bereits früher bei hypoxischer Perfusion diskrete Veränderungen an der endothelialen Glykokalyx elektronenmikroskopisch visualisiert.

Ebenso könnte die Erklärung im erhaltenen Fluss liegen, der den Abtransport von entzündlichen Mediatoren, Heparanase und Proteasen erlaubt und so zu einem weniger ausgeprägten Schaden führt. So könnten auch die Inseln noch erhaltener Glykokalyx erklärt werden, die elektronenmikroskopisch nach Hypoxie noch zu erkennen waren (97). Diese Beobachtung steht im Einklang mit Untersuchungen, die bei unterbrochenem Fluss einen größeren Effekt von Heparanase an der Glykokalyx zeigen (5). Dieses Enzym wird benötigt, um Heparansulfat von der Glykokalyx abzuspalten.

#### **4.1.3 Glykokalyxbestandteile**

Selbst bei intaktem Endothel gelingt der Nachweis der Glykokalyxbestandteile Syndecan-1 und Heparansulfat in geringen Konzentrationen im Koronareffluat. Dies ist aber im Sinne eines dynamischen Auf- und Abbaus der Schicht zu sehen. In verschiedenen Versuchen unserer Arbeitsgruppe am isoliert perfundierten Meerschweinchenherzen konnte das Abspalten der Bestandteile Syndecan-1 und Heparansulfat von der Glykokalyx nach Ischämie/Reperfusion sowohl im Effluat als auch elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden (27, 32, 101). Daher können diese als Parameter für das Shedding herangezogen werden.

Sowohl während der hypoxischen Perfusion als auch bei Reperfusion nach Ischämie waren die Konzentrationen von Syndecan-1 und Heparansulfat im Effluat signifikant erhöht. Bei beiden Interventionen konnte also eine vergleichbare Erhöhung des Washout von Glykokalyxbestandteilen nachgewiesen werden.

#### **4.1.4 Sauerstoffangebot, Laktat und Purinkatabolite**

Die Energiegewinnung des Herzens ist auf Glukose und Pyruvat angewiesen. Nur bei ausreichender Sauerstoffversorgung über die Koronarien ist das Herz auch in der Lage, Laktat zur Deckung des Energiebedarfs zu reoxidieren. Laktat fällt als Endprodukt der anaeroben Glykolyse an. Erhöhung der Laktatkonzentrationen im koronarvenösen Effluat, ohne dass eine Mehrarbeit des Herzens vorliegt, darf also als Zeichen der Sauerstoffunterversorgung gewertet werden (91, 102).

Sowohl Ischämie als auch Hypoxie führten zu einem signifikanten Absinken des Sauerstoffangebots im Modell. Hieraus resultierte eine signifikante Erhöhung der Laktatkonzentrationen bei hypoxischer Perfusion sowie bei Reperfusion nach Ischämie. Letztere Erhöhung hielt 5 Minuten an während der reaktiven Hyperämie.

Ähnliche Beobachtungen konnten für die Purine Adenosin und Inosin gemacht werden, beides Katabolite der energiereichen Nukleotide ATP, ADP und AMP.

#### **4.1.5 Übersicht**

Wir konnten nachweisen, dass sowohl eine 20minütige Hypoxie als auch eine 20minütige Ischämie mit darauf folgender Reperfusion zu vergleichbarer Erhöhung der Nettofiltration und des Washout von Glykokalyxbestandteilen führen.

Der geforderte Sauerstoffmangel konnte in beiden Interventionsgruppen über das errechnete Sauerstoffangebot als signifikant gegenüber der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. In der Konsequenz zeigten sich in beiden Interventionsgruppen ähnliche, signifikant erhöhte Laktatspiegel und Konzentrationen von Inosin und Adenosin. Es kann also von einem vergleichbaren eingegangenen Sauerstoffdefizit ausgegangen werden.

Wir haben gezeigt, dass weder Anoxie noch die Kombination aus fehlendem Fluss und fehlendem Sauerstoff für das Shedding der Glykokalyx notwendig sind. Sauerstoffmangel allein bei erhaltenem Fluss ist dafür ausreichend.

Weiterhin traten die Erhöhung der Nettofiltration und die Freisetzung von Glykokalyxkomponenten in unserem Modell schon nach 5minütiger Hypoxie in Erscheinung. Demnach ist die Rückkehr von Sauerstoff also nicht der entscheidende Faktor für den Funktionsverlust der endothelialen Glykokalyx .

## **4.2 Mechanismen**

### **4.2.1 Adenosin und Inosin**

Adenosin ist ein ubiquitäres Nukleosid, das eine wichtige Rolle bei der Gefäßfunktion spielt (62). Es besitzt sowohl parakrine als auch autokrine Wirkung, über seinen ebenfalls wirksamen primären Metaboliten Inosin ist jedoch erst wenig bekannt.

Es gibt vier verschiedene Subtypen des Adenosinrezeptors: A1, A2a, A2b, A3 (63), die von unterschiedlichen Geweben und Zellen, wie Mastzellen, Leukozyten und Endothelzellen, exprimiert werden. Hieraus resultiert ein komplexes System, in dem Adenosin je nach Rezeptor und Konzentration unterschiedliche Effekte hervorrufen kann (64). Diese umfassen Eigenschaften wie Vasodilatation, Erhöhung der Gefäßpermeabilität, antithrombogene Effekte und sowohl pro- als auch antiinflammatorische Wirkungen (65, 66).

#### **4.2.2 Adenosinmetabolismus**

Adenosin ist ein Purinnukleosid, welches aus der Base Adenin und dem Zucker Ribose aufgebaut ist. Akut entsteht es durch Dephosphorylierung von Adeninnukleotiden wie beispielsweise Adenosintriphosphat (ATP). Für die Verstoffwechslung von Adenosin existieren zwei Wege: Zum einen kann es für die Nukleotidsynthese von Adenosindiphosphat und Adenosintriphosphat, welche ebenfalls potente Mediatoren darstellen, verwendet werden (74). Zum anderen kann Adenosin über die Adenosindesaminase in Inosin umgewandelt werden. Welcher der beiden Wege eingeschlagen wird, hängt von der Verfügbarkeit der Substrate ab (75). Sind die Adenosinspiegel niedrig, wird Adenosin von der Adenosinkinase in AMP umgewandelt. Bei steigenden Adenosinspiegeln jedoch, zum Beispiel im Falle einer Hypoxie oder Ischämie, wird von der Adenosindesaminase vermehrt Inosin gebildet, was zu Konzentrationen von mehr als einem  $\mu\text{mol/l}$  führen kann (76).

Die Freisetzung der Purine Adenosin und Inosin geschieht proportional zum Energieverbrauch und umgekehrt proportional zur Energiegewinnung (91). So steigt die Freisetzung immer dann, wenn zu wenig Sauerstoff für die Regeneration von Adenosintriphosphat vorhanden ist. Sowohl Hypoxie als auch Ischämie führen zur vermehrten Freisetzung von Adenosin und damit auch konsekutiv zur Freisetzung von Inosin. Bei Hypoxie und Ischämie kommt es durch vermehrten Abbau von Adenin-Nukleotiden (ATP) und verminderte Verwertung der Nukleoside (Adenosin) und unter anderem auch mit Hemmung der Adenosinkinase ( $\text{ATP} + \text{Adenosin} \rightarrow \text{ADP} + \text{AMP}$ ) (88) zu einem Purinanstieg.

#### **4.2.3 Purinfreisetzung**

Adenosin: Bei Hypoxie wurden im Effluat signifikant erhöhte Konzentrationen erreicht. Die Konzentrationen fielen bei Reoxygenierung wieder ab. Auch die Reperfusion nach Ischämie führte zu signifikant erhöhten Konzentrationen im Effluat.

Inosin: Vor allem im Transsudat, als Spiegel des Interstitiums, wurden signifikant erhöhte Konzentrationen sowohl bei hypoxischer Perfusion als auch bei Reperfusion nach Ischämie gemessen. Diese Inosinwerte lagen um mindestens eine Zehnerpotenz höher als die des Adenosins.

Die Auswirkungen von Adenosin auf die Glykokalyx wurden von Platts (56, 62) untersucht. Hochaffinitäts-Adenosin-A2-Rezeptoren, die von niedrigen Adenosinkonzentrationen aktiviert werden, tragen zum Schutz derselben bei. Niedrigaffinitäts-Adenosin-A3-Rezeptoren, die von hohen Adenosinkonzentrationen aktiviert werden, führen zur Degranulation von Gewebemastzellen. Brands (89) zeigte eine signifikante Freisetzung von Hyaluronsäure, wahrscheinlich abgespalten aus der Glykokalyx, nach Adenosingabe. Bei Adenosin-A3-Rezeptor-Knockout-Mäusen konnte Adenosin die Glykokalyx hingegen nicht schädigen, und die Permeabilitäts erhöhungen blieben in mastzelldefizienten Knockout-Mäusen ebenfalls aus (62).

#### **4.2.4 Mastzellmechanismus**

Es existieren Hinweise darauf, dass Gewebemastzellen zum Shedding der Glykokalyx durch Ischämie/Reperfusion und Hypoxie/Reoxygenierung beitragen (67, 68). In Arbeiten unserer Arbeitsgruppe (67, 101) konnten wir die Aktivierung dieser Zellen durch die Messung von Tryptase- $\beta$  im koronarvenösen Effluat bei Reperfusion nach Ischämie nachweisen. Dieses Enzym gelangt vom Ort seiner Freisetzung, nämlich den Mastzellen im Interstitium, in die Gefäße. Daher kann es als potentielle Sheddase am Glykokalyxschaden mitwirken (69).

In niedriger Konzentration von weniger als 100 nmol/l kann Adenosin und auch sein Metabolit Inosin die Aktivierung von Mastzellen über den A2-Rezeptor verhindern (72). In hoher Konzentration von über einem  $\mu\text{mol/l}$  aber wird die Degranulation von Mastzellen über den A3-Rezeptor stimuliert (73). Obwohl Adenosin im Hinblick auf die Mastzelldegranulation ungefähr um einen Faktor 10 potenter wirkt als Inosin (77), kann Inosin ebenfalls an der Rezeptoraktivierung teilnehmen. Denn Inosin bindet A3-Rezeptoren bei Konzentrationen von 10 bis 50  $\mu\text{mol/l}$  (72), und, wie unsere Untersuchungen ergeben haben, steigen die Konzentrationen von Adenosin und Inosin während Ischämie und Hypoxie in den mikromolaren Bereich (78).

Relevante Untersuchungen zeigten, dass durch Adenosin vermittelte Erhöhung der Permeabilität bei A3-Rezeptor-Knockout-Mäusen und bei Mäusen mit fehlenden Mastzellen nicht auftrat (70). So kann davon ausgegangen werden, dass Adenosin und Inosin eine Ödembildung indirekt hervorrufen. Dies geschieht über die Aktivierung der

Gewebemastzellen, die dann sekundäre Mediatoren freisetzen, welche auf die Endothelzellen wirken (71).

In unserem Modell konnten mit Einsetzen der Hypoxie hohe Adenosinkonzentrationen (1  $\mu\text{mol/l}$ ) gemessen werden, die die bei Reperfusion nach Ischämie gemessenen bei weitem überstiegen. Diese Adenosinkonzentrationen bei Hypoxie waren hoch genug, um über die Aktivierung des Adenosin-A<sub>3</sub>-Rezeptors eine Mastzelldegranulation hervorzurufen (70).

Die Adenosinkonzentrationen, die direkt im Anschluss an die Ischämie gemessen wurden, waren jedoch nicht hoch genug für eine solche Aktivierung (70). Außerdem liegen die Mastzellen perivaskulär verteilt, daher ist das relevante Kompartiment für die Aktivierung des Adenosin-A<sub>3</sub>-Rezeptors der interstitielle Raum.

In diesem Kontext waren die Konzentrationen von Inosin im Transsudat eine Zehnerpotenz höher bei Reperfusion nach Ischämie (10  $\mu\text{mol/l}$ ). Eine mögliche Erklärung dafür könnte der Abbau von während der Ischämie gebildetem Adenosin zu Inosin durch Adenosindesaminase sein. Alternativ könnte die intrazelluläre Azidose die AMP Desaminase aktivieren, was zu IMP und durch die 5'-Nukleotidase, welche Zuckerreste abspaltet, zu Inosin führen würde (88, 92). Inosin aktiviert ebenfalls den Adenosin-A<sub>3</sub>-Rezeptor auf Mastzellen, und die Konzentrationen, die während der Reperfusion gemessen wurden, waren dafür hoch genug (70, 72).

Die zeitliche Simultanität der Anstiege von Inosin und Tryptase- $\beta$  während Ischämie/Reperfusion und Hypoxie/Reoxygenierung, die von unserer Arbeitsgruppe beschrieben wurde, verstärkt die Vermutung, dass Inosin Mastzellen über den A<sub>3</sub>-Rezeptor aktiviert (69).

#### **4.2.5 Histaminfreisetzung und Tryptase- $\beta$ -Aktivität**

Sowohl hypoxische Perfusion als auch Reperfusion nach Ischämie führten zu signifikant erhöhten Histaminkonzentrationen im Transsudat, was eine Aktivierung der Mastzellen zeigt. Bei Reoxygenierung gingen die Histaminkonzentrationen im Transsudat wieder zurück.

Im Effluat war in Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe (67, 101) die Aktivität der Tryptase- $\beta$  bei Reperfusion nach Ischämie signifikant erhöht. Dies lässt auf eine Aktivierung der

Mastzellproteasen im Gefäßlumen schließen. Tryptase- $\beta$  gelangt also von ihrem Freisetzungsort im Interstitium ins Gefäßlumen und könnte so als potentielle Sheddase zum Glykokalyschaden beitragen.

Dies ist vor allem deshalb wichtig, weil die Mechanismen des Sheddings, neben membranständigen Proteasen, Sauerstoffradikalen und aktivierten Entzündungszellen wohl auch aktivierte Gewebemastzellen mit einschließen (36, 67, 86). Ergänzend zur möglichen Rolle der Mastzellen wurde auf der anderen Seite Mastzellstabilisation als Schutz vor Ischämie/Reperfusionsschäden gezeigt (68, 87).

Weiterhin können Mastzellen noch viele weitere Proteasen und Mediatoren bei Stimulation ausschütten (68). TNF- $\alpha$  beispielsweise kann in Mastzellen nachgewiesen werden und wird während Reperfusion aus ihnen freigesetzt (68). Gerade auch Entzündungsreize wie TNF- $\alpha$  können Glykokalyschäden hervorrufen (90, 47, 91).

#### **4.2.6 Übersicht**

Die Purin-Signalwege könnten in unserem Modell eine Erklärung für die Mastzellaktivierung bei Hypoxie und Ischämie sein. Im Herzen des Menschen ist das Heparansulfat-hydrolysierende Enzym Heparanase ausschließlich in den residenten perivaskulären Mastzellen gespeichert (81). Dessen Freisetzung führt bereits zum partiellen Abbau der Glykokalyx (86). Durch Mastzellaktivierung könnte die Freisetzung weiterer Entzündungsmediatoren, wie zum Beispiel Proteasen und TNF- $\alpha$ , ausgelöst werden, was zu weiterer Schädigung der Double Barrier führen würde, nämlich durch Shedding von Syndekanen.

Durch die von unserer Arbeitsgruppe (67, 101) bereits gezeigte Freisetzung von Tryptase- $\beta$  ins Koronarsystem zeigt sich eine weitere potentielle Sheddase. Diese könnte, zusätzlich zur Heparanase, zum Shedding der endothelialen Glykokalyx und damit auch zum hypoxie-beziehungsweise ischämievermittelten Schaden am Herzen beitragen.

### **4.3 Methodenkritik**

Unsere Organpräparation führte zu isolierten, druckkonstant mit Puffer perfundierten Herzen, die spontan schlagen und es uns erlauben, Effekte im intakten Gefäßbett zu beschreiben.

Unser Modell arbeitet mit einem künstlichen zellfreien Perfusat, was, wie in früheren Untersuchungen schon gezeigt, selbst in der Kontrollgruppe mit nachgewiesenerweise intakter Glykokalyx nach 30 Minuten zu gewissen Gewebsödemen führt (27). Solche Ödeme könnten zum Absinken des Koronarflusses, das wir in den Schädigungsgruppen beobachteten, beitragen. Insgesamt sind die Herzpräparate bis zu 4-6 h funktionell stabil. So wurden auch nur die frühen Auswirkungen von Reperfusion und Reoxygenierung untersucht, während Spätfolgen (zum Beispiel durch Apoptose) nicht berücksichtigt werden konnten.

Bezüglich der Purine könnte es Unterschiede zwischen den Spezies im Hinblick auf die verschiedenen Rezeptoren und die damit verbundene Mastzellaktivierung geben. Es wurden zwar kürzlich Adenosin-A<sub>3</sub>-Rezeptoren auf Mastzellen im menschlichen Herzen immunhistochemisch nachgewiesen; die Konzentration, bei der Inosin Mastzellen im menschlichen Herzen zur Degranulation bringt, wurde jedoch noch nicht beschrieben.

Außerdem tragen Plasmabestandteile wie Komplement- und Gerinnungsfaktoren, pro- und antiinflammatorische Enzyme sowie Granulozyten und Thrombozyten ebenfalls zu Ischämie/Reperusions- und Hypoxie/Reoxygenierungsschäden bei. Diese Einflüsse kamen in unserem Modell nicht zur Geltung und konnten in unseren Studien nicht untersucht werden.

### **4.4 Schlussfolgerung**

In unserem Modell stellten wir die Bedingungen für eine hypoxische beziehungsweise ischämische Perfusion sicher. In beiden Interventionsgruppen war das Sauerstoffangebot signifikant gegenüber der Kontrollgruppe vermindert, und es bildeten sich ähnliche, signifikant erhöhte Laktatspiegel. Also kann von einem vergleichbaren Sauerstoffdefizit ausgegangen werden.

Sowohl bei 20minütiger Hypoxie als auch bei Reperfusion nach 20minütiger Ischämie kam es zu einer signifikant erhöhten Nettofiltration und einer signifikanten Freisetzung von Glykokalyxbestandteilen ins koronarvenöse Effluat. Da diese Veränderungen schon kurz nach Beginn der hypoxischen Perfusion zu beobachten waren, ist die Rückkehr des Sauerstoffs nicht der entscheidende Faktor für den Funktionsverlust der endothelialen Glykokalyx. Sauerstoffmangel allein bei erhaltenem Fluss ist dafür ausreichend. Weder das komplette Fehlen des Sauerstoffs noch die Kombination aus fehlendem Fluss und fehlendem Sauerstoff ist für ein Shedding der Glykokalyx notwendig.

Der Mechanismus der Glykokalyxschädigung könnte eine durch Purine wie Inosin oder Adenosin vermittelte Mastzellaktivierung beinhalten. Die konsekutive Freisetzung von Entzündungsmediatoren, Lyasen und Proteasen würde hierbei zu einer Schädigung der Glykokalyx beitragen.

## 5. Zusammenfassung

Unter physiologischen Bedingungen bilden die endotheliale Glykokalyx und gebundene Plasmaproteine den „endothelial surface layer“ (ESL). Hierdurch entsteht eine antiinflammatorische und antithrombotische Barriere gegen Wasser- und Proteinverlust ins Interstitium. Nach dem revidierten Starling-Prinzip sorgt eine intakte, negativ geladene Glykokalyx für eine Balance im Flüssigkeitsstrom zwischen Gefäßen und Interstitium.

Die Zusammensetzung der Glykokalyx scheint aus dem Gleichgewicht zwischen Synthese und Abbau (Shedding) zu resultieren. Über die Mechanismen des „turnover“ der Glykokalyx ist aber wenig bekannt. Schädigungen reichen von Störungen, die nur den ESL betreffen, bis hin zur Zerstörung der kompletten Glykokalyx. Aus diesen Schäden folgen Gewebsödeme, ein Austritt von Plasmaproteinen, Störungen im Blutfluss und eine verstärkte Adhäsion von Leukozyten und Thrombozyten an das Endothel.

Der Verlust von Glykokalyxbestandteilen, das sogenannte Shedding, konnte im Rahmen dieser Schädigungen durch eine vermehrte Freisetzung von Heparansulfat und Syndecan-1 nachgewiesen werden. Die genauen Auslöser und Mechanismen sind jedoch noch nicht vollständig bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass Shedding als Folge von Ischämie/Reperfusion entstehen kann. Jedoch beinhaltet diese Pathologie mehrere Komponenten. Ob der fehlende Sauerstoff, die unterbrochene Perfusion oder die letztendliche Rückkehr des Sauerstoffs für die Schäden verantwortlich sind, ist nicht geklärt.

Wir untersuchten die Auswirkungen einer alleinigen Hypoxie, die als Absinken des Sauerstoffangebots unter den Bedarf des Gewebes bei erhaltenem Fluss definiert ist, im Gegensatz zur Ischämie, welche eine fehlende Perfusion darstellt. Hierbei sind nicht nur der fehlende Sauerstoff zu beachten, sondern auch die rasche Ansammlung von Abfallprodukten, freigesetzten Aktivatoren und die Entstehung einer Gewebsazidose.

Durch unser Versuchsprotokoll wurde in beiden Interventionsgruppen ein signifikanter Sauerstoffmangel erzeugt. In der Hypoxie-Gruppe enthielt der Puffer des isoliert perfundierten Meerschweinchenherzens nur 20 % des Sauerstoffs der Kontrollgruppe. Als Zeichen der eingegangenen Sauerstoffschuld war während der Hypoxie eine signifikante

Freisetzung von Laktat im Effluat zu beobachten. Gleichmaßen konnte dies in Form eines "Washout" bei Reperfusion nach Ischämie nachgewiesen werden.

Schädigungen der endothelialen Glykokalyx, zu erkennen an einer erhöhten Nettofiltration in Verbindung mit einer signifikanten Erhöhung der Glykokalyxbestandteile Heparansulfat und Syndecan-1 im Effluat, waren schon während der Hypoxie zu erkennen. Während der Reoxygenierung blieb die Gefäßpermeabilität (Nettofiltration) ebenso wie während der Reperfusion erhöht, auch wenn sie in der Hypoxie-Gruppe zur Erholung neigte.

Um Schäden an der endothelialen Glykokalyx zu erzeugen, ist also weder ein komplett unterbrochener Fluss noch das völlige Fehlen von Sauerstoff notwendig. Auch die Rückkehr des Sauerstoffs ist nicht der entscheidende Faktor für den Funktionsverlust der Glykokalyx, da die Erhöhung der Nettofiltration und die Freisetzung von Glykokalyxkomponenten in unserem Modell schon nach 5minütiger Hypoxie auftraten. Unsere Ergebnisse zeigen, dass eine hypoxische Perfusion ausreichend ist, um Schäden an der endothelialen Glykokalyx zu initiieren.

Wir konnten in unserer Arbeitsgruppe die Aktivierung von Mastzellen durch eine signifikante Freisetzung von Histamin sowohl bei Hypoxie als auch nach Ischämie zeigen. Vor allem der Purinkatabolit Inosin erreichte im Interstitium von hypoxischen und postischämischen Herzen Konzentrationen, deren Höhe eine Aktivierung der Mastzellen erklärt. Shedding könnte daher durch purinvermittelte Degranulation von Mastzellen ausgelöst werden. Folglich scheint es naheliegend, dass ein Schädigungsmechanismus der endothelialen Glykokalyx durch die hohen Konzentrationen von Adenosin und Inosin ausgelöst wird, die während der Hypoxie beziehungsweise Ischämie gebildet werden.

Obwohl Mastzellen sehr wichtig erscheinen, kann man sie nicht als allein möglichen Weg zum Auslösen des Sheddings betrachten. Auf diesem Gebiet sind deshalb weitere Studien nötig, um die genauen Mechanismen der Glykokalyxschädigung zu untersuchen. Hieraus dürften sich neuartige therapeutische Optionen erschließen.

## 6. Quellen

- (1) Danielli JF (1940): Capillary permeability and edema in the perfused frog. *Journal of Cellular Physiology* 98, 109-129.
- (2) Copley AL, Staple PH (1962): Haemorheological studies on the plasmatic zone in the microcirculation of the cheek pouch of Chinese and Syrian hamsters. *Biorheology* 1, 3-14.
- (3) Luft JH (1966): Fine structures of capillary and endocapillary layer as revealed by ruthenium red. *Federation Proceedings* 25, 1773-1783.
- (4) Klitzman B, Duling BR (1979): Microvascular hematocrit and red cell flow in resting and contracting striated muscle. *American Journal of Physiology* 237, 481-490.
- (5) Desjardins C, Duling BR (1990): Heparinase treatment suggests a role for the endothelial cell glycocalyx in regulation of capillary hematocrit. *American Journal of Physiology* 258, 647-654.
- (6) Vink H, Duling BR (1996): Identification of distinct luminal domains for macromolecules, erythrocytes, and leukocytes within mammalian capillaries. *Circulation Research* 79, 581-89.
- (7) Weinbaum S, Tarbell JM, Damiano ER (2007): The structure and function of the endothelial glycocalyx layer. *Annual Review of Biomedical Engineering* 9, 121-167.
- (8) Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P (2000): The endothelial surface layer. *Pflügers Archiv* 440, 653-666.
- (9) Reitsma S, Slaaf DW, Vink H et al (2007): The endothelial glycocalyx: composition, functions and visualization. *Pflügers Archiv* 454, 345-359.
- (10) Megens RTA, Reitsma S, Schiffers PHM, Hilgers RHP, De Mey JGR, Slaaf DW, oude Egbrink MGA, van Zandvoort MAMJ (2007): Two-photon microscopy of vital murine elastic and muscular arteries. *Journal of Vascular Research* 44, 87-98.
- (11) Montreuil J, Bouquelet S, Debray H, Fournet B, Spik G, Strecker G (1986): Glycoproteins. In: Chaplin MF, Kennedy JF (eds) *Carbohydrate analysis. A practical approach*. IRL, Oxford, 143-203.
- (12) Sperandio M (2006): Selectins and glycosyltransferases in leukocyte rolling in vivo. *FEBS Journal* 273, 4377-4389.
- (13) Bombeli T, Schwartz BR, Harlan JM (1998): Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), alpha5beta3 integrin, and GPIbalpha. *The Journal of Experimental Medicine* 187, 329-339.
- (14) Carney SL (1986): Proteoglycans. In: Chaplin MF, Kennedy JF (eds) *Carbohydrate analysis. A practical approach*. IRL, Oxford, 97-221.
- (15) Rapraeger A (1989): Transforming growth factor (type beta) promotes the addition of chondroitin sulfate chains to the cell surface proteoglycan (syndecan) of mouse mammary epithelia. *The Journal of Cell Biology* 109, 2509-2518.
- (16) Carey DJ (1997): Syndecans: multifunctional cell-surface coreceptors. *Biochemical Journal* 327, 1-16.
- (17) Fransson LA, Belting M, Cheng F, Jonsson M, Mani K, Sandgren S (2004): Novel aspects of glypican glycobiology. *Cellular and Molecular Life Sciences* 61, 1016-1024.

- (18) Jackson RL, Busch SJ, Cardin AD (1991): Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. *Physiological Reviews* 71, 481–539.
- (19) Ihrcke NS, Wrenshall LE, Lindman BJ, Platt JL (1993): Role of heparan sulfate in immune system-blood vessel interactions. *Immunology Today* 14, 500–505.
- (20) Laurent TC, Fraser JR (1992): Hyaluronan. *The FASEB Journal* 6, 2397–2404.
- (21) Kinsella MG, Bressler SL, Wight TN (2004): The regulated synthesis of versican, decorin, and biglycan: extracellular matrix proteoglycans that influence cellular phenotype. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* 14, 203–234.
- (22) Huxley VH, Curry FE (1991): Differential actions of albumin and plasma on capillary solute permeability. *American Journal of Physiology* 260, 1645–1654.
- (23) van Haaren PM, VanBavel E, Vink H, Spaan JA (2003): Localization of the permeability barrier to solutes in isolated arteries by confocal microscopy. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 285, 2848–2856.
- (24) van den Berg BM, Vink H, Spaan JA (2003): The endothelial glycocalyx protects against myocardial edema. *Circulation Research* 92, 592–594.
- (25) Starling EH (1896): On the Absorption of Fluids from the Connective Tissue Spaces. *The Journal of Physiology* 19, 312–326.
- (26) Curry FE, Michel CC (1980): A fiber matrix model of capillary permeability. *Microvascular Research* 20, 96–99.
- (27) Rehm M, Zahler S, Lotsch M et al (2004): Endothelial glycocalyx as an additional barrier determining extravasation of 6% hydroxyethyl starch or 5% albumin solutions in the coronary vascular bed. *Anesthesiology* 100, 1211–1223.
- (28) Levick JR (2004): Revision of the Starling principle: new views of tissue fluid balance. *The Journal of Physiology* 557, 704.
- (29) Adamson RH, Lenz JF, Zhang X, Adamson GN, Weinbaum S, Curry FE (2004): Oncotic pressures opposing filtration across non-fenestrated rat microvessels. *The Journal of Physiology* 557, 889–907.
- (30) Sunnergren KP, Fairman RP, DeBlois GG, Glauser FL (1987): Effects of protamine, heparinase, and hyaluronidase on endothelial permeability and surface charge. *Journal of Applied Physiology* 63, 1987–92.
- (31) van Haaren PM, VanBavel E, Vink H, Spaan JA (2005): Charge modification of the endothelial surface layer modulates the permeability barrier of isolated rat mesenteric small arteries. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 289, 2503–2507.
- (32) Jacob M, Bruegger D, Rehm M, Welsch U, Conzen P, Becker BF (2006): Contrasting effects of colloid and crystalloid resuscitation fluids on cardiac vascular permeability. *Anesthesiology* 104, 1223–1231.
- (33) Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM (1986): Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *American Journal of Physiology* 250, 1145–1149.
- (34) Florian JA, Kosky JR, Ainslie K, Pang Z, Dull RO, Tarbell JM (2003): Heparan sulfate proteoglycan is a mechanosensor on endothelial cells. *Circulation Research* 93, 136–142.

- (35) Jacob M, Rehm M, Loetsch M, Paul JO, Bruegger D, Welsch U, Conzen P, Becker BF (2007): The endothelial glycocalyx prefers albumin for evoking shear stress-induced, nitric oxide-mediated coronary dilatation. *Journal of Vascular Research* 44, 435-443.
- (36) Becker BF, 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.
- (37) Seal JB, Gewertz BL (2005): Vascular dysfunction in ischemia-reperfusion injury. *Annals of Vascular Surgery* 19, 572-584.
- (38) Quinsey NS, Greedy AL, Bottomley SP, Whisstock JC, Pike RN (2004): Antithrombin: in control of coagulation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36, 386-389.
- (39) Shimada K, Kobayashi M, Kimura S, Nishinaga M, Takeuchi K, Ozawa T (1991): Anticoagulant heparin-like glycosaminoglycans on endothelial cell surface. *Japanese Circulation Journal* 55, 1016-1021.
- (40) Lijnen HR, Collen D (1997): Endothelium in hemostasis and thrombosis. *Progress in Cardiovascular Diseases* 39, 343-350.
- (41) Egbrink MG, Van Gestel MA, Broeders MA, Tangelder GJ, Heemskerk JM, Reneman RS, Slaaf DW (2005): Regulation of microvascular thromboembolism in vivo. *Microcirculation* 12, 287-300.
- (42) Li Q, Bolli R, Qiu Y, Tang XL, Murphree SS, French BA (1998): Gene therapy with extracellular superoxide dismutase attenuates myocardial stunning in conscious rabbits. *Circulation* 98, 1438-1448.
- (43) Ley K (1996): Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process. *Cardiovascular Research* 32, 733-742.
- (44) Springer TA (1990): Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346, 425-434.
- (45) van Haaren PM, VanBavel E, Vink H, Spaan JA (2003): Localization of the permeability barrier to solutes in isolated arteries by confocal microscopy. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 285, 2848-2856.
- (46) Megens RTA, Reitsma S, Schiffers PHM, Hilgers RHP, De Mey JGR, Slaaf DW, oude Egbrink MGA, van Zandvoort MAMJ (2007): Two-photon microscopy of vital murine elastic and muscular arteries. *Journal of Vascular Research* 44, 87-98.
- (47) Henry CB, Duling BR (2000): TNF-alpha increases entry of macromolecules into luminal endothelial cell glycocalyx. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 279, 2815-2823.
- (48) Constantinescu AA, Vink H, Spaan JA (2003): Endothelial cell glycocalyx modulates immobilization of leukocytes at the endothelial surface. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 23, 1541-1547.
- (49) Chappell D, Jacob M, Hofmann-Kiefer K, Rehm M, Welsch U, Conzen P, et al (2009): Antithrombin reduces shedding of the endothelial glycocalyx following ischaemia/reperfusion. *Cardiovascular Research* 83, 388-396.
- (50) Mulivor AW, Lipowsky HH (2004): Inflammation- and ischemia induced shedding of venular glycocalyx. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 286, 1672-1680.
- (51) Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, et al (2008): Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Intensive Care Medicine* 34, 17-60.

- (52) Meuwese MC, Mooij HL, Nieuwdorp M, van LB, Marck R, Vink H, et al (2009): Partial recovery of the endothelial glycocalyx upon rosuvastatin therapy in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. *The Journal of Lipid Research* 50, 148-153.
- (53) Nieuwdorp M, van Haeften TW, Gouverneur MC, Mooij HL, van Lieshout MH, Levi M, et al (2006): Loss of endothelial glycocalyx during acute hyperglycemia coincides with endothelial dysfunction and coagulation activation in vivo. *Diabetes* 55, 480-486.
- (54) Jacob M, Chappell D, Rehm M (2007): Clinical update: perioperative fluid management. *Lancet* 369, 1984-1986.
- (55) Rubio-Gayosso I, Platts SH, Duling BR (2006): Reactive oxygen species mediate modification of glycocalyx during ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 290, 2247-2256.
- (56) Platts SH, Linden J, Duling BR (2003): Rapid modification of the glycocalyx caused by ischemia-reperfusion is inhibited by adenosine A2A receptor activation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 290, 2360-2367.
- (57) Oliver MG, Specian RD, Perry MA, Granger DN (1991): Morphologic assessment of leukocyte-endothelial cell interactions in mesenteric venules subjected to ischemia and reperfusion. *Inflammation* 15, 331-346.
- (58) Kurose I, Argenbright LW, Wolf R et al (1997): Ischemia/reperfusion-induced microvascular dysfunction: role of oxidants and lipid mediators. *American Journal of Physiology* 272, 2976-2982.
- (59) Vollmar B, Glasz J, Menger MD, Messmer K (1995): Leukocytes contribute to hepatic ischemia/reperfusion injury via intercellular adhesion molecule-1-mediated venular adherence. *Surgery* 117, 195-200.
- (60) Rehm M, Bruegger D, Christ F et al (2007): Shedding of the endothelial glycocalyx in patients undergoing major vascular surgery with global and regional ischemia. *Circulation* 116, 1896-1906.
- (61) Bruegger D, Rehm M, Abicht J, Paul JO, Stoeckelhuber M, Pfirrmann M et al (2009): Shedding of the endothelial glycocalyx during cardiac surgery: On-pump versus offpump coronary artery bypass graft surgery. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 138, 1445-1447.
- (62) Platts, SH, Duling BR (2004): Adenosine A3 receptor activation modulates the capillary endothelial glycocalyx. *Circulation Research* 94, 77-82.
- (63) Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J (2001): International Union of Pharmacology, XXV: nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacological Reviews* 53, 527-552.
- (64) Linden J (2001): Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 41, 775-787.
- (65) Cronstein BN (1994): Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. *Journal of Applied Physiology* 76, 5-13.
- (66) Mubagwa K and Flameng W (2001): Adenosine, adenosine receptors and myocardial protection: an updated overview. *Cardiovascular Research* 52, 25-39.
- (67) Annecke T, Chappell D, Chen C, Jacob M, Welsch U, Sommerhoff CP, Rehm M, Conzen PF, Becker BF (2010): Sevoflurane preserves the endothelial glycocalyx against ischaemia-reperfusion injury. *British Journal of Anaesthesia* 104, 414-421.

- (68) Gilles S, Zahler S, Welsch U, Sommerhoff CP, Becker BF (2003): Release of TNF-alpha during myocardial reperfusion depends on oxidative stress and is prevented by mast cell stabilizers. *Cardiovascular Research* 60, 608–616.
- (69) Becker BF, Fischer J, Hartmann H, Chen C, Sommerhoff CP, Tschöep J, Conzen P C, Anneck T (2011): Inosine, not Adenosine, Initiates Endothelial Glycocalyx Degradation in Cardiac Ischemia and Hypoxia. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* 30:12, 1161-1167.
- (70) Tilley SL, Wagoner VA, Salvatore CA, Jacobson MA, Koller BH (2000): Adenosine and inosine increase cutaneous vasopermeability by activating A3 receptors on mast cells. *The Journal of Clinical Investigation* 105, 361–367.
- (71) Reeves JJ, Jones CA, Sheehan MJ, Vardey CJ, Whelan CJ (1997): Adenosine A3 receptors promote degranulation of rat mast cells both in vitro and in vivo. *Inflammation Research* 46, 180–184.
- (72) Jin X, Shepherd RK, Duling BR, Linden J (1997): Inosine binds to A3 adenosine receptors and stimulates mast cell degranulation. *The Journal of Clinical Investigation* 100, 2849–2857.
- (73) Salvatore CA, Tilley SL, Latour AM, Fletcher DS, Koller BH, Jacobson MA (2000): Disruption of the A3 adenosine receptor gene in mice and its effect on stimulated inflammatory cells. *The Journal of Biological Chemistry* 275, 4429–4434.
- (74) Silverman ES, Gerritsen ME, Collins T (1997): Metabolic functions of the pulmonary endothelium. In *The lung: scientific foundations*. R.G. Crystal, J.B. West, E.R. Weibel, and P.J. Barnes, (eds) Lippincott- Raven. Philadelphia, PA. 629–651.
- (75) Hellewell PG, Pearson JD (1983): Metabolism of circulating adenosine by the porcine isolated perfused lung. *Circulation Research* 53, 1–7.
- (76) Jones CE, Thomas JX, Devous MD, Norris CP, Smith EE (1977): Positive inotropic response to inosine in the in situ canine heart. *American Journal of Physiology* 233, 438–443.
- (77) Church MK, Hughes PJ, Vardey CJ (1986): Studies on the receptor mediating cyclic AMP-independent enhancement by adenosine of IgE dependent mediator release from rat mast cells. *British Journal of Pharmacology* 87, 233–242.
- (78) Mentzer RM, Rubio R, Berne RM (1975): Release of adenosine by hypoxic canine lung tissue and its possible role in pulmonary circulation. *American Journal of Physiology* 229, 1625–1631.
- (79) Kanwar S, Hickey MJ, Kubes P (1998): Postischemic inflammation: a role for mast cells in intestine but not in skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 275, 212–218.
- (80) Galli SJ (1990): New insights into “the riddle of the mast cells”: microenvironmental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity. *Laboratory Investigation* 62, 5–33.
- (81) Becker BF, Chappell D, Jacob M (2010): Endothelial glycocalyx and coronary vascular permeability: the fringe benefit. *Basic Research in Cardiology* 105, 687–701.
- (82) Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA (1997): Mast cells. *Physiological Reviews* 77, 1033–1079.
- (83) Jacob M, Bruegger D, Rehm M et al (2007): The endothelial glycocalyx affords compatibility of Starling’s principle and high cardiac interstitial albumin levels. *Cardiovascular Research* 73, 575–586.
- (84) Potter DR, Jiang J, Damiano ER (2009): The recovery time course of the endothelial cell glycocalyx in vivo and its implications in vitro. *Circulation Research* 104, 1318–1325.

- (85) Ward BJ, Donnelly JL (1993): Hypoxia induced disruption of the cardiac endothelial glycocalyx: implications for capillary permeability. *Cardiovascular Research* 27, 384–389.
- (86) Chappell D, Jacob M, Rehm M et al (2008): Heparinase selectively sheds heparan sulphate from the endothelial glycocalyx. *The Journal of Biological Chemistry* 389, 79–82.
- (87) Hei ZQ, Gan XL, Huag PJ, Wei J, Shen N, Gao WL (2008): Influence of ketotifen, cromolyn sodium, and compound 48/80 on the survival rates after intestinal ischemia reperfusion injury in rats. *BMC Gastroenterology* 8, 42.
- (88) Sitkovsky MV, Lukashev D, Apasov S et al (2004): Physiological control of immune response and inflammatory tissue damage by hypoxia-inducible factors and adenosine A2A receptors. *Annual Review of Immunology* 22, 657–682.
- (89) Brands J, Spaan JA, Van den Berg BM, Vink H, VanTeeffelen JW (2009): Acute attenuation of glycocalyx barrier properties increase coronary blood volume independently of coronary flow reserve. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 298, 515–523.
- (90) Bruegger D, Jacob M, Rehm M et al (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.
- (91) Chappell D, Hofmann-Kiefer K, Jacob M et al (2009): TNF-alpha induced shedding of the endothelial glycocalyx is prevented by hydrocortisone and antithrombin. *Basic Research in Cardiology* 104, 78–89.
- (92) Becker BF, Reinholz N, Ozelik T, Leipert B, Gerlach E (1989): Uric acid as radical scavenger and antioxidant in the heart. *Pflügers Archiv* 415, 127–135.
- (93) Ward BJ, Firth JA (1989): Effect of hypoxia on endothelial morphology and interendothelial junctions in the isolated perfused rat heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 21, 1337–1347.
- (94) Mulivor AW, Lipowsky HH (2002): Role of glycocalyx in leukocyte-endothelial cell adhesion. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 283, 1282–1291.
- (95) Czarnowska E, Karwatowska-Prokopczuk E (1995): Ultrastructural demonstration of endothelial glycocalyx disruption in the reperfused rat heart. Involvement of oxygen free radicals. *Basic Research in Cardiology* 90, 357–364.
- (96) Zhang C, Wu J, Xu X, Potter BJ, Gao X (2010): Direct relationship between levels of TNF-alpha expression and endothelial dysfunction in reperfusion injury. *Basic Research in Cardiology* 105, 453–464.
- (97) Annecke T, Fischer J, Hartmann H, Tschoep J, Rehm M, Conzen P, Sommerhoff CP, Becker BF (2011): Shedding of the coronary endothelial glycocalyx: effects of hypoxia/reoxygenation vs ischaemia/reperfusion. *British Journal of Anaesthesia* 107, 679-686.
- (98) Kumulative Habilitationsschrift Thorsten Annecke (München, 2011): Organprotektion durch volatile Anästhetika-Beeinflussung von Schäden infolge Ischämie/Reperfusion und Inflammation.
- (99) Lucchinetti E, Ambrosio S, Aguirre J et al (2007): Sevoflurane inhalation at sedative concentrations provides endothelial protection against ischemia–reperfusion injury in humans. *Anesthesiology* 106, 262–268.
- (100) Tarbell JM, Pahakis MY (2006): Mechanotransduction and the glycocalyx. *Journal of Internal Medicine* 259, 339–350.

(101) Chappell D, Jacob M, Hofmann-Kiefer K, Bruegger D, Rehm M, Conzen P, Welsch U, Becker BF (2007): Hydrocortisone preserves the vascular barrier by protecting the endothelial glycocalyx. *Anesthesiology*, 107, 776.

(102) Adeva-Andany M, López-Ojén M, Funcasta-Calderón R, Ameneiros-Rodríguez E, Donapetry-García C, Vila-Altesor M, Rodríguez-Seijas J.(2014): Comprehensive review on lactate metabolism in human health. *Mitochondrion*. 17, 76-100.

(103) Forster H, Wicarkzyk C, Dudziak R (1981): Determination of the plasma elimination of hydroxyethyl starch and dextran using improved analytical methods. *Infusionstherapie und klinische Ernährung* 8, 88-94.

(104) Becker BF, Jacob M, Leipert S, Salmon AHJ, Chappell D (2015): Degradation of the endothelial glycocalyx in clinical settings: searching for the sheddases. *British Journal of Clinical Pharmacology* 80(3), 389-402.

## 7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Endotheliale Glykokalyx und “endothelial surface layer”
Abbildung 2:	Klassisches Prinzip von Starling
Abbildung 3:	Revidiertes Prinzip von Starling
Abbildung 4:	Ergebnis der Präparation
Abbildung 5:	Schematischer Versuchsaufbau
Abbildung 6:	Versuchsprotokoll der Kontrollgruppe
Abbildung 7:	Versuchsprotokoll der Ischämie/Reperfusionsgruppe
Abbildung 8:	Versuchsprotokoll der Hypoxie/Reoxygenierungsgruppe
Abbildung 9:	Verhältnis von Effluat und Transsudat
Abbildung 10:	Freisetzung von Laktat
Abbildung 11:	Adenosin- und Inosinkonzentrationen in der Kontrollgruppe
Abbildung 12:	Adenosinkonzentrationen in der Hypoxiegruppe
Abbildung 13:	Adenosinkonzentrationen in der Ischämiegruppe
Abbildung 14:	Inosinkonzentrationen in der Ischämiegruppe
Abbildung 15:	Inosinkonzentrationen in der Hypoxiegruppe
Abbildung 16:	Inosinkonzentrationen in der Hypoxiegruppe (Interstitium)

## 8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Zusammensetzung Krebs-Henseleit Puffer
Tabelle 2:	Tiergewichte
Tabelle 3:	Koronarfluss
Tabelle 4:	Freisetzung von Hydroxyethylstärke
Tabelle 5:	Histaminkonzentrationen
Tabelle 6:	Konzentrationen von Syndecan-1
Tabelle 7:	Konzentrationen von Heparansulfat
Tabelle 8:	Sauerstoffangebot

## 9. Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	analysis of variance
ANP	atriales natriuretisches Peptid
ATP	Adenosintriphosphat
EG	Endotheliale Glykokalyx
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ESL	endothelial surface layer
GAG	Glykosaminoglykan
GP	Glykoprotein
HES	Hydroxyethyl-Stärke
HPLC	high performance liquid chromatography
ICAM	intercellular adhesion molecule
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
PECAM	platelet endothelial adhesion molecule
PG	Proteoglykan
ROS	reactive oxygen species

SOD	Superoxiddismutase
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
VCAM	vascular cell adhesion molecule
XOR	Xanthin-Oxidoreduktase

# Eidesstattliche Versicherung

---

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 einzeln nachgewiesen habe.

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

---

Ort, Datum

---

Unterschrift Doktorandin/Doktorand