

**Aus der Universitätsklinik für
Anaesthesiologie und Intensivmedizin
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. K. Unertl**

**Effekte von Perfusionsstörungen
auf systemische Entzündungsreaktionen
am Beispiel der Monozyten-Granulozyten-Endothel-
Interaktion**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Miriam Nadja Kampmann, geb. Bänzner
aus
Bietigheim-Bissingen
2011**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. B. Nohé

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. J. Glatzle

**Aus der Universitätsklinik für
Anaesthesiologie und Intensivmedizin
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. K. Unertl**

**Effekte von Perfusionsstörungen
auf systemische Entzündungsreaktionen
am Beispiel der Monozyten-Granulozyten-Endothel-
Interaktion**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Miriam Nadja Kampmann, geb. Bänzner
aus
Bietigheim-Bissingen
2011**

Für meine Kinder Hanna, Max und Charlotte.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Inhaltsverzeichnis	4-6
Abkürzungen	7
1. Einleitung und Fragestellung	8-11
2. Material und Methoden	12-45
2.1 Endothelzellkultur	12-19
2.1.1 Nabelschnurpräparation	12-15
2.1.2 Medienwechsel	15-17
2.1.3 Passage	17-19
2.2 Monozytenisolation	19-24
2.2.1 Dichtegradientenzentrifugation	19-21
2.2.2 Magnetische Zellseparation (MACS®, magnetic activated cell sorting)	21-24
2.3 Granulozytenisolation	24-26
2.3.1 Fluoreszenzfärbung der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten mit Calcein	24
2.3.2 Dichtegradientenzentrifugation mit Percoll	25-26
2.4 Stimulation mit Lipopolysaccharid	27
2.5 Cokulturen	27-28
2.6 Monoklonale Antikörper	29-30
2.7 Markierung mit Antikörpern	30-31
2.8 Brefeldin A	32

2.9	Flusskammer	32-36
2.9.1	Aufbau der Flusskammer, Versuchsdurchführung	33-35
2.9.2	Physikalische Grundlagen	35-36
2.10	Quantitative Auswertung der Zelladhäsion	36-37
2.11	Durchflusszytometrie	37-38
2.12	Statistische Auswertung der Daten	39
2.13	Tabellarische Auflistung der verwendeten monoklonalen Antikörper, Reagenzien, Materialien und Geräte	39-45
3.	Ergebnisse	46-56
3.1	Expression von E-Selektin und ICAM-1 auf HUVEC-Monokulturen	46
3.2	Effekte der Schubspannung auf die Adhäsion	47-48
3.3	Effekte der statischen Coinkubation auf die Expression von E-Selektin und ICAM-1	49-52
3.3.1	Monozyten-HUVEC-Cokulturen	49-50
3.3.2	Granulozyten-HUVEC-Cokulturen	51
3.3.3	Kontamination mit Monozyten	52
3.4	Effekte der statischen Coinkubation auf die Adhäsion bei Reperfusion	53-56
3.4.1	Effekte der statischen unstimulierten Monokulturen und der Lipopolysaccharid stimulierten Monokulturen auf die Adhäsion bei Reperfusion	54-55
3.4.2	Effekte der statischen polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten-HUVEC-Cokulturen auf die Adhäsion bei Reperfusion	54-55
3.4.3	Effekte der statischen Monozyten-HUVEC-Cokulturen auf die Adhäsion bei Reperfusion	54-55
3.4.4	Effekte der Blockade von Selektinen bei statischen Monozyten-HUVEC-Cokulturen auf die Adhäsion bei Reperfusion	55-56

4.	Diskussion	57-67
5.	Zusammenfassung	68-69
6.	Literaturverzeichnis	70-78
7.	Danksagung	79
8.	Lebenslauf	80

Abkürzungen

AMS	Antibiotic-Antimycotic-Solution
ANOVA	analysis of variance
BSA	bovines Serumalbumin
CLP	cecal ligation and perforation
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGM	Endothelial Cell Growth Medium
FKS	fetales Kälberserum
HBSS	Hank's buffered saline solution
HUVEC	human umbilical venous endothelial cells
ICAM	intercellular adhesion molecule
IL	Interleukin
LBP	Lipopolysaccharid bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid
mAk	monoklonaler Antikörper
MW	arithmetischer Mittelwert
PAF	platelet activating factor
PBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
RT	Raumtemperatur
SF	Standardfehler
SW	Standardabweichung
TF	tissue factor
TNFα	Tumornekrosefaktor α
VCAM	vascular cell adhesion molecule

1. Einleitung

Ein essentieller Bestandteil der körpereigenen Immunabwehr ist die Transmigration leukozytärer Zellen aus der Blutbahn in das umliegende Gewebe.¹⁶ Die Zellinteraktionen von Leukozyten und Thrombozyten mit dem Endothel dienen bei Infektionen und Zelluntergang unterschiedlicher Genese der Gewebereparation, Keimelimination und Blutstillung. Um die Blutbahn verlassen zu können, müssen die Zellen in Kontakt mit dem Gefäßendothel treten. Diese Leukozyten-Endothel-Wechselwirkungen haben große Bedeutung für die Anzahl der transmigrierenden Zellen sowie für deren gerichtete Verteilung.^{51,62} Andererseits tragen Leukozyten-induzierte Reaktionen bei exzessiver Adhäsion am Gefäßendothel auch wesentlich zur Pathogenese von Organdysfunktionen bei Ischämie/Reperfusion und Schock entzündlicher oder nicht-entzündlicher Genese wie bei Sepsis, Hypovolämie und Trauma bei.^{7,11,24,35,49,50,55,66}

Im physiologischen Zustand verhindern intravasale Scherkräfte eine Interaktion zwischen der antithrombogenen Oberfläche des Gefäßendothels und Leukozyten. Sobald ein inflammatorischer Reiz auf das Endothel wirkt, wird ein System von wechselwirkenden Mechanismen in Gang gesetzt, welches die Auswanderung leukozytärer Zellen um ein Vielfaches steigert. Intravasale Scherkräfte werden durch eine Steigerung der Expression der Adhäsionsmoleküle sowohl auf den Leukozyten als auch auf dem Endothel überwunden.^{7,43,46,64,88} Die Hauptrolle dabei spielen unterschiedliche Selektine, Integrine sowie Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie. Eine selektinvermittelte Geschwindigkeitsreduktion der Leukozyten im Blutstrom, das Rolling, funktioniert über ein Gleichgewicht aus Bindung und Lösung von Molekülen und ist somit die essentielle Voraussetzung für die Adhäsion.^{48,51,62} Selektine finden sich auf Leukozyten und auf Endothelzellen. Man unterscheidet E-, P- und L-Selektin, die das Rolling vermitteln.^{7,27,42,48}

Anschließend folgt das integrinvermittelte Sticking.^{30,42,56} Unter Sticking wird die der Transmigration vorausgehende feste Adhäsion der Zelle an die Gefäßwand über die endothelialen Liganden ICAM-1 und VCAM verstanden.^{56,77} Das Sticking tritt vor allem in der postkapillären Mikrozirkulation auf, da hier die Schubspannung niedriger ist. Diese Kaskade an ablaufenden Reaktionen vermittelt im Anschluss weitere Mechanismen der Zellaktivierung.

Mehrere proinflammatorische Stimuli wie Lipopolysaccharid, TNF α oder Interleukine führen zu einer gesteigerten Expression von Adhäsionsmolekülen.^{10,19,59,76} Lipopolysaccharid ist ein Bestandteil der Membran gram-negativer Bakterien. Nur über einen Bindungspartner, dem Lipopolysaccharidbindenden Protein (LBP), kann Lipopolysaccharid an seinen Membranrezeptor CD14 binden.^{12,80,86} Nach dem Transfer von Lipopolysaccharid-Monomeren in den Leukozyten folgt eine Aktivierung einer intrazellulären Signalkaskade über sogenannte Toll-like Rezeptoren, die dann wiederum die Adhäsionsmolekülexpression induzieren.^{1,12,39,63,83}

Auf Endothelzellen führt eine Lipopolysaccharid-Stimulation zu einer gesteigerten Expression von E-, P-Selektin, ICAM-1 und VCAM. Auf Leukozyten führt eine Lipopolysaccharid-Stimulation zu einer Aktivierung des Integrinkomplexes CD18/CD11a, b, c sowie zu einem irreversiblen Verlust von L-Selektin, dem L-Selektin-Shedding.³ Der letzte Mechanismus soll vermutlich eine überschießende Leukozytenadhäsion limitieren.

Der zweite entscheidende Faktor für die Adhäsion, beziehungsweise Leukozyten-Endothel-Interaktion, ist die Scherkraft des Blutstroms. Diese verhindert Interaktionen nicht-aktivierter Zellen, kann jedoch nach inflammatorischer Aktivierung durch die Bindungen der vermehrt exprimierten Adhäsionsmoleküle überwunden werden.^{3,9,12,32} Sie entspricht der Kraft, die auf eine bestimmte Fläche des Endothels wirkt. Sie wird auch als Schubspannung bezeichnet, ihre Einheit ist dyn/cm² oder Pascal, wobei

1 Pa = 10 dyn/cm² entspricht. Beeinflusst wird die Schubspannung durch die Strömungsgeschwindigkeit, die Viskosität des Blutes sowie durch die Gefäßgeometrie. Die besten Voraussetzungen für Interaktionen mit der Gefäßwand liegen somit bei niederen Strömungsgeschwindigkeiten, wie sie in der postkapillären Mikrozirkulation vorherrschen. Für das Modell der laminaren Strömung ergibt sich eine Abhängigkeit von Viskosität, Innenradius, Druckdifferenz und Gefäßlänge. Nach einer unter Entzündung stattfindenden Gefäßdilatation folgt zum Beispiel eine Verlangsamung des Blutstroms. Die Möglichkeit einer Kontaktaufnahme zur Gefäßwand wird verbessert. Dabei resultieren bereits geringste Veränderungen im Gefäßdurchmesser aufgrund der umgekehrten Proportionalität der Stromstärke zur vierten Potenz des Radius mit deutlicher Veränderung der Strömungsgeschwindigkeit.

Aufgrund der komplexen Verhältnisse *in vivo* ist es schwierig, Effekte der Scherkraft von Effekten der inflammatorischen Aktivierung zu trennen. Für die Pathophysiologie verschiedener Schocksyndrome und den Gewebeschaden bei Ischämie/Reperfusion sind die verminderte Gewebepfusion und die Steigerung der Wechselwirkungen zwischen Leukozyten und Endothel entscheidende Faktoren. Die Funktion der Adhäsionsmoleküle wurde in Studien bereits oft untersucht. Im Gegensatz dazu wurden die Auswirkungen einer verminderten Schubspannung ohne Einfluss eines inflammatorischen Reizes bis jetzt noch nicht eindeutig dargestellt. Es gibt Untersuchungen, die zeigen, dass nach der Reduktion der Schubspannung vermehrte Wechselwirkungen zwischen Endothel und Leukozyten auftreten.^{9,26,40,46} Jedoch existieren kontroverse Ergebnisse zur Rolle der Schubspannung ohne Einfluss eines entzündlich wirkenden Botenstoffs.^{8,21,32} Somit blieb bis jetzt umstritten, ob eine verminderte Schubspannung alleiniger Auslöser einer Endothelaktivierung mit gesteigerter Adhäsionsmolekülexpression sein kann.⁸⁸ Falls ja, ist weiterhin noch unklar, ob dieser Effekt zeitlich begrenzt im Rahmen der verminderten Schubspannung auftritt oder ob er bei wiederhergestellten physiologischen Flussbedingungen andauernde Folgereaktionen hervorruft.

Auch die Rolle der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten sowie der Monozyten wird in diesem Zusammenhang noch nicht richtig verstanden. Den Monozyten wird eine Hauptrolle bei der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen zugeschrieben. Die neutrophilen Granulozyten scheinen eine wichtige Rolle bei Organschädigungen im Rahmen von Schock zu spielen.^{37,61,64,87} Aktivierte neutrophile Granulozyten beeinflussen die kapilläre Perfusion und Gewebeintaktheit.^{61,87} Dazu müssen sie jedoch sowohl durch auf dem Endothel haftende Zellen, als auch durch inflammationsauslösende Botenstoffe aktiviert werden.^{25,37,57,65,78,81,87}

Die leukozytenabhängige Organdysfunktion stellt einen wichtigen Faktor für die Prognose kritisch kranker Patienten dar. Gezeigt wurde, dass Mikrozyklationsstörungen unabhängig von Makrozyklationsstörungen persistieren und mit der Prognose korrelieren.^{13,14,75}

Die Wechselwirkungen von Monozyten, polymorphkernigen Granulozyten und dem Endothel unter dem Einfluss der Schubspannung wurden deshalb in einem etablierten Flusskammermodell untersucht. Folgende Fragen sollen beantwortet werden:

1. Aktivieren Zellwechselwirkungen zwischen Monozyten, polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten und dem Endothel bei reduzierter Schubspannung die Aktivierung des Endothels?
2. Gibt es über den zeitlich begrenzten Einfluss der reduzierten Schubspannung hinaus anhaltende Folgen?
3. Gibt es Unterschiede im Verhalten der Monozyten und polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten in Bezug auf die endotheliale Aktivierung?

2. Material und Methoden

In diesem Kapitel werden die angewandten Methoden beschrieben. Die verwendeten Antikörper, Reagenzien, Materialien und Geräte werden am Ende des Kapitels aufgelistet.

2.1 Endothelzellkultur

2.1.1 Nabelschnurpräparation

Die humanen Endothelzellen wurden nach ausgetragener Schwangerschaft und unauffälligem Geburtsverlauf aus einer wenig traumatisierten Nabelschnurvene (HUVEC) gewonnen. Die Nabelschnur wurde unmittelbar post partum bis zum Beginn der Präparation maximal 24 Stunden lang bei 4°C im Transportgefäß in einer Flüssigkeit aus 100ml PBS+ versetzt mit 1% Antibiotic-Antimycotic-Solution aufbewahrt. Die Auslösung der Endothelzellen aus der Nabelschnurvene erfolgte enzymatisch mit Hilfe von Collagenase A. Das gewonnene Pellet aus Endothelzellen wurde in Endothelzellmedium resuspendiert und dann in eine 75cm² große Zellkulturflasche zum Wachsen ausgesät. Im Brutschrank bildeten die Endothelzellen innerhalb von 4 bis 7 Tagen unter regelmäßigem Medienwechsel einen Monolayer. Im Anschluss erfolgte die Passage, worunter das Ablösen der adhärennten Zellen mittels Trypsin und das erneute Aussäen in Zellkulturflaschen, auf 12-Well-Platten oder auf Flusskammerwells verstanden wird.

Materialien:

- zwei sterile 100ml Bechergläser und ein steriles 600ml Becherglas
- drei 50ml Röhrchen aus Polypropylen (kegelförmiges Zentrifugenröhrchen), jeweils beschriftet mit Pellet, EGM und Collagenase

- eine kollagenbeschichtete 75cm² große Zellkulturflasche
- sterile Handschuhe
- einen 0,22µm Sterilfilter
- eine 2ml Spritze, eine 10ml Spritze und vier 20ml Spritzen
- zwei sterile Nierenschalen
- eine Straussskanüle
- zwei sterile Abdecktücher
- vier sterilen Kompressen
- eine Instrumentenschale, die folgendes sterilisiertes Material enthält:
eine Pinzette, zwei Pean-Klemmen, vier Kabelbinder, eine Schere, zwei Schläuche, 4 rote Verschlusskämpchen, eine 20G- Kanüle
- Reagenzien: Antibiotic Antimycotic Solution (AMS), Collagenase A, Endothelial Cell Basal Medium (EGM), Medium 199, PBS-, PBS+, Ringerlösung, Sodium Pyruvate, Foetal Bovine Serum (FBS)

Durchführung:

Die Nabelschnurpräparation erfolgte in steriler Umgebung unter der Werkbank:

- Das 600ml Becherglas mit 300ml Ringerlactat füllen, mit Alufolie abdecken und in das 37°C warme Wasserbad stellen.
- Spülung 1 und 2 herstellen:
In das erste 100ml Becherglas 50ml PBS+ und 0,5ml Antibiotic Antimycotic Solution (Spülung 1) geben. Das zweite 100ml Becherglas wird mit 50ml Medium 199, 5ml FBS, 0,5ml Antibiotic Antimycotic Solution sowie 0,5ml Natriumpyruvat gefüllt (Spülung 2).
- 1ml Collagenase A und 1ml Antibiotic Antimycotic Solution bei Raumtemperatur auftauen.
- Die Collagenase A in eine 2ml Spritze aufziehen und mit einem 0,22µm Sterilfilter in ein Polypropylen-Röhrchen filtrieren. Anschließend den Filter noch mit Luft durchspritzen. Das Polypropylen-Röhrchen mit 9ml PBS- auffüllen.

- In ein Polypropylen-Röhrchen 17ml EGM pipettieren. Das Kulturmedium in das 37°C warme Wasserbad stellen.
- Die Werkbank reinigen.
- Die Instrumentenschale unter Flow aufklappen und die 10ml Spritze beziehungsweise die vier 20ml Spritzen, die Kompressen sowie die Straussskanüle in den Instrumententeil legen. Die Tücher steril auf die Nierenschalen legen und sterile Handschuhe anziehen.
- Als nächstes Spülung 1 in zwei 20ml Spritzen, auf denen je ein Schlauch steckt, aufziehen. Spülung 2 durch eine Straussskanüle in zwei 20ml Spritzen aufziehen, die dann mit Kappen verschlossen werden.
- Im folgenden Arbeitsschritt die Nabelschnur vorsichtig mit einer Pinzette aus dem Transportgefäß holen. Die Nabelschnur mit den Kompressen vorsichtig äußerlich reinigen und überprüfen, ob sie eventuell Punktionsstellen, die gegebenenfalls abgeschnitten werden müssen, aufweist. Die Klemmmarken gerade abschneiden.
- Nun einen Kabelbinder auf das eine Ende der Nabelschnur stecken. Die Vene mit dem Schlauch, auf dem die Spritze mit der Spüllösung 1 steckt, kanülieren. Sobald die Vene kanüliert ist, den Kabelbinder so fest anziehen, dass der Schlauch nicht mehr aus der Vene rutschen kann und die Vene mit Spülung 1 durchspülen.
- Im Anschluss den Vorgang auf der anderen Seite wiederholen. Dann beide Schläuche abklemmen. Die Schlauchenden steril halten.
- Die Collagenase ins Wasserbad stellen und sie auf 37°C erwärmen.
- Mit der gelben Kanüle die angewärmte Collagenase in eine 10ml Spritze aufziehen. Die Spritze auf den linken Schlauch aufstecken. Auf dieser Seite die Klemme entfernen und die Klemme auf der rechten Seite öffnen. Dann die Flüssigkeit vorsichtig durchspritzen, bis sie auf der rechten Seite aus dem Schlauch austritt. Die rechte Klemme schließen und die Vene mit der Flüssigkeit prall auffüllen. Die linke Klemme schließen.

- Die Nabelschnur für 5 Minuten in das Becherglas, welches im Wasserbad steht, eintauchen. Dabei darauf achten, dass die Verbindungsstellen zwischen der Nabelschnur und den Schläuchen nicht in die Ringerlösung eintauchen.
- Nach der Inkubationszeit die Nabelschnur sofort wieder unter Flow halten.
- Eine Spritze mit Lösung 2 links aufstecken, die Klemme links entfernen und die Klemme rechts öffnen. Das rechte Schlauchende über das Polypropylen-Röhrchen halten. Mit 20ml der Lösung 2 die Vene durchspülen und die Flüssigkeit im Polypropylen-Röhrchen auffangen.
- Das Polypropylen-Röhrchen mit dem Pellet 8 Minuten lang bei 800U/min bei Raumtemperatur (RT) und ohne Bremse in die Zentrifuge stellen.
- Nach dem Zentrifugieren den Überstand abpipettieren und das Pellet mit den restlichen 20ml der Spülung 2 resuspendieren. Das Röhrchen erneut unter gleichen Bedingungen in die Zentrifuge stellen.
- Den Überstand aus dem Röhrchen wieder abpipettieren und das Pellet mit den angewärmten 17ml EGM auffüllen und aufschütteln.
- Die Zellsuspension in eine Kulturflasche füllen. Dabei darf mit der Pipettenspitze nicht der Flaschenhals berührt werden.
- Bei 37°C, 100% relativer Luftfeuchtigkeit, 5% CO₂-Konzentration und 95% O₂-Konzentration zum Kultivieren in den Brutschrank stellen.
- Am nächsten Tag die Endothelzellen mikroskopisch kontrollieren. Die Zellen sollen spindelförmig sein und kleine Nester bilden.

2.1.2 Medienwechsel

Beim Medienwechsel wurde das alte Medium abpipettiert, die Endothelzellen gespült und anschließend mit neuem Zellkulturmedium versorgt. Damit sollten die nicht adhärenen Zellen, die restlichen Erythrozyten und Gerinnsel entfernt werden und dem Endothel neue Nährstoffe bereitgestellt werden.

Medienwechsel von HUVEC in Zellkulturflaschen

Nach der mikroskopischen Kontrolle der Endothelzellen einen Tag nach der Nabelschnurpräparation erfolgte der Medienwechsel.

Durchführung:

- 30ml PBS+ in ein Polypropylen-Röhrchen und 17ml EGM in ein weiteres Polypropylen-Röhrchen pipettieren. Beide Röhrchen im Wasserbad auf 37°C erwärmen.
- Vorsichtig das Kulturmedium aus der Flasche abziehen. Bei leicht schräg gestellter Flasche zwei Mal vorsichtig mit je 15ml PBS+ überschichten und leicht schwenken, um alle nicht haftenden Endothelzellen, Erythrozyten und sonstige Zellen zu entfernen.
- Die Endothelzellen wieder mit 17ml EGM resuspendieren und im Brutschrank reinkubieren.

Ab jetzt erfolgte der Medienwechsel wie beschrieben alle zwei Tage. Sobald die Endothelzellen den Boden der Flasche zu circa 80% bedeckt hatten, wurden sie passagiert. Diese präkonfluente Phase wurde am 4. bis 7. Tag nach der Präparation erreicht.

Medienwechsel von HUVEC auf Flusskammerwells

Der Medienwechsel bei Verwendung von Flusskammerwells erfolgte einmal. Einen Tag nach der Passage von einer Zellkulturflasche auf das Well wurde das Medium gewechselt bevor am dritten Tag nach der Passage die Platte zur Versuchsdurchführung verwendet wurde.

Durchführung:

- Pro Well 1ml EGM und 2ml PBS+ ins Wasserbad stellen.
- Das Medium auf einem Well abziehen und das Well zwei Mal nacheinander mit je 1ml PBS+ vorsichtig spülen. Dazu eine 1ml-Stripette verwenden und nur am Rand pipettieren.

- Mit einer neuen 1ml-Stripette das erwärmte Zellkulturmedium vorsichtig auf die Zellen geben. Das Well sofort zurück in den Brutschrank stellen.

Medienwechsel von HUVEC auf 12-Well-Platten

Der Medienwechsel erfolgte einen Tag nach der Passage auf die 12-Well-Platte (Becton Dickinson). Am dritten Tag nach der Passage wurde die Platte zur Versuchsdurchführung verwendet.

Durchführung:

- Pro Well 1ml EGM und 2ml PBS+ ins Wasserbad stellen.
- Das Medium auf einem Well abziehen und jedes Well zwei Mal nacheinander mit je 1ml PBS+ vorsichtig spülen. Dazu eine Pipette verwenden und immer an den Rand des Wells pipettieren.
- Mit einer neuen Pipettenspitze das erwärmte Zellkulturmedium vorsichtig auf die Zellen geben. Pro Well wird 1ml Medium aufgetragen.

2.1.3 Passage

Sobald der Endothelzellrasen nach circa vier bis sieben Tagen präkonfluent war, erfolgte die Passage. Damit ist gemeint, dass die Zellen neu ausgesät und dabei im Verhältnis 1:3 mit neuem Medium verdünnt wurden. Somit wurden aus einer Flasche drei neue Zellkulturflaschen oder drei 12-Well-Platten oder 36 Flusskammerwells neu kultiviert. Benutzt wurden Monolayer, die zu 80% konfluent waren, da bei diesen die Endothelzellen noch teilungsfreudig sind. Weil die Zellen adhärent wachsen, mussten sie aus den Flaschen mit dem Enzym Trypsin ausgelöst werden. Um eine Schädigung der Zellen durch das Trypsin zu vermeiden, wurde es so niedrig wie nötig dosiert und sobald sich die

Zellen vom Flaschenboden lösen, inhibiert. Zur Erleichterung der Ablösung entzog man den Zellen davor mit Hanks Buffered Saline (HBSS) Calcium. Um den richtigen Zeitpunkt, nämlich bei Annahme einer rundlichen Form, für das Neutralisieren mit Trypsin Neutralizing Solution (TNS) nicht zu verpassen, beobachtete man das Ablösen der Zellen unter dem Mikroskop.

Durchführung:

- HBSS, Trypsin und TNS auf 37°C erwärmen, Zellen mikroskopisch kontrollieren.
- Verbrauchtes Medium abziehen und vorsichtig 10ml HBSS in ein Eck der leicht schräg gestellten Flasche füllen, leicht schwenken und das HBSS nach 30 Sekunden wieder abpipettieren.
- 7ml Trypsin in die Flasche füllen bis sich unter mikroskopischer Kontrolle die Endothelzellen ablösen. Zum Neutralisieren sofort 7ml TNS zugeben.
- Mit einer Stripette die Flasche mehrmals mit ihrem Inhalt spülen.
- Den Flascheninhalt nun in das bereitgestellte Polypropylen-Röhrchen abpipettieren, mit 4ml HBSS spülen und dieses auch in das 50ml Pellet-Röhrchen geben.
- Zentrifugation der Zellen bei 1100U/min, 5 Minuten, RT und mit Bremse. Das Pellet in Kulturmedium resuspendieren.
- Je nach der folgenden Versuchsanordnung, die Zellen auf 75cm² Zellkulturflaschen, 12-Well-Platten oder Flusskammerwells passagieren.
- Für eine Zellkulturflasche werden 17ml Zellsuspension, für die 12-Well-Platte werden 12x1 ml und für ein Flusskammerwell wird 1ml Zellsuspension benötigt. Dabei sind die 75cm²-Zellkulturflaschen und die 12-Well-Platten gebrauchsfertig mit Collagen beschichtet. Die Flusskammerwells werden dagegen aus einem mit Alkohol gereinigtem Deckglas aus Borosilikat und selbstklebenden Silikondichtungen hergestellt. Die Silikondichtung (5mm dick, sechseckig) reinigen und auf das Deckglas aufkleben. Anschließend die Zellkulturträger bei 120°C zwei Stunden

autoklavieren. Bevor die Endothelzellen auf den Zellkulturträger aufgetragen werden, wird er mit Collagen A beschichtet. Das Collagen A mit PBS+ auf eine Gebrauchskonzentration von 0,2mg/ml verdünnen und je 1ml Suspension pro Well 50 Minuten lang bei RT einwirken lassen. Das Gemisch nach der Inkubationszeit abpipettieren und jedes Well mit 600µl PBS+ spülen.

- Nun die Endothelzellen im Medium sofort auf jedes Well auftragen. Am darauffolgenden Tag das Kulturmedium wechseln. Am dritten Tag nach der Passage wird der konfluente Monolayer für den Versuch verwendet.

2.2 Monozytenisolation

Die Isolation der Monozyten aus frisch gewonnenem Blut eines Spenders erfolgte über eine Auftrennung der Blutbestandteile durch einen Ficoll-Dichtegradienten in mehrere Banden. Zunächst wurden die mononukleären Zellen abgetrennt, um dann aus ihnen im magnetischen Zellseparator mittels Positivselektion die CD33 markierten Monozyten zu isolieren. Dieses Verfahren hatte sich in vergleichenden Untersuchungen gegenüber der Depletion, ohne direkte Markierung der Monozyten, als überlegen erwiesen.⁶⁹

2.2.1 Dichtegradientenzentrifugation

Da sich die einzelnen Blutbestandteile in ihrer Dichte unterscheiden, konnten die mononukleären Zellen von den anderen Bestandteilen des Blutes getrennt werden. Dazu wurde verdünntes Citratblut vorsichtig auf Ficoll aufgeschichtet. Das Ficoll hat eine Dichte von 1,077g/l. Mononukleäre Zellen haben eine geringere Dichte als das Ficoll, somit sammelten sie sich nach der Zentrifugation über dem Ficoll an und konnten mit einer Pipette abgezogen werden. Die restlichen Blutbestandteile sind schwerer. Auf dem Boden des

Röhrchens bildete sich ein Pellet aus Erythrozyten, Granulozyten und Thrombozyten welches verworfen wurde.

Wichtig für eine gute Isolation von Monozyten sind die Verdünnung des Blutes, das Verhältnis von Ficoll und Blut und die Zentrifugationsgeschwindigkeit von 1600U/min. Die Temperatur von Ficoll und Zentrifuge soll zwischen 15°C und 22°C liegen. Alle Isolationsschritte nach der Dichtegradientenzentrifugation fanden bei 4°C statt, um ein mögliches Shedding von L-Selektin zu vermeiden. Die Zellen wurden deshalb immer auf Eis gelagert.

Vor der magnetischen Zellseparation der Monozyten aus den mononukleären Zellen wurde die Anzahl der mononukleären Zellen im Coulter counter® bestimmt. Das Gerät misst über eine Kapillaröffnung Widerstände, die durch die hindurchströmenden Zellen verursacht werden. Auf dem Display des Gerätes wurden dann die Anzahl der Zellen und die Zellgröße auf einem Histogramm abgelesen:

- die Größe der mononukleären Zellen liegt zwischen 5,5µm und 10,5µm
- die Größe der Monozyten liegt zwischen 8,0µm und 10,5µm

Anhand des Verhältnisses von mononukleären Zellen zu Monozyten konnte die Reinheit des Isolats berechnet werden.

Durchführung:

Alle Arbeitsschritte werden unter Flow durchgeführt:

- Abnahme von Vollblut (Ausbeute: ca. $1-2 \times 10^6$ MNC pro 10ml Citratblut).
- Citratblut mit PBS- bei RT 1:1 verdünnen und in einem Polypropylen-Röhrchen je 25ml verdünntes Citratblut auf je 16ml Ficoll aufschichten.
- Zentrifugation bei 1600U/min, RT, 40 Minuten, ohne Bremse.
- Absaugen der Banden aus mononukleären Zellen mit einer Eppendorf-Pipette und sofortiges Überführen je einer Bande aus mononukleären Zellen in je ein auf Eis gestelltes Polypropylen-Röhrchen.
- Ab jetzt: alle Isolationsschritte bei 4°C durchführen.
- Die Polypropylen-Röhrchen mit kaltem PBS- auf 50ml auffüllen.

- Zentrifugation mit 1100U/min mit Bremse, 10 Minuten, 4°C
- Überstand abgießen und die Röhrrchen auf 50ml mit NH₄Cl zur Lyse (um Erythrozytenkontaminationen zu vermeiden) auffüllen.
- Alle Röhrrchen mischen und 10 Minuten lang auf Eis stellen.
- Zentrifugation mit 1100U/min mit Bremse, 10 Minuten, 4°C, Überstand abgießen.
- Alle Zellpellets mit 5ml PBS⁻ in ein Polypropylen-Röhrrchen überführen, jedes Röhrrchen mit 5ml PBS⁻ gründlich nachspülen.
- Polypropylen-Röhrrchen nochmals zur Lyse auf 50ml füllen, 10 Minuten auf Eis.
- Zentrifugation mit 1100U/min mit Bremse, 10 Minuten, 4°C.
- Überstand abkippen, das Pellet mit kaltem PBS⁻ auf 20ml auffüllen, mischen.
- 2 µl zur Zellzahlbestimmung im Coulter counter® entnehmen.
- Zentrifugation mit 1100U/min mit Bremse, 10 Minuten, 4°C, Überstand abgießen.
- Pellet auf Eis lagern.

2.2.2 Magnetische Zellseparation (MACS®, magnetic activated cell sorting)

Bei dieser Positivselektion wurden die Monozyten von den übrigen mononukleären Zellen getrennt. Dazu erfolgte die Kennzeichnung der Monozyten in der Zellsuspension aus mononukleären Zellen mit metallischen CD33-Beads. Die markierten Monozyten wurden dann beim Durchlaufen einer metallischen Säule, die sich in einem Magnetfeld befand, in der Säule zurückgehalten und somit von den anderen Zellen, die die Säule verließen, getrennt. Anschließend wurde die Säule aus dem Magnetfeld genommen, um die Monozyten durch Spülvorgänge mit PBS⁻ aus der Säule zu entfernen.

Vorbereitungen zur Durchführung der Zellseparation:

- 200ml Selektionspuffer herstellen:
167ml PBS-, 20ml 10%ige Acid Citrate Dextrose, 13ml 0,5%iges Albumin Bovine Solution mischen und mit dem pH-Meter auf einen pH-Wert von 7,2 einstellen. Die Lösung 30 Minuten lang im Wasserbad mit Hilfe von Ultraschallwellen entgasen und dann steril filtrieren. Anschließend auf 4°C abkühlen.
- Das Pellet aus mononukleären Zellen mit 80µl Puffer pro 10^7 Gesamtzellen und 20µl CD33-Micro Beads pro 10^7 Gesamtzellen resuspendieren, auf dem Vortexer mischen und 30 Minuten lang bei 4°C inkubieren.
- Mit MACS-Puffer (10-20fache Menge des Markierungsvolumens) auffüllen, Überstand abgießen.
- Zugabe von 500µl MACS-Puffer pro 10^8 Gesamtzellen, bei weniger Zellen trotzdem 500µl Puffer hinzufügen.

Durchführung der Zellseparation:

- Die Flowresistoren (22G und 23G-Kanülen), die Spritze, den Drei-Wege-Hahn und die AS- oder BS-Säulen vorkühlen. Die AS-Säulen werden für bis zu 10^8 Gesamtzellen, die BS-Säulen für mehr als 10^8 Gesamtzellen verwendet.
- Spritze mit Puffer füllen und Einzelteile entsprechend der Herstellerempfehlung montieren. Im System dürfen keine Luftblasen entstehen.
- Drei-Wege-Hahn nach unten schließen, über die Spritze die Säule retrograd mit Puffer füllen. Die Depletionssäule vorsichtig in das VarioMACS® einspannen.
- Den Drei-Wege-Hahn nach unten öffnen, damit der Puffer aus der Säule in ein Polypropylen-Röhrchen ablaufen kann. Damit die Säule nicht leerlaufen kann, muss ständig über ihre obere Öffnung Puffer nachgefüllt werden bis

bei einer AS-Säule ein Spülvolumen von 10ml und bei einer BS-Säule ein Spülvolumen von 30ml im Polypropylen-Röhrchen erreicht wird. Jeweils die letzten 5ml des Puffers laufen bei montiertem Flow-Resistor, einer 23G-Kanüle, in das Polypropylen-Röhrchen ab.

- Die mit 500µl Puffer resuspendierte und magnetisch markierte Zellsuspension von oben mit einer Pipette in die mit Puffer vorgefüllte Säule pipettieren. Die Negativfraktion in einem neuen Polypropylen-Röhrchen sammeln.
- Den Flow-Resistor auf eine 22G-Kanüle wechseln.
- Einen "back-flush" zur Steigerung der Reinheit der isolierten Zellen durchführen: den Drei-Wege-Hahn nach unten schließen und die Säule aus dem VarioMACS® entnehmen. Erneut die Säule über die Spritze mit Puffer füllen, wieder vorsichtig in das VarioMACS® einspannen und den Drei-Wege-Hahn nach unten öffnen.
- Die AS-Säule mit insgesamt 3ml Puffer, die BS-Säule mit insgesamt 15ml Puffer spülen. Die Negativfraktion im Polypropylen-Röhrchen immer auf Eis lassen.
- Nachdem das „Waschvolumen“ erreicht ist, den Drei-Wege-Hahn nach unten schließen und die Säule aus dem Magnetfeld nehmen.
- Die Positivfraktion aus der Säule isolieren. Dazu die Säule um 180° drehen und über die Spritze mit Puffer durchspülen, um die gewonnene Positivfraktion in einem auf Eis gestellten Polypropylen-Röhrchen zu sammeln.
- Die Spritze vom Drei-Wege-Hahn lösen, mit Puffer füllen, wieder aufstecken und die Säule retrograd mit Puffer durchspülen bis sich 15ml Positivfraktion im Polypropylen-Röhrchen befinden. Zwei Mal mit der Spritze Luft durch die Säule spritzen.
- Im Coulter counter® die Zellzahl der Negativ- und der Positivfraktion bestimmen.

- Zentrifugation der Positivfraktion mit 1100U/min mit Bremse, 10 Minuten, 4°C.
- Überstand abkippen. Das Zellpellet mit PBS- auf 20ml auffüllen.
- Zentrifugation mit 1100U/min mit Bremse, 10 Minuten, 4°C.
- Überstand abkippen und Zellen bis zum Gebrauch bei 4°C in einer geringen Menge PBS- aufbewahren.

2.3 Granulozytenisolation

Die Isolation der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten erfolgte aus frisch gewonnenem Vollblut eines Spenders über die Dichtegradientenzentrifugation mittels Percoll. Vor Isolation der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten aus Vollblut wurden die Blutzellen je nach Versuchsaufbau mit dem fluoreszenten Marker Calcein angefärbt. Diese Anfärbung diente im eigentlichen Versuchsablauf der optischen Differenzierung von Zellen aus statischen Cokulturen und Zellen im Perfusat. Nur die Zellen für das Perfusat wurden markiert.

2.3.1 Fluoreszenzfärbung der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten mit Calcein

Calcein ist ein Acetoxymethylesterderivat (AM-Ester) eines Fluoreszenzfarbstoffes. Das lipophile Molekül durchdringt die Zellmembran der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten. Der AM-Ester ist farblos und fluoresziert erst, wenn er im Zellinneren hydrolysiert wird. Die Konzentration des AM-Esters soll so gering wie nötig sein, um eine inkomplette Hydrolyse oder toxische Reaktion, wie zum Beispiel die Bildung von Formaldehyd, zu verhindern. Pro Milliliter Blut wurden deshalb 10µl Calcein verwendet.

2.3.2 Dichtegradientenzentrifugation mit Percoll

Die einzelnen Blutbestandteile unterscheiden sich in ihrem Gewicht und ihrer Dichte. Aufgrund der unterschiedlichen Sedimentation der einzelnen Blutbestandteile beim Zentrifugieren war eine Auftrennung des frisch abgenommenen Blutes möglich. Mit Hilfe der diskontinuierlichen Percoll-Dichtegradientenzentrifugation entstanden verschiedene Banden, aus welchen dann die polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten isoliert werden konnten. Zur Durchführung wurden zwei Percoll Medien unterschiedlicher Dichte und eine Schicht Citratblut bei Raumtemperatur in einem Gewebekulturröhrchen übereinander geschichtet. Nach der Zentrifugation zeigten sich von oben nach unten folgende Banden:

Erythrozyten
polymorphkernige neutrophile Granulozyten
Monozyten und Thrombozyten
Plasma

Die polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten wurden mit einer Pipette abgezogen und bei 4°C weiter verarbeitet, um eine Veränderung der Adhäsionsmoleküle zu vermeiden.

Vorbereitung:

Herstellung zweier Percoll-Medien mit unterschiedlicher Dichte:

- Ansetzen von 63%-igem Percoll (100ml):
62,9 ml Percoll mit der Dichte von 1,131 mit 6,06ml 10xPBS- und 30ml PBS-mischen.
- Ansetzen von 72%-igem Percoll (100ml):
71,94ml Percoll mit der Dichte 1,131 mit 8,06ml 10xPBS- und 20ml PBS-mischen.

4ml des 63%-igen Percoll-Mediums mit einer Pipette in ein Gewebekulturröhrchen geben. Dann das 63%-ige Percoll mit 4ml 72%-igem Percoll mittels einer 25G-Spinocan-Kanüle unterschichten.

Herstellung von Lysereagenz zur Vermeidung einer Erythrozytenkontamination:

- 1000ml destilliertes Wasser, 840mg Ammoniumchlorid, 3500mg EDTA und 168mg Natriumbicarbonat sorgfältig mischen, steril filtrieren und auf 4°C abkühlen.

Durchführung:

Für einen hohen Reinheitsgrad der isolierten Zellen war es wichtig, dass das Percoll und das Citratblut eine Temperatur von 20°C aufwiesen. Nach Zentrifugation und Abpipettieren der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten wurden die Zellen bis zum Versuchsbeginn immer bei 4°C aufbewahrt.

- Abnahme von Citratblut; hiervon 4ml vorsichtig auf die beiden Percoll-Schichten pipettieren.
- Zentrifugation mit 1700U/min, ohne Bremse, 29 Minuten lang, bei 20°C.
- Abpipettieren der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten Bande und Sammeln in einem auf Eis gestellten Polypropylen-Röhrchen. Ab jetzt alle Schritte bei 4°C.
- Das Röhrchen auf 50ml mit Lysereagenz auffüllen, 10 Min inkubieren.
- Zentrifugation mit 1000U/min, mit Bremse, 10 Minuten lang, bei 4°C.
- Den Überstand abkippen und das Röhrchen mit PBS- auf 50ml auffüllen.
- Zentrifugation mit 1000U/min, mit Bremse, 10 Minuten lang, bei 4°C.
- Den Überstand abkippen. Zur Lyse auf 50ml auffüllen, 10 Min. inkubieren.
- Zentrifugation mit 1000U/min, mit Bremse, 10 Minuten lang, bei 4°C.
- Den Überstand abkippen. Das Pellet in 1ml Medium 199 und FCS im Verhältnis 1:1 resuspendieren.
- Bestimmung der Anzahl an polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten im Coulter counter®. Pellet bei 4°C lagern.

2.4 Stimulation mit Lipopolysaccharid

Auf den mit Lipopolysaccharid stimulierten Wells wurde im Durchflusszytometer die Expression von Adhäsionsmolekülen im Vergleich zu den unstimulierten und im Vergleich zu den mit Monozyten oder polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten stimulierten Wells gemessen. In der Flusskammer wurde das Rolling und Sticking auf den Lipopolysaccharid stimulierten Wells im Vergleich zu den unstimulierten oder Monozyten beziehungsweise polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten stimulierten Wells überprüft.

Zur Stimulation von Flusskammer-Wells und Wells auf 12-Well-Platten wurde das Endothel mit Lipopolysaccharid von *Escherichia coli* (Stamm 026:B6) inkubiert. Im Trägermedium wurde Lipopolysaccharid in einer Konzentration von 100ng pro ml verwendet. Als Trägermedium wurde pro Well 1ml EGM (Endothelial Cell Growth Medium) plus 20% FCS (Fetales Kälber Serum, nicht hitzeinaktiviert) auf das Endothel gegeben. Die mit Lipopolysaccharid stimulierten Wells wurden dann 4 Stunden lang bei 37,0°C im Brutschrank inkubiert. Unabhängig von der Stimulation war die Inkubationszeit bei allen Wells gleich lang.

2.5 Cokulturen

In den durchgeführten Versuchen gab es dynamische und statische Cokulturen.

Statische Cokulturen:

Die statischen Cokulturen dienten zur Messung der Adhäsionsmolekülexpression im Durchflusszytometer. Für die statischen Cokulturen wurden auf das mit Endothel bewachsene Well je nach Versuchsaufbau Monozyten oder Granulozyten in unterschiedlicher Anzahl im Trägermedium gegeben. In jedem Versuch wurden die

statischen Cokulturen immer mit 250 000, 500 000 und 1 000 000 Monozyten oder Granulozyten angelegt. Nach der vierstündigen Inkubationszeit wurden alle Wells abgezogen und jedes Well zwei Mal mit je 1ml PBS+ gewaschen. Dann folgte die Fluoreszenzfärbung der Zellen, um anschließend im Durchflusszytometer die Expression der Adhäsionsmoleküle CD62E, CD14 und CD54 quantifizieren zu können.

Zum quantitativen Vergleich der Adhäsionsmolekülexpression wurde pro Versuch zusätzlich ein Well als Monokultur belassen, also nicht mit Monozyten oder Granulozyten inkubiert. Ein weiteres Well wurde nur mit Lipopolysaccharid inkubiert.

Dynamische Cokulturen:

Die dynamischen Cokulturen wurden für die Flusskammer verwendet. Diese Versuchsserien bestimmten das Rolling und Sticking der jeweils zu untersuchenden Zellen unter Schubspannung.

Je nach Fragestellung wurden 250 000 Monozyten oder Granulozyten in 1ml Trägermedium (EGM und FCS) auf das Endothel gebracht. Die dynamischen Cokulturen wurden dann 4 Stunden lang bei 37°C im Brutschrank inkubiert, anschließend gewaschen und umgehend in der Flusskammer verwendet.

Für die Flusskammerversuche benötigte man immer 6 Wells pro Versuch. Aus 4 Wells wurden dynamische Cokulturen hergestellt, wobei 3 von diesen nach der Inkubationszeit mit jeweils unterschiedlichen Antikörpern blockiert wurden. Die anderen beiden Wells wurden als dynamische Monokultur zum Vergleich beibehalten. Eine der beiden Monokulturen wurde vor der Inkubationszeit mit Lipopolysaccharid stimuliert. Auch die Monokulturen wurden nach Ablauf der Inkubationszeit mit PBS+ gewaschen.

2.6 Monoklonale Antikörper

Bei jedem Flusskammerversuch wurden 3 der 4 dynamischen Cokulturen mit Antikörpern blockiert. Die Antikörper richteten sich gegen die Adhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche und sollten, je nach Blockade des entsprechenden Oberflächenmoleküls, das physiologische Rolling oder Sticking auf dem Endothel verhindern.

Dazu wurden die Antikörper in der jeweils erforderlichen Konzentration sowohl direkt auf das Well als auch in das Perfusat gegeben. Folgende Antikörper kamen bei dieser Versuchsreihe zum Einsatz:

- Anti-CD62E (CD entspricht "cluster of differentiation")
- Anti-CD62L
- Anti-CD18

Durchführung:

Antikörper auf HUVEC geben:

- Trägermedium aus Medium 199 plus 1% BSA herstellen.
- Anti-CD62E und Anti-CD62L jeweils in einer Konzentration von 10µg/ml in 0,5ml Trägermedium geben und mischen.
- Anti-CD18 in einer Konzentration von 1,0mg/ml in Trägermedium geben und mischen.
- Auf jedes Well vorsichtig das jeweilige, mit Antikörper gemischte, Trägermedium pipettieren.
- 30 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubieren.
- Sofortige Verwendung in der Flusskammer.

Antikörper in das Perfusat geben:

- Die polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten in Medium 199 plus 1% BSA resuspendieren.

- Den entsprechenden Antikörper in der Konzentration von 10µg/ml für Anti-CD62E und Anti-CD62L, in der Konzentration von 1mg/ml für Anti-CD18 in das Perfusat geben und gut mischen.
- Das Perfusat sofort in der Flusskammer verwenden.

2.7 Markierung mit Antikörpern

Dieses Verfahren war nötig, um die Zellen im Durchflusszytometer auf die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle, die zur Zelladhäsion essentiell sind, zu untersuchen. Zur Markierung wurden Fluorochrom-konjugierte Antikörper verwendet. In dieser Versuchsreihe kamen Antikörper gegen die Oberflächenmoleküle CD14, CD62-E und CD54 zum Einsatz.

Durchführung:

Mit allen zu untersuchenden Zellen wurde gleich verfahren. Im Anschluss an die 4 Stunden Inkubationszeit nach Stimulation des Endothels mit den jeweiligen Zellen beziehungsweise mit Lipopolysaccharid wurden die 12-Well-Platten folgendermaßen markiert (Abbildung Nr. 1):

- Alle Wells mit einer Pipette abziehen.
- Jedes Well zwei Mal mit je 1ml 37°C warmen PBS+ waschen.
- In alle Wells je 160µl EGM gemischt mit 40µl FCS pipettieren.
- Je 60µl Anti-CD54 PE in folgende Wells geben: 2, 3, 5, 7, 10, 11 (siehe Abbildung Nr. 1)
- Je 30µl Anti-CD62-E in folgende Wells geben: 2, 3, 5, 6, 7, 11
- Je 30µl Anti-CD14-PC5 in folgende Wells geben: 2, 3, 5, 7, 11

- Die 12-Well-Platte auf dem Schüttler 20 Minuten lang bei Raumtemperatur markieren und danach alle Wells abziehen.
- 500µl HBSS für 60sec auf jedes Well geben, dann abziehen.
- 350µl Trypsin auf jedes Well geben. Unter dem Mikroskop kontrollieren wann sich die Endothelzellen vom Boden des Wells ablösen und sofort
- 350µl TNS zur Neutralisation zufügen.
- Die 700µl Zellsuspension in ein Polypropylen-Röhrchen pipettieren und umgehend im Durchflusszytometer untersuchen.

1	2	3	4
Endothelzellen + Isotyp-Kontrolle	Endothelzellen + Lipopolysaccharid + Anti-CD14,-54,-62	Endothelzellen + 1 Mio Monozyten oder Granulozyten + Anti-CD14,-54,-62	leer
5	6	7	8
Endothelzellen + Anti-CD14,-54,-62	Endothelzellen + Lipopolysaccharid + Anti-CD62	Endothelzellen + 0,5 Mio Monozyten oder Granulozyten + Anti-CD14,-54,-62	leer
9	10	11	12
leer	Endothelzellen + Lipopolysaccharid + Anti-CD54	Endothelzellen + 0,25 Mio Monozyten oder Granulozyten + Anti-CD14,-54,-62	leer

Abbildung Nr. 1: Aufteilung der 12-Well-Platte zur Untersuchung der Expression von Adhäsionsmolekülen im Durchflusszytometer.

2.8 Brefeldin A

Brefeldin A diente der Blockade des intrazellulären Transports. Die mit Hilfe der Magnetseparation isolierten Monozyten wurden 5 Stunden lang mit Brefeldin A inkubiert. Ein Drittel der isolierten Monozyten wurde mit 2,5µg/ml, ein Drittel mit 5µg/ml und ein Drittel mit 10µg/ml Brefeldin A inkubiert. Die Zellen mussten dazu immer auf Eis stehen und mit Alufolie vor Lichteinstrahlung geschützt werden. Im Anschluss wurden die Monozyten gewaschen und in 1ml Trägerflüssigkeit wurden 250 000 Monozyten pro Well auf das Endothel zur vierstündigen Inkubation pipettiert. Dann wurde das Trägermedium abpipettiert, die Zellen im Well ausgelöst, mit Antikörpern markiert und umgehend im Durchflusszytometer untersucht.

Durchführung:

- Das Brefeldin A in folgenden Konzentrationen zu den Monozyten geben: 2,5µg/ml, 5µg/ml und 10µg/ml jeweils in ein Drittel der Monozyten.
- 5 Stunden lang bei 4°C und vor Lichteinwirkung geschützt inkubieren.
- Zentrifugation mit 1100U/min, mit Bremse, 10 Minuten bei 4°C.
- Je 250 000 inkubierte Monozyten in den jeweils verschiedenen Brefeldin A Konzentrationen in je 1ml Trägerflüssigkeit auf je ein Well geben.
- Die 12-Well-Platte 4 Stunden lang bei 37°C im Brutschrank inkubieren.
- Die Zellen mit den jeweiligen Antikörpern markieren, auslösen und sofort im Durchflusszytometer untersuchen.

2.9 Flusskammer

Zur Untersuchung von Rolling und Sticking simulierte die mikroskopierbare Flusskammer die Bedingungen, die in der postkapillären Mikrozirkulation vorliegen. Dazu wurden die endothelbewachsenen Wells als Mono- oder

Cokulturen mit polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in Medium 199 perfundiert. Zum Teil wurden zur Blockade der Adhäsionsmoleküle Antikörper (Anti-CD18, -CD62E, -CD62L) in gleicher Konzentration auf die HUVEC als auch in das Perfusat gegeben.

Dabei wurden pro Versuch sechs verschiedene Wells verwendet:

- Ein Well als Monokultur, das heißt, es bestand nur aus dem Endothelrasen.
- Ein Well als Lipopolysaccharid stimulierte Monokulturtur.
- Ein Well als Cokultur aus Endothelrasen plus 250 000 Monozyten oder polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten.
- Ein Well als Cokultur aus Endothelrasen plus 250 000 Monozyten oder polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten plus Anti-CD18.
- Ein Well als Cokultur aus Endothelrasen plus 250 000 Monozyten oder polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten plus Anti-CD62E.
- Ein Well als Cokultur aus Endothelrasen plus 250 000 Monozyten oder polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten plus Anti-CD62L.

2.9.1 Aufbau der Flusskammer, Versuchsdurchführung

Der Arbeitsplatz bestand aus einem inversen Mikroskop, einer Flusskammer, einer Farbkamera, einem Videorecorder und einem Computer zur digitalen Bildverarbeitung. Die Flusskammer war auf dem Objektisch des inversen Fluoreszenzmikroskops fixiert. Sie besteht aus einem Metallgehäuse, welches an einen Wasserstrom angeschlossen war und über diesen temperiert werden konnte. Die Zellsuspensionen wurden somit erst bei der Versuchsdurchführung auf 37°C erwärmt, um einer Veränderung der Adhäsionsmolekülexpression entgegen zu wirken. In das Metallgehäuse wurden zur Versuchsdurchführung die Zellkulturträger eingesetzt. Nach oben wurde die Kammer mit einem durchsichtigen Makrolonblock verschlossen. Über Markierungen auf dem Schraubring des Metallgehäuses konnte die Kammerhöhe, als Maß des

Abstands zwischen Zellkulturträger und Makrolonblock definiert werden. An beiden Enden des Makrolonblocks befand sich je ein Einlass beziehungsweise ein Auslass. Der Einlass wurde mit einem Perfusor verbunden. In der Spritzenpumpe (Harvard Apparatus, PHD 2000) befand sich das zur Perfusion des Endothels nötige Medium. (Abbildung Nr. 2). Je nach Versuch bestand die Zellsuspension im Perfusat aus Monozyten oder Granulozyten mit einer Konzentration von 10^6 Zellen pro ml im Trägermedium plus, je nach Fragestellung, einem Antikörper im Perfusat. Bevor das jeweilige Medium superfundiert wurde, wurde die Kammer luftblasenfrei mit entgastem Medium 199 gefüllt. Mithilfe des Perfusors konnte die jeweils gewünschte Flussrate eingestellt werden. Nachdem die Zellsuspension den Endothelrasen perfundiert hatte, wurde sie über den Auslass im Makrolonblock abgeleitet und in einem Erlenmeyerkolben aufgefangen.

An das Mikroskop (DMIRB, Leica, Bensheim) war eine Videokamera (Sony/AVT Horn) angeschlossen. Die Kammer wurde über das 20-fache Objektiv am Mikroskop vergrößert. Auf einem angeschlossenen Videomonitor wurde die Bild- und Flussqualität auf einem 200-fach vergrößerten Bildausschnitt beobachtet und bei Bedarf korrigiert. Da die Granulozyten im Perfusat mit Calcein angefärbt waren, konnten sie über das Fluoreszenzlicht selektiv sichtbar gemacht werden. Jedes Well wurde 10 Minuten lang perfundiert. Über einen an die Kamera angeschlossenen Videorecorder (Sony) wurde dieser Zeitraum auf einem Videoband aufgenommen. Nachdem das Well neun Minuten lang perfundiert wurde, wurden fünf zufällig ausgewählte Bildausschnitte jeweils 11 Sekunden lang zusätzlich zur Videoaufnahme über einen Framegrabber (CFG 512) auf eine Computerfestplatte als Bitmaps gespeichert. Diese Bitmaps dienten später der computergestützten Auswertung und quantitativen Bestimmung der Roller und Sticker auf den jeweiligen Wells. Ein digitalisiertes Bild wird frame genannt.

Eine Bitmap besteht aus 276 frames. Nur 250 frames wurden zur Auswertung verwendet.

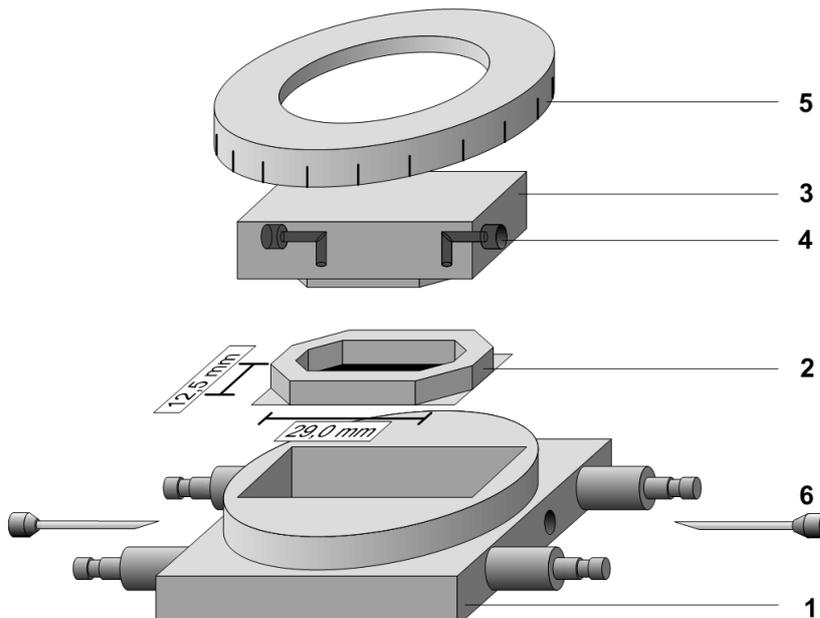


Abbildung 2: Schema zum Aufbau der Flusskammer.

Temperierbares Metallgehäuse mit Anschlüssen für Umlaufheizung (1), Zellkulturträger mit Silikondichtung (2), transparenter Makrolonblock zur Möglichkeit der Videoaufnahme, Einlass (4), skaliertes Schraubring zur Höheneinstellung (5), Anschluß der Spritzenpumpe mit Leukocytensuspension (6).

2.9.2 Physikalische Grundlagen

Die Flussrate entsprach dem einzigen variierten Parameter im Versuchsablauf. Die Kammergeometrie ist durch die Höhe und Breite der Flusskammer genau definiert. Die Höhe wurde durch den Schraubring auf 0,02cm eingestellt, die Breite der Kammer betrug 1,25cm, vorgegeben durch die Breite der Silikondichtungen der Flusskammerwells. Die Viskosität der

Zellsuspension war bekannt ($\mu = 0,007P$). Durch die Flussgeschwindigkeit ließ sich die unterschiedliche Schubspannung, die während der Kammerpassage auf die Zellen im Perfusat wirkte, bestimmen. Die Einheit der Schubspannung ist dyn/cm^2 . Der Schubspannung hat die Dimension eines Drucks und ist die wichtigste, der Adhäsion an der Gefäßwand entgegenwirkende Kraft. Die Versuche wurden bei 2dyn/cm^2 (physiologische Schubspannung) und bei $0,25\text{dyn/cm}^2$ durchgeführt. Der notwendige Perfusatfluss konnte, abhängig von der gewünschten Schubspannung, nach folgender Formel berechnet werden:

$$Q = (h^2 \cdot b \cdot \tau_w) / 6\mu$$

wobei:

Q	= Flussgeschwindigkeit in ml/s
h	= Kammerhöhe in cm (hier 0,02cm)
b	= Kammerbreite in cm (hier 1,25cm)
τ_w	= Schubspannung in dyn/cm^2
μ	= Viskosität (P)

2.10 Quantitative Auswertung der Zelladhäsion

Die gesamte Perfusionszeit von 10 Minuten pro Well wurde mit dem Videorecorder auf ein Videoband aufgezeichnet. In der 10. Minute kamen 5 jeweils 11 Sekunden dauernde Bildausschnitte zur Aufnahme. Diese 5 Bildsequenzen wurden im folgenden Arbeitsschritt als 11 Sekunden dauernde Bitmaps auf CD's gebrannt. Mit der Software Cell Tracker (C. Zanke, Universität Tübingen) wurde dann die Anzahl der Roller und Sticker für 10 Sekunden der Bildsequenz ausgewertet. Das Programm bestimmte Rollinggeschwindigkeiten nach Definition einer kritischen Geschwindigkeit und maß die Adhäsion in Zellen pro Bildfeld. Diese konnte dann in Zellen pro mm^2 umgerechnet werden.

Definition von Rollern und Stickern:

- Als Sticker wurden alle Zellen gewertet, die sich innerhalb von 10 Sekunden weniger als einen Zelldurchmesser bewegten.
- Als Roller wurden alle Zellen definiert, die sich innerhalb von 10 Sekunden mehr als einen Zelldurchmesser bewegten.
- Die Maximalgeschwindigkeit eines Rollers betrug $100\mu\text{m/s}$ bei 2dyn/cm^2 und $49\mu\text{m/s}$ bei $0,25\text{dyn/cm}^2$. Alle Zellen, die diese Maximalgeschwindigkeit überschritten, gingen nicht in die Auswertung ein.
- Sobald zwei Roller miteinander kollidierten, wurde die Berechnung der Strombahn und der Geschwindigkeit am Kollisionspunkt beendet.

2.11 Durchflusszytometrie

Das Durchflusszytometer oder FACS® (fluorescence activated cell sorting) ist ein optisches Meßsystem, das als Lichtquelle einen Argon-Laser besitzt. Für die Versuche wurde das Durchflusszytometer FACSort und die Software CellQuest 3.1 (Becton Dickinson, San Jose, CA) verwendet.

Mit dem Durchflusszytometer werden Streulicht- und Fluoreszenzsignale nach dem Prinzip der angeregten Emission zur Analyse bereitgestellt. Mit diesen Signalen konnte eine Aussage zur Zellmorphologie und somit zur Qualität der Zellisolation und zur Menge an Adhäsionsmolekülen getroffen werden. Dabei wurde die mittlere Fluoreszenzintensität [MFI] von 5000 bis 10000 Zellen pro Probe bestimmt. Die Zellen, die sich in den Proben zur Messung befanden, mussten vorher markiert werden. Das bedeutet, sie wurden mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern, die an bestimmte Oberflächenepitope auf den Zellen

binden, inkubiert. Dabei war jeder Antikörper spezifisch für ein bestimmtes Oberflächenmolekül.

Über eine Ansaugvorrichtung wurden Zellen aus der Probe angezogen und im Flüssigkeitsstrom der Reihe nach am Argon-Laser vorbeigeleitet. Durch die Laserbeleuchtung kam es zur Anregung des Fluorochrom-Farbstoffes. Dabei absorbierten die verschiedenen Fluorochrome Licht in den unterschiedlichen Wellenlängen. Durch die Anregung des Farbstoffes werden Elektronen in den Schalen der Atome auf ein höheres Energieniveau angehoben. Beim Rücksprung der Elektronen auf ihr ursprüngliches Energieniveau wird durch Photonen Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert. Je eine Wellenlänge ist charakteristisch für ein bestimmtes Fluorochrom, das heißt, die Emissionsspektren sind abhängig von den verwendeten Antikörpern. Das emittierte Licht wurde über Sammeloptiken aufgefangen und über Lichtverstärker zu elektrischen Signalen umgewandelt. Die elektrischen Signale sind proportional zur Fluoreszenzintensität und zu den zellulären Eigenschaften. Durch Weiterleitung an das Auswertungsprogramm wurden die Ergebnisse in Histogrammen oder sogenannten "dot plots" graphisch dargestellt. Die Streulichtsignale ermöglichen eine morphologische Zuordnung der Zellen. Dabei wird zwischen dem Vorwärtsstreulicht (FSC) und dem Seitwärtsstreulicht (SSC), welches in einem Winkel von 90° gemessen wird, unterschieden. Das Vorwärtsstreulicht gibt die Zellgröße an, das Seitwärtsstreulicht die Zellgranularität. Durch diese Parameter konnte eine Aussage zum Reinheitsgrad der Isolation gemacht werden.

Auswertung:

Die Geräteeinstellung wurde vor Versuchsbeginn an die Morphologie der zu untersuchenden Zellen angepasst und mit unspezifischen Isotyp-Antikörpern festgelegt. Untersucht wurden die zellulären Oberflächenmoleküle CD62L, CD54E und CD14.

2.12 Statistische Auswertung der Daten

Mit dem Softwareprogramm JMP®, Version 3. (SAS Institute, Cary, N. Y.) erfolgte die statistische Auswertung der Daten.

2.13 Tabellarische Auflistung der verwendeten monoklonalen Antikörper, Reagenzien, Materialien und Geräte

Tabelle 1: monoklonale Antikörper

<u>Monoklonale Antikörper</u>	<u>Bestellnummer</u>	<u>Hersteller</u>
Anti CD54-PE (ICAM-1) (IgG1, mouse anti-human), Clone 84H10	1239	Immunotech, Marseille
Mouse Anti-Human CD62E (Mouse IgG1, ν), Fluorescein Conjugate, Clone 1.2B6	9500-02	Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham
Anti-CD14PC-5	PNIM2640	Immunotech, Marseille
Isotyp Kontrolle PC-5 (IgG2a, mouse anti-human)	PNIM2664	Immunotech, Marseille
Isotyp Kontrolle FITC (IgG1, mouse anti-human), MOPC-21	MG101	Caltag Laboratories, San Francisco
Isotyp Kontrolle PE (IgG1, mouse anti-human), Clone X40	340459	Becton Dickenson, San Jose CA
Purified Mouse Anti-Human Monoclonal Antibody CD62L (Mouse IgG1, ν), Clone Dreg-56	32230D	PharMingen Europe

Mouse Anti-Human E-Selektin Monoclonal Antibody, Clone P2H3	MAB2150	Chemicon International, Inc.
Monoclonal Anti-Human CD-18 (mouse IgG2a), Clone IB4	167-020	Ancell Corporation, Bayport USA

Tabelle 2: Reagenzien

<u>Reagenzien</u>	<u>Bestell- nummer</u>	<u>Hersteller</u>
Acid Citrate Dextrose (ACD)	C-3821	Sigma, St. Louis
Albumin Bovine Solution (7,5%)	A-8412	Sigma, St. Louis
Ammoniumchlorid	1145	Merck, Darmstadt
Antibiotic Antimycotic Solution	A-5955	Sigma, St. Louis
Calcein, AM *special packaging*	C-3100	Molecular Probes, Inc. Eugene, USA
Cell Fix	340181	Becton Dickinson, San Jose CA
Cell Wash	349524	Becton Dickinson, San Jose CA
Collagen Typ I	354236	Becton Dickinson, Labware Bedford
Collagenase A	103578	Boehringer, Mannheim
Coulter Clenz, Cleaning Agent	8448222	Beckman Coulter, Krefeld
Dulbecco´s Phosphate Bufferd Saline	D5652	Sigma, St. Louis
EDTA	ED4S	Sigma, St. Louis

Endothelial Cell Basal Medium Supplemental Pack Endothelial Cell Growth Medium - FCS-10 - ECGS/H-2 - h EGF-0.05 - hbFGF-0.5 - Gentamicin-25 - Ampho B-0.025	C-22110 C-39210 C-37320 C-30120 C-30220 C-30310 C-36030 C-36040	PromoCell, Heidelberg
FACS® Flow	342003	Becton Dickinson, San Jose CA
FACS® Lysing Solution	92-0002	Becton Dickinson, San Jose CA
FACS® Rinse	340346	Becton Dickinson, San Jose CA
FACS® Safe	340346	Becton Dickinson, San Jose CA
FBS Foetal Bovine Serum	10081-164	Gibco BRL, Life Technologies, Paisley
Ficoll-Paque Plus	17-1440-02	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Hanks Buffered Saline Solution	CC-5022	Bio Whittacker Europe, Verviers
Isoton II	8448011	Beckman Coulter, Krefeld
Lipopolysaccharid from E.coli 026:B6	L-2654	Sigma Chemical CO, St. Louis

Medium 199	M-4530	Sigma, St. Louis
Medium 199, with Earle`s Balanced Salt Solution, with L-Glutamin and HEPES		
Natriumhydrogencarbonat	6329	Merck, Darmstadt
PBS minus Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline, w/o Sodium Bicarbonate	14040-091	Gibco BRL, Life Technologies, Paisley
PBS plus Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline, w/o Calcium, Magnesium, Sodium Bicarbonate	14190-094	Gibco BRL, Life Technologies, Paisley
Percoll Density (g/ml) 1.130 +- 0.005	17-0891-02	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala
Positivselektion MACS® CD33-MicroBeads CD3-MicroBeads	455-01	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Ringerlösung Fresenius		Fresenius, Bad Homburg
Sodium Pyruvate	S-8636	Sigma, St. Louis
TNS, Trypsin Neutralizing Solution	CC-5002	Bio Whittacker Europe, Verviers
Trypsin / EDTA	CC-5012	Bio Whittacker Europe, Verviers
ZAP-Oglobin II	PN7546138	Beckman Coulter, Krefeld

Tabelle 3: Materialien

<u>Materialien</u>	<u>Bestell- nummer</u>	<u>Hersteller</u>
Accuvette Einweg-Proben-Becher	9366014	Beckman coulter, Krefeld
Bakterienfilter µStarLB 0.22µm	8110	Costar, Cambridge
Bio Coat Collagen I 12-Well-Platte	354500	Becton Dickinson, Bedford
Bio Coat Zellkulturflasche Collagen I, 75cm ²	354462	Becton Dickinson, Bedford
Bottel Top Filter 150ml	430626	Corning, Corning
Combitips plus		Eppendorf, Hamburg
Falcon Blue Max 50ml Polypropylenröhrchen	352070	Becton Dickinson, San Jose CA
Flusskammerzubehör: - Silikondichtungen PCM Standard - Objektträger		Physikalisch Technische Studien (PTS) GmbH, Freiburg
Klinidrape 37x45 cm	800330	Mölnlycke, Belgium
MACS® single use Separation Columns - AS-Columns - BS-Columns - CS-Columns	413-02 413-04 413-05	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mullkompressen 7,5x7,5cm	13621	Lohmann Rauscher GmbH, Rengsdorf
Perfusorspritze 50ml	0050	Becton Dickinson, Drogheda, Ireland
Pipettenspitzen		Eppendorf Hamburg

Polypropylenröhrchen		Eppendorf Hamburg
S -Monovette 9NC 10ml	02.1067.001	Sarstedt, Nümbrecht
Storage Bottel, 250ml	430281	Corning, USA
Stripetten		Costar, Cambridge
Venenpunktionskanüle nach Strauss	0467 6157	Braun, Melsungen

Tabelle 4: Geräte

<u>Geräte</u>	<u>Hersteller</u>
B rutschrank Cytoperm	Heraeus Instruments GmbH, Stuttgart
C oulter counter® Zellzählgerät	Beckman Coulter, Krefeld
D igital Video Cassette Recorder AJ-D230H	Panasonic
Durchflusszytometer FACSort	Becton Dickinson, San Jose CA
F luoreszenzmikroskop Leitz DMIRB	Leica, Bensheim
Framegrabber CFG 512	Imaging Technology Inc., MA, USA
K amera (Ein-Chip-Farbkamera) CF 15 MCC	Kappa, Gleichen
L ichtmikroskop DM-IL	Leica, Bensheim
M ulti Tupe Vortexer	Corning, Medfield USA
Multipette	Eppendorf, Hamburg
pH -Meter pH539	WTW Weilheim
Pipettboy Acu	Integra Biosciences, Fernwald
S oftware Cell Quest 3.1f für Durchflusszytometer	Becton Dickinson, San Jose CA
Spritzenpumpe Harvard Apparatus PHD 2000	FMI GmbH, Seeheim/ Ober-Beerbach

VarioMACS® Separation System	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Varipette	Eppendorf, Hamburg
Videorecorder Sony U-matic	Sony, Japan
Wasserbad Typ 1083	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Werkbank Lamin Air HB 2472 S	Heraeus Instruments GmbH, Stuttgart
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments GmbH, Stuttgart

3. Ergebnisse

3.1 Expression von E-Selektin und ICAM-1 auf HUVEC-Monokulturen

Nach der Stimulation der HUVEC mit 100ng/ml Lipopolysaccharid für 4 Stunden erfolgte die Messung der Fluoreszenzaktivität der endothelialen Adhäsionsmoleküle CD62E und ICAM-1 im FACS. Im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe, bei der es ohne Aktivierung nicht zu einer gesteigerten Ausbildung von Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche kam, zeigte sich eine signifikante Steigerung der Expression von CD62E ($p \leq 0,01$) als auch eine signifikante Steigerung der ICAM-1 Expression ($p \leq 0,01$) in den Lipopolysaccharid aktivierten Endothelkulturen (Abbildung 3).

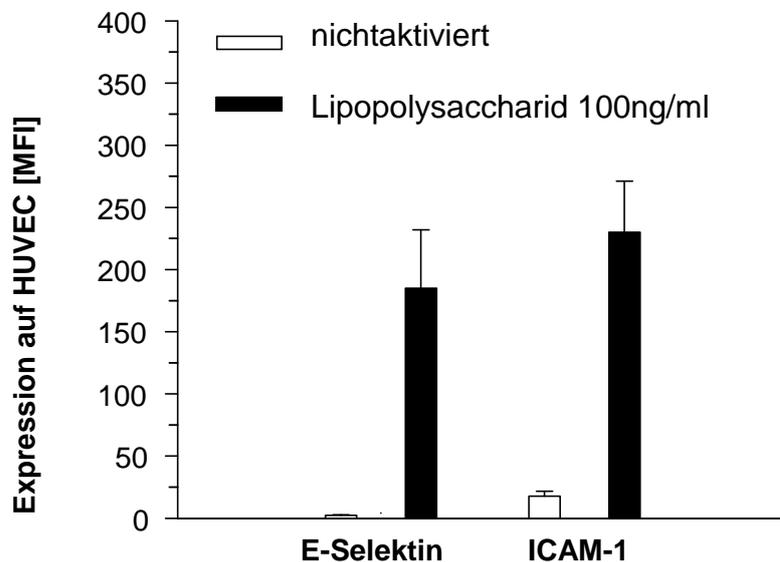


Abbildung 3:

Signifikante Steigerung der Expression von E-Selektin und ICAM-1 auf Lipopolysaccharid-stimuliertem (schwarz) versus unstimuliertem Endothel (weiß).

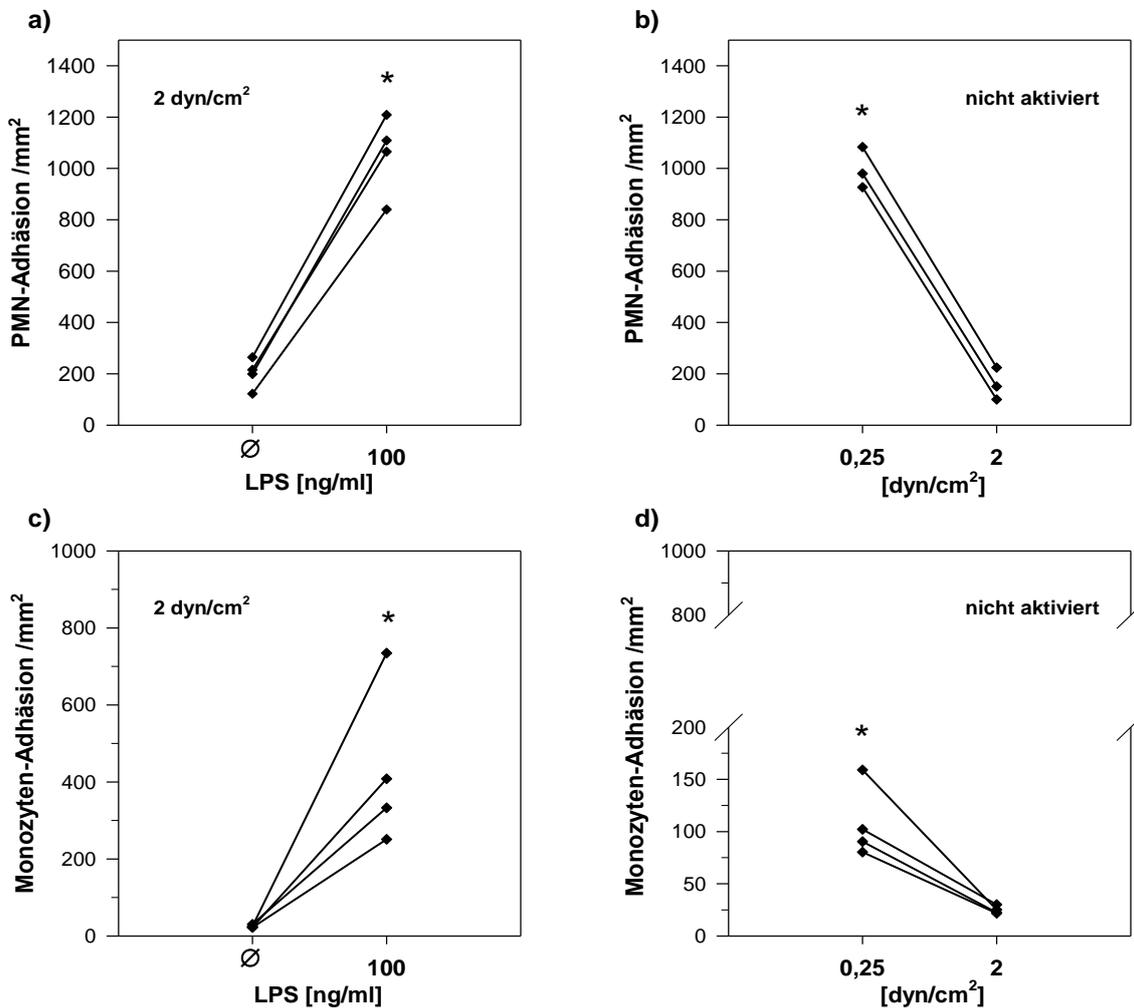
3.2 Effekte der Schubspannung auf die Adhäsion

Unter einer normalen Schubspannung von 2dyn/cm^2 war die Stimulation der HUVEC mit Lipopolysaccharid notwendig, um eine Adhäsion von Monozyten oder polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten zu induzieren ($p \leq 0,01$; ANOVA) (Abbildung 4a und 4c).

In der Flusskammer erfolgte die Reduktion der Schubspannung von 2dyn/cm^2 auf $0,25\text{dyn/cm}^2$, um den Einfluss pathologischer Strömungsbedingungen zu simulieren. Dabei zeigten sich signifikante Steigerungen der Adhäsion sowohl von Monozyten als auch von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten ohne Stimulation mit Lipopolysaccharid ($p \leq 0,01$; ANOVA) (Abbildung 4b und 4d).

Die reduzierte Schubspannung von $0,25\text{dyn/cm}^2$ induzierte einen 6,9-fachen Anstieg der Adhäsion von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten auf HUVEC ohne Stimulation mit Lipopolysaccharid. Diese Adhäsionssteigerung war vergleichbar mit der Adhäsionssteigerung von Granulozyten nach Stimulation des Endothels mit Lipopolysaccharid unter einer Schubspannung von 2dyn/cm^2 (Abbildung 4a und 4b).

Die Adhäsionssteigerung der Monozyten unter einer Schubspannung von $0,25\text{dyn/cm}^2$ war nicht so hoch wie die Adhäsionssteigerung bei den polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten ohne Einfluss von Lipopolysaccharid. Sie entsprach einem 4,6-fachen Anstieg unter reduzierter Schubspannung und ohne Einfluss von Lipopolysaccharid (Abbildung 4c und 4d).

**Abbildung 4:****Auswirkungen von Schubspannung und Endothelaktivierung auf die Adhäsion.**

a: Adhäsion von nicht aktivierten polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten auf HUVEC mit und ohne Lipopolysaccharid-Aktivierung (100ng/ml, 4 Stunden) bei normaler Schubspannung.

b: Adhäsion von nicht aktivierten polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten auf nicht aktivierten HUVEC bei normaler und reduzierter Schubspannung.

c: Adhäsion von nicht aktivierten Monozyten auf HUVEC mit und ohne Lipopolysaccharid-Aktivierung (100ng/ml, 4 Stunden) bei normaler Schubspannung.

d: Adhäsion von nicht aktivierten Monozyten auf nicht aktivierten HUVEC bei normaler und reduzierter Schubspannung.

(* $p < 0,05$; t-Test für verbundene Stichproben, verbundene Stichproben sind verbunden dargestellt, $n=4$)

3.3 Effekte der statischen Coinkubation auf die Expression von E-Selektin und ICAM-1

3.3.1 Monozyten-HUVEC-Cokulturen

Die HUVEC wurden 4 Stunden mit Monozyten unter statischen Bedingungen coinkubiert. Dabei entsprach die Zellzahl der eingesetzten Monozyten der Zahl an adhärennten Monozyten im dynamischen Experiment in der Flusskammer unter einer Schubspannung von $0,25 \text{ dyn/cm}^2$. Um den Einfluss von konzentrationsabhängigen Effekten auf die Selektin-Expression auszuschließen, wurden die Monozyten neben der Konzentration von $2,5 \times 10^5$ Monozyten/ml zusätzlich jeweils noch in den Konzentrationen von 5×10^5 Monozyten/ml und 1×10^6 Monozyten/ml eingesetzt. Bei der analytischen Auswertung im FACS zeigte sich im Vergleich zur unstimulierten HUVEC Monokultur ein signifikanter Anstieg der E-Selektin-Expression ($p \leq 0,01$) und der ICAM-1 Expression ($p \leq 0,01$) (Abbildung 5 a und 5b). Dieser signifikante Anstieg war unabhängig von der eingesetzten Monozyten-Konzentration und war mit dem Effekt einer Lipopolysaccharid-Aktivierung auf Endothel-Monokulturen vergleichbar.

Nach Vorbehandlung der Monozyten mit Brefeldin A, welches den intrazellulären Proteintransport in den Monozyten unterbindet, lies sich nach vierstündiger Coinkubation der Monozyten auf HUVEC keine gesteigerte Expression der endothelialen Adhäsionsmoleküle mehr nachweisen (Abbildung 5 a und 5b).

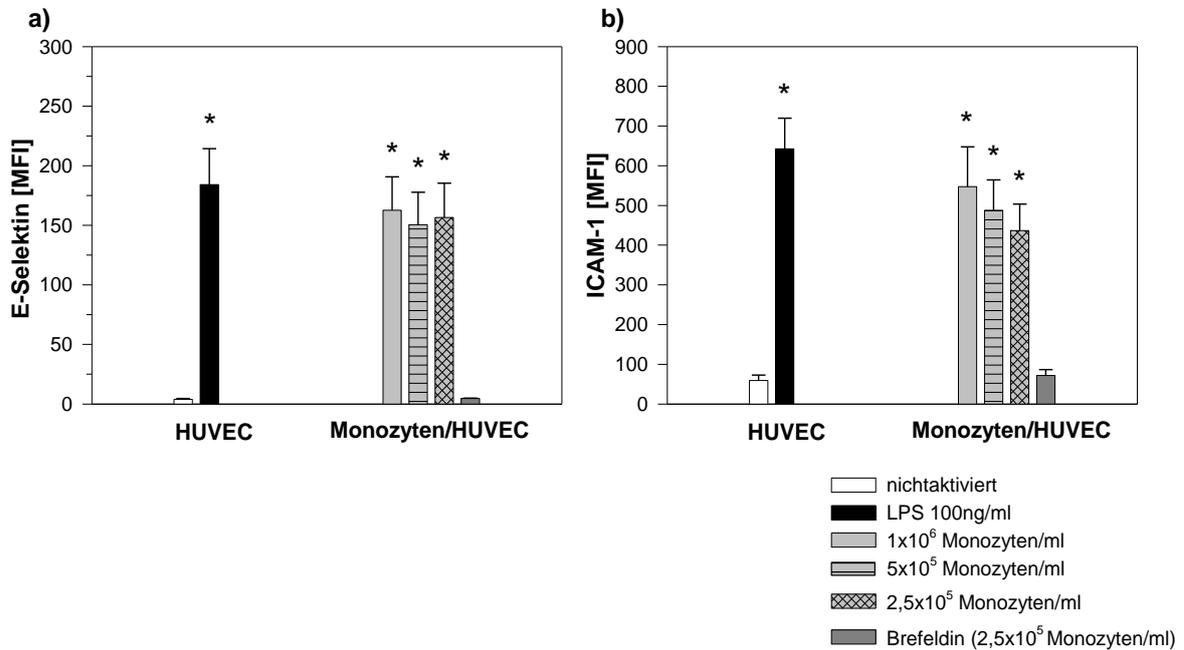


Abbildung 5:

Expression der Adhäsionsmoleküle E-Selektin und ICAM-1 nach vierstündiger Coinkubation mit Monozyten in verschiedenen Konzentrationen unter statischen Bedingungen. Messung der Expression als mittlere Fluoreszenzaktivität (MFI). Vergleichbar mit der Lipopolysaccharid stimulierten Monokultur (schwarz) hatten die HUVEC-Monozyten-Cokulturen (grau) ebenfalls eine im Vergleich zur unstimulierten HUVEC-Monokultur (weiß) signifikante Steigerung von E-Selektin und ICAM-1 zur Folge (* p<0,01, ANOVA, post hoc t-Test, n=4). Diese Auswirkung wurde durch die Vorbehandlung der Monozyten-HUVEC-Cokulturen mit Brefeldin A verhindert (dunkelgrau).

3.3.2 Granulozyten-HUVEC-Cokulturen

Im Vergleich zu den nicht aktivierten HUVEC-Monokulturen führte eine vierstündige Coinkubation der Endothelzellen mit polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten unter statischen Bedingungen bei keiner der eingesetzten Konzentrationen von $2,5 \times 10^5$, 5×10^5 und 1×10^6 polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten/ml zu einer gesteigerten Expression von E-Selektin oder ICAM-1 (Abbildung 6 a und 6b). Somit lies sich bei den statischen polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten-HUVEC-Cokulturen keine endotheliale Entzündungsreaktion induzieren.

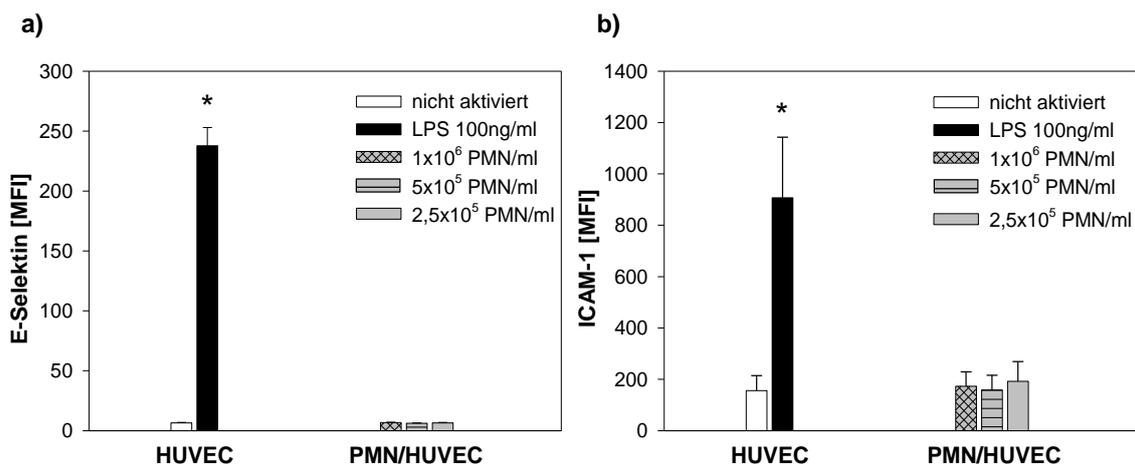


Abbildung 6:

Expression der Adhäsionsmoleküle E-Selektin und ICAM-1 nach vierstündiger Coinkubation mit polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) in verschiedenen Konzentrationen unter statischen Bedingungen. Messung der Expression als mittlere Fluoreszenzaktivität (MFI). Die mit polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten coinkubierten HUVEC (grau) zeigten im Vergleich zu HUVEC-Monokulturen (weiß) keine signifikant höhere Expression von Adhäsionsmolekülen (* $p < 0,01$, ANOVA, post hoc t-Test, $n=4$).

3.3.3 Kontamination mit Monozyten

Wie wichtig monozytäre Aktivierungsmechanismen zur Auslösung einer endothelialen Entzündungsreaktion sind, zeigt die Auswertung einer durch einen geringen Anteil CD14-positiver Monozyten verunreinigten Granulozyten-suspension. Bei einer Gesamtzellzahl von $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml reichte eine 5%-ige Monozyten-Verunreinigung aus, um eine signifikante Steigerung der Expression von E-Selektin und ICAM-1 zu induzieren (Abbildung 7).

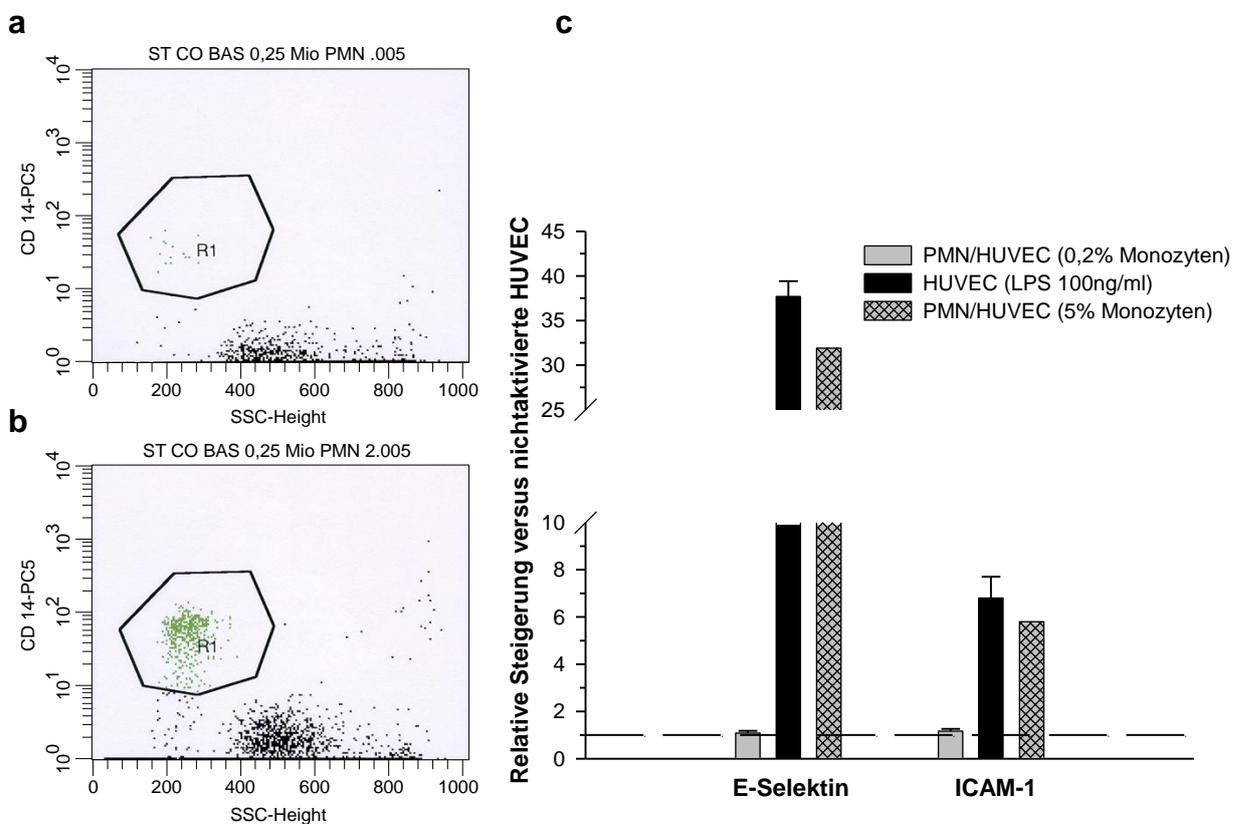


Abbildung 7:

Auswirkung einer geringen Monozytenkontamination auf die Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle. Verunreinigung der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN)-Suspension mit 5% CD14+ Monozyten (Region R1 in b) versus a)). Nach vier Stunden Coinkubation führte diese geringe Monozytenkonzentration von $1,25 \times 10^4$ /ml zu einem Lipopolysaccharid-ähnlichen Anstieg von E-Selektin und ICAM-1 auf dem Endothel (c). Originalabbildungen aus der Durchflusszytometrie (y-Achse: CD14-Fluoreszenz; x-Achse: Granularität) einer hochreinen (a) und verunreinigten (b) polymorphkernigen neutrophilen Granulozytensuspensionen. Effekt der jeweiligen Suspension nach Coinkubation mit HUVEC als relative Steigerung von E-Selektin und ICAM-1 gegenüber nichtaktivierten HUVEC-Monokulturen in c) dargestellt (fehlender Effekt durch Referenzlinie bei Quotient 1 gekennzeichnet).

3.4 Effekte der statischen Coinkubation auf die Adhäsion bei Reperfusion

Nach vierstündiger Coinkubation der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten-HUVEC-Cokulturen und in einer weiteren Versuchsreihe der Monozyten-HUVEC-Cokulturen untersuchten wir die Auswirkungen einer Reperfusion der HUVEC-Cokulturen mit einer polymorphkernigen neutrophilen Granulozytensuspension bei einer Schubspannung von 2dyn/cm^2 .

Zur Differenzierung der Leukozyten in der Flusskammer wurden die zur Reperfusion verwendeten Granulozyten mit Calcein markiert. Aufgrund der höheren Zellausbeute und der benötigten hohen Zellzahlen zur Endothelperfusion in der Flusskammer wurden für die Reperfusion ausschließlich polymorphkernige neutrophile Granulozyten verwendet.

Die Effekte der statischen Coinkubation von HUVEC mit Granulozyten oder Monozyten auf die Adhäsion bei Reperfusion wurden mit den Effekten von unstimulierten HUVEC-Monokulturen und Lipopolysaccharid stimulierten HUVEC-Monokulturen nach Reperfusion verglichen.

Um konzentrationsabhängige Effekte ausschließen zu können, wurden die polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten oder Monozyten in den statischen HUVEC-Cokulturen in den Konzentrationen von $2,5 \times 10^5$, 5×10^5 und 1×10^6 Zellen/ml verwendet.

3.4.1 Effekte der statischen unstimulierten Monokulturen und der Lipopolysaccharid stimulierten Monokulturen auf die Adhäsion bei Reperfusion

Lipopolysaccharid-aktivierte HUVEC-Monokulturen führten nach Reperfusion durch Calcein-markierte polymorphkernige neutrophile Granulozyten zu einer signifikanten Steigerung der Adhäsion von 23 ± 2 polymorphkernige neutrophile Granulozyten pro mm^2 auf nicht aktivierten HUVEC-Monokulturen auf 1.293 ± 66 polymorphkernige neutrophile Granulozyten pro mm^2 ($\text{MW} \pm \text{SF}$) nach Lipopolysaccharid-Aktivierung (Abbildung 8).

3.4.2 Effekte der statischen polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten-HUVEC-Cokulturen auf die Adhäsion bei Reperfusion

Nach Cokultivierung der HUVEC mit polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten zeigte sich bei Reperfusion dieser Cokulturen mit Calcein-markierten polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten unter physiologischer Schubspannung von 2 dyn/cm^2 keine gesteigerte Granulozyten-Adhäsion im Vergleich zu nicht stimulierten HUVEC-Monokulturen: 39 ± 3 polymorphkernige neutrophile Granulozyten pro mm^2 in den statischen Granulozyten-HUVEC-Cokulturen gegenüber 23 ± 2 Granulozyten pro mm^2 auf nicht stimulierten HUVEC-Monokulturen (Abbildung 8a).

3.4.3 Effekte der statischen Monozyten-HUVEC-Cokulturen auf die Adhäsion bei Reperfusion

Dagegen führte die vierstündige Coinkubation der HUVEC mit Monozyten unter statischen Bedingungen im Vergleich zu nicht aktivierten HUVEC-Monokulturen nach der Reperfusion mit Calcein markierten Granulozyten zu einer signifikanten Steigerung der Adhäsion von Granulozyten ($p \leq 0,01$): von 23 ± 2 pro mm^2 auf der unstimulierten Monokultur auf 1.104 ± 151 polymorphkernige neutrophile Granulozyten pro mm^2 ($\text{MW} \pm \text{SF}$) auf der Monozyten-HUVEC-Cokultur. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit der Zahl an adhären

polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten nach Lipopolysaccharid-Aktivierung des Endothels. Die Ausprägung von E-Selektin und ICAM-1 war ebenfalls drastisch gesteigert ($p \leq 0,01$) (Abb. 8a) und b).

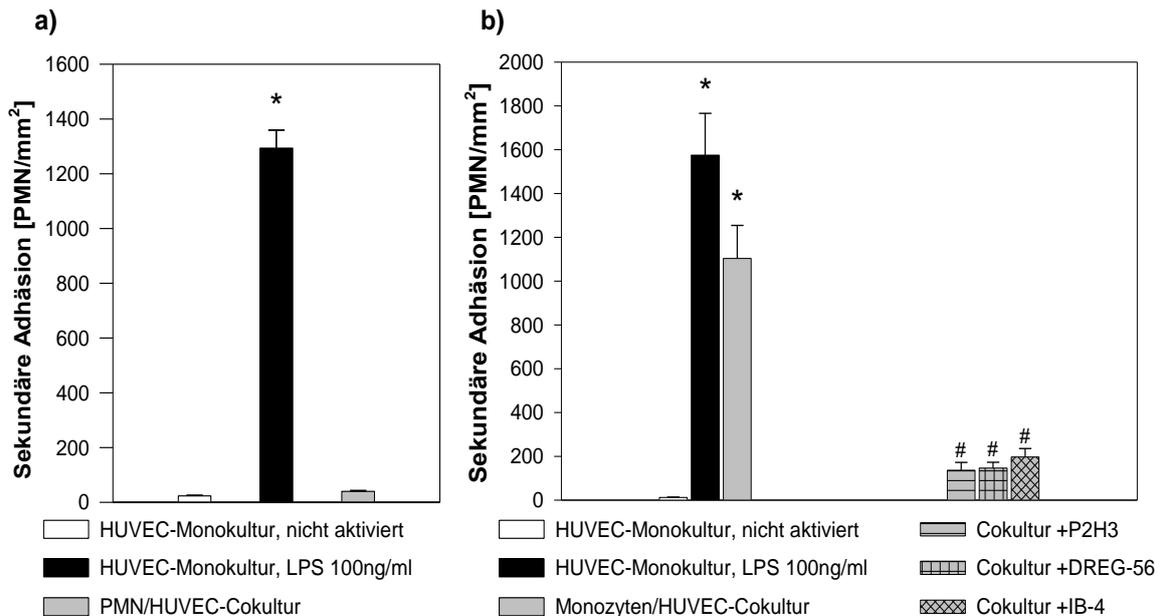


Abbildung 8:

Sekundäre Granulozyten-Adhäsion nach Reperfusion statischer Cokulturen unter normalisierten Strömungsbedingungen. Abgebildet ist die sekundäre Adhäsion in statischen Granulozyten-HUVEC- (a) und Monozyten-HUVEC-Cokulturen (b) jeweils nach 4 Stunden Coinkubation und nach 10min Reperfusion mit Calcein-markierten Granulozyten unter 2 dyn/cm^2 . Die Darstellung der Mittelwerte aus 5 Bildfeldern während eines jeden Versuchs erfolgt als MW+SF von $n=6$ Experimenten. Die Granulozyten-Adhäsion nach Reperfusion auf nichtaktivierten (weiß) und Lipopolysaccharid-aktivierten HUVEC-Monokulturen (schwarz) ist der Granulozyten-Adhäsion auf Cokulturen (grau) nach Reperfusion gegenübergestellt. Die molekularen Grundlagen der Adhäsion nach Reperfusion wurden durch Blockade der Oberflächenmoleküle CD18 (mAk IB-4), L-Selektin (mAk DREG-56) und E-Selektin (mAk P2H3) in Monozyten-HUVEC-Cokulturen charakterisiert. Im Gegensatz zur Coinkubation der HUVEC mit polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (a) hatte die Coinkubation der HUVEC mit Monozyten (b) eine ausgeprägte Steigerung der Adhäsion bei Reperfusion mit Calcein-markierten polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten zur Folge ($* p < 0,01$ versus nichtaktivierter HUVEC-Monokultur). Diese gesteigerte Adhäsion konnte durch alle eingesetzten monoklonalen Antikörper nahezu vollständig verhindert werden ($p < 0,01$ versus Monozyten-HUVEC-Cokultur). Während P2H3 und DREG-56 auch Rolling-Interaktionen effektiv unterdrückten, wies IB-4 diesen Effekt nicht auf (nicht abgebildet).

3.4.4 Effekte der Blockade von Selektinen bei statischen Monozyten-HUVEC-Cokulturen auf die Adhäsion bei Reperfusion

Die Blockade des endothelialen E-Selektins hatte eine ausgeprägte Reduktion der Adhäsion zur Folge (Abbildung 8). Im Vergleich zur Lipopolysaccharid-aktivierten Monokultur zeigte sich eine Reduktion der Adhäsion nach Reperfusion der statischen Monozyten-HUVEC-Cokulturen bei 2dyn/cm² um über 90% nach Blockade mit dem monoklonalen Antikörper P2H3.

Dem Effekt der E-Selektin-Blockade vergleichbar, führte die Blockade von L-Selektin durch den monoklonalen Antikörper DREG-56 ebenfalls zu einer ausgeprägten Verminderung der Granulozyten-Adhäsion bei Reperfusion unter 2dyn/cm². Gegenüber den Lipopolysaccharid-aktivierten Monokulturen resultierte nach Blockade von L-Selektin in der Monozyten-HUVEC-Cokultur eine über 90% verringerte Adhäsion (Abbildung 8).

Während die Blockade der Selektine mit einer Reduktion der Rolling-Interaktionen vergesellschaftet war, führte eine Blockade des CD18-Integrins mit IB-4 zu einer Reduktion des Stickings bei weiterhin nachweisbarem Rolling. Die Adhäsion der Granulozyten bei Reperfusion wurde hierdurch um 90% reduziert (Abbildung 8).

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollen die bislang noch wenig verstandenen, hoch differenzierten Wechselwirkungen zwischen polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Endothel näher betrachtet werden. Inflammation und Perfusionsstörungen tragen bei Ischämie/Reperfusion, Trauma, Schock und Sepsis erheblich zu Gewebeschäden und Multiorganversagen bei. Zentraler Mechanismus in der Pathogenese des Multiorganversagens sind Leukozyten vermittelte Gewebeschäden, die meist mit erheblichen Mikrozirkulationsstörungen assoziiert sind.

In dieser Arbeit soll folgenden Fragen nachgegangen werden:

1. Induzieren Leukozyteninteraktionen bei niedriger Strömungsgeschwindigkeit endotheliale Entzündungsreaktionen?
2. Wenn ja, persistieren diese Reaktionen auch während der Reperfusion, wenn die reduzierte Schubspannung bereits behoben wurde?
3. Gibt es Unterschiede zwischen den Leukozyten-Subpopulationen (polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten und Monozyten) hinsichtlich dieser Fragen? Wenn ja, könnten diese wichtig sein für die Planung zukünftiger Therapien gegen Leukozyten assoziierte Gewebeschäden?

Die signifikant gesteigerte Adhäsion der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten und Monozyten auf dem Endothel bei verminderter Schubspannung impliziert, dass eine verminderte Schubspannung einen selbstständigen Auslöser für die leukozytäre Adhäsion auf Endothel und für die folgende Inflammation darstellt. Im Ergebnissteil wurde gezeigt, dass der Effekt der verminderten Schubspannung so ausgeprägt ist, wie eine Endothelaktivierung mit Lipopolysaccharid in einer hohen Konzentration von 100ng/ml. In den Versuchsreihen, die die Effekte der statischen Coinkubation auf die Adhäsion bei der Reperfusion darlegen, wurde ein wichtiger Unterschied im Verhalten der Monozyten-HUVEC-Cokulturen im Vergleich zu den Granulozyten-HUVEC-Cokulturen gezeigt. Nach Reperfusion führten statische Cokulturen mit Monozyten im Unterschied zu statischen Cokulturen mit polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten zu einer gesteigerten Adhäsion der Granulozyten aus dem Perfusat.

Im Vergleich zu unseren Ergebnissen gab es in früheren Studien sowohl konträre^{32,85} als auch gleichsinnige Ergebnisse hinsichtlich der zunehmenden Adhäsion als Resultat abnehmender Schubspannung. So konnte in verschiedenen tierexperimentellen Studien an der Ratte oder Katze ein gesteigertes Rolling beziehungsweise eine gesteigerte Adhäsion unter abnehmender Schubspannung gezeigt werden.^{8,21}

Weiterhin gab es in einer Studie zur humanen pulmonalen Mikrozirkulation die Beobachtung, dass eine relativ kleine Abnahme der Schubspannung von 266s^{-1} auf 188s^{-1} zu einer Steigerung der leukozytären Adhäsion um 20% führt.⁴¹

In Tiermodellen variierte die Rolle der Schubspannung jedoch abhängig von der Stärke der Reduktion des Blutflusses und von der Anwesenheit eines entzündlichen Geschehens. In Studienmodellen mit endothelialer Stimulierung zum Beispiel nach Ischämie, Infektion oder pharmakologischer Intervention resultierte abnehmende Schubspannung in einem Anstieg der Adhäsion.^{9,40,61,88}

In anderen Modellen, die keine offensichtliche Zellaktivierung aufwiesen, beobachtete man sowohl ansteigende als auch gleich bleibende Zahlen adhärenter Leukozyten.^{8,21,32} Weitere Arbeitskreise, die Untersuchungen zu diesem Thema mit nicht aktivierten Zellen durchführen wollten, verwendeten Methoden der Zellseparation, die anfällig für leukozytäre Aktivierung sind.^{23,46,82,88} Die ungewollte und unbewusste Aktivierung von Zellen, zum Beispiel bei der Separation, war bis dato das Hauptargument gegen die These, dass eine verminderte Schubspannung alleiniger Auslöser für eine gesteigerte Leukozytenadhäsion sein könnte. Und somit blieb es bislang umstritten, ob eine abnehmende Schubspannung einen unabhängigen Auslöser für die gesteigerte Leukozytenadhäsion auf Endothel darstellt, ohne dass andere Aktivierungsmechanismen interferieren.^{8,21,32,45,47,54,67,79,88}

Um Störfaktoren so gut wie möglich ausblenden zu können und um den Fokus der Untersuchungen gezielt auf Monozyten, polymorphkernige neutrophile Granulozyten und Änderungen der Schubspannung zu richten, erfolgten die Versuchsreihen in einem dynamischen, etablierten Flusskammermodell *in vitro*. Effekte anderer zellulärer Blutbestandteile wurden dadurch ausgeschlossen. Obwohl die Flusskammer die komplexen Verhältnisse *in vivo* nicht vollständig simulieren kann, bescheinigen ihr frühere Untersuchungen einen zuverlässigen Versuchsaufbau zur Untersuchung der Zelladhäsion unter Flussbedingungen.^{29,45,48,68,73,85} Durchflussrate, Kammergeometrie und Viskosität dienen dabei als variable Parameter.

In vitro sind jedoch nicht alle rheologischen Rahmenbedingungen gegeben und es herrscht nicht das physiologische Milieu des Endothels. Auch entspricht die größere Flusskammergeometrie nicht der Kapillargröße und die Komplexität eines Organs oder gar eines Organismus kann nicht simuliert werden. Postkapilläre physiologische Scherkräfte mit Werten von 2 dyn/cm^2 können jedoch genauso simuliert werden wie pathologische Strömungsbedingungen mit Werten von $0-0,25 \text{ dyn/cm}^2$. Die herabgesetzte Schubspannung bis hin zur

Stase tritt bei Schock unterschiedlicher Genese oder Ischämie/Reperfusion auf.^{14,15,17,31,74,75}

Da sich die Adhäsionsmoleküldichte arteriell und venös unterscheidet, wurden ausschließlich Endothelzellen aus venösen Nabelschnurgefäßen verwendet. Die HUVEC wurden aus unverletzten Nabelschnüren unmittelbar post partum gewonnen. Für alle Experimente wurden HUVEC nach erster Passage auf Kollagen beschichteten Oberflächen verwendet.

Zur Stimulation von Endothel und Leukozyten wurde Lipopolysaccharid, ein Membranbestandteil gramnegativer Bakterien, in einer Konzentration von 100ng/ml verwendet. In Voruntersuchungen wurde gezeigt, dass eine verstärkte Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle bei einer optimalen Inkubationszeit von 4 Stunden erst ab einer Konzentration von 100ng/ml Lipopolysaccharid auftritt.²⁸

Zur Definition von Rollern gibt es in der Literatur den theoretischen Ansatz der „critical velocity“. Dabei besteht ein HUVEC- Leukozyten-Kontakt dann, wenn die rollende Zelle 70% der Geschwindigkeit eines theoretischen Objekts in der Entfernung von einem Zell-Radius plus 100nm vom Randwall erreicht hat. Deshalb bestimmten wir die Hälfte der „critical velocity“ und setzten die Obergrenze für Rolling auf 100µm/s fest. Für 0,25dyn/cm² folgte daraus eine Grenzgeschwindigkeit von 49µm/s, für 0,5dyn/cm² von 98µm/s und für 1dyn/cm² und 2dyn/cm² eine Grenzgeschwindigkeit von 100µm/s. In die Berechnung gingen nur Zellen ein, die länger als eine Sekunde beobachtet wurden und die keinen Kontakt mit anderen Zellen im Perfusat hatten.

Als Sticker wurden alle Zellen gewertet, die sich innerhalb von 10 Sekunden weniger als einen Zelldurchmesser bewegten.

Wie in einer vorhergehenden Studie gezeigt, beeinflusst die Markierung CD-33 positiver Monozyten mit metallischen Microbeads nicht die Ausprägung von Adhäsionsmolekülen.⁶⁹ Sämtliche Arbeitsschritte im Rahmen der Granulozyten- und Monozyten-Isolation wurden konsequent bei 4°C durchgeführt, um eine Aktivierung der Zellen oder Veränderung der Adhäsionsmoleküle zu vermeiden. Die Erwärmung der Zellen erfolgte schrittweise zunächst auf Raumtemperatur. Erst in der Flusskammer wurde die Zellsuspension auf 37°C gebracht. Die Kammertemperatur wurde in Vorversuchen mit einer miniaturisierten PT-100 Temperatursonde geprüft. Durch die Modifizierung der Monozytenisolation und die Verhinderung einer vorzeitigen Zellerwärmung mit folgender Veränderung der Oberflächenmoleküle wurde in diesen Versuchsreihen eine ungewollte Leukozytenaktivierung ausgeschlossen.

In der Flusskammer wurden der Einfluss der variierbaren Schubspannung und die Zellwechselwirkungen gezielt untersucht. Die intravaskuläre Schubspannung ergibt sich aus der Blutflussgeschwindigkeit und der Blutviskosität.^{32,35} Änderungen des Gefäßtonus oder des Blutflusses wirken sich somit umgehend auf die Schubspannung aus. Eine Schubspannung von 2dyn/cm² wurde als physiologische postkapilläre Schubspannung betrachtet. Diese Größe entspricht der Scherkraft von 300s⁻¹, die in verschiedenen Tiermodellen in der mesenterialen und pulmonalen Mikrozirkulation beobachtet wurde.^{8,21} Die Adhäsion von Leukozyten findet insbesondere in der postkapillären Mikrozirkulation statt, weil die Schubspannung venös niedriger ist und die Endothelzellen durch ihre Morphologie die Adhäsion begünstigen.^{53,71,67} Die reduzierte Schubspannung von 0,25dyn/cm² wurde aufgrund verschiedener Voruntersuchungen gewählt. Sie entspricht einem nahezu stagnierenden Blutfluss, wie er bei schwerem Schock oder Ischämie/Reperfusion auftritt.

Darüber hinaus entspricht diese Schubspannung den stark reduzierten Strömungsgeschwindigkeiten, wie sie bei Patienten mit kardiogenem oder septischem Schock in der Mikrozirkulation beobachtet wurden, unabhängig davon, ob die Makrozirkulationsstörung behoben wurde.^{13,14,75} Beim hämorrhagischen Schock und bei der Ischämie/Reperfusion geht den Leukozyten-Endothel-Interaktionen ursächlich eine Perfusionsstörung voraus.^{18,81} Es gibt Untersuchungen die zeigen, dass auch bei systemischen Entzündungen Perfusionsstörungen in der Mikrozirkulation vor inflammatorischen Veränderungen nachweisbar sind.^{4,15,17,20,34}

Das Modell der Flusskammer ist jedoch dadurch limitiert, dass es nicht alle Faktoren einer intakten Mikrozirkulation simulieren kann. Eine abnehmende Verformbarkeit der Leukozyten in den schmalen mikrovaskulären Gefäßen kann nicht simuliert werden. Die passive Sedimentation als Störfaktor bei niedriger Schubspannung kann nicht völlig umgangen werden.⁴⁴ Diese dürfte unsere Ergebnisse jedoch nicht nachhaltig beeinflusst haben, da 72% der Leukozyten nach einer schrittweisen Steigerung der Schubspannung bis auf 32dyn/cm² am Endothel gebunden blieben und dieser enormen hydrodynamischen Belastung stand hielten. Mittels dieser, über eine statistische ANOVA Analyse ausgewerteten Daten, konnte eine reduzierte Schubspannung als unabhängiger Auslöser für Leukozyten-Endothel-Interaktionen nachgewiesen werden.

Die Rolle der Schubspannung auf die Adhäsion und Inflammation konnte in unseren Versuchsreihen unabhängig von Störfaktoren wie Ischämie oder ungewollter Zellaktivierung untersucht werden. Eine bei Schock unterschiedlicher Genese und in der Frühphase bei Ischämie/Reperfusion auftretende verminderte Schubspannung führte dabei nicht nur zur Adhäsionssteigerung.^{13,14,17,40,75} Die reduzierte Schubspannung erwies sich darüber hinaus als unabhängiger Auslöser einer weiteren Endothelaktivierung und steigender Granulozytenadhäsion im Rahmen der Reperfusion.

E-Selektin und ICAM-1 stellen sensible, quantitativ messbare Parameter der endothelialen Zellaktivierung dar. Interessanterweise zeigten statische polymorphkernige neutrophile Granulozyten-HUVEC-Cokulturen im Vergleich zu statischen Monozyten-HUVEC-Cokulturen keine signifikante Steigerung der Adhäsionsmolekülexpression. Obwohl beide Leukozytenpopulationen bei Reduktion der Schubspannung auf $0,25\text{dyn/cm}^2$ vermehrt adhärten, führte nur die Adhäsion von Monozyten zur Aktivierung des Endothels. Die hierdurch gesteigerte Expression von E-Selektin und ICAM-1 führte zu einer gesteigerten sekundären Adhäsion bei Reperfusion. Die Steigerung der Expression der Adhäsionsmoleküle war vergleichbar mit der Expressionssteigerung von E-Selektin und ICAM-1 nach Inkubation der HUVEC mit Lipopolysaccharid.

Diese signifikante Hochregulation von E-Selektin und ICAM-1 fand sich auch in einem Granulozytenisolat, das mit einer geringen Menge an Monozyten kontaminiert war. Dabei entsprachen nur 5% der Zellen Monozyten. Folglich scheint eine sehr geringe Menge an Monozyten auszureichen, um eine anhaltende endotheliale Aktivierung mit weitreichenden Konsequenzen auszulösen. Somit kann in Geweben mit reduzierter Strömungsgeschwindigkeit eine andauernde endotheliale Entzündungsreaktion induziert werden, die auch nach Wiederherstellung der Strömungsgeschwindigkeit zu einer drastisch gesteigerten Leukozytenakkumulation führt. Obwohl Granulozyten quantitativ überwiegen, ist hierfür die Adhäsion von Monozyten maßgeblich.

Die eingesetzten monoklonalen Antikörper gegen Selektine heben deren Wichtigkeit im Ablauf der Adhäsionskaskade hervor. Bei Blockade des L-Selektins in den Monozyten-HUVEC-Cokulturen unterblieb während der Reperfusion eine gesteigerte Granulozytenadhäsion. Hieraus kann abgeleitet werden, dass Interaktionen zwischen Granulozyten und bereits adhärenen Monozyten wesentlichen Einfluss auf die Adhäsion bei Reperfusion hatten.⁷⁰ Die ausbleibende Adhäsion in den Reperfusionsexperimenten an Granulozyten-

HUVEC-Cokulturen weist jedoch ebenso wie der Effekt einer E-Selektin-Blockade nach, dass Leukozyten-Leukozyten-Interaktionen ohne zusätzliche Aktivierung des Endothels nicht zu einer gesteigerten Adhäsion in der Reperfusion führen. In reperfundierten Cokulturen aus polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten und HUVEC kam es ohne eine endotheliale Aktivierung zu keiner Steigerung der Adhäsion. Außerdem blieb die sekundäre Adhäsion bei Reperfusion in Cokulturen mit endothelialer Aktivierung bei Einsatz eines E-Selektin blockierenden Antikörpers aus.

Die Rolle von P-Selektin wurde nicht weiter untersucht, da P-Selektin nur initial und nicht bei andauernder Aktivierung auf humanem Endothel exprimiert wird.⁸⁸

Der Einsatz eines Antikörpers gegen CD-18 Integrine in den dynamischen Versuchsreihen in der Flusskammer zeigte außerdem, dass integrinabhängige Wechselwirkungen zwischen neutrophilen Granulozyten und endotheliale ICAM-1 essentiell für den Übergang von Rolling zur Adhäsion sind. Eine Blockade von CD-18 Integrinen führte zu erhöhten Rollinginteraktionen bei signifikanter Minderung von an die HUVEC bindenden Granulozyten.

Frühere Studien haben eine endotheliale Aktivierung nach Coinkubation von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten und Endothel nachgewiesen^{25,65,78}.

Dieses Ergebnis kommt mit unserem jedoch nicht in Konflikt da, im Gegensatz zu unseren Versuchsreihen, aktivierte polymorphkernige neutrophile Granulozyten verwendet wurden. Die Beobachtung legt nahe, dass polymorphkernige neutrophile Granulozyten Costimulation benötigen, um eine Adhäsionssteigerung auszulösen. Monozyten benötigen keine exogene Stimulation, um eine endotheliale Aktivierung mit einer gesteigerten Expression der Adhäsionsmoleküle, hervorzurufen.

Da CD11/CD18 Integrine und L-Selektin auf allen Leukozytensubpopulationen exprimiert werden, können sie nach ihrer Bindung nicht alleinige und direkte Auslöser der Aktivierungskaskade sein. Ansonsten hätte auch in den Granulozyten-HUVEC-Cokulturen eine Aktivierung erkennbar sein müssen. Dies war jedoch nicht der Fall.

Zudem konnte die Aktivierung des Endothels in den Monozyten-HUVEC-Cokulturen durch Vorbehandlung der Monozyten mit Brefeldin A unterbunden werden. Da Brefeldin A den intrazellulären Proteintransport verhindert ohne die Zelloberfläche zu verändern, zeigt dieser Befund, dass die Aktivierung des Endothels nach dem Zellkontakt weitere intrazelluläre Signale in den Monozyten erfordert. In Voruntersuchungen beobachtete man eine Vielzahl verschiedener monozytärer Aktivierungsschritte, die als Signalweg in Frage kommen.^{36,52,60} Cytokinvermittelte Reaktionen könnten beispielsweise eine Rolle spielen, da integrinabhängige Signalwege zwischen Zellinnerem und Zelläußerem zu einer Stabilisierung der cytokinen mRNA, insbesondere von Interleukin-1 β führen.² Eine weitere (mit)verantwortliche Komponente in Zusammenhang mit den intrazellulären Abläufen adhärenter Monozyten zur Auslösung einer endothelialen Antwort könnten monozytäre Chemokine sein. Studien haben gezeigt, dass sie eine Hauptrolle bei endothelialer Dysfunktion im Rahmen von Gefäßkrankheiten spielen.^{33,84}

Die hier beschriebenen Wechselwirkungen können eine Erklärung für scheinbar gefundene kontroverse Befunde in chronischen Sepsismodellen darstellen. In LPS-sensitiven und LPS-insensitiven Mäusen korrelierte die Leukozytenakkumulation nicht mit der Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle.⁵ Das Modell beruht auf einer CLP (cegal ligation and perforation) induzierten polymikrobiellen Sepsis. Die Expression an endothelialen Adhäsionsmolekülen war in LPS-sensitiven Mäusen deutlich geringer als in LPS-insensitiven, obwohl in den LPS-sensitiven eine deutlich gesteigerte Leukozytenakkumulation beobachtet wurde. Jedoch war in

den LPS-sensitiven Mäusen eine deutlich stärkere Kreislaufdepression nachweisbar. Diese Beobachtung kann in Zusammenhang mit der beschriebenen Adhäsionssteigerung unter reduzierter Schubspannung stehen. Zumal in einem anderen CLP-Modell mit stabiler Hämodynamik keine vermehrte Leukozytenadhäsion nachweisbar war.⁷² In einer weiteren CLP-Studie derselben Arbeitsgruppe war bei arterieller Hypotonie eine ausgeprägte Leukozytenakkumulation mesenterial und pulmonal nachweisbar.⁵⁸

Eine weitere Untersuchung widerspricht der These, dass einer Leukozytenakkumulation eine Steigerung der endothelialen Selektinexpression vorangehen muss. Bei der Präkonditionierung mittels Lipopolysaccharid wurde eine E-Selektin-Expression nach intraperitonealer Lipopolysaccharid-Injektion unterbunden, eine gesteigerte Leukozytenakkumulation konnte trotzdem beobachtet werden.⁶

Perfusionsstörungen sind demzufolge nicht nur Konsequenz, sondern auch Ursache einer Entzündungsreaktion. Dies wird auch durch eine Untersuchung am ischämischen Skelettmuskel der Ratte verdeutlicht. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass die Leukozytenadhäsion erst 60 Minuten nach der Reperfusion auftrat und von der vorangegangenen Strömungsgeschwindigkeit abhängig war.²²

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die bislang kontrovers diskutierte These, dass erniedrigte Scherkräfte unabhängig von einem weiteren inflammatorischen Stimulus Leukozyten-Endothel-Interaktionen auslösen können.

Während der Effekt von Granulozyteninteraktionen nicht über die Phase der Perfusionsstörung hinausreicht, führen Monozyteninteraktionen zu einer anhaltenden Entzündungsreaktion des Endothels. Diese mündet in einer drastisch gesteigerten sekundären Adhäsion in der Phase der Reperfusion.

Da die mikrovaskulären Scherkräfte unabhängig von der Wiederherstellung der Makrozirkulation nach Schockphasen erniedrigt sein können,^{13-15,38} wäre es für eine optimierte Schocktherapie wünschenswert, die therapeutischen Maßnahmen an der mikrovaskulären Perfusion auszurichten.

Obwohl polymorphkernige neutrophile Granulozyten bislang als die wesentlichen Auslöser des Reperfusionsschadens verstanden wurden, deuten die Ergebnisse dieser Arbeit daraufhin, dass den Monozyten die funktionell größere Bedeutung beigemessen werden sollte.

5. Zusammenfassung

Humane venöse Endothelzellen, die mit polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten oder Monozyten kokultiviert wurden, wurden in einem etablierten Flusskammermodell unter dem Einfluss physiologischer postkapillärer und reduzierter Schubspannungen untersucht. Dabei wurde die endotheliale Adhäsion mit einem Fluoreszenzmikroskop quantifiziert. Die Folgen der reduzierten Schubspannung wurden zum einen mit der Expression der Adhäsionsmoleküle im Durchflusszytometer bestimmt. Zum anderen wurde in der Flusskammer die sekundäre Adhäsion von Granulozyten nach Reperfusion gemessen. Dazu wurden zuvor mit Granulozyten oder Monozyten kokultierte HUVEC mit polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten unter normalisierter Schubspannung von 2dyn/cm^2 superfundiert.

Bei einer Schubspannung von 2dyn/cm^2 induzierten mit Lipopolysaccharid stimulierte HUVEC eine gesteigerte Adhäsion von Granulozyten oder Monozyten. Eine reduzierte Schubspannung von $0,25\text{dyn/cm}^2$ verursachte ohne exogene Stimulation eine mit dem Einfluss von Lipopolysaccharid vergleichbare Adhäsionssteigerung von Granulozyten und Monozyten. Im Gegensatz zu den polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten resultierte die Adhäsion der Monozyten in einem Anstieg von ICAM-1 und E-Selektin. Aufgrund der gesteigerten Adhäsionsmolekülexpression hatte nur die Kokultivierung von nicht aktivierten HUVEC mit Monozyten einen Anstieg der sekundären Adhäsion nach Reperfusion bei normaler Schubspannung zur Folge.

Schlussfolgernd lässt sich festhalten, dass die reduzierte Schubspannung einen unabhängigen Auslöser für die Adhäsion von Granulozyten und Monozyten darstellt. Allerdings führt nur die Adhäsion von MNC zu einer relevanten Endothelaktivierung mit anhaltender Inflammation in der Reperfusion. Hierdurch

kommt es auch in der Reperfusion bei normalisierter Schubspannung zur Steigerung der Leukozytenakkumulation. Für diesen Effekt scheinen noch nicht vollständig verstandene Wechselwirkungen zwischen Monozyten und den HUVEC verantwortlich zu sein.

Zukünftig sollte mehr Gewicht auf die unterschiedliche Rolle der Leukozytensubpopulationen während Ischämie/Reperfusion und Schock entzündlicher und nicht-entzündlicher Genese gelegt werden. Obwohl Monozyten quantitativ den polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten unterlegen sind, haben sie einen erheblichen Einfluss auf die weitere Entwicklung der Entzündungsreaktion bei Schockgeschehen oder Ischämie/Reperfusion.

Da Parameter der Makrozirkulation nicht hinreichend mit der Strömungsgeschwindigkeit in der Mikrozirkulation korrelieren, sollten hierfür neue Monitoringverfahren etabliert werden, um der Bedeutung der mikrovaskulären Scherkräfte gerecht zu werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Abbassi, O., T. K. Kishimoto, L. V. McIntire, D. C. Anderson, and C. W. Smith. 1993. E-Selectin Supports Neutrophil Rolling In-Vitro Under Conditions of Flow. *Journal of Clinical Investigation* 92:2719-2730.
2. Abram, C. L. and C. A. Lowell. 2009. The Ins and Outs of Leukocyte Integrin Signaling. *Annual Review of Immunology* 27:339-362.
3. Allport, J. R., H. T. Ding, A. Ager, D. A. Steeber, T. F. Tedder, and F. W. Luscinskas. 1997. L-selectin shedding does not regulate human neutrophil attachment, rolling, or transmigration across human vascular endothelium in vitro. *Journal of Immunology* 158:4365-4372.
4. Astiz, M. E., E. Tilly, E. D. Rackow, and M. H. Weil. 1991. Peripheral Vascular Tone in Sepsis. *Chest* 99:1072-1075.
5. Bauer, P., C. W. Lush, P. R. Kvietys, J. M. Russell, and D. N. Granger. 2000. Role of endotoxin in the expression of endothelial selectins after cecal ligation and perforation. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 278:R1140-R1147.
6. Bauer, P., T. Welbourne, T. Shigematsu, J. Russell, and D. N. Granger. 2000. Endothelial expression of selectins during endotoxin preconditioning. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 279:R2015-R2021.
7. Bevilacqua, M. P., R. M. Nelson, G. Mannori, and O. Cecconi. 1994. Endothelial-Leukocyte Adhesion Molecules in Human-Disease. *Annual Review of Medicine* 45:361-378.
8. Bienvenu, K. and D. N. Granger. 1993. Molecular Determinants of Shear Rate-Dependent Leukocyte Adhesion in Postcapillary Venules. *American Journal of Physiology* 264:H1504-H1508.
9. Bienvenu, K., J. Russell, and D. N. Granger. 1992. Leukotriene-B(4) Mediates Shear Rate Dependent Leukocyte Adhesion in Mesenteric Venules. *Circulation Research* 71:906-911.
10. Boldt, J., M. Heesen, W. Padberg, K. Martin, and G. Hempelmann. 1996. The influence of volume therapy and pentoxifylline infusion on circulating adhesion molecules in trauma patients. *Anaesthesia* 51:529-535.

11. Boldt, J., M. Muller, D. Kuhn, L. C. Linke, and G. Hempelmann. 1996. Circulating adhesion molecules in the critically ill: A comparison between trauma and sepsis patients. *Intensive Care Medicine* 22:122-128.
12. Cunningham, M. D., R. A. Shapiro, C. Seachord, K. Ratcliffe, L. Cassiano, and R. P. Darveau. 2000. CD14 employs hydrophilic regions to "capture" lipopolysaccharides. *Journal of Immunology* 164:3255-3263.
13. De Backer, D., J. Creteur, M. J. Dubois, Y. Sakr, M. Koch, C. Verdant, and J. L. Vincent. 2006. The effects of dobutamine on microcirculatory alterations in patients with septic shock are independent of its systemic effects. *Critical Care Medicine* 34:403-408.
14. De Backer, D., J. Creteur, M. J. Dubois, Y. Sakr, and J. L. Vincent. 2004. Microvascular alterations in patients with acute severe heart failure and cardiogenic shock. *American Heart Journal* 147:91-99.
15. De Backer, D., J. Creteur, J. C. Preiser, M. J. Dubois, and J. L. Vincent. 2002. Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 166:98-104.
16. Ebnet, K. and D. Vestweber. 1999. Molecular mechanisms that control leukocyte extravasation: the selectins and the chemokines. *Histochemistry and Cell Biology* 112:1-23.
17. Ellis, C. G., R. M. Bateman, M. D. Sharpe, W. J. Sibbald, and R. Gill. 2002. Effect of a maldistribution of microvascular blood flow on capillary O₂ extraction in sepsis. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 282:H156-H164.
18. Eppihimer, M. J. and D. N. Granger. 1997. Ischemia/reperfusion-induced leukocyte-endothelial interactions in postcapillary venules. *Shock* 8:16-25.
19. Erzurum, S. C., G. P. Downey, D. E. Doherty, B. Schwab, E. L. Elson, and G. S. Worthen. 1992. Mechanisms of Lipopolysaccharide-Induced Neutrophil Retention - Relative Contributions of Adhesive and Cellular Mechanical-Properties. *Journal of Immunology* 149:154-162.
20. Farquhar, I., C. M. Martin, C. Lam, R. Potter, C. G. Ellis, and W. J. Sibbald. 1996. Decreased capillary density in vivo in bowel mucosa of rats with normotensive sepsis. *Journal of Surgical Research* 61:190-196.
21. Firrell, J. C. and H. H. Lipowsky. 1989. Leukocyte Margination and Deformation in Mesenteric Venules of Rat. *American Journal of Physiology* 256:H1667-H1674.

22. Fitzal, F., F. A. Delano, C. Young, and G. W. Schmid-Schonbein. 2002. Early capillary no-reflow during low-flow reperfusion after hind limb ischemia in the rat. *Annals of Plastic Surgery* 49:170-180.
23. Forsyth, K. D. and R. J. Levinsky. 1990. Preparative Procedures of Cooling and Rewarming Increase Leukocyte Integrin Expression and Function on Neutrophils. *Journal of Immunological Methods* 128:159-163.
24. Frijns, C. J. M. and L. J. Kappelle. 2002. Inflammatory cell adhesion molecules in ischemic cerebrovascular disease. *Stroke* 33:2115-2122.
25. Fujita, H., I. Morita, and S. I. Murota. 1994. A Possible Mechanism for Vascular Endothelial-Cell Injury Elicited by Activated Leukocytes - A Significant Involvement of Adhesion Molecules, Cd11/Cd18, and Icam-1. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 309:62-69.
26. Gaboury, J. P. and P. Kubes. 1994. Reductions in Physiological Shear Rates Lead to Cd11/Cd18-Dependent, Selectin-Independent Leukocyte Rolling In-Vivo. *Blood* 83:345-350.
27. Gerszten, R. E., E. A. Garcia-Zepeda, Y. C. Lim, M. Yoshida, H. A. Ding, M. A. Gimbrone, A. D. Luster, F. W. Lusinskas, and A. Rosenzweig. 1999. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature* 398:718-723.
28. Goetz, D. J., M. E. Elsabban, B. U. Pauli, and D. A. Hammer. 1994. Dynamics of Neutrophil Rolling Over Stimulated Endothelium In-Vitro. *Biophysical Journal* 66:2202-2209.
29. Gopalan, P. K., C. W. Smith, H. F. Lu, E. L. Berg, L. V. McIntire, and S. I. Simon. 1997. Neutrophil CD18-dependent arrest on intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in shear flow can be activated through L-selectin. *Journal of Immunology* 158:367-375.
30. Hentzen, E. R., S. Neelamegham, G. S. Kansas, J. A. Benanti, L. V. McIntire, C. W. Smith, and S. I. Simon. 2000. Sequential binding of CD11a/CD18 and CD11b/CD18 defines neutrophil capture and stable adhesion to Intercellular adhesion molecule-1. *Blood* 95:911-920.
31. Horstick, G., M. Lauterbach, T. Kempf, S. Bhakdi, A. Heimann, M. Horstick, J. Meyer, and O. Kempfski. 2002. Early albumin infusion improves global and local hemodynamics and reduces inflammatory response in hemorrhagic shock. *Critical Care Medicine* 30:851-855.

32. House, S. D. and H. H. Lipowsky. 1987. Leukocyte Endothelium Adhesion - Microhemodynamics in Mesentery of the Cat. *Microvascular Research* 34:363-379.
33. Imhof, B. A. and M. Aurrand-Lions. 2004. Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nature Reviews Immunology* 4:432-444.
34. Ince, C. 2004. Microcirculation in distress: A new resuscitation end point? *Critical Care Medicine* 32:1963-1964.
35. Jaeschke, H. and C. W. Smith. 1997. Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury. *Journal of Leukocyte Biology* 61:647-653.
36. Johnston, B. and E. C. Butcher. 2002. Chemokines in rapid leukocyte adhesion triggering and migration. *Seminars in Immunology* 14:83-92.
37. Kamochi, M., F. Kamochi, Y. B. Kim, S. Sawh, J. M. Sanders, I. Sarembock, S. Green, J. S. Young, K. Ley, S. M. Fu, and C. E. Rose. 1999. P-selectin and ICAM-1 mediate endotoxin-induced neutrophil recruitment and injury to the lung and liver. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 277:L310-L319.
38. Klijjn, E., C. A. Den Uil, J. Bakker, and C. Ince. 2008. The Heterogeneity of the Microcirculation in Critical Illness. *Clinics in Chest Medicine* 29:643-+.
39. Kopp, E. B. and R. Medzhitov. 1999. The Toll-receptor family and central of innate immunity. *Current Opinion in Immunology* 11:13-18.
40. Kubes, P. 1997. The role of shear forces in ischemia/reperfusion-induced neutrophil rolling and adhesion. *Journal of Leukocyte Biology* 62:458-464.
41. Kuhnle, G. E. H., W. M. Kuebler, J. Groh, and A. E. Goetz. 1995. Effect of Blood-Flow on the Leukocyte-Endothelium Interaction in Pulmonary Microvessels. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 152:1221-1228.
42. Kuijpers, T. W., B. C. Hakkert, M. Hoogerwerf, J. F. M. Leeuwenberg, and D. Roos. 1991. Role of Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule-1 and Platelet-Activating-Factor in Neutrophil Adherence to Il-1-Prestimulated Endothelial-Cells - Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule-1-Mediated Cd18 Activation. *Journal of Immunology* 147:1369-1376.

43. Kunkel, E. J., J. L. Dunne, and K. Ley. 2000. Leukocyte arrest during cytokine-dependent inflammation in vivo. *Journal of Immunology* 164:3301-3308.
44. Lawrence, M. B., G. S. Kansas, E. J. Kunkel, and K. Ley. 1997. Threshold levels of fluid shear promote leukocyte adhesion through selectins (CD62L,P,E). *Journal of Cell Biology* 136:717-727.
45. Lawrence, M. B., L. V. Mcintire, and S. G. Eskin. 1987. Effect of Flow on Polymorphonuclear Leukocyte Endothelial-Cell Adhesion. *Blood* 70:1284-1290.
46. Lawrence, M. B., C. W. Smith, S. G. Eskin, and L. V. Mcintire. 1990. Effect of Venous Shear-Stress on Cd18-Mediated Neutrophil Adhesion to Cultured Endothelium. *Blood* 75:227-237.
47. Lawrence, M. B. and T. A. Springer. 1991. Leukocytes Roll on A Selectin at Physiological Flow-Rates - Distinction from and Prerequisite for Adhesion Through Integrins. *Cell* 65:859-873.
48. Lawrence, M. B. and T. A. Springer. 1993. Neutrophils Roll on E-Selectin. *Journal of Immunology* 151:6338-6346.
49. Lefer, A. M. and D. J. Lefer. 1993. Pharmacology of the Endothelium in Ischemia-Reperfusion and Circulatory Shock. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 33:71-90.
50. Levy, J. H. and K. A. Tanaka. 2003. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *Annals of Thoracic Surgery* 75:S715-S720.
51. Ley, K. 2001. Pathways and bottlenecks in the web of inflammatory adhesion molecules and chemoattractants. *Immunologic Research* 24:87-95.
52. Ley, K. 2002. Integration of inflammatory signals by rolling neutrophils. *Immunological Reviews* 186:8-18.
53. Ley, K. and P. Gaehtgens. 1991. Endothelial, Not Hemodynamic, Differences Are Responsible for Preferential Leukocyte Rolling in Rat Mesenteric Venules. *Circulation Research* 69:1034-1041.
54. Lindemann, S., N. D. Tolley, D. A. Dixon, T. M. McIntyre, S. M. Prescott, G. A. Zimmerman, and A. S. Weyrich. 2001. Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1 beta synthesis. *Journal of Cell Biology* 154:485-490.

55. Liu, L. X. and P. Kubes. 2003. Molecular mechanisms of leukocyte recruitment: organ-specific mechanisms of action. *Thrombosis and Haemostasis* 89:213-220.
56. Lo, S. K., S. Lee, R. A. Ramos, R. Lobb, M. Rosa, G. Chiroso, and S. D. Wright. 1991. Endothelial-Leukocyte Adhesion Molecule-1 Stimulates the Adhesive Activity of Leukocyte Integrin Cr3 (Cd11B Cd18, Mac-1, Alpha-M-Beta-2) on Human Neutrophils. *Journal of Experimental Medicine* 173:1493-1500.
57. Lu, H. F., C. Ballantyne, and C. W. Smith. 2000. LFA-1 (CD11a/CD18) triggers hydrogen peroxide production by canine neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology* 68:73-80.
58. Lush, C. W., G. Cepinskas, W. J. Sibbald, and P. R. Kvietys. 2001. Endothelial E- and P-selectin expression in iNOS-deficient mice exposed to polymicrobial sepsis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 280:G291-G297.
59. Madjdpour, C., B. Oertli, U. Ziegler, J. M. Bonvini, T. Pasch, and B. Beck-Schimmer. 2000. Lipopolysaccharide induces functional ICAM-1 expression in rat alveolar epithelial cells in vitro. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 278:L572-L579.
60. Mahoney, T. S., A. S. Weyrich, D. A. Dixon, T. McIntyre, S. M. Prescott, and G. A. Zimmerman. 2001. Cell adhesion regulates gene expression at translational checkpoints in human myeloid leukocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:10284-10289.
61. Mazzone, M. C. and G. W. Schmid-Schonbein. 1996. Mechanisms and consequences of cell activation in the microcirculation. *Cardiovascular Research* 32:709-719.
62. McIntyre, T. M., S. M. Prescott, A. S. Weyrich, and G. A. Zimmerman. 2003. Cell-cell interactions: leukocyte-endothelial interactions. *Current Opinion in Hematology* 10:150-158.
63. Means, T. K., S. Y. Wang, E. Lien, A. Yoshimura, D. T. Golenbock, and M. J. Fenton. 1999. Human toll-like receptors mediate cellular activation by Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Immunology* 163:3920-3927.
64. Mestas, J. and K. Ley. 2008. Monocyte-Endothelial Cell Interactions in the Development of Atherosclerosis. *Trends in Cardiovascular Medicine* 18:228-232.

65. Murota, S., H. Fujita, I. Morita, and Y. Wakabayashi. 1995. Adhesion Molecule Mediated Endothelial-Cell Injury Elicited by Activated Leukocytes. *Atherosclerosis Iii: Recent Advances in Atherosclerosis Research* 748:133-147.
66. Mutunga, M., B. Fulton, R. Bullock, A. Batchelor, A. Gascoigne, J. I. Gillespie, and S. V. Baudouin. 2001. Circulating endothelial cells in patients with septic shock. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 163:195-200.
67. Nazziola, E. and S. D. House. 1992. Effects of Hydrodynamics and Leukocyte Endothelium Specificity on Leukocyte Endothelium Interactions. *Microvascular Research* 44:127-142.
68. Neelamegham, S., A. D. Taylor, A. R. Burns, C. W. Smith, and S. I. Simon. 1998. Hydrodynamic shear shows distinct roles for LFA-1 and Mac-1 in neutrophil adhesion to intercellular adhesion molecule-1. *Blood* 92:1626-1638.
69. Nohe, B., C. Zanke, T. Johannes, T. Kiefer, and H. J. Dieterich. 2002. Effects of magnetic cell separation on monocyte adhesion to endothelial cells under flow. *Apmis* 110:299-308.
70. Paschall, C. D. and M. B. Lawrence. 2008. L-selectin shear thresholding modulates leukocyte secondary capture. *Annals of Biomedical Engineering* 36:622-631.
71. Perry, M. A. and D. N. Granger. 1991. Role of Cd11/Cd18 in Shear Rate-Dependent Leukocyte-Endothelial Cell-Interactions in Cat Mesenteric Venules. *Journal of Clinical Investigation* 87:1798-1804.
72. Piper, R. D., M. L. Pitt-Hyde, L. A. Anderson, W. J. Sibbald, and R. F. Potter. 1998. Leukocyte activation and flow behavior in rat skeletal muscle in sepsis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 157:129-134.
73. Reinhardt, P. H. and P. Kubes. 1998. Differential leukocyte recruitment from whole blood via endothelial adhesion molecules under shear conditions. *Blood* 92:4691-4699.
74. Ritter, L. S., J. A. Orozco, B. M. Coull, and P. F. McDonagh. 2000. Leukocyte accumulation and hemodynamic changes in the cerebral microcirculation during early reperfusion after stroke. *Stroke* 31:1153-1161.

75. Sakr, Y., M. J. Dubois, D. De Backer, J. Creteur, and J. L. Vincent. 2004. Persistent microcirculatory alterations are associated with organ failure and death in patients with septic shock. *Critical Care Medicine* 32:1825-1831.
76. Schneeberger, P. M., P. Vanlangelve, K. P. M. Vankessel, C. M. J. E. Vandenbrouckegrauls, and J. Verhoef. 1994. Lipopolysaccharide Induces Hyperadhesion of Endothelial-Cells for Neutrophils Leading to Damage. *Shock* 2:296-300.
77. Smyth, S. S., C. C. Joneckis, and L. V. Parise. 1993. Regulation of Vascular Integrins. *Blood* 81:2827-2843.
78. Sohn, H. Y., F. Krotz, S. Zahler, T. Gloe, M. Keller, K. Theisen, T. M. Schiele, V. Klauss, and U. Pohl. 2003. Crucial role of local peroxynitrite formation in neutrophil-induced endothelial cell activation. *Cardiovascular Research* 57:804-815.
79. Taylor, A. D., S. Neelamegham, J. D. Hellums, C. W. Smith, and S. I. Simon. 1996. Molecular dynamics of the transition from L-selectin- to beta(2)-integrin-dependent neutrophil adhesion under defined hydrodynamic shear. *Biophysical Journal* 71:3488-3500.
80. Vasselon, T., E. Hailman, R. Thieringer, and P. A. Detmers. 1999. Internalization of monomeric lipopolysaccharide occurs after transfer out of cell surface CD14. *Journal of Experimental Medicine* 190:509-521.
81. Vedder, N. B., R. K. Winn, C. L. Rice, E. Y. Chi, K. E. Arfors, and J. M. Harlan. 1988. A Monoclonal-Antibody to the Adherence-Promoting Leukocyte Glycoprotein, Cd18, Reduces Organ Injury and Improves Survival from Hemorrhagic-Shock and Resuscitation in Rabbits. *Journal of Clinical Investigation* 81:939-944.
82. Weill, D., J. L. Wautier, C. Dosquet, M. P. Wautier, M. P. Carreno, and B. Boval. 1995. Monocyte Modulation of Endothelial-Leukocyte Adhesion Molecules. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 125:768-774.
83. Wright, S. D. 1999. Toll, a new piece in the puzzle of innate immunity. *Journal of Experimental Medicine* 189:605-609.
84. Yang, J. Y., Y. J. Park, H. R. Zhang, X. Gao, E. Wilson, W. Zimmer, L. Abbott, and C. H. Zhang. 2009. Role of MCP-1 in tumor necrosis factor-alpha-induced endothelial dysfunction in type 2 diabetic mice. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 297:H1208-H1216.

85. Yoshida, N., T. Yoshikawa, Y. Nakamura, K. Sakamoto, S. Takenaka, Y. Boku, K. Kassai, and M. Kondo. 1997. Interactions of neutrophils and endothelial cells under low flow conditions in vitro. *Shock* 8:125-130.
86. Yu, B. and S. D. Wright. 1996. Catalytic properties of lipopolysaccharide (LPS) binding protein - Transfer of LPS to soluble CD14. *Journal of Biological Chemistry* 271:4100-4105.
87. Zarbock, A. and K. Ley. 2008. Mechanisms and consequences of neutrophil interaction with the endothelium. *American Journal of Pathology* 172:1-7.
88. Zarbock, A. and K. Ley. 2009. Neutrophil Adhesion and Activation under Flow. *Microcirculation* 16:31-42.

7. Danksagung

Danke allen, die mich auf meinem bisherigen Weg begleitet und unterstützt haben!

Herzlichen Dank Dir Boris für all Deine Hilfe, insbesondere in der Endphase!

Danke dem Laborteam im Waldhörnle, vor allem Alice und Michaela, die mir immer mit kompetentem Rat zu Seite standen.

Danke meiner Familie, allen voran natürlich meinem Mann Thomas und meinen Kindern Hanna, Max und Charlotte. Ihr seid einfach spitze!

Vielen Dank auch meinen Eltern und meiner Schwester Stephanie sowie unserer Inge, - ihr, insbesondere Du Papa, wart immer da, wenn es mal hier und da geklemmt hat.

Danke Susi für Deine Hilfe und Deine Tipps sowie

danke an alle Blut- und Nabelschnurspender sowie den „Korrekturlesern“!

8. Lebenslauf

Name: Miriam Nadja Kampmann, geb. Bänzner
Geburtsdatum: 28.09.1978
Geburtsort: Bietigheim-Bissingen
Familienstand: verheiratet, 3 Kinder im Alter von 9, 6 und 2 Jahren

Schulbildung:

September 1985 – Juli 1989 Grundsule Gemmrigheim
September 1989 – Juni 1998 Gymnasium Besigheim
Abschluss mit Allgemeiner Hochschulreife

Universitätsausbildung:

Oktober 1998 – November 2005 Studium der Humanmedizin
an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

August 2000 Physikum
April 2002 Erstes Staatsexamen
April 2004 Zweites Staatsexamen
Oktober 2004 – Oktober 2005 Praktisches Jahr im Klinikum am Steinenberg,
Reutlingen
10.11. 2005 Drittes Staatsexamen

Berufliche Weiterbildung:

Seit Dezember 2005 Assistenzärztin im Fach Radiologie
im Klinikum am Steinenberg, Reutlingen