



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Aus dem Institut für Physiologie
der Universität zu Lübeck
Direktorin: Prof. Dr. rer. nat. K. Kusche-Vihrog

**Auswirkungen der Komplementfaktoren C3a und C5a
auf die endotheliale Glykokalyx
im Rahmen des akuten Myokardinfarkts**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin -

Vorgelegt von
Samuel Löning
aus Itzehoe

Lübeck, 2025

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. Kristina Kusche-Vihrog

Kobetreuer: Prof. Dr. Christian Karsten

2. Berichterstatter: PD. Dr. med. Abdelhakim Allali

Tag der mündlichen Prüfung: 30.07.2025

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 31.07.2025

Promotionskommission der Sektion Medizin

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Fragestellung	1
1.1. <i>Das vaskuläre System</i>	1
1.1.1. Der Aufbau der Blutgefäße	1
1.1.2. Der Aufbau des Endothels und der endothelialen Glykokalyx	2
1.1.3. Funktionen des Endothels und der endothelialen Glykokalyx	3
1.1.4. Dysfunktion des Endothels und der endothelialen Glykokalyx	4
1.2. <i>Interaktionen zwischen Endothel und Zellen des Immunsystems</i>	6
1.3. <i>Der akute Myokardinfarkt</i>	7
1.3.1. Ischämie/Reperfusionsschäden	8
1.4. <i>Das Komplementsystem als Teil der Immunabwehr</i>	9
1.4.1. Aufbau und Funktion	9
1.4.2. Die Anaphylatoxine C3a und C5a und ihre Rezeptoren	10
1.5. <i>Ziel der Arbeit</i>	13
2. Material und Methoden	14
2.1. <i>Zellkulturverfahren</i>	14
2.1.1. Extraktion und Poolbildung primärer Endothelzellen	14
2.1.2. Einfrieren der gepoolten primären Endothelzellen	14
2.1.3. Auftauen und Kultivieren	15
2.1.4. Aussäen auf Deckgläser und Stimulation	15
2.2. <i>Isolation humaner Monozyten</i>	16
2.3. <i>Patientenkollektiv der Myokardinfarktpatienten</i>	17
2.4. <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i>	18
2.5. <i>Stimulationen</i>	19
2.5.1. Stimulation mit den Komplementfaktoren C3a und C5a	19
2.5.2. Stimulation mit Seren von Myokardinfarkt-Patienten	20
2.6. <i>Atomic Force Microscopy</i>	21
2.6.1. Nanoindentation	21
2.6.2. Auswertung Nanoindentation	23
2.6.3. Cell-Hesion	23
2.6.4. Auswertung Cell-Hesion	25
2.7. <i>Monozyten-Adhäsions-Assay</i>	26
2.7.1. Immunfärbung der Monozyten	26
2.7.2. Durchführung Monozyten-Adhäsions-Assay	26
2.7.3. Auswertung Monozyten-Adhäsions-Assay	26
2.8. <i>Auswertung / Statistik</i>	27
3. Ergebnisse	29
3.1. <i>Stimulation mit C3a und Rezeptorantagonist</i>	29
3.1.1. C3a führt zu einer Schädigung der endothelialen Glykokalyx	29
3.1.2. C3a erhöht die Anzahl der adhärenen Monozyten	30
3.1.3. C3a führt zu einer verstärkten Adhäsion von Monozyten	31
3.2. <i>Stimulation mit Serum (hohe C3a-Konzentration) und RA</i>	33
3.2.1. Serum mit hoher C3a-Konzentration führt zur Schädigung der Glykokalyx	33
3.2.2. Serum (hohe C3a-Konzentration) erhöht die Anzahl adhärenen Monozyten	34
3.2.3. Serum (hohe C3a-Konzentration) führt zu verstärkter Monozytenadhäsion	35
3.3. <i>Stimulation mit C5a und Rezeptorantagonist</i>	37
3.3.1. C5a führt zu einer Schädigung der endothelialen Glykokalyx	37

3.3.2.	C5a erhöht die Anzahl adhärenter Monozyten	38
3.3.3.	C5a führt zu einer verstärkten Adhäsion von Monozyten	39
3.4.	<i>Stimulation mit Serum (hohe C5a-Konzentration) und RA</i>	41
3.4.1.	Serum mit hoher C5a-Konzentration führt zur Schädigung der Glykokalyx	41
3.4.2.	Serum (hohe C5a-Konzentration) erhöht die Anzahl adhärenter Monozyten	42
3.4.3.	Serum (hohe C5a-Konzentration) führt zu verstärkter Monozytenadhäsion	43
4.	Diskussion	45
4.1.	<i>C3a und C5a schädigen die endotheliale Glykokalyx</i>	46
4.2.	<i>C3a und C5a führen zu einer verstärkten Monozytenadhäsion</i>	47
4.3.	<i>Glykokalyxschädigung im Rahmen des akuten Myokardinfarkts</i>	49
4.4.	<i>Klinische Relevanz</i>	51
5.	Zusammenfassung	54
6.	Literaturverzeichnis	55
7.	Anhang	64
7.1.	<i>Tabellen</i>	64
PBS	64
HUVEC-Medium	65
HEPES-Puffer	65
Patientenkollektiv	66
7.2.	<i>Abbildungsverzeichnis</i>	67
7.3.	<i>Tabellenverzeichnis</i>	67
8.	Danksagung	68
	<i>Publikationen und Vorträge</i>	69

1. Einleitung und Fragestellung

1.1. Das vaskuläre System

1.1.1. Der Aufbau der Blutgefäße

Ein komplexes Netz aus Arterien, Venen und Kapillaren sorgt ein Leben lang im menschlichen Körper für die Aufrechterhaltung der Homöostase [1]. Dazu fließen in Ruhe etwa 3,4 Liter Blut pro Minute und m^2 Körperoberfläche durch den in Hoch- und Niederdrucksystem unterteilten Gefäßbaum, dessen Oberfläche sich durch zahlreiche Verzweigungen auf etwa 1.000 m^2 erstreckt [2].

Mit Ausnahme der Kapillaren sind alle Blutgefäße aus drei Schichten aufgebaut (siehe Abbildung 1.1). Außen begrenzt die bindegewebige Adventitia alle Arterien und Venen und verbindet sie mit dem umliegenden Gewebe. Darunter liegt die Media, eine Schicht aus glatter Muskulatur, Elastin und Kollagen. Die Intima bildet die Grenzschicht zum Lumen. Sie besteht aus einer einschichtigen Endothelzellschicht [2]. Während das Endothel überall einschichtig ist, variiert die Ausprägung der übrigen Schichten, abhängig von regionalen und physiologischen Anforderungen [3].

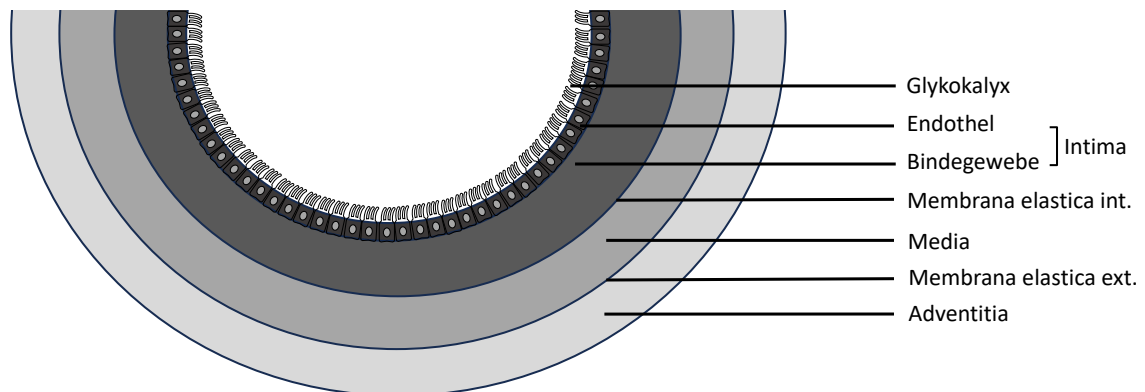


Abbildung 1.1 Schematische Darstellung eines Blutgefäßes

Querschnitt durch ein halbiertes Blutgefäß mit Darstellung der drei Wandschichten, den beiden trennenden Membranen und der innen aufsitzenden endothelialen Glykokalyx. Abbildung nicht maßstabsgetreu.

1.1.2. Der Aufbau des Endothels und der endothelialen Glykokalyx

Endothelzellen bilden das weit verzweigte Netz der Kapillaren und kleiden alle übrigen Gefäße und Lymphbahnen aus. Ihrer Funktion als regulierende Barriere zwischen Blutstrom und Zytoplasma können sie aufgrund ihrer einschichtigen Anordnung (*Monolayer*) und ihrer Verknüpfungen durch interzelluläre Kontakte nachkommen [2,4]. Angesichts der lokal verschiedenen Anforderungen unterscheiden sich die Endothelzellen zwischen verschiedenen Organen, entlang des Gefäßbaums und sogar innerhalb der Kapillaren eines einzelnen Organs [5].

Die äußerste Schicht der Endothelzellmembran auf der luminalen Seite der Endothelzellen besteht dabei aus dem 50-200 nm dicken Zellkortex (*CTX*) mit dem vor allem aus Aktin gebildeten Membranskelett. Das Aktin-Netzwerk bildet dabei ein dynamisches System, das sich den zellulären Erfordernissen rasch anpassen kann. Dies geschieht durch Polymerisation vom globulären G-Aktin zum filamentären F-Aktin, sowie den umgekehrten Prozess [6]. Die Konformation des Aktins hat dabei einen unmittelbaren Einfluss auf die nanomechanischen Eigenschaften der Endothelzellen und damit auf die physiologischen Aufgaben, z.B. die Blutdruckregulation [7]. Dem Zellkortex schließt sich die Plasmamembran und die ihr aufsitzende endotheliale Glykokalyx (*eGC*) an [8,9].

Die eGC ist eine bürstenartige, negativ geladene Schicht aus einer Vielzahl von teils in der Plasmamembran verankerten, kohlenhydratreichen Molekülen mit einer kontinuierlich variablen Zusammensetzung und Höhe von bis zu 500 nm [4,10]. Gemeinsam mit dem Zellkortex bildet sie eine vasoprotektive Nanobarriere im gesamten Gefäßsystem [11,12].

Den Großteil der eGC bilden Glykoproteine, Proteoglykane und Plasmaproteine [13,14]. Die Proteoglykane bestehen aus einem Kernprotein und an dieses gebundene, negativ geladene Seitenketten, den Glykosaminoglykanen [15]. In diesen findet sich u.a. Heparansulfat, Chondroitinsulfat und Hyaluronsäure in variablen Konzentrationen [15,16]. Als Kernproteine finden sich in der endothelialen Plasmamembran vor allem das transmembranäre Syndecan und das membrangebundene Glypican [17]. Syndecan-1 bildet dabei das strukturelle Rückgrat der eGC [18]. Seine transmembranäre Domäne ist direkt mit dem kortikalen Aktin verknüpft und dient neben seiner Funktion als Kernprotein der Proteoglykane der Signaltransduktion extrazellulärer Signale nach intrazellulär [19].

Alle genannten Bestandteile bilden ein verzweigtes Netz, in dem weitere, lösliche Moleküle eingebaut sind. Zwischen diesen löslichen Komponenten und dem Blut besteht ein dynamisches Equilibrium, wodurch die eGC, bedingt durch physiologische und pathophysiologische Stimuli, ständig ihre Konformation ändert und nicht als eine statische Struktur verstanden werden kann [4,17]. Über den gesamten Organismus verteilt entsteht so ein geschätztes eGC-Gesamtvolumen von etwa 1,7 Litern [20]. Angesichts seiner Größe und Bedeutung wird das Endothel stellenweise als das größte Organ des menschlichen Körpers bezeichnet [21].

1.1.3. Funktionen des Endothels und der endothelialen Glykokalyx

Der Aufbau des Endothels und seiner Glykokalyx steht in engem Zusammenhang zu deren physiologischen Funktionen. Sie umfassen u.a. das Bilden einer semipermeablen Barriere zwischen Blutstrom und Interstitium, die mechanosensitive Detektion und Reaktion auf Änderungen von Blutfluss und -druck und die Bindung zahlreicher Plasmamoleküle zum Zweck der Signaltransduktion [4,17,22].

In Starlings ursprünglichen Ausführungen zum transkapillären Fluss [23] fand die eGC noch keine Beachtung, ungeachtet dessen, dass der hydrostatische und onkotische Druckgradient zum Großteil von ihr abhängen [24]. Nicht zuletzt resultiert die Semipermeabilität aus der negativen Netto-Ladung der eGC, die vor allem durch die Glykosaminoglykane, die negativ geladenen Seitenketten der Proteoglykane, allen voran Heparansulfat, entsteht. Die Adhäsion und Migration der ebenfalls negativ geladenen Blutzellen an die endotheliale Oberfläche wird somit reguliert [25].

Das fließende Blut erzeugt in Form von Blutdruck und Strömung einen permanenten Reiz auf das Endothel. Mit Hilfe von u.a. Syndecan und Glypican werden diese Stimuli in intrazelluläre Signale transduziert [24]. Das wohl bekannteste Beispiel ist die Freisetzung von Endothelium-derived relaxing factors (*EDRFs*), allen voran Stickstoffmonoxid (NO) bei steigendem intravasalen Druck durch die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (*eNOS*) und die daraus resultierende Vasodilatation [26,27].

Neben mechanischen Stimuli können zahlreiche lösliche Moleküle durch Bindung an Glykosaminoglykane ihre lokale und systemische Wirkung entfalten. Neben den immunmodulatorisch wirksamen Interleukinen und Wachstumsfaktoren [28] sind dies z.B. antikoagulatorische Mediatoren wie Antithrombin III [29].

1.1.4. Dysfunktion des Endothels und der endothelialen Glykokalyx

Im Falle von Permeabilitäts- und Barrierestörungen sowie einer unzureichenden oder ausbleibenden Ausschüttung von EDRFs liegt eine Dysfunktion des Endothels vor [8]. Dies kann im menschlichen Körper durch eine Vielzahl von pathologischen Ereignissen auftreten. Dazu zählen neben Ischämie/Reperfusionssituationen, wie sie zum Beispiel im Rahmen eines akuten Myokardinfarktes auftreten, auch Entzündungen, Sepsis, Schock, Hypovolämie und Hyperglykämie [24,30–32]. Allen gemein ist die Schädigung der eGC, die sich in messbaren Unterschieden der Höhe und Steifigkeit zeigt. Anders als im physiologischen, intakten Zustand präsentiert sich die eGC in diesen Fällen kollabiert (reduzierte Höhe, erhöhte Steifigkeit) oder gesheddet (reduzierte Höhe, reduzierte Steifigkeit) (siehe Abb. 1.2.). Diese morphologischen Veränderungen sind unmittelbar mit funktionellen Änderungen der Endothelzellen verknüpft [8,14].

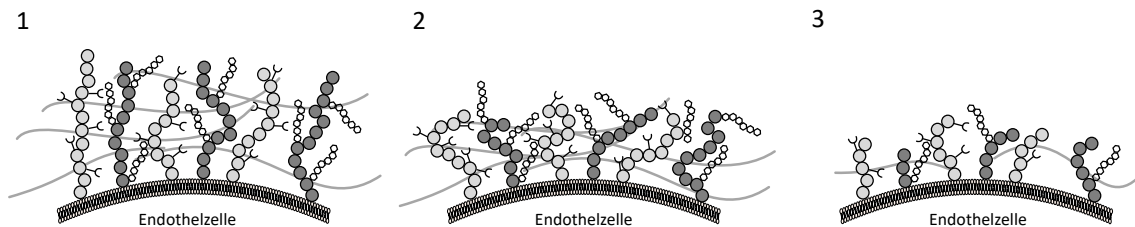


Abbildung 1.2 Schematische Darstellung der eGC in verschiedenen Konformationen

An die Plasmamembran gebunden sind Glykoproteine (helle Ketten) mit kurzen kohlenhydratreichen Seitenketten und Proteoglykane (dunkle Ketten) mit langen, unverzweigten Glykosaminoglykan-Seitenketten. Zwischen diesen befinden sich lösliche Komponenten, hier exemplarisch dargestellt Hyaluronsäure. Die eGC kann abhängig von den extrazellulären Gegebenheiten in mindestens drei Konformationen vorliegen: 1. intakt, 2. kollabiert (collapsed), 3. gesheddet. (Modifiziert nach Cosgun et al., 2020)

Im Tierexperiment führt eine Schädigung durch Ischämie/Reperfusion zu einer signifikanten Reduktion der Glykokalyxhöhe, höchstwahrscheinlich aufgrund eines Shedding der Glykosaminoglykan-Ketten [32]. Dieser Schaden an der eGC führt zu einer erhöhten kapillären Permeabilität mit einhergehendem Ödem, verstärkter Plättchenaggregation, systemischer

Entzündungsantwort und einem Verlust der nanomechanischen Eigenschaften [33], z.B. der NO-Freisetzung und daraus resultierenden gestörten Relaxation der glatten Gefäßmuskulzellen. Darüber hinaus verstärkt eine reduzierte eGC-Höhe die Bindung zwischen zirkulierenden Monozyten und der endothelialen Oberfläche, was die vermehrte Migration in das entsprechende Gewebe begünstigt [8].

1.2. Interaktionen zwischen Endothel und Zellen des Immunsystems

Monozyten stammen von Promonozyten aus dem Knochenmark ab und zirkulieren frei im Blut. Sie gehören zu den Leukozyten und sind Vorläufer der aktiven Immunzellen im Gewebe [34]. Um aus dem Blutstrom ins Gewebe zu gelangen, müssen die Monozyten am Endothel anhaften und dieses durchdringen. Im gesunden Zustand werden die Monozyten durch die eGC von ihren Adhäsionsmolekülen (*ICAM*, *VCAM*, *PECAM*) ferngehalten und damit am Migrieren gehindert [14,35]. Dies geschieht neben der bloßen Distanz auch durch die negativen Ladungen von eGC und Blutzellen [36]. Sowohl die im Rahmen einer Schädigung auftretende Reduktion der eGC, als auch der Verlust negativer Ladungen, führen zu einer vermehrten Bindung von Monozyten an die endothelialen Rezeptoren [37]. Im Rahmen einer lokalen Immunantwort kommt es zunächst zum Annähern der Monozyten an die eGC, wobei Leukozyten am äußeren Rand des Lumens nah am Endothel vorbeifließen [38]. Diese Nähe zum Endothel ermöglicht das Rollen und die anschließende Bindung zwischen eGC und Monozyten über Adhäsionsmoleküle, u.a. Selectine und Integrine [39]. Diese ändern bei Kontakt mit endothelial exprimierten Arrest-Chemokinen ihre Konformation [40]. Die Kontaktzeit der Adhäsionsmoleküle der vorbeierollenden Monozyten und der endothelialen Glykokalyx ist mit 0,1 – 1 ms sehr kurz [41]. Während aktiviertes Endothel E- und P-Selectin exprimiert, exprimieren Monozyten L-Selectin [39,42]. Primärer Ligand aller Selectine ist der P-selectin glycoprotein ligand 1 (*PSGL-1*), der sowohl von Endothelzellen, als auch annähernd allen Leukozyten exprimiert wird [43]. Das Zelladhäsionsmolekül *PSGL-1* interagiert zum Zwecke der Monozytenadhäsion mit P-Selectin und E-Selectin [44]. Integrine, wie das vascular cell-adhesion molecule 1 (*VCAM-1*) und das intercellular adhesion molecule 1 (*ICAM-1*) auf der Zelloberfläche der Endothelzellen, bilden die Anhaftungspunkte für die Integrine der Monozyten [45]. Darüber hinaus wird im entzündeten Gewebe vermehrt das platelet endothelial cell adhesion molecule (*PECAM-1*) exprimiert [39]. Zytokine an den Endothelzellen aktivieren nun die Monozyten und initiieren damit das parazelluläre Auswandern der Monozyten aus dem Blut [40]. Nach der Migration entwickeln sie sich zu Makrophagen oder dendritischen Zellen und können so an der Immunantwort teilnehmen [46].

1.3. Der akute Myokardinfarkt

Trotz intensiver Bemühungen in der präklinischen und klinischen Versorgung, sind chronische oder akute Einschränkungen der Koronardurchblutung noch immer für etwa ein Drittel aller Todesfälle in den westlichen Industrienationen verantwortlich [2]. Sie alle werden unter dem Begriff der koronaren Herzkrankheit (KHK) zusammengefasst. Ihr charakteristisches Merkmal ist eine Koronarinsuffizienz, also ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf am Herzmuskel. Diesem Missverhältnis liegt in 90 % der Fälle eine Koronarstenose zugrunde, die meist durch atherosklerotische Veränderungen eines oder mehrerer der großen extramuralen Gefäße entsteht [47].

Dabei führen lokale Störungen der Endothelfunktion, ausgelöst durch arteriellen Hypertonus, Nikotinabusus, erhöhte Cholesterinspiegel, Diabetes mellitus, Bewegungsmangel und Übergewicht [48] zu einer erhöhten Gefäß-Permeabilität, verstärkter Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten und Extravasation von Lipoproteinen (v.a. Low Density Lipoprotein (*LDL*)), die in die Intima übertreten und sich dort ablagern können. Die Ablagerungen führen zu einer lokalen Entzündungsreaktion, in deren Rahmen vermehrt Monozyten am Endothel adhäreren, migrieren und zu Makrophagen transformieren, um das LDL zu phagozytieren. Im Verlauf entstehen Schaumzellen, die wiederum zugrunde gehen und hochgradig oxidierte Lipide hinterlassen, die Lipidplaques in der Gefäßwand bilden. Die weitere Anlagerung von Thrombozyten führt zu Fibrinthromben mit einer Vielzahl weiterer Pathomechanismen. Das Vollbild der Atherosklerose entsteht durch die Einlagerung von Kalk [47].

Bei der Ruptur eines solchen Plaques kommt es zur Freisetzung der Bestandteile aus der Plaque und einem sofortigen Verschluss des betreffenden Koronargefäßes. Dieses, als akutes Koronarsyndrom (*ACS*) oder akuter Myokardinfarkt (*AMI*) bezeichnete Ereignis, umfasst die beiden Entitäten des ST-Strecken-Hebungs-Infarktes (*STEMI*) und des prognostisch günstigeren Nicht-ST-Strecken-Hebungs-Infarktes (*NSTEMI*) [49]. Die Unterscheidung dieser beiden Formen erfolgt über die Betrachtung der ST-Strecke im Elektrokardiogramm (EKG) [50].

Im Rahmen des akuten Myokardinfarktes kann ein signifikanter Anstieg von Komplementfaktoren [51] beobachtet werden. Diese Komplementaktivierung ist ein wichtiger Mediator des entzündlichen Schadens und ist mit einem schlechteren klinischen Outcome assoziiert [52].

Des Weiteren zeigen sich in Blutproben der Patienten erhöhte Werte von endothelialen Biomarkern sowie Glykokalyxbestandteilen, z.B. Syndecan-1 oder Thrombomodulin [53–56]. Etwas zeitverzögert steigt nach einem kardiovaskulären Ereignis auch die Serumkonzentration des Glykosaminoglykans Heparansulfat an [54]. Ein weiterer, die kapilläre Permeabilität beeinflussender, Mediator im Rahmen des AMI ist das Angiopoetin-2 (Ang-2). Von den Weibel-Palade-Körpern der Endothelzellen freigesetzt, bindet es an den Tie2-Rezeptor und wirkt proinflammatorisch, proapoptotisch und adhäsionssteigernd auf Neutrophile. Die Serumkonzentration von Ang-2 im Rahmen des AMI korreliert mit dem Outcome der Patienten [57].

1.3.1. Ischämie/Reperfusionsschäden

Der AMI ist das wohl prominenteste Beispiel einer Ischämie/Reperfusionssituation (I/R) mit daraus resultierendem Schaden. Nach etwa 5-6 Stunden ist das betroffene Areal irreversibel geschädigt [2,47], was die Notwendigkeit einer zeitnahen Intervention unterstreicht [58].

Zu beachten ist hierbei, dass sowohl die eigentliche Ischämie als auch die folgende Reperfusion mit Freisetzung freier Sauerstoff-Radikale und Entzündungsmediatoren in das betroffene Areal zu einem Schaden an der eGC führen [30]. Die Abnahme der eGC-Höhe ist dabei *in vitro* nach Ischämie/Reperfusion größer als nach alleiniger Ischämie [31].

Bereits 20 min Ischämiezeit bei 37° C mit anschließender Reperfusion reichen im isolierten Meerschweinchenherzen für ein nahezu vollständiges Shedding der eGC [59].

Die gescheddeten Hauptbestandteile der eGC, Syndecan-1 und Heparansulfat, lassen sich *in vivo* proportional zum Ausmaß und der Dauer der Ischämie im Blut quantifizieren. So kann nach regionaler Ischämie ein Anstieg während der Reperfusion festgestellt und somit auf einen Schaden der eGC rückgeschlossen werden [55,60].

Neben dem Anstieg von eGC-Bestandteilen kommt es im Rahmen der durch I/R ausgelösten Entzündungsreaktion zu einem Anstieg proinflammatorischer Zytokine, einer Aktivierung der Gerinnungskaskade und einer Aktivierung des Komplementsystems [61]. Dieses gilt als früher Marker der Entzündung und Endothelschädigung, wobei unter anderem die Anaphylatoxine C3a und C5a eine bedeutende Rolle spielen [51,62]

1.4. Das Komplementsystem als Teil der Immunabwehr

Für die Abwehr von Mikroorganismen und Fremdkörpern stehen dem Körper verschiedene Komponenten zur Verfügung. Diese lassen sich den zwei Klassen der angeborenen unspezifischen und erworbenen spezifischen Mechanismen zuordnen. Jede dieser Klassen besitzt jeweils eine zelluläre und eine humorale Komponente.

Die spezifische zelluläre Immunabwehr beruht auf der Funktion der Lymphozyten und ist durch eine hohe Spezifität und ein immunologisches Gedächtnis gekennzeichnet. Die Hauptbestandteile der spezifischen humoralen Abwehr sind die Immunglobuline, die erregerspezifisch exprimiert werden.

Zur unspezifisch zellulären Immunabwehr zählen Granulozyten und Phagozyten, die im Blutstrom und Gewebe Pathogene eliminieren können. Die unspezifische humorale Komponente bilden verschiedene Faktoren, u.a. das Komplementsystem [2,46,63].

1.4.1. Aufbau und Funktion

Das Komplementsystem umfasst eine Familie von mehr als 20 Proteinen, die im Serum gelöst und an Zellen gebunden vorliegen. Diese liegen zum Großteil als inaktive Vorstufen vor und werden im Rahmen der Kaskade proteolytisch aktiviert, wodurch einige von ihnen wiederum proteolytisch aktiv werden und die Kaskade fortsetzen. Die initiale Aktivierung kann über antikörpermarkierte Antigene (klassischer Weg), für Pathogene charakteristische Oberflächenmerkmale wie Membranpolysaccharide (alternativer Weg), oder das in der Membran von Bakterien vorkommende Lektin (Lektin-Weg) erfolgen.

Alle drei Wege münden in die Spaltung des Proteins C3 mittels einer Protease, der C3-Konvertase. Das entstehende C3b dient dabei der Opsonierung und ist auf verschiedenen Wegen an der Bildung von C5-Konvertasen beteiligt, die wiederum C5 spalten. Das dabei entstehende C5b bildet den Ausgangspunkt für die gemeinsame Endstrecke, den Membranangriffskomplex (MAC). Der MAC bildet eine Pore und sorgt mittels Einstrom von Wasser und Calciumionen in die Zelle für eine Lyse [34].

Die kleinen, bei der Komplementaktivierung entstehenden Fragmente C3a und C5a (*Anaphylatoxine*) haben eine wichtige Aufgabe in der Entzündungsentwicklung. Sie wirken v.a.

chemotaktisch und aktivierend auf Granulozyten und Mastzellen. Die von diesen freigesetzten Substanzen, z.B. Histamin, sorgen daraufhin für eine Vasodilatation, erhöhte Gefäßpermeabilität und vermehrte Leukozytenadhäsion [2,46,63].

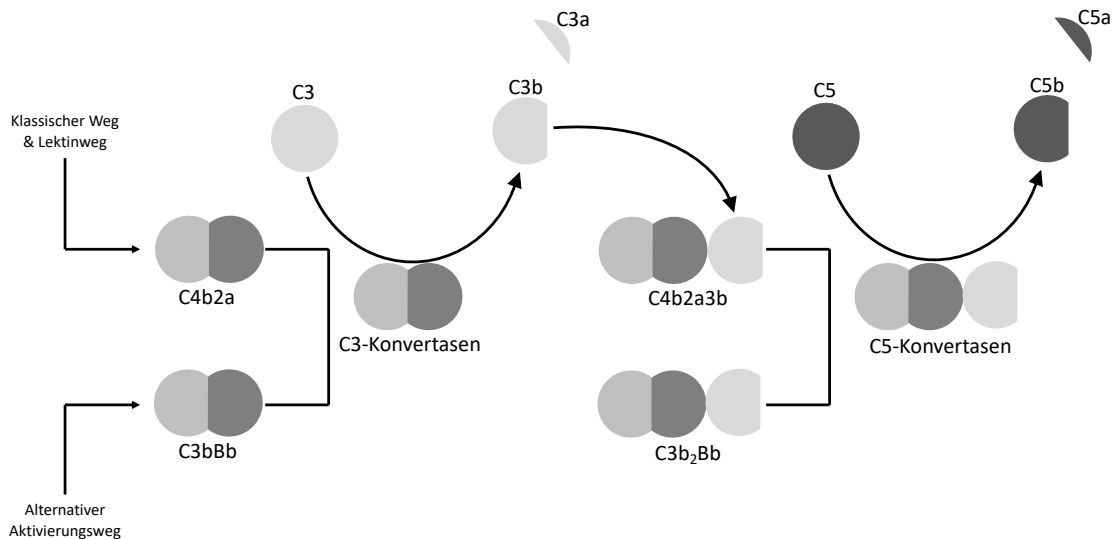


Abbildung 1.3 Absplattung der Anaphylatoxine C3a und C5a im Rahmen der Komplementaktivierung

Ausschnitt der Komplementkaskade. Über die drei möglichen Aktivierungswege des Komplementsystems kommt es zur Freisetzung der proinflammatorischen Anaphylatoxine C3a und C5a durch proteolytische Spaltung von Proteinvorläufern. Nicht dargestellt ist die gemeinsame Endstrecke mit Bildung des Membranangriffskomplexes.

1.4.2. Die Anaphylatoxine C3a und C5a und ihre Rezeptoren

Die Anaphylatoxine C3a und C5a entstehen im Rahmen der Komplementaktivierung. Wie die meisten anderen Proteine des Körpers werden auch diese in der Leber produziert und in das Blut abgegeben. Aber auch Gewebe außerhalb der Leber können Komplementproteine konstitutiv oder als Reaktion auf schädliche Reize synthetisieren [64]. Geschädigtes Gewebe ist dabei in der Lage, die Gene, die für die Bildung von Komplementproteinen kodieren, hochzuregulieren [65]. Neueste Untersuchungen haben darüber hinaus auch ein intrazelluläres Komplementsystem gefunden, das sogenannte Komplosom [66]. Dieses reguliert u.a. die mitochondriale Aktivität, die Glykolyse, zelluläres Überleben und die Genregulation in Immun- und Endothelzellen [66].

Ihre Wirkung entfalten die Anaphylatoxine über die Bindung an ihre spezifischen Rezeptoren (C3a-Rezeptor: *C3aR*; C5a-Rezeptoren: *C5aR1* und *C5aR2* (*C5L2*)). *C3aR* und *C5aR1* gehören zur Gruppe der G-Proteine [67] und sitzen unter anderem auf den Granulozyten [68].

C5aR2 fehlen wichtige Sequenzmotive zur G-Protein-Kopplung, wodurch er initial als Rezeptorattrappe angesehen wurde, die C5a zwar bindet, aber keine Signalkaskade in Gang setzt [69].

Nach Bindung an die Rezeptoren kommt es durch die Anaphylatoxine u.a. zur Rekrutierung von Immunzellen, Bildung von Sauerstoffspezies, vermehrter Adhäsion von Immunzellen ans Endothel, gesteigerter Gerinnung und Zytokinfreisetzung [70].

Ein im Rahmen des akuten Myokardinfarktes entstandener I/R-Schaden führt über die bereits geschilderten Mechanismen zu erhöhten Konzentrationen von C3a und C5a. In einem Patientenkollektiv konnte gezeigt werden, dass die C5a-Konzentration im Serum nach einem MI um die Hälfte anstieg. Die C3a-Konzentration erhöhte sich signifikant erst nach der Reperfusion [71]. Dies konnten Wang et al. sowohl für den akuten Myokardinfarkt als auch für die Koronarstenose zeigen [72]. Bestätigt werden diese Daten durch Messungen unserer Arbeitsgruppe. Mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (*ELISA*) konnten erhöhte C3a- (STEMI: 676,0 ng/ml; Kontrolle: 79,3 ng/ml) und C5a- (STEMI: 36,2 ng/ml; Kontrolle: 3,61 ng/ml) Konzentrationen in den Serumproben des AMI-Patientenkollektivs festgestellt werden.

Verschiedene Arbeiten haben mittels zahlreicher in-vitro und in-vivo Modelle bereits gezeigt, dass die Inhibierung bestimmter Faktoren oder ganzer Aktivierungswege des Komplementsystems zu einem signifikant reduzierten Gewebeschaden und besserem Outcome führen [70]. Bei diesem komplementvermittelten Gewebeschaden handelt es sich unter anderem um ein Shedding der eGC, das in I/R-Situationen zu beobachten ist [73].

Den Stellenwert der Anaphylatoxine unterstreicht die Arbeit von Busche und Stahl. Sie konnten zeigen, dass eine systemische C5-Inhibierung sowie die Behandlung mit einem C3a-Rezeptorantagonist (C3aRA) Mäuse signifikant vor I/R-Schäden schützen konnte [62]. Neben dem Anstieg der Komplementfaktoren kommt es im Rahmen der Immunantwort auch zu einer verstärkten Expression der Rezeptoren. Im Mausmodell konnte eine vermehrte Expression des C5aR nach Ischämie beobachtet werden [74], im Infarktgewebe von Patienten mit MI konnte eine signifikant erhöhte Expression von C3aR gemessen werden [72].

Die bedeutende Rolle von C5a konnte auch in anderen Studien belegt werden. Das Blockieren des C5aR mittels eines C5aR-Antagonisten senkte die Gefäßpermeabilität und Leukozytenadhäsion im ischämischen Myokardareal. Darüber hinaus konnte die Inhibierung von C5a eine Reduzierung der durch I/R induzierten Größe des Infarktareals bewirken [75].

1.5. Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollen die Auswirkungen der Anaphylatoxine C3a und C5a auf das Gefäß-Endothel, insbesondere im Hinblick auf die endotheliale Glykokalyx, untersucht werden. Mit dem Rasterkraftmikroskop (Atomic-Force-Microscope, *AFM*) sollen einschichtige Zellverbände (Monolayer) aus humanen Endothelzellen nach Stimulation mit C3a und C5a auf Veränderungen ihrer nanomechanischen Eigenschaften *in vitro* untersucht werden. Dabei sollen Konformation und Funktion der eGC bestimmt werden. In weiteren Messungen werden die Auswirkungen der spezifischen Rezeptorantagonisten (*RA*) in Anwesenheit ihrer Agonisten auf die eGC bestimmt.

Neben den mechanischen Eigenschaften soll die Funktionalität des Endothels quantifiziert werden. Dies soll über die Messung der Adhäsionskräfte zwischen humanen Monozyten und humanen Endothelzellen erfolgen.

Mit Hilfe von Serumproben eines Patientenkollektivs sollen die strukturellen und funktionellen Auswirkungen der Anaphylatoxine C3a und C5a im Rahmen eines akuten Myokardinfarkts auf das Endothel, genauer die endotheliale Glykokalyx, erforscht werden. Dafür werden die oben geschilderten Messungen nach Stimulation der Endothelzellen mit Infarkt-Serum wiederholt.

Darüber hinaus soll geklärt werden, ob der Einsatz spezifischer Rezeptorantagonisten eine mögliche therapeutische Option im Rahmen des AMI darstellen und die mechanischen Eigenschaften und Funktion der endothelialen Glykokalyx beeinflussen kann.

Folgende Arbeitshypothesen wurden zu diesem Zweck formuliert: Die Anaphylatoxine C3a und C5a schädigen die endotheliale Glykokalyx. Im Rahmen dieses Glykokalyxschadens und der vermittelten Immunreaktion binden Monozyten verstärkt an die eGC. Die Blockade der spezifischen Anaphylatoxin-Rezeptoren schwächt den eGC-Schaden und die damit einhergehende Immunreaktion ab.

2. Material und Methoden

2.1. Zellkulturverfahren

2.1.1. Extraktion und Poolbildung primärer Endothelzellen

Für alle durchgeführten zellbiologischen Arbeiten und Messungen wurden primäre Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen (human umbilical vein endothelial cells, *HUVEC*) verwendet. Sie stellen ein häufig genutztes und etabliertes Modellsystem zur Erforschung endothelialer Zellfunktionen dar.

Für die Gewinnung der HUVEC wurden, nach schriftlicher Aufklärung der Probandinnen, frische Nabelschnüre aus dem ehemaligen Marienhospital Lübeck und dem UKSH genutzt (Ethik-Votum: 18-319). Nach einer ersten Überprüfung auf Beschädigungen wurde eine Knopfkanüle in die Vena umbilicalis eingeführt und fixiert. Die Spülung des Gefäßes wurde mit phosphate buffered saline (*PBS*^{-/-}, siehe Anhang) so lange wiederholt, bis makroskopisch kein koaguliertes Restblut oder sonstige Verunreinigungen mehr zu identifizieren waren. Nach Verschluss des zweiten Endes erfolgte über die Knopfkanüle und einen Dreiwegehahn die vollständige Füllung mit Dispase (Gibco, Carlsbad, Kalifornien) in der Konzentration 50 U/ml. Die Nabelschnüre inkubierten anschließend für eine Stunde bei 37° C. Nach dieser Zeit wurde die gewonnene Zellsuspension aus der Nabelschnurvene über den Dreiwegehahn in ein 50 ml Falcon-Tube abgelassen. Für die weiteren Versuche wurden jeweils 6 verschiedene Zellsuspensionen als Pool zusammengeführt. Die anschließende Zentrifugation mit 200 rcf (relative Zentrifugalkraft) für 5 min führte zur Bildung eines Zellpellets in der Spitze des Falcon-Tubes. Mit dem Sterilsauger wurde die überschüssige Flüssigkeit abgesaugt und das Pellet mit 10 ml HUVEC-Medium (siehe Anhang) resuspendiert. Die zellreiche Suspension wurde in eine zuvor mit 3 ml 0,5 % Gelatine beschichtete T-75 Zellkulturflasche überführt.

2.1.2. Einfrieren der gepoolten primären Endothelzellen

Die konfluent gewachsenen und lichtmikroskopisch auf Kontaminationen geprüften Zellen wurden für die weiteren Schritte mit 1 ml 0,05% Trypsin (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) gelöst, in ein 15 ml Falcon-Tube überführt und bei 4° C 5 min bei 200 rcf zentrifugiert.

Um die Kryokonservierung schonend für die Zellen zu initiieren wurden die Zellen in mehreren Einzelschritten behandelt: Die Überführung und Resuspendierung des Zellpellets erfolgte in Kryomedium (10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) in HUVEC-Medium). Von dieser Suspension wurde je 1 ml in beschriftete Kryogefäße überführt und diese zunächst innerhalb von 24 h auf -80°C heruntergekühlt. Nach 24 h wurden die Proben im nächsten Schritt in Dewar mit flüssigem Stickstoff (-196°C) überführt und gelagert.

2.1.3. Auftauen und Kultivieren

Etwa eine Woche vor der Messung wurden kryokonservierte Zellen aus dem stickstoffgefüllten Dewar entnommen und für 2 – 3 min im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Unter der Sterilbank wurde das Kryo-Röhrchen geöffnet und die Zellen zu 10 ml vorgelegtem HUVEC-Medium in ein 15 ml Falcon pipettiert, um die toxische Wirkung des DMSO auf aufgetaute Zellen zu verringern. Es folgte die Zentrifugation bei 200 rcf für 5 min und das anschließende sterile Absaugen des überstehenden Mediums. Das entstandene Zellpellet wurde in 10 ml frischem Kulturmedium resuspendiert. Das Umsetzen der Suspension erfolgte in eine neue T-75 Zellkulturflasche, die im Vorhinein mit 3 ml 0,5 % Gelatine beschichtet, 1 h inkubiert und vor dem Befüllen abgesaugt wurde. Die beschriftete Zellkulturflasche wurde in den Brutschrank bei 37°C , 21 % O_2 und 5 % CO_2 verbracht.

Hier wuchsen die Zellen bis zu einer konfluenten Bedeckung des Flaschenbodens bei regelmäßiger lichtmikroskopischer Kontrolle und, falls erforderlich, durchgeführten Wechsels des HUVEC-Mediums.

2.1.4. Aussäen auf Deckgläser und Stimulation

Um den HUVEC ausreichend Zeit zu bieten, ihr konfluentes Monolayer und ihre endotheliale Glykokalyx auszubilden, wurden die Zellen mindestens 4 Tage vor der Stimulation aus den Kulturflaschen entnommen und auf 15 mm Deckgläser (DG) ausgesät. Die DG befanden sich dafür in 12er-Wells und wurden mit 100 μl einer 1:50 Verdünnung Fibronectin (entspricht 0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) in PBS ^{-/-} gleichmäßig benetzt. Anschließend verblieben sie für 30 min bei Raumtemperatur unter der Sterilbank, bevor überschüssige Flüssigkeit kurz vor der Hinzugabe der Zellen abgesaugt wurde.

Die bis zur Konfluenz gewachsenen HUVEC wurden in ihrer T-75 Zellkulturflasche mit 10 ml PBS ^{-/-} gewaschen und anschließend mit 1 ml 0,05 % Trypsin für etwa 1 min im Brutschrank inkubiert. Die trypsinierten Zellen wurden in 10 ml Medium suspendiert, mittels Zentrifuge (200 rcf, 5 min) pelletiert und anschließend in 1 ml Medium resuspendiert.

Mit dem Cell-Counter erfolgte nach Herstellerangaben die Bestimmung der Zellzahl / ml. Die benötigte Zellzahl (z.B. 20.000 Zellen / Well) wurde in 1 ml Medium verdünnt und auf das DG gegeben. Im Brutschrank inkubierten die HUVEC unter regelmäßiger lichtmikroskopischer Kontrolle bis zur vollständigen Konfluenz und Stimulation.

24 h vor der geplanten Messung wurde das HUVEC-Medium durch die gewünschte Stimulation ersetzt.

2.2. Isolation humaner Monozyten

Für die im folgenden beschriebenen Versuche Cell-Hesion und Monozyten-Adhäsions-Assay wurden Monozyten aus dem Blut gesunder, freiwilliger Spender isoliert (Ethik-Votum: 19-310). Dafür erfolgte die Abnahme venösen Spenderblutes mittels Punktion. Die Menge des entnommenen Blutes richtete sich nach den geplanten Versuchen. Dem Vollblut wurde das Antikoagulant Buffer A aus dem S-pluriBead Maxi Reagent Kit (pluriSelect, Leipzig, Deutschland) zugefügt. Zu jeweils 5 ml Vollblut in einem 15 ml Falcon-Tube wurden 10 ml Waschpuffer gegeben. Anschließend erfolgte die Zentrifugation 10 min bei 250 g. Der wässrige Überstand wurde abgesaugt und der Waschgang ein zweites Mal wiederholt.

Der abzentrifugierte Hämatokrit diente als Ausgangsstoff für die Monozytenisolation. Die darin enthaltenen Monozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche das Oberflächenprotein CD14, das ein spezifischer Marker für Monozyten und Makrophagen darstellt. Lösliches CD14 (*sCD14*) wurde zur Steigerung der Qualität des Endproduktes in 2.2.1. ausgewaschen. Durch Zugabe der pluriBeads, kleiner Polyesterolkugeln mit spezifischer Oberfläche, erfolgte die Bindung der Monozyten über das CD14 an diese. Dazu wurden die Proben 30 min auf einem Horizontalmischer durchgemischt.

Die Trennung der übrigen Blutbestandteile von den Beads erfolgte mittels pluriStrainer. Durch dieses Sieb mit 30 µm großen Poren wurden durch mehrfaches Spülen alle Bestandteile in ein darunter befindliches 50 ml Falcon-Tube gespült. Einzig die pluriBeads mit den an ihnen gebundenen Monozyten verblieben im Sieb.

Mittels Ablösepuffer erfolgte in 10-minütiger Inkubation die Trennung der Monozyten von den Beads. Während die Beads den Filter noch immer nicht passieren konnten, wurden die nun gelösten Monozyten in das darunter befindliche Tube gespült.

Die Suspension wurde erneut bei 250 g für 10 min zentrifugiert, sodass ein Monozytenpellet entstand.

Dieses wurde in 1 ml Waschpuffer resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Für die Cell-Hesion Messungen am AFM wurden etwa 50.000 Monozyten in 500 µl HUVEC-Medium überführt und von nun an bei 37° C im Wasserbad gelagert.

Für das Monozyten Adhäsions-Assay erfolgte eine Immun-Färbung der Monozyten (siehe 2.7.1).

2.3. Patientenkollektiv der Myokardinfarktpatienten

Die Grundlage für die im Folgenden beschriebenen Versuche bildete das Serum von Patientinnen und Patienten, die allesamt einen klinisch bestätigten, akuten ST-Hebungs-Myokardinfarkt (*STEMI*) erlitten hatten.

Nach positivem Votum der Ethikkommission der Universität zu Lübeck (Ethik-Votum: 19-310) wurden insgesamt 64 Patientinnen und Patienten im Alter von 48 bis 85 Jahren im Zeitraum von Januar bis April 2020 in das Studienkollektiv aufgenommen. Einschlusskriterien waren ein akuter STEMI und dessen Versorgung im Rahmen einer interventionellen Koronarangiographie. Während der Koronarangiographie erfolgte die Entnahme von Blutproben zur Serumgewinnung. Patientinnen und Patienten, welche im Rahmen der Untersuchung verstarben, wurden nachträglich ausgeschlossen. Ebenso Patientinnen und Patienten, die ihr Einverständnis nicht gaben. Als Kontrollgruppe wurden alters- und geschlechtsangeglichene, freiwillige, gesunde Probandinnen und Probanden ohne Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems in die Studie eingeschlossen.

Zu den beschriebenen Patienten erfolgte die anonymisierte Erhebung diverser klinischer und laborchemischer Parameter, die in einer Tabelle zur statistischen Auswertung zusammengetragen wurden (siehe Anhang).

2.4. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Im Rahmen der Versuchsvorbereitung und Erstellung der Tabelle mit Daten der Patienten, die einen akuten Myokardinfarkt erlitten haben, wurden Enzyme-linked Immunosorbent Assays (*ELISA*) zur Bestimmung von Serumkonzentrationen einzelner Bestandteile genutzt. Diese wurden nach Herstellerangaben durchgeführt und ausgewertet.

Aus den Serumproben erfolgte die Bestimmung der Konzentration der Anaphylatoxine C3a (Human C3a ELISA Kit, invitrogen, Carlsbad, Kalifornien) und C5a (Human C5a ELISA Kit, invitrogen, Carlsbad, Kalifornien). Die bestimmten Werte wurden ihrer Größe folgend in vier Quartile aufgeteilt. Das unterste (0 – 25 %) erhielt die Bezeichnung *Low* und das oberste (75 – 100 %) *High*.

Die Seren innerhalb dieser Quartile wurden für die Erstellung eines Serumpools zu gleichen Anteilen gemischt. Für die Messungen genutzt wurde der Pool *High*.

Weitere, selbstständig durchgeführte ELISAs dienten der Bestimmung der Serumkonzentration von Angiopoetin-2 (Quantikine ELISA, R&D Systems, Minneapolis, Minnesota) und Heparansulfat (Cloud-Clone Corporation, Houston, Texas).

2.5. Stimulationen

2.5.1. Stimulation mit den Komplementfaktoren C3a und C5a

Mit Hilfe des AFM wurden die Glykokalyxhöhe und die Adhäsionskräfte zwischen Monozyten und HUVECs nach unterschiedlichen Stimulationen gemessen. Die Stimulation der Zellen erfolgte nach den in Tabelle 2.1 und 2.2 gezeigten Schemata.

Tabelle 2.1 Stimulation C3a + RA

C3a	Gruppe	Zusammensetzung
1	DMSO Kontrolle	HUVEC-Medium + DMSO (1000:1) (Mediumwechsel, wenn andere Gruppen stimuliert werden)
2	C3a 250 ng/ml	250ng/ml Komplement C3a zu HUVEC-Medium + DMSO (1000:1)
3	C3a 250 ng/ml + RA	250ng/ml Komplement C3a zu HUVEC-Medium + C3a-RA (1000:1)

Tabelle 2.2 Stimulation C5a + RA

C5a	Gruppe	Zusammensetzung
1	DMSO Kontrolle	HUVEC-Medium + DMSO (1000:1) (Mediumwechsel, wenn andere Gruppen stimuliert werden)
2	C5a 50 ng/ml	50ng/ml Komplement C5a zu HUVEC-Medium + DMSO (1000:1)
3	C5a 50 ng/ml + RA	50ng/ml Komplement C5a zu HUVEC-Medium + C5a-RA (1000:1)

Im Mittelpunkt standen hierbei die Komplementfaktoren C3a und C5a. Zu vollständigem HUVEC-Medium wurde der jeweilige Komplementfaktor in der durch Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe (siehe Dissertation C. Hamacher) gezeigten, wirksamen Konzentration gegeben. Anwendung fanden der Komplementfaktor C3a (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) mit einer Ausgangs-Konzentration von 0,53 mg/ml und der Komplementfaktor C5a-des-Arg (Sigma-Aldrich) mit 0,51 mg/ml. Bei letzterem handelt es sich um die physiologisch wirksame, desaminierte Form, die im Körper durch proteolytische Abspaltung des C-terminalen Arginin entsteht.

Zusätzlich erfolgte die Stimulation der jeweils dritten Gruppe mit dem spezifischen Rezeptor-Antagonisten (RA). Als spezifischer C3a-Rezeptorantagonist wurde das SB290157 Trifluoracetat Salz (Sigma-Aldrich) verwendet. Die Blockierung des C5a-Rezeptor-1 erfolgte über den spezifischen C5aR1-Antagonisten PMX53 (EMD Millipore Corp., Burlington, Massachusetts). Da die RA in DMSO gelöst wurden, erfolgte die Zugabe von DMSO bis zu einer Zielkonzentration von 0,1 % bei allen Gruppen.

Unter dem AFM befanden sich die Zellen in konstant 37° C warmen HEPES-Puffer (siehe Anhang), der die pH-Stabilität während des Experimentes gewährleistete, + 1 % FCS (fetales Kälberserum) (Sigma-Aldrich), das sich in Vorversuchen der Arbeitsgruppe positiv auf die Glykokalyx auswirkte.

2.5.2. Stimulation mit Seren von Myokardinfarkt-Patienten

Für die Stimulationen mit humanem Serum wurden die in Tabelle 2.3 und 2.4 gezeigten Zusammensetzungen gewählt.

Tabelle 2.3 Stimulation Patientenserum + RA

C3a	Gruppe	Zusammensetzung
1	DMSO Serum Kontrolle	10% Patientenserum (Control (Pool)) zu HUVEC-Medium + DMSO (1000:1)
2	C3a Serum high	10% Patientenserum (C3a oberste Perzentile (Pool)) zu HUVEC-Medium + DMSO (1000:1)
3	C3a Serum high + RA	10% Patientenserum (C3a oberste Perzentile (Pool)) zu HUVEC-Medium + C3a-RA (1000:1)

Tabelle 2.4 Stimulation Patientenserum + RA

C5a	Gruppe	Zusammensetzung
1	DMSO Serum Kontrolle	10% Patientenserum (Control (Pool)) zu HUVEC-Medium + DMSO (1000:1)
2	C5a Serum high	10% Patientenserum (C5a oberste Perzentile (Pool)) zu HUVEC-Medium + DMSO (1000:1)
3	C5a Serum high + RA	10% Patientenserum (C5a oberste Perzentile (Pool)) zu HUVEC-Medium + C5a-RA (1000:1)

Die Grundlage bildete das in 2.3. beschriebene Patientenkollektiv.

Aus den Seren der Patientengruppe *high* wurde ein Pool gebildet, in dem die entsprechenden Seren zu gleichen Anteilen enthalten waren. Analog dazu erfolgte eine Poolbildung aus den jeweiligen Kontrollseren.

Die Stimulation erfolgte mit FCS-freiem HUVEC-Medium. Zu dem Medium wurde das Patienten-Serum im Verhältnis 10:1 gegeben.

Unter dem AFM befanden sich die Zellen in konstant 37° C warmen HEPES-Puffer + 1 % FCS.

2.6. Atomic Force Microscopy

Das AFM ermöglicht die Abtastung von Oberflächen und die Messung von atomaren Kräften im Nanometerbereich. Ursprünglich aus der Materialforschung findet es als Bio-AFM in der naturwissenschaftlichen Forschung Anwendung. Für die Messungen wurden konfluente Monolayer der HUVECs verwendet.

2.6.1. Nanoindentation

Bei der Nanoindentation wird mit Hilfe des Rasterkraftmikroskops ermittelt, welche Kraft nötig ist, um eine vorgegebene Deformation von Zellbestandteilen zu erreichen. In den hier beschriebenen Versuchen fand das Gerät Nanowizard4 der Firma Bruker/JPK BioAFM (Berlin, Deutschland) Verwendung.

Der Kontakt zur untersuchenden Zelle wird über den triangulären Cantilever (Novascan, Boone, Iowa), eines als Blattfeder fungierenden Metallplättchens, hergestellt. An dessen Spitze befindet sich der Tip, eine Polysterolkugel mit 10 µm Durchmesser. Der Cantilever lenkt mit seiner goldbeschichteten Rückseite einen auf ihn gerichteten Laserstrahl auf eine Photodiode, den position sensitive detector (*PSI*). Dazu wird die Einheit aus montiertem Cantiliver, Laser und Detektor mit Hilfe von Piezo-Elementen um eine definierte Z-Länge an die Probe herangeführt. Bei Kontakt mit der Probe verbiegt die Spitze. Diese Bewegung wird von der Photodiode anhand der Ablenkung des Lasers detektiert und quantifiziert (V). Um in den folgenden Messungen die auf den Cantilever wirkende Kraft (F), die zur Verbiegung und Ablenkung des Lasers führt, bestimmen zu können, wurde die tatsächliche Federkonstante (K_{cant} , nominal 0,01 N/m) und Ablenkempfindlichkeit (α) durch die kontaktbasierte Kalibration in Flüssigkeit auf dem Deckglas und das Thermal-noise-Verfahren ermittelt ($F = V \times \alpha \times K_{cant}$). Die gesuchte Deformation der Probe (x_{Probe}) kann mit Hilfe der bekannten Piezobewegung (x_{Piezo}) berechnet werden ($x_{Probe} = x_{Piezo} - (\alpha \times V)$). Mittels Hook'schem Gesetz ($F = D \times \Delta x$) $D =$ Federkonstante, $\Delta x =$ Längenänderung) lässt sich die Steifigkeit (K) der Probe ($K_{Probe} = F / x_{Probe}$) berechnen. Die Steifigkeit bezeichnet dabei die mechanische Resistenz gegen eine wirkende Kraft.

Als Parameter für die Messung wurden eine maximale Kraft von 0,5 nN, eine Z-Länge von 2 µm, die mit einer Geschwindigkeit von 1 µm/s zurückgelegt werden, und eine Kontaktzeit von 0 sec gewählt (siehe Abb. 2.1).

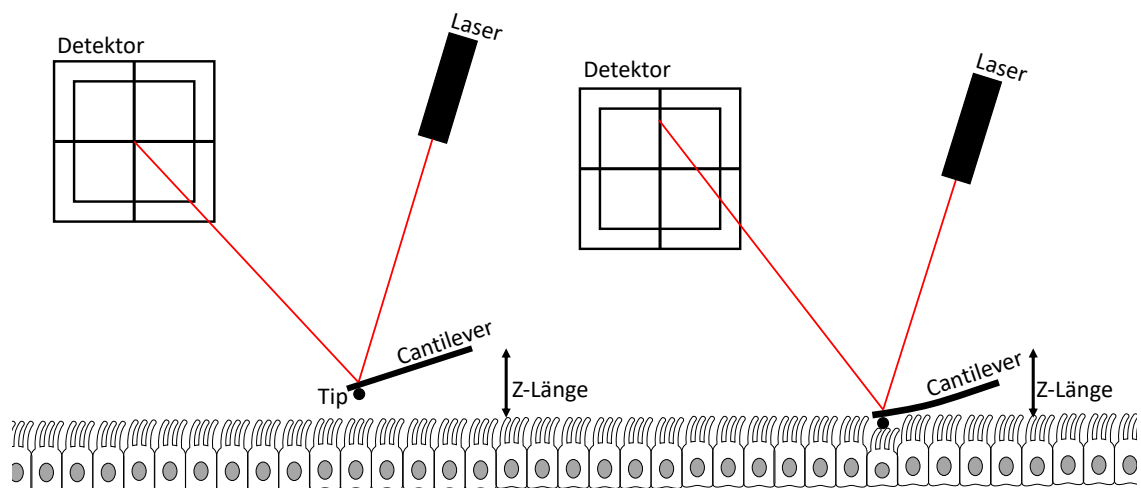


Abbildung 2.1 Schematische Darstellung des Nanoindentationsverfahrens

Die Einheit aus Cantilever, Laser und Detektor befindet sich knapp oberhalb der Probe (links). Der Cantilever ist nicht in Kontakt mit der Probe, der Laser befindet sich in der Mitte der Fotodiode. Während der Messung fährt der Cantilever an die Probe heran. Die Berührung der Probe (rechts) führt zu einer Deformation des Cantilevers, welche zu einer Ablenkung des Lasers führt. Diese Ablenkung wird vom Detektor aufgezeichnet und in einer Kraft-Distanz-Kurve ausgegeben.

Aus der aus Messung und Berechnung entstehenden Kraft-Distanz-Kurve lässt sich die Höhe und Steifigkeit der Glykokalyx und weiterer Zellbestandteile bestimmen. Die entstehende Kurve zeigt zwei Anstiege, wobei der erste die Glykokalyx und der zweite den Zellkortex abbildet.

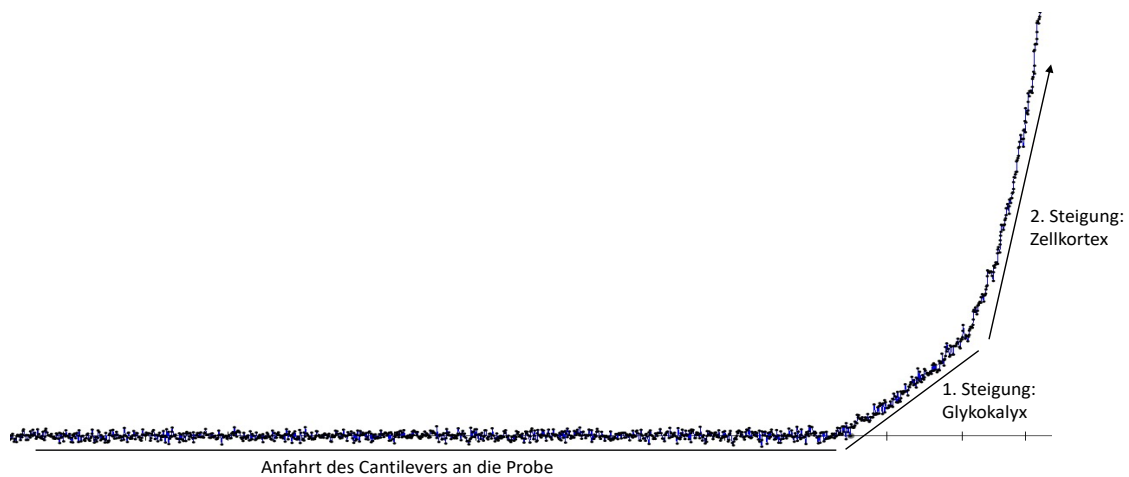


Abbildung 2.2 AFM Kraft-Distanz-Kurve mit angelegter Steigung

Aufgezeigt ist die zurückgelegte Distanz auf der Ordinate gegen die dafür benötigte Kraft (Abszisse). Sobald der Cantilever die Probenoberfläche berührt und deformiert wird, verlässt die Kurve die Ordinate. Die zwei Steigungen bilden dabei die Glykokalyx und den Zellkortex ab. Je steiler die Kurve, desto mehr Kraft wird für eine definierte Deformation der Zelle benötigt. Eine steilere Kurve bedeutet demnach eine erhöhte zelluläre Steifigkeit.

Als Probe dienten konfluent gewachsene HUVECs auf einem 15 mm DG. Zur Messung erfolgte die Überführung in 35 mm Dishes, in denen die DG mittels doppelseitigen Klebebandes fixiert wurden.

Pro DG wurde an mindestens 20 Stellen jeweils achtmal gemessen, wobei die Annahme gilt, dass jede gemessene Stelle eine Zelle abbildet. Die Auswahl der Stellen erfolgte lichtmikroskopisch anhand des lokalen Zustandes und Verteilungsmusters der Zellen.

2.6.2. Auswertung Nanoindentation

Die Auswertung erfolgte mit der Protein-Unfolding and Nanoindentation-Analysis Software „*Punias*“ (Version 1.0 Release 2.3, last modified November 2016). Dazu wurde eine Gerade an die erste Steigung angelegt (vgl. Abb. 2.2). Daraus ergeben sich Werte für Höhe und Steifigkeit der Glykokalyx. Kurven, die keine gerade Anfahrt oder die zwei zu erwartenden Anstiege zeigten, wurden in der Annahme einer gestörten Messung verworfen. Für gemessene Zellen mit mindestens vier ausgewerteten Kurven erfolgte die Bestimmung der Mittelwerte. Diese wurden für die weitere Statistik genutzt.

2.6.3. Cell-Hesion

Bei dem als Cell-Hesion bezeichneten Verfahren wird mit Hilfe des AFM die Energie gemessen, die für die Ablösung einer Zelle von einer anderen benötigt wird. Als abzulösende Zelle wurden isolierte Monozyten aus dem Blut gesunder Personen genutzt (siehe 2.2.). Für die Messung wurden Cantilever vom Typ Arrow-tipless (Nanoworld, Neuenburg, Schweiz) mit einer Federkonstante von 0,03 N/m verwendet. Diese wurden für 30 min mit dem natürlichen Klebstoff Cell-Tak (Sigma-Aldrich) in Natriumhydrogencarbonat (1:30) beschichtet. Der Ablageplatz für die Monozyten wurde mit 30 µl BSA (bovines Serum-Albumin) (Sigma-Aldrich) beschichtet, um eine Adhäsion zu vermeiden. Die Messung erfolgte in 37° C-HEPES. Der Aufbau von Cantilever, Laser und Detektor bleibt wie in 2.6.1. beschrieben. Mit dem beschichteten Cantilever wurde ein nicht adhärenter Monozyt über dem BSA-Spot durch 10-sekündigen Druck auf diesen aufgenommen. Der Monozyt wurde anschließend in den Versuchen für 1 sec auf die Probe, ein konfluentes Monolayer von stimulierten HUVEC, gedrückt. Dafür wurden die Einstellungen Ablenkung: 0,5 V, Z-Länge: 80,0 µm bei einem Z-

Speed von $5,0 \mu\text{m/s}$ gewählt. Anschließend wurde der Cantilever mit dem Monozyten mit denselben Einstellungen von der Probe entfernt.

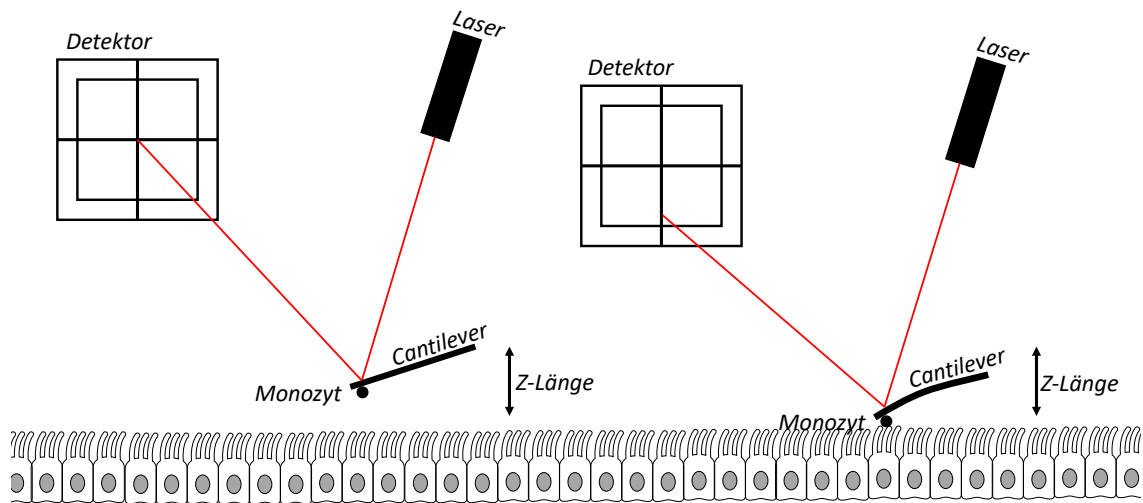


Abbildung 2.3 Schematische Darstellung des Cell-Hesion-Verfahrens

Der Monozyt wird mittels Cantilever an die Probe herangeführt (links). Nach einer definierten Zeit entfernt sich der Cantilever wieder von der Probe. Bei der Retraktion sorgen Adhäsionskräfte für ein Verbiegen des Cantilevers und damit Ablenken des Lasers (rechts).

Die Adhäsion des Monozyten führt dabei zu einer Verbiegung des Cantilevers. Diese führt zu einer Ablenkung des Lasers. Dies detektiert der PSI und zeichnet sie in Form einer Kraft-Distanz-Kurve auf. Anhand der Retraktionskurve lässt sich die maximale Adhäsionskraft (N) ermitteln. Die sich unter der Kurve erstreckende area under the curve (AUC) ergibt die zur vollständigen Lösung der beiden Zellen benötigte Energie (J).

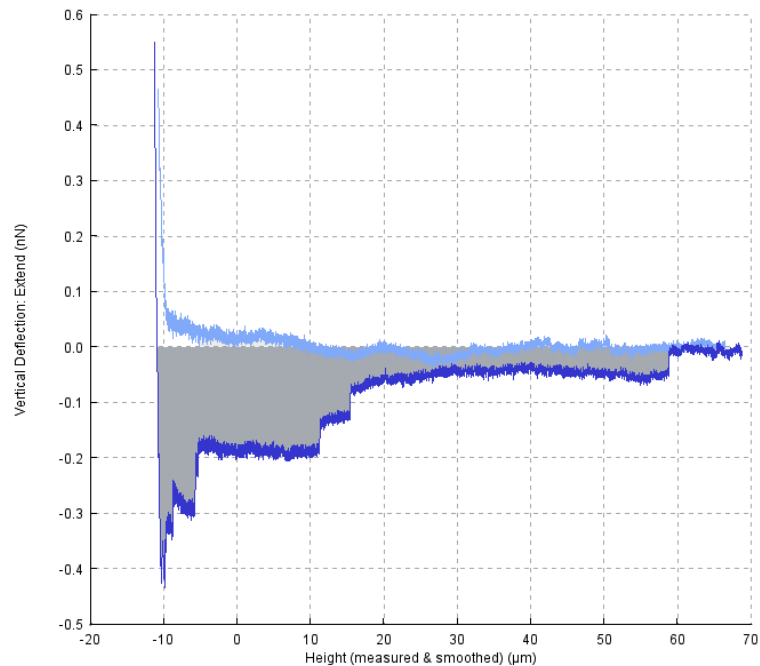


Abbildung 2.4 Ergebnis einer Cell-Hesion-Messung

Bildschirmfoto einer Cell-Hesion-Messkurve. Dargestellt wird die Anfahrt (hellblau) und die Retraktion (dunkelblau). Aufgezeigt ist die zurückgelegte Retraktionsstrecke (height in μm) gegen die dafür benötigte Kraft (vertical deflection in nN). Die AUC bildet die insgesamt benötigte Energie zur Ablösung des Monozyten von den HUVEC ab. Eine große AUC zeigt folglich starke interzelluläre Wechselwirkungen.

2.6.4. Auswertung Cell-Hesion

Die Auswertung der Cell-Hesion-Kurven erfolgte mit der Herstellersoftware JPKSPM Data Processing (Version 7.0.112). Nach Niedzielski (2018) wurden folgende Kriterien für die verwendeten Kurven übernommen:

1. Die Kurve der Anfahrt muss auf mindestens 75 % der Länge horizontal verlaufen, um einen ausreichenden Abstand des Monozyten vor der Messung zu gewährleisten.
2. Auf die steile *Deflection-Kurve* darf nur eine Spitze folgen. Diese bildet die maximale Adhäsionskraft.
3. Nach der minimalen Spitze muss ein ansteigender Bereich vorliegen, der in einem linearen Teil endet.
4. Die AUC muss sich in ihrer Gesamtheit unter der Grundlinie der Rückfahrt befinden.

Kurven, die diesen Ansprüchen genügten, wurden um den Faktor 5 (width) geglättet und mittels Baseline Subtraction an die Nulllinie geführt. Die vom Programm vorgeschlagene Adhesion und Enclosed Area wurden überprüft und übernommen.

2.7. Monozyten-Adhäsions-Assay

2.7.1. Immunfärbung der Monozyten

Die Monozyten wurden nach der Isolation (siehe 2.2.) für das Monozyten-Adhäsions-Assay mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 488 anti-human CD14 Antibody (Biolegend, San Diego, Kalifornien) mit 5 µl pro 200 µl Monozytensuspension angefärbt. Die anschließende Inkubation erfolgte 15 min dunkel bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen zweimal in 1 ml Waschpuffer (aus Monozyten-Isolations-Kit) gewaschen und zentrifugiert (250 rcf, 10 min). Danach erfolgte die Überführung in 12 ml HUVEC-Medium mit einer Zielkonzentration von 100.000 Monozyten / ml Medium.

2.7.2. Durchführung Monozyten-Adhäsions-Assay

Das Monozyten-Adhäsions-Assay gibt Aufschluss über die quantitative Bindung von Monozyten an HUVEC. 24 Stunden vor der Zugabe der angefärbten Monozyten (siehe 2.7.1) erfolgte die Stimulation der konfluent gewachsenen HUVEC auf DG mit den oben genannten Substanzen (siehe Tabelle 2.1, 2.2, 2.3, 2.4). Nach einmaligem Waschen mit PBS ^{-/-} wurde jeweils 1 ml Medium mit 100.000 darin befindlichen Monozyten auf die DG gegeben. Nach 24 h Inkubation erfolgte das Waschen der DG viermal mit kaltem PBS ^{+/+} (siehe Anhang). Anschließend wurden die DG in 500 µl Fixierungsmedium, bestehend aus 4 % Paraformaldehyd (PFA) (Sigma-Aldrich) in Aqua bidest, überführt und 20 min auf Eis dunkel inkubiert. Das viermalige Waschen mit PBS ^{+/+} wurde wiederholt und die DG im Anschluss upside-down in einen Tropfen Mounting-Medium (Dako, Santa Clara, Kalifornien) + Hoechst-33342-Farbstoff (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) 1000:1 auf einen Objektträger überführt. Die Trocknung erfolgte dunkel über Nacht bei 4° C.

2.7.3. Auswertung Monozyten-Adhäsions-Assay

Nach der Trocknung wurden die Objektträger mittels Fluoreszenzmikroskopie (Keyence, BZ-9000, Neu-Isenburg, Deutschland) analysiert. Dazu wurde eine 60x Vergrößerung mit Immersionsöl verwendet. Ausgehend von der Mitte des Deckglases erfolgte die systematische Abrasterung des DG. Zur Kontrolle der vorherrschenden Konfluenz wurde bei 340 nm das Vorhandensein von mittels Hoechst 33342 angefärbten HUVEC-Zellkernen kontrolliert.

Zur Verhinderung eines systematischen Fehlers erfolgte das Fotografieren ohne vorherige Kontrolle auf das Vorliegen von Monozyten bei 488 nm. Pro DG wurden so 40 Bilder aufgenommen.

Die Bilder des Overlays wurden mittels ImageJ (Version 1.53f51 Fiji, NIH, Bethesda, Maryland) ausgewertet. Dazu erfolgte die händische Markierung aller blauen HUVEC-Zellkerne und grüner Monozyten mittels Cell-Counter Plugin. Die Anzahl der Monozyten pro Bild bildete dabei die Grundlage für die statistische Auswertung.

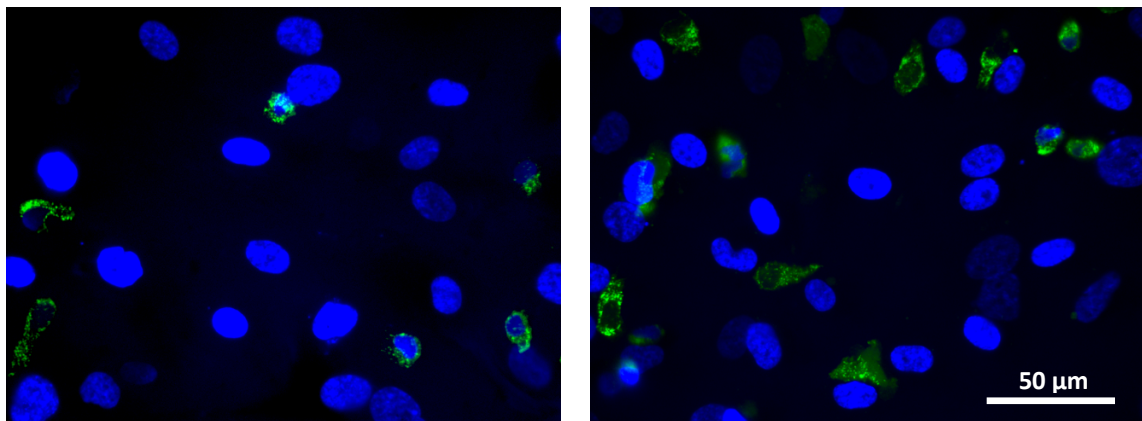


Abbildung 2.5 HUVEC-Zellkerne und Monozyten unter dem Fluoreszenzmikroskop

Dargestellt sind konfluente Monolayer aus HUVECs, von denen nur die angefärbten, blauen Zellkerne sichtbar sind. Ihnen anhaftend zeigen sich Monozyten (grün). Links: Kontrollgruppe; Rechts: Stimulation mit Infarkt-Serum.

2.8. Auswertung / Statistik

Für alle Versuche wurden 3 Messreihen ($N=3$) durchgeführt. Innerhalb einer Messreihe wurden auf je zwei Deckgläsern pro Gruppe Messungen vorgenommen. Für die AFM-Messungen wurden 20 Zellen pro Deckglas gemessen. Dabei erfolgten für jede Zelle acht Einzelmessungen, aus denen anschließend der Mittelwert gebildet wurde. Die daraus resultierenden Messpunkte ($n=120$) gingen in die statistische Auswertung ein.

Die Cell-Hesion-Messungen erfolgten ebenfalls in 3 Messreihen ($N=3$) mit jeweils zwei Deckgläsern pro Gruppe. Auf jedem Deckglas wurden 20 Einzelmessungen von Zellen durchgeführt, was zu einer Gesamtzahl von 120 Messpunkten ($n=120$) führte.

Im Rahmen des Monozyten-Adhäsions-Assays wurden in 3 Messreihen ($N=3$) je zwei Deckgläser pro Gruppe untersucht. Pro Deckglas wurden in diesen Versuchen 40 Aufnahmen gemacht. Dies führte in der Summe zu 240 Datenpunkten ($n=240$).

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Software IBM SPSS Statistics (IBM Corp., Version 28.0.1, 2020, Armonk, New York) und GraphPad PRISM (GraphPad Software Inc., Version 7.0, März 2016, San Diego, Kalifornien). GraphPad PRISM wurde auch zum Erstellen der Abbildungen genutzt. Schematische Abbildungen im Einleitungs- und Methodikteil wurden mit Microsoft PowerPoint (Microsoft Corporation, Version 16.85, 2024, Redmond, Washington) erstellt.

Alle Datensätze wurden mithilfe des D'Agostino-Pearson-Tests auf Normalverteilung getestet und darauf basierend die am besten passenden statistischen Auswertungsoptionen gewählt.

Vor der Anwendung weiterer statistischer Tests wurden die erhobenen Daten auf Ausreißer geprüft. Dazu wurde der ROUT-Ausreißertest basierend auf der Falscherkennungsrate (Q-Wert = 1 %) verwendet. Ausreißer wurden vor der weiteren Analyse aus dem Datensatz entfernt.

Für alle Gruppen wurde eine deskriptive Statistik angefertigt. Die Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden mit Hilfe des Student-t-Tests für parametrische Werte und mit dem Mann-Whitney-Test für nicht-parametrische Werte analysiert. Gruppenunterschiede zwischen drei oder mehr Gruppen wurden mit der ANOVA (parametrisch) oder mit dem Kruskal-Wallis-Test (nicht-parametrisch) ermittelt.

Unterschiede wurden als statistisch signifikant angesehen, wenn $p < 0,05$ (* = $p < 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$; **** = $p \leq 0,0001$). Alle Daten sind als absolute Werte von Mittelwert \pm Standardabweichung ($m \pm SD$) angegeben und dargestellt. Die Balkendiagramme zeigen mit ihrer Höhe den Mittelwert, die Whisker zeigen eine Standardabweichung. Wenn sinnvoll, sind einzelne Messpunkte dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1. Stimulation mit C3a und Rezeptorantagonist

3.1.1. C3a führt zu einer Schädigung der endothelialen Glykokalyx

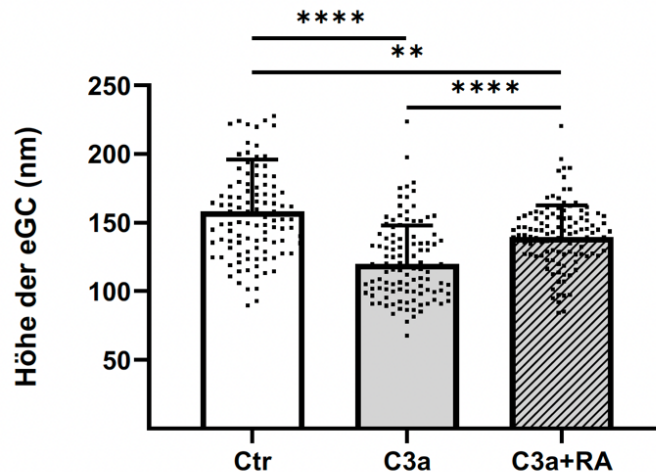


Abbildung 3.1 AFM-Messung nach Stimulation mit C3a und Rezeptorantagonist

Aufgezeigt wird die gemessene Höhe der eGC in Nanometer (nm) nach 24-stündiger Stimulation. Die Abbildung umfasst die Ergebnisse von N=3 Messreihen mit n=120 gemessenen Zellen.

** = $p \leq 0,01$; **** = $p \leq 0,0001$.

Abbildung 3.1 zeigt die mittels AFM ermittelte Höhe der eGC nach Stimulation mit dem Anaphylatoxin C3a und dessen spezifischem Rezeptorantagonist. Die Kontrollgruppe präsentiert sich mit einer mittleren eGC-Höhe von 158,1 nm. Nach Stimulation mit C3a reduziert sich diese um 27,5 % (Ctr vs. C3a: $158,1 \pm 37,8$ nm vs. $119,9 \pm 27,9$ nm; $p < 0,0001$). Die zusätzliche Stimulation mit dem Rezeptorantagonisten führt im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit C3a zu einer Zunahme der Glykokalyxhöhe um 15,2 % (C3a vs. C3a+RA: $119,9 \pm 27,9$ nm vs. $139,6 \pm 23,0$ nm; $p < 0,0001$). Trotz signifikanter Zunahme der Höhe erreicht die C3a + Rezeptorantagonist-Gruppe nicht das Niveau der Kontrolle. Im direkten Vergleich bleibt sie 12,4 % unter dem Ausgangswert (Ctr. vs. C3a+RA: $158,1 \pm 37,8$ nm vs. $139,6 \pm 23,0$ nm; $p < 0,01$).

3.1.2. C3a erhöht die Anzahl der adhärenen Monozyten

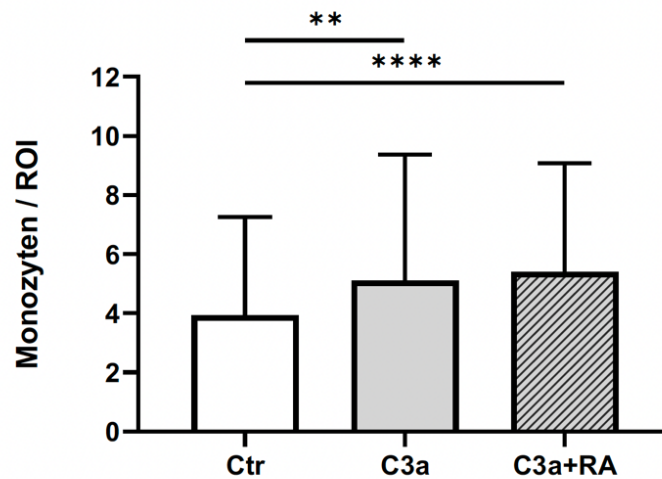


Abbildung 3.2 Monozyten-Adhäsions-Assay nach Stimulation mit C3a und Rezeptorantagonist

Aufgezeigt wird die Zahl adhärenen Monozyten pro Bild (region of interest (ROI)) nach 24-stündiger Stimulation. Die Abbildung umfasst die Ergebnisse von N=3 Messreihen mit n=240 gemessenen Zellen.

** = $p \leq 0,01$; **** = $p \leq 0,0001$.

Abbildung 3.2 zeigt die quantitative Bindung der isolierten Monozyten an die stimulierten HUVEC. Im Vergleich zur Kontrolle adhärenen auf den mit C3a stimulierten Zellen 26,1 % mehr Monozyten pro Region of Interest (ROI) (Ctr vs. C3a: $3,93 \pm 3,33$ Monozyten / ROI vs. $5,11 \pm 4,26$ Monozyten / ROI; $p < 0,01$). Die Zugabe des Rezeptorantagonisten führt im Vergleich zur Kontrolle sogar zu einer Zunahme der fixierten Monozyten um 31,7 % (Ctr vs. C3a+RA: $3,93 \pm 3,33$ Monozyten / ROI vs. $5,41 \pm 3,68$ Monozyten / ROI; $p < 0,0001$). Der Unterschied zwischen den Gruppen C3a und C3a + Rezeptorantagonist ist statistisch nicht signifikant (C3a vs. C3a+RA: $5,11 \pm 4,26$ Monozyten / ROI vs. $5,41 \pm 3,68$ Monozyten / ROI; $p > 0,05$)

3.1.3. C3a führt zu einer verstärkten Adhäsion von Monozyten

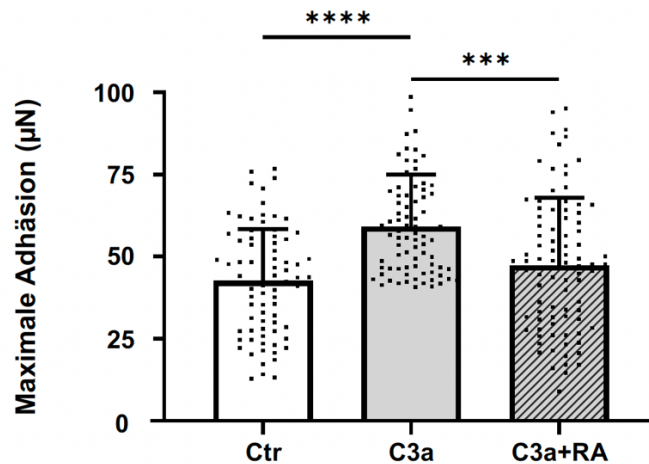


Abbildung 3.3 Cell-Hesion-Messung nach Stimulation C3a und Rezeptorantagonist

Aufgezeigt wird die maximale Adhäsion zwischen Monozyten und eGC in Mikronewton (μN). Die Abbildung umfasst die Ergebnisse von N=3 Messreihen mit n=120 gemessenen Zellen.

*** = $p \leq 0,001$; **** = $p \leq 0,0001$.

Abbildung 3.3 zeigt die quantitative Bindung eines isolierten humanen Monozyten an die unterschiedlich stimulierten HUVEC, gemessen mittels Cell-Hesion am AFM. Im Vergleich zur Kontrolle zeigt sich in der Gruppe der mit C3a stimulierten HUVEC eine signifikante Erhöhung der Adhäsionskraft um 32,5 % (Ctr vs. C3a: $42,59 \mu\text{N} \pm 15,81 \mu\text{N}$ vs. $59,10 \mu\text{N} \pm 15,93 \mu\text{N}$; $p < 0,0001$).

Nach Zugabe von C3a + Rezeptorantagonist zeigt sich eine im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit C3a um 22,1 % verringerte Adhäsion (C3a vs. C3a+RA: $59,10 \mu\text{N} \pm 15,93 \mu\text{N}$ vs. $47,33 \mu\text{N} \pm 20,54 \mu\text{N}$; $p < 0,001$). Der Unterschied zwischen der Kontrolle und der Gruppe C3a + Rezeptorantagonist beträgt 10,5 %, ist statistisch jedoch nicht signifikant (Ctr vs. C3a+RA: $42,59 \mu\text{N} \pm 15,81 \mu\text{N}$ vs. $47,33 \mu\text{N} \pm 20,54 \mu\text{N}$; $p > 0,05$).

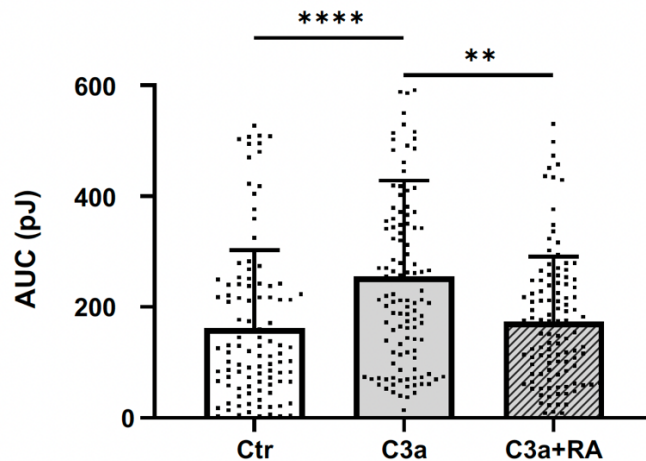


Abbildung 3.4 Cell-Hesion-Messung nach Stimulation mit C3a und Rezeptorantagonist

Aufgezeigt wird die zur Lösung des Monozyten benötigte Energie als Area under the Curve (AUC) in Picojoule (pJ). Die Abbildung umfasst die Ergebnisse von N=3 Messreihen mit n=120 gemessenen Zellen.

** = $p \leq 0,01$; **** = $p \leq 0,0001$.

Abbildung 3.4 zeigt die zur Lösung eines isolierten humanen Monozyten insgesamt benötigte Energie in Picojoule. Im Vergleich zur Kontrolle erhöht sich diese nach Stimulation mit C3a um 44,8% (Ctr vs. C3a: 161,4 pJ ± 141,5 pJ vs. 254,5 pJ ± 173,5 pJ; $p < 0,0001$). Die mit C3a + Rezeptorantagonist stimulierte Gruppe zeigt im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit C3a eine Verringerung der benötigten Energie um 37,9 % (C3a vs. C3a+RA: 254,5 pJ ± 173,5 pJ vs. 173,4 ± 118,0 pJ; $p < 0,01$). Die Kontrolle und die Gruppe C3a + Rezeptorantagonist unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Ctr vs. C3a+RA: 161,4 pJ ± 141,5 pJ vs. 173,4 ± 118,0 pJ; $p > 0,05$). Der Unterschied beträgt 7,2 %.

3.2. Stimulation mit Serum (hohe C3a-Konzentration) und RA

3.2.1. Serum mit hoher C3a-Konzentration führt zur Schädigung der Glykokalyx

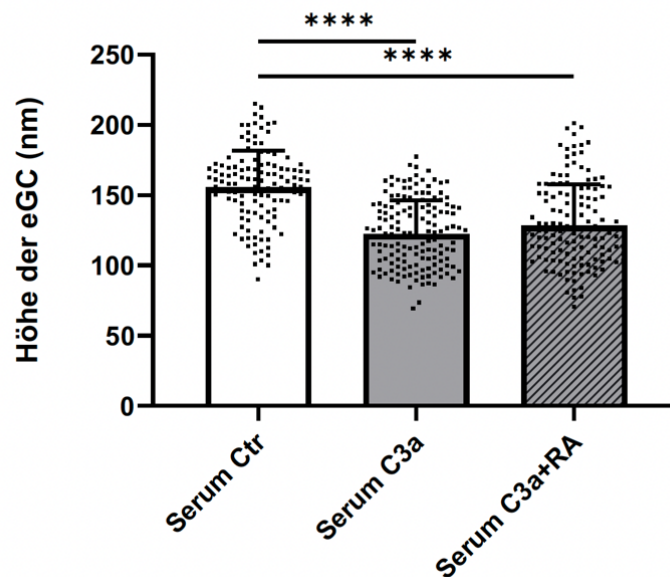


Abbildung 3.5 AFM-Messung nach Stimulation mit Infarkt-Serum mit hoher C3a-Konzentration und RA

Aufgezeigt wird die gemessene Höhe der eGC in Nanometer (nm) nach 24-stündiger Stimulation. Die Abbildung umfasst die Ergebnisse von N=3 Messreihen mit n=120 gemessenen Zellen.

**** = $p \leq 0,0001$.

Abbildung 3.5 zeigt die endotheliale Glykokalyxhöhe, gemessen am AFM. Die Serum-Kontrolle hat im Durchschnitt eine Höhe von 155,4 nm. Nach Stimulation mit Myokardinfarkt-Serum mit hoher C3a-Konzentration sinkt die mittlere Höhe der eGC um 33,1 nm bzw. 23,8 % (Ctr vs. Serum C3a: $155,4 \pm 26,2$ nm vs. $122,3 \pm 23,8$ nm; $p < 0,0001$). Die zusätzliche Stimulation mit dem C3a-RA zeigt ein ähnliches Ergebnis, hier beträgt die Reduktion im Vergleich zur Kontrolle 19,1 % (Ctr vs. Serum C3a+RA: $155,4 \pm 26,2$ nm vs. $128,3 \pm 29,2$ nm; $p < 0,0001$). Der Unterschied zwischen Serum mit hoher C3a-Konzentration und Serum mit hoher C3a-Konzentration + Rezeptorantagonist ist mit einer Differenz von 4,8 % als nicht signifikant zu werten (Serum C3a vs. Serum C3a+RA: $122,3 \pm 23,8$ nm vs. $128,3 \pm 29,2$ nm; $p > 0,05$).

3.2.2. Serum (hohe C3a-Konzentration) erhöht die Anzahl adhärenter Monozyten

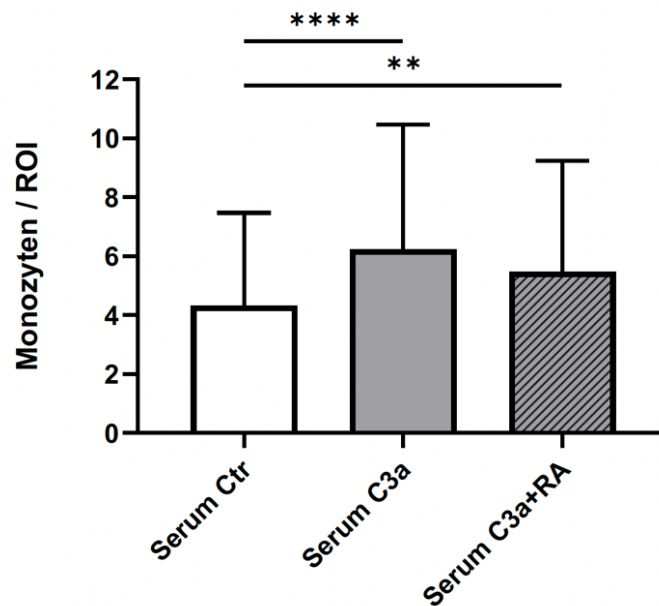


Abbildung 3.6 Monozyten-Adhäsions-Assay nach Stimulation mit Serum (hohe C3a Konzentration) und RA

Aufgezeigt wird die Zahl adhärenter Monozyten pro Bild (region of interest (ROI)) nach 24-stündiger Stimulation. Die Abbildung umfasst die Ergebnisse von N=3 Messreihen mit n=240 gemessenen Zellen.

** = $p \leq 0,01$; **** = $p \leq 0,0001$.

Abbildung 3.6 zeigt die quantitative Bindung von isolierten humanen Monozyten an die mit Serum stimulierten HUVEC. Im Vergleich zur Kontrolle adhäreren auf den mit Myokardinfarkt-Serum mit hoher C3a-Konzentration stimulierten HUVEC 36,3 % mehr Monozyten (Ctr. vs. Serum C3a: $4,33 \pm 3,15$ Monozyten / ROI vs. $6,25 \pm 4,22$ Monozyten / ROI; $p < 0,0001$). Trotz 13,3 % weniger gebundener Monozyten in der Gruppe Myokardinfarkt-Serum mit hoher C3a-Konzentration + Rezeptorantagonist unterscheidet sich diese nicht signifikant von der alleinigen Myokardinfarkt-Serum mit hoher C3a-Konzentration Stimulation (Serum C3a vs. Serum C3a+RA: $6,25 \pm 4,22$ Monozyten / ROI vs. $5,47 \pm 3,76$ Monozyten / ROI; $p > 0,05$).

Im Vergleich zur Kontrolle ließen sich nach Stimulation mit Myokardinfarkt-Serum mit hoher C3a-Konzentration + Rezeptorantagonist noch 23,3 % mehr Monozyten auf den Zellen finden (Ctr. vs. Serum C3a+RA: $4,33 \pm 3,15$ Monozyten / ROI vs. $5,47 \pm 3,76$ Monozyten / ROI; $p < 0,001$).

3.2.3. Serum (hohe C3a-Konzentration) führt zu verstärkter Monozytenadhäsion

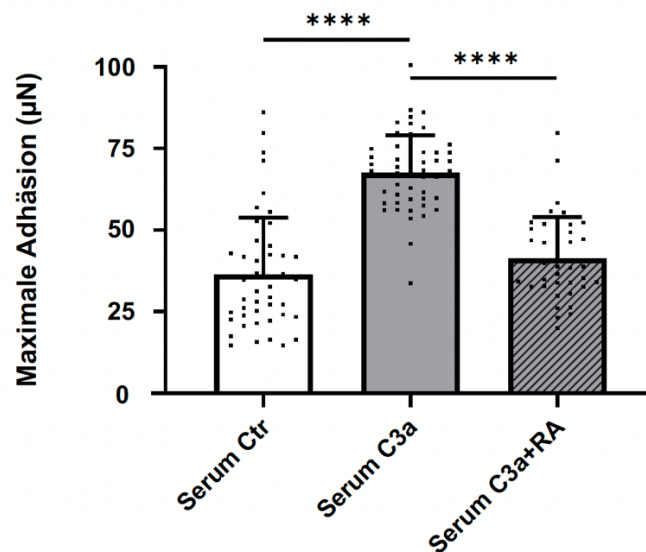


Abbildung 3.7 Cell-Hesion Messung nach Stimulation mit Infarkt-Serum (hohe C3a-Konzentration) und RA

Aufgezeigt wird die maximale Adhäsion zwischen Monozyten und eGC in Mikronewton (μN). Die Abbildung umfasst die Ergebnisse von N=3 Messreihen mit n=120 gemessenen Zellen.

**** = $p \leq 0,0001$.

Abbildung 3.7 zeigt die quantitative Bindung eines isolierten humanen Monozyten an die mit Myokardinfarkt-Serum mit hoher C3a-Konzentration und Rezeptorantagonist stimulierten HUVEC. Im Vergleich zur Kontrolle ist die maximale Adhäsion nach Stimulation mit Myokardinfarkt-Serum mit hoher C3a-Konzentration um 60 % erhöht (Ctr vs. Serum C3a: $36,36 \mu\text{N} \pm 17,46 \mu\text{N}$ vs. $67,55 \mu\text{N} \pm 11,51 \mu\text{N}$; $p < 0,0001$). Nach Stimulation mit Myokardinfarkt-Serum mit hoher C3a-Konzentration + Rezeptorantagonist verringert sich die Bindung mit einer gegenüber der alleinigen Stimulation mit Myokardinfarkt-Serum mit hoher C3a-Konzentration um 48,1 % (Serum C3a vs. Serum C3a+RA: $67,55 \mu\text{N} \pm 11,51 \mu\text{N}$ vs. $41,34 \mu\text{N} \pm 12,64 \mu\text{N}$; $p < 0,0001$). Nach Zugabe des Rezeptorantagonisten besteht ein Unterschied von 12,8 % zur Kontrollgruppe (Ctr vs. Serum C3a+RA: $36,36 \mu\text{N} \pm 17,46 \mu\text{N}$ vs. $41,34 \mu\text{N} \pm 12,64 \mu\text{N}$; $p > 0,05$). Diese Veränderung ist statistisch nicht signifikant

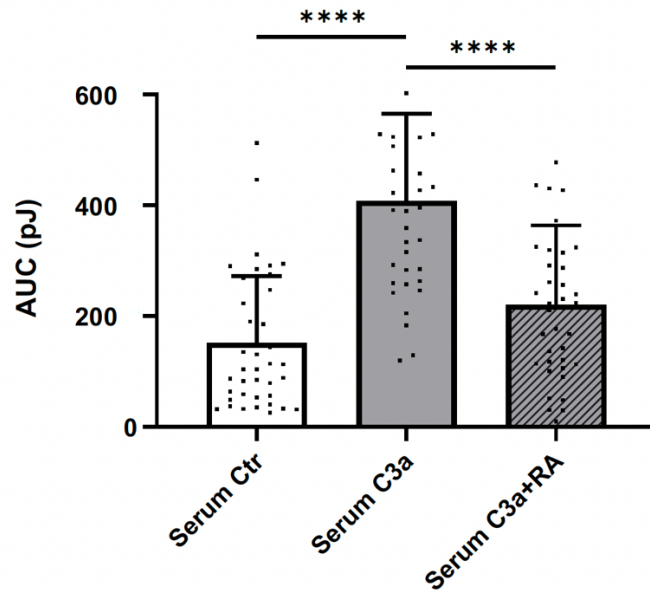


Abbildung 3.8 Cell-Hesion-Messung nach Stimulation mit Infarkt-Serum (hohe C3a-Konzentration) und RA

Aufgezeigt wird die zur Lösung des Monozyten benötigten Energie als Area under the Curve (AUC) in Picojoule (pJ). Die Abbildung umfasst die Ergebnisse von N=3 Messreihen mit n=120 gemessenen Zellen.

**** = $p \leq 0,0001$.

Abbildung 3.8 zeigt die zur Lösung eines isolierten humanen Monozyten insgesamt benötigte Energie in Picojoule. Im Vergleich zur Kontrolle erhöht sich die benötigte Energie zur Lösung eines Monozyten nach Stimulation mit Myokardinfarkt-Serum mit hoher C3a-Konzentration um 91,3 % (Ctr vs. Serum C3a: $152,1 \text{ pJ} \pm 120,0 \text{ pJ}$ vs. $407,8 \text{ pJ} \pm 157,4 \text{ pJ}$; $p < 0,0001$). Die zusätzliche Zugabe des Rezeptorantagonisten führt im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Myokardinfarkt-Serum mit hoher C3a-Konzentration zu einer um 59,6 % verringerten benötigten Energie (Serum C3a vs. Serum C3a+RA: $407,8 \text{ pJ} \pm 157,4 \text{ pJ}$ vs. $220,6 \text{ pJ} \pm 142,9 \text{ pJ}$; $p < 0,0001$). Trotz eines Unterschieds von 36,8 % zwischen den Gruppen Kontrolle und Myokardinfarkt-Serum mit hoher C3a-Konzentration + Rezeptorantagonist (Ctr vs. Serum C3a+RA: $152,1 \text{ pJ} \pm 120,0 \text{ pJ}$ vs. $220,6 \text{ pJ} \pm 142,9 \text{ pJ}$; $p > 0,05$) ist dieses Ergebnis statistisch nicht signifikant.

3.3. Stimulation mit C5a und Rezeptorantagonist

3.3.1. C5a führt zu einer Schädigung der endothelialen Glykokalyx

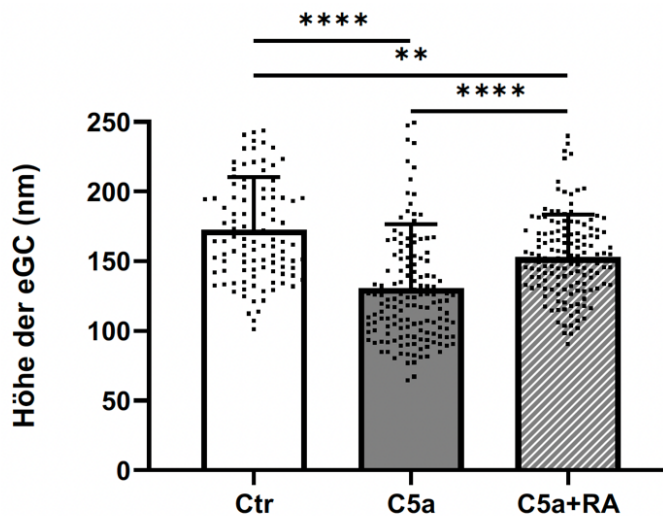


Abbildung 3.9 AFM-Messung nach Stimulation mit C5a und Rezeptorantagonist

Aufgezeigt wird die gemessene Höhe der eGC in Nanometer (nm) nach 24-stündiger Stimulation. Die Abbildung umfasst die Ergebnisse von N=3 Messreihen mit n=120 gemessenen Zellen.

** = $p \leq 0,01$; **** = $p \leq 0,0001$.

Die Abbildung 3.9 zeigt die mit Hilfe des AFM gemessene Höhe der endothelialen Glykokalyx nach Stimulation. Durch Stimulation mit dem Anaphylatoxin C5a zeigt sich mit 27,6 % eine signifikante Verringerung der Glykokalyxhöhe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Ctr vs. C5a: $172,6 \pm 37,7$ nm vs. $130,7 \pm 45,9$ nm; $p < 0,0001$). Dies entspricht im Schnitt einer Abnahme von 42 nm. Nach Zugabe des Rezeptorantagonisten zeigt sich eine um 15,7 % höhere Glykokalyx im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit C5a (C5a vs. C5a+RA: $130,7 \pm 45,9$ nm vs. $152,9 \pm 30,8$ nm; $p < 0,0001$). Dies entspricht einer Zunahme von 22,2 nm. Nach zusätzlicher Zugabe des Rezeptorantagonisten ist im Vergleich zur Kontrolle eine Reduktion der Glykokalyxhöhe um 12,1 % zu beobachten (Ctr vs. C5a+RA: $172,6 \pm 37,7$ nm vs. $152,9 \pm 30,8$ nm; $p < 0,01$). Damit bleibt die Höhe der eGC nach Stimulation mit C5a + Rezeptorantagonist im Mittel 19,7 nm unter der der Kontrolle.

3.3.2. C5a erhöht die Anzahl adhärenter Monozyten

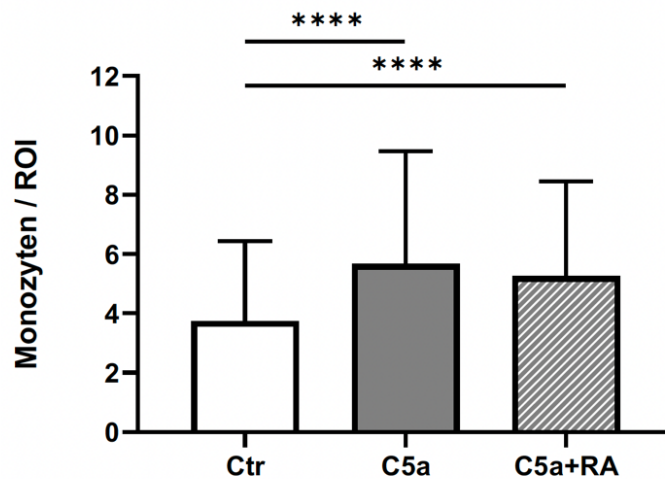


Abbildung 3.10 Monozyten-Adhäsions-Assay nach Stimulation mit C5a und Rezeptorantagonist

Aufgezeigt wird die Zahl adhärenter Monozyten pro Bild (region of interest (ROI)) nach 24-stündiger Stimulation. Die Abbildung umfasst die Ergebnisse von N=3 Messreihen mit n=240 gemessenen Zellen.

**** = $p \leq 0,0001$.

Abbildung 3.10 zeigt die quantitative Bindung von isolierten humanen Monozyten an die unterschiedlich stimulierten HUVEC. Nach Stimulation mit C5a zeigt sich eine signifikante Erhöhung der adhärenter Monozyten pro Region of Interest um 41,0 % (Ctr vs. C5a: $3,74 \pm 2,70$ Monozyten / ROI vs. $5,67 \pm 3,81$ Monozyten / ROI; $p < 0,0001$). Dies entspricht einem durchschnittlichen Plus von 1,93 Monozyten pro ROI.

Nach Zugabe von C5a + Rezeptorantagonist zeigt sich ein ähnliches Bild. Im Vergleich zur Kontrolle erhöht sich die Zahl der adhärenter Monozyten um 33,8 % (Ctr vs. C5a+RA: $3,74 \pm 2,70$ Monozyten / ROI vs. $5,26 \pm 3,19$ Monozyten / ROI; $p < 0,0001$).

Nach Zugabe von C5a und Rezeptorantagonist ist gegenüber der alleinigen Stimulation mit C5a keine signifikante Veränderung zu erkennen (C5a vs. C5a+RA: $5,67 \pm 3,81$ Monozyten / ROI vs. $5,26 \pm 3,19$ Monozyten / ROI; $p > 0,05$). Der Unterschied beträgt 7,5 %.

3.3.3. C5a führt zu einer verstärkten Adhäsion von Monozyten

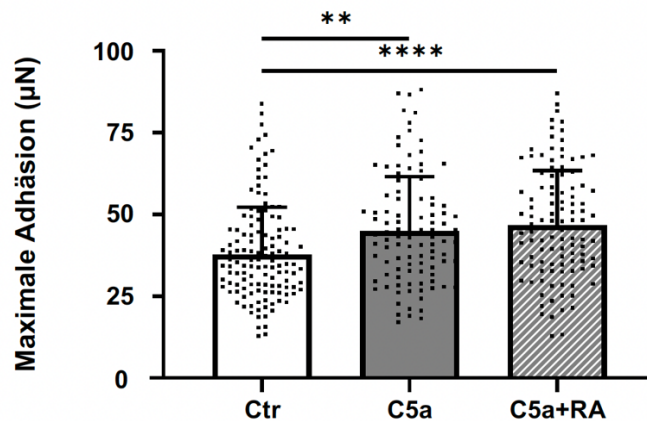


Abbildung 3.11 Cell-Hesion-Messung nach Stimulation mit C5a und Rezeptorantagonist

Aufgezeigt wird die maximale Adhäsion zwischen Monozyten und eGC in Mikronewton (μN). Die Abbildung umfasst die Ergebnisse von N=3 Messreihen mit n=120 gemessenen Zellen.

** = $p \leq 0,01$; **** = $p \leq 0,0001$.

Abbildung 3.11 zeigt die quantitative Bindung eines isolierten humanen Monozyten an die unterschiedlich stimulierten HUVEC, gemessen mittels Cell-Hesion am AFM. In der Gruppe der mit C5a stimulierten HUVEC zeigt sich eine signifikante Erhöhung der Adhäsion um 17,4 % (Ctr vs. C5a: $37,7 \mu\text{N} \pm 14,5 \mu\text{N}$ vs. $44,9 \mu\text{N} \pm 16,6 \mu\text{N}$; $p < 0,01$).

Nach Zugabe von C5a + Rezeptorantagonist zeigt sich ein ähnliches Bild. Im Vergleich zur Kontrolle erhöht sich die Adhäsion um 21,3 % (Ctr vs. C5a+RA: $37,7 \mu\text{N} \pm 14,5 \mu\text{N}$ vs. $46,7 \mu\text{N} \pm 16,7 \mu\text{N}$; $p < 0,0001$).

Trotz der weiteren Zunahme der Adhäsion nach Stimulation mit C5a + Rezeptorantagonist ist gegenüber der alleinigen Stimulation mit C5a keine signifikante Veränderung zu erkennen (C5a vs. C5a+RA: $44,9 \mu\text{N} \pm 16,6 \mu\text{N}$ vs. $46,7 \mu\text{N} \pm 16,7 \mu\text{N}$; $p > 0,05$). Der Unterschied der beiden Gruppen beträgt 3,9 %.

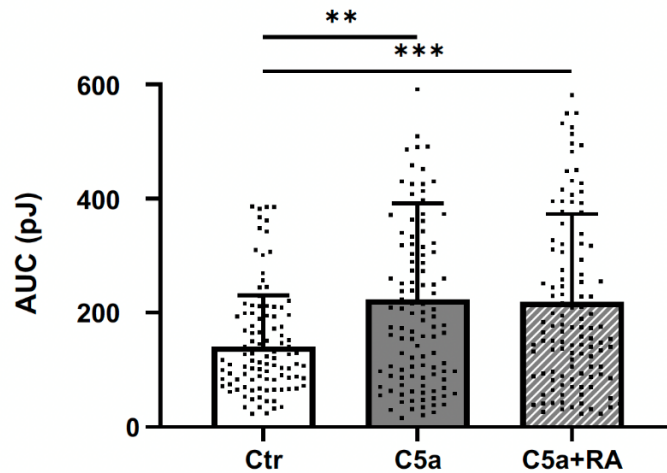


Abbildung 3.12 Cell-Hesion-Messung nach Stimulation mit C5a und Rezeptorantagonist

Aufgezeigt wird die zur Lösung des Monozyten benötigten Energie als Area under the Curve (AUC) in Picojoule (pJ). Die Abbildung umfasst die Ergebnisse von N=3 Messreihen mit n=120 gemessenen Zellen.

** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$.

Abbildung 3.12 zeigt die zur Lösung eines isolierten humanen Monozyten insgesamt benötigte Energie in Picojoule, gemessen als Area under the Curve (AUC). Im Vergleich zur Kontrolle erhöht sich die AUC nach Stimulation mit C5a um 45,4 % (Ctr vs. C5a: $140,6 \text{ pJ} \pm 90,0 \text{ pJ}$ vs. $223,2 \text{ pJ} \pm 168,6 \text{ pJ}$; $p < 0,01$). Die mit C5a + Rezeptorantagonist stimulierte Gruppe zeigt eine um 43,7 % erhöhte AUC im Vergleich zur Kontrolle (Ctr vs. C5a+RA: $140,6 \text{ pJ} \pm 90,0 \text{ pJ}$ vs. $219,3 \pm 154,1 \text{ pJ}$; $p < 0,001$). Die Gruppen C5a und C5a + Rezeptorantagonist unterscheiden sich mit einem Unterschied von 1,8 % nicht signifikant voneinander (C5a vs. C5a+RA: $223,2 \text{ pJ} \pm 168,6 \text{ pJ}$ vs. $219,3 \pm 154,1 \text{ pJ}$; $p > 0,05$). Dies passt zu den gemessenen Adhäsionskräften in Mikronewton aus Abbildung 3.11.

3.4. Stimulation mit Serum (hohe C5a-Konzentration) und RA

3.4.1. Serum mit hoher C5a-Konzentration führt zur Schädigung der Glykokalyx

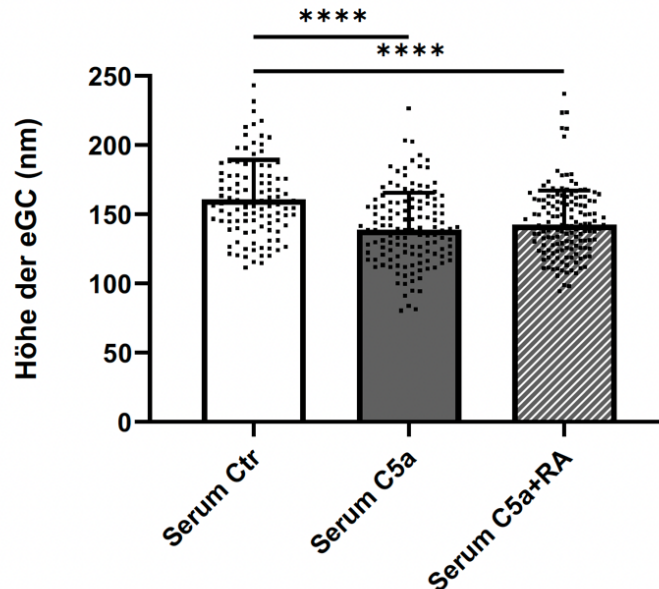


Abbildung 3.13 AFM-Messung nach Stimulation mit Infarkt-Serum mit hoher C5a-Konzentration und RA

Aufgezeigt wird die gemessene Höhe der eGC in Nanometer (nm) nach 24-stündiger Stimulation. Die Abbildung umfasst die Ergebnisse von N=3 Messreihen mit n=120 gemessenen Zellen.

**** = $p \leq 0,0001$.

Die Abbildung 3.13 zeigt die mit Hilfe des AFM gemessene Höhe der endothelialen Glykokalyx nach unterschiedlichen Stimulationen mit Patientenserum. Durch Stimulation mit Myokardinfarkt-Serum mit hoher C5a-Konzentration zeigt sich eine signifikante Verringerung der Glykokalyxhöhe im Vergleich zur Kontrollgruppe um 14,7 % (Ctr vs. Serum C5a: $160,8 \pm 28,6$ nm vs. $138,8 \pm 26,8$ nm; $p < 0,0001$). Dies entspricht im Schnitt einer Abnahme von 22 nm. Nach Zugabe des Rezeptorantagonisten zeigt sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Reduktion der Glykokalyxhöhe um 12 %. (Ctr vs. Serum C5a+RA: $160,8 \pm 28,6$ nm vs. $142,6 \pm 24,9$ nm; $p < 0,0001$). Die Abnahme beträgt im Mittel 18,9 nm. Die Zugabe des Rezeptorantagonisten führt zu keiner signifikanten Veränderung im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Serum (Serum C5a vs. Serum C5a+RA: $138,8 \pm 26,8$ nm vs. $142,6 \pm 24,9$ nm; $p > 0,05$).

3.4.2. Serum (hohe C5a-Konzentration) erhöht die Anzahl adhärenter Monozyten

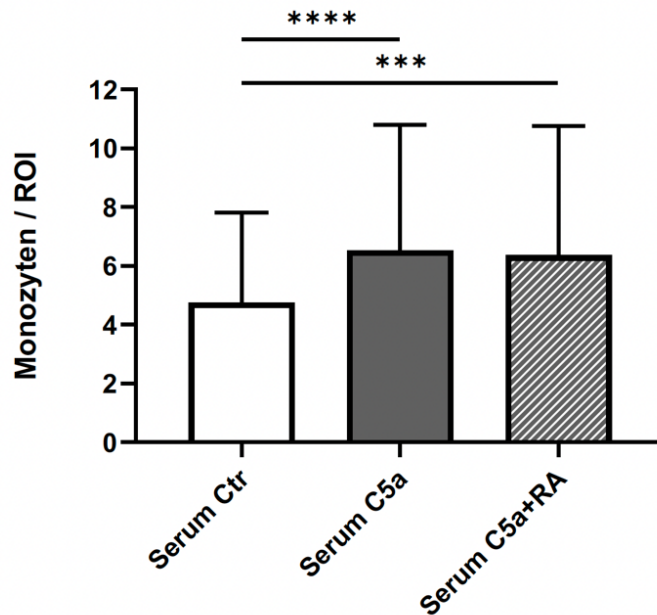


Abbildung 3.14 Monozyten-Adhäsions-Assay nach Stimulation mit Serum (hohe C5a-Konzentration) und RA

Aufgezeigt wird die Zahl adhärenter Monozyten pro Bild (region of interest (ROI)) nach 24-stündiger Stimulation. Die Abbildung umfasst die Ergebnisse von N=3 Messreihen mit n=240 gemessenen Zellen.

*** = $p \leq 0,001$; **** = $p \leq 0,0001$.

Abbildung 3.14 zeigt die quantitative Bindung von isolierten humanen Monozyten an die mit Serum stimulierten HUVEC. Im Vergleich zur Kontrolle adhären auf den mit Myokardinfarkt-Serum mit hoher C5a-Konzentration stimulierten HUVEC 31,4 % mehr Monozyten (Ctr. vs. Serum C5a: $4,76 \pm 3,06$ Monozyten / ROI vs. $6,53 \pm 4,28$ Monozyten / ROI; $p < 0,0001$). Nach zusätzlicher Stimulation mit dem C5a-Rezeptorantagonisten befanden sich im Vergleich zur Kontrolle 28,9 % mehr Monozyten auf den Zellen (Ctr. vs. Serum C5a+RA: $4,76 \pm 3,06$ Monozyten / ROI vs. $6,37 \pm 4,40$ Monozyten / ROI; $p < 0,01$). Trotz 2,5 % weniger gebundener Monozyten in der Gruppe Myokardinfarkt-Serum mit hoher C5a-Konzentration + Rezeptorantagonist unterscheidet sich diese nicht signifikant von der alleinigen Myokardinfarkt-Serum mit hoher C5a-Konzentration Stimulation (Serum C5a vs. Serum C5a+RA: $6,53 \pm 4,28$ Monozyten / ROI vs. $6,37 \pm 4,40$ Monozyten / ROI; $p > 0,05$).

3.4.3. Serum (hohe C5a-Konzentration) führt zu verstärkter Monozytenadhäsion

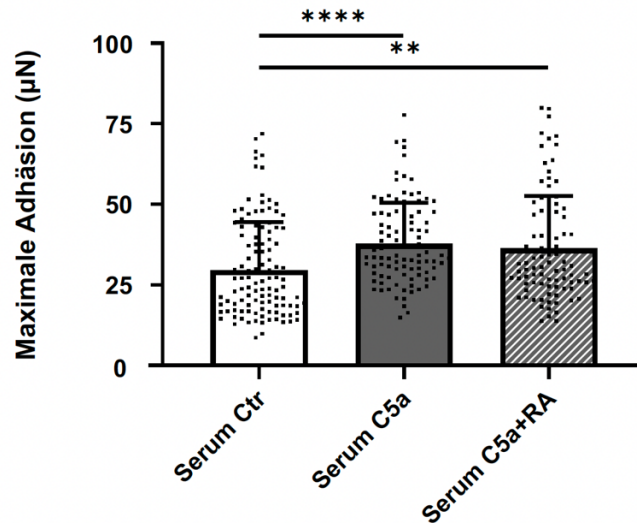


Abbildung 3.15 Cell-Hesion-Messung nach Stimulation mit Serum mit hoher C5a-Konzentration und RA

Aufgezeigt wird die maximale Adhäsion zwischen Monozyten und eGC in Mikronewton (μN). Die Abbildung umfasst die Ergebnisse von N=3 Messreihen mit n=120 gemessenen Zellen.

** = $p \leq 0,01$; **** = $p \leq 0,0001$.

Abbildung 3.15 zeigt die qualitative Bindung eines isolierten humanen Monozyten an die mit Serumproben stimulierten HUVEC. Im Vergleich zur Kontrolle ist die maximale Adhäsion nach Stimulation mit Infarktserum um 24,4 % erhöht (Ctr vs. Serum C5a: $29,56 \mu\text{N} \pm 14,9 \mu\text{N}$ vs. $37,77 \mu\text{N} \pm 12,73 \mu\text{N}$; $p < 0,0001$). Auch nach Stimulation mit Myokardinfarkt-Serum mit hoher C5a-Konzentration + Rezeptorantagonist ist die Bindung mit einer Zunahme von 20,8 % gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht (Ctr vs. Serum C5a+RA: $29,56 \mu\text{N} \pm 14,9 \mu\text{N}$ vs. $36,41 \mu\text{N} \pm 16,23 \mu\text{N}$; $p < 0,01$). Die Zugabe des Rezeptorantagonisten bewirkt folglich eine Verringerung der Adhäsion um 3,7 % im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Myokardinfarkt-Serum mit hoher C5a-Konzentration (Serum C5a vs. Serum C5a+RA: $37,77 \mu\text{N} \pm 12,73 \mu\text{N}$ vs. $36,41 \mu\text{N} \pm 16,23 \mu\text{N}$; $p > 0,05$). Diese Veränderung ist statistisch nicht signifikant .

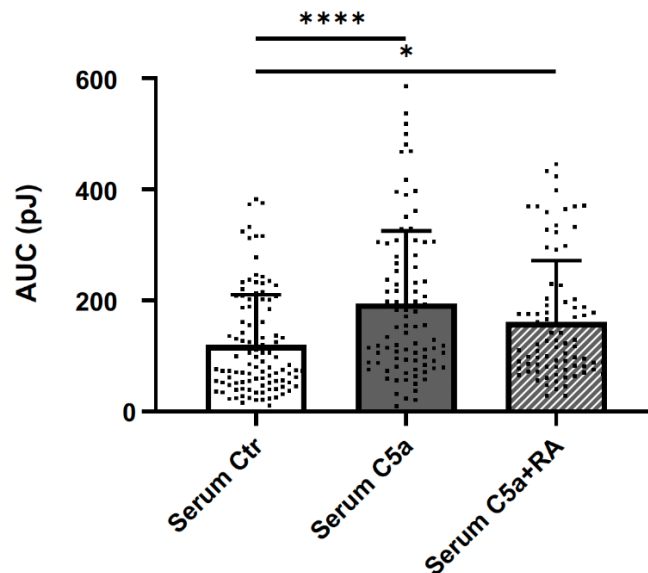


Abbildung 3.16 Cell-Hesion-Messung nach Stimulation mit Serum mit hoher C5a-Konzentration und RA

Aufgezeigt wird die zur Lösung des Monozyten benötigten Energie als Area under the Curve (AUC) in Picojoule (pJ). Die Abbildung umfasst die Ergebnisse von N=3 Messreihen mit n=120 gemessenen Zellen.

* = $p \leq 0,05$; **** = $p \leq 0,0001$.

Abbildung 3.16 zeigt die zur Lösung eines isolierten humanen Monozyten insgesamt benötigte Energie in Picojoule. Im Vergleich zur Kontrolle erhöht sich die benötigte Energie zur Lösung eines Monozyten nach Stimulation mit Myokardinfarkt-Serum mit hoher C5a-Konzentration um 47,3 % (Ctr vs. Serum C5a: $119,8 \text{ pJ} \pm 90,3 \text{ pJ}$ vs. $194,1 \text{ pJ} \pm 131,2 \text{ pJ}$; $p < 0,0001$). Die zusätzliche Zugabe des Rezeptorantagonisten führt im Vergleich zur Kontrolle zu einer um 29,7 % erhöhte benötigte Energie (Ctr vs. Serum C5a+RA: $119,8 \text{ pJ} \pm 90,3 \text{ pJ}$ vs. $161,5 \text{ pJ} \pm 110,4 \text{ pJ}$; $p < 0,05$). Trotz eines Unterschieds von 18,3 % zwischen den Gruppen Myokardinfarkt-Serum mit hoher C5a-Konzentration und Myokardinfarkt-Serum mit hoher C5a-Konzentration + Rezeptorantagonist (Serum C5a vs. Serum C5a+RA: $194,1 \text{ pJ} \pm 131,2 \text{ pJ}$ vs. $161,5 \text{ pJ} \pm 110,4 \text{ pJ}$; $p > 0,05$) ist dieses Ergebnis statistisch nicht signifikant.

4. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Auswirkungen der Anaphylatoxine C3a und C5a im Rahmen eines akuten Myokardinfarkts auf das Gefäß-Endothel, im speziellen auf die endotheliale Glykokalyx, zu untersuchen. Die Rolle der Anaphylatoxine im Rahmen von Ischämie/Reperfusionssituationen, vor allem im Rahmen der kardialen Ischämie, wie sie im Rahmen eines akuten Myokardinfarkts auftritt, wurde mit anderen Methoden als den hier genutzten bereits mehrfach untersucht [62,75,76]. Die genauen Mechanismen dahinter sind weiterhin Gegenstand der Forschung [77,78].

Neben der bereits bekannten Schädigung des Myokards gibt es Hinweise darauf, dass es zu einer kardialen und systemischen Schädigung des Endothels mit einhergehender Änderung der nanomechanischen Eigenschaften der Zelloberfläche kommt. Studien, die dies direkt am Endothel untersuchen, gibt es bisher nicht. Auch der Einfluss dieser potenziellen Schädigung auf die Monozytenadhäsion wurde bisher nicht untersucht.

Darüber hinaus ist bekannt, dass zahlreiche weitere Faktoren, die im Rahmen eines akuten Myokardinfarktes freigesetzt werden, zu einer Endothelschädigung und damit einhergehendem partiellen oder sogar vollständigem Funktionsverlust führen können [8,30,79]. Aus diesem Grund erfolgte ein zweigeteilter Versuchsaufbau. Neben den Stimulationen mit Serum aus dem Patientenkollektiv, dessen eingeschlossene Patientinnen und Patienten erstmals an einem akuten Myokardinfarkt erkrankten und hohe Anaphylatoxinkonzentrationen zeigten, erfolgte die Stimulation und Messung in einer weiteren Messreihe mit den Anaphylatoxinen C3a und C5a. In beiden Fällen wurden anschließend spezifische Rezeptorantagonisten eingesetzt. Der Einsatz dieser im Rahmen eines Endothelschadens, bzw. zur möglichen Verhinderung eines solchen, erfolgte erstmalig in einer Studie.

Während Endothelschäden im Rahmen des akuten Myokardinfarktes bisher über die Bestimmung von gelösten eGC-Bestandteilen im Blut nachgewiesen wurden [53,55], erlauben die durchgeführten Versuche eine direkte Betrachtung der Glykokalyx. Konformationsänderungen und Veränderungen der nanomechanischen Eigenschaften können direkt ermittelt werden. Zur Quantifizierung der Konformations- und Eigenschaftsänderungen der endothelialen Glykokalyx erfolgte die Messung von Höhe und Steifigkeit sowie der Grad der Aktivierung mittels Messung der Adhäsionskräfte zu humanen Monozyten.

4.1. C3a und C5a schädigen die endotheliale Glykokalyx

Das Komplementsystem hat im menschlichen Körper vielfältige Aufgaben in der angeborenen Immunabwehr. In den letzten Jahrzehnten mehrten sich darüber hinaus die Beobachtungen, dass eine Komplementaktivierung in vielen Situationen eine pathophysiologische Relevanz hat. Da die Aktivierung des Komplementsystems und die Freisetzung der Anaphylatoxine C3a und C5a auch eine zentrale Rolle bei der Schädigung der endothelialen Glykokalyx im Rahmen der Ischämie/Reperfusion einnimmt [30,73], wurden in einer ersten Versuchsreihe Messungen nach isolierter Stimulation mit eben jenen Komplementfaktoren durchgeführt.

Sowohl die Stimulation mit C3a als auch die Stimulation mit C5a führen hierbei zu einer signifikanten Abnahme der Höhe der endothelialen Glykokalyx. Dieser Befund spricht für ein Shedding der Glykokalyx [20]. Die Schädigung der endothelialen Glykokalyx und der damit einhergehende, durch die Anaphylatoxine ausgelöste Verlust von Glykokalyxbestandteilen, konnte in Vorarbeiten und eigenen Versuchen durch Bestimmung der Konzentration dieser im Serum gemessen werden. [51,60,80,81]. Die Wirkung von C3a und C5a erfolgt G-Protein-gekoppelt über die Rezeptoren C3aR, C5aR1 und C5aR2 [67]. Endothelzellen und weitere Körperzellen exprimieren die entsprechenden Rezeptoren [82]. Die intrazelluläre Expression kann hierbei variieren [83]. Die Achsen C3a:C3aR und C5a:C5aR1 scheinen einen großen Einfluss auf die Konformation und Funktion der endothelialen Glykokalyx zu haben [18]. In bereits durchgeführten Versuchen konnte sowohl für C3a [84] als auch für C5a [85] ein schädigender, proinflammatorischer Einfluss auf das vaskuläre Endothel festgestellt werden. Diese Beobachtungen können mit den Ergebnissen aus der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Hier zeigte sich eine deutliche Schädigung der eGC im Sinne eines Sheddings.

Diese Annahme wird durch die Beobachtung gestützt, dass die Zugabe der Antagonisten am C3a-Rezeptor und C5a-Rezeptor in unseren Messungen zu einer signifikant höheren Glykokalyx führt, bzw. eine Schädigung verhindert und der schädigende Effekt der Anaphylatoxine abgeschwächt wird. Die Ausgangswerte der Kontrollgruppe können dabei allerdings nicht erreicht werden. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen vergleichbarer Arbeiten.

Klinische Parameter, wie die von Busche und Stahl bestimmte kardiale Ejektionsfraktion [62] oder von Procotor et al. quantifizierte intestinale Ödeme [68], sowie die laborchemisch bestimmten Marker Troponin I [62], das von Bongoni et al. gemessene Serum-Kreatinin [73] und die Alanin-Amino-Transferase (*ALAT*) [68] als Zeichen des Zellschadens, erreichten die Ausgangswerte der Kontrollgruppe in den aufgeführten Studien nicht.

Eine zeitgleiche Wirkung von Agonist und Antagonist, sowie weitere, unbekannte Wirkungen des Antagonisten können mögliche Erklärungsansätze sein. Einen möglichen, von Busche und Stahl verfolgten Ansatz, um die Wirkung des Antagonisten zu verstärken, stellt die vorzeitige Gabe des Rezeptorantagonisten dar [62], bevor die Anaphylatoxine in Kontakt mit den Endothelzellen kommen.

Die systemische C5-Inhibierung 30 min vor der Reperfusion schützte im Tiermodell signifikant vor einem Myokardschaden. In der klinischen Praxis sind derartige prophylaktische Ansätze jedoch nur äußerst eingeschränkt nutzbar. In Bezug auf den STEMI ergibt sich keine Situation, in der dessen Eintreten vorhergesagt werden und ein Antagonist vorzeitig verabreicht werden kann.

4.2. C3a und C5a führen zu einer verstärkten Monozytenadhäsion

In der vorliegenden Arbeit ging mit dem Shedding der endothelialen Glykokalyx eine verstärkte Adhäsion von Monozyten einher. Dies zeigte sich auch bei Lee et al. [86]. Ähnliche Effekte konnten auch bei Mulivor et al. und Proppen et al. nachgewiesen werden, die zudem zeigen konnten, dass es im Rahmen einer Komplementaktivierung zu einer vermehrten Expression von ICAM [87] und VCAM-1 [84,88] kommen kann. Diese vermitteln die Rollen, Anhaften und anschließende Migrieren der Monozyten [78].

Die Zahl adhärenter Monozyten steigt im Monozyten-Adhäsions-Assay nach Stimulation mit C3a und C5a. In beiden Fällen haften dem konfluenten Monolayer aus HUVEC nach Stimulation signifikant mehr Monozyten an. Gleichzeitig ist die Adhäsion zwischen Monozyten und endothelialer Glykokalyx stärker. Insgesamt wird nach Stimulation sowohl mit C3a als auch mit C5a eine größere Energie benötigt, um einen humanen Monozyten vom Endothel zu lösen. Diese Zunahme der Monozytenadhäsion konnte auch in anderen Fällen der Glykokalyxschädigung beobachtet werden [88]. Der Kontakt der am Endothel gebun-

denen Selectine mit ihrer Höhe von ≤ 38 nm, mit den etwa 50 nm großen PSGL-1 auf Monozyten, wird im physiologischen Zustand durch die Glykokalyx verhindert [89]. Dadurch rollen die Monozyten wie „auf Zehenspitzen“ über die endotheliale Glykokalyx und können ihre Rezeptoren erst bei einer Schädigung dieser erreichen [88]. Zytokine aktivieren sowohl das Endothel als auch die Monozyten und führen zu einer Expression von Adhäsionsmolekülen [90]. Das Shedding der eGC begünstigt dabei die Ausbildung von Bindungen zwischen Monozyten und Endothel [91].

Die Zugabe der Rezeptorantagonisten führt in den Monozyten-Adhäsions-Assays zu keiner Reduktion der Zahl adhärenter Monozyten. Die Stärke der Monozytenbindung an die endotheliale Glykokalyx kann zwar nach Zugabe des C3a-Rezeptorantagonisten gesenkt werden, nicht jedoch nach der Zugabe des C5a-Rezeptorantagonisten. Zu bedenken ist hierbei, dass nach dem aktuellen Stand der Forschung nur ein C3a-Rezeptor vorliegt, jedoch zwei C5a-Rezeptoren, von denen lediglich einer durch den Antagonisten blockiert wird.

Nach Stimulation mit C3a und Blockade des C3a-Rezeptors scheinen noch immer schädigende Einflüsse auf das Endothel zu wirken. Ein möglicher Erklärungsansatz ist der verwendete C3a-Rezeptorantagonist SB290157. Ursprünglich als reiner Antagonist beschrieben, zeigten sich in Zellmodellen auch agonistische Eigenschaften [92]. Mathieu et al. sprechen in ihren Versuchen sogar von einer vollständig agonistischen Aktivität und weisen darauf hin, dass einige Effekte des Rezeptorantagonisten nicht mit einem bloßen Antagonismus am C3aR1 erklärbar seien [93]. Dafür ursächlich sind u.a. eine C3aR1-abhängige Aktivierung von Gi/o/z (ein Subtyp der G α -Untereinheit des C3aR1), die Rekrutierung von β -Arrestin, was eine Internalisierung bewirkt, und eine cAMP-Inhibierung [94]. Lee et al. gehen so weit davon zu sprechen, dass man nach Einsatz von SB290157 alle Ergebnisse auf den Antagonismus, den Agonismus und das dazwischen liegende pharmakologische Spektrum zurückführen muss [92]. In welcher Situation welche Eigenschaften überwiegen, wird nicht klar. Darüber hinaus werden für SB290157 neben den agonistischen Eigenschaften am C3aR1 auch partiell agonistische Eigenschaften am C5aR2 beschrieben [92,95]. Diese Beobachtungen konnten in Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe nicht bestätigt werden. Eine isolierte Stimulation mit dem Rezeptorantagonisten führte zu keiner signifikanten Wirkung am Endothel der stimulierten HUVECs.

Die nicht quantitativ verminderte Monozytenbindung nach Zugabe des C3a-Rezeptorantagonisten könnte dennoch über bisher nicht genau geklärte Wirkungen des Antagonisten erklärt werden. Eine genaue Klärung der Ursache bedarf weiterer Versuche.

Nach Stimulation mit C5a und Blockade des C5aR1-Rezeptors kommt es weder zu einer reduzierten Zahl adhärenter Monozyten noch zu einer Abnahme der Adhäsionskräfte. In Versuchen konnte gezeigt werden, dass der Rezeptorantagonist PMX53 z.B. das Rückenmark von Ratten im Falle einer Ischämie/Reperfusion schützen kann [96]. Nach einer Darmtransplantation an Ratten konnte nach Gabe von PMX53 eine Verringerung der Anreicherung von Makrophagen im Transplantat und Monozyten im Blut erreicht werden [97]. An diese Erkenntnisse kann mit den erhobenen Daten nicht vollumfänglich angeschlossen werden. Die Blockade des C5aR1-Rezeptors ohne die zusätzliche Zugabe von C5a führte in Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe nicht zu signifikanten Ergebnissen. Zu beachten ist hierbei, dass die C5a-Wirkung über zwei Rezeptoren vermittelt wird [98], PMX53 jedoch nur als Antagonist an einem, dem C5aR1 wirkt. Über die Funktionsweise von C5aR2 ist weitaus weniger bekannt als über C5aR1. Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass C5aR2 eine bedeutende Rolle bei der Aktivierung, Regulierung und Funktion von Neutrophilen spielt [99]. Dies lässt die Vermutung zu, dass weitere, bisher nicht bekannte Mechanismen, trotz C5aR1-Antagonismus, eine Schädigung der endothelialen Glykokalyx herbeiführen.

4.3. Glykokalyxschädigung im Rahmen des akuten Myokardinfarkts

Um den strukturellen und funktionellen Endothelschaden im Rahmen des akuten Myokardinfarkts zu untersuchen, wurden die zuvor mittels Anaphylatoxinen durchgeführten Stimulationen mit Serumproben wiederholt. Im ersten Schritt erfolgten Nanoindentationsmessungen mittels AFM. In diesen zeigt sich eine deutliche Abnahme der Glykokalyxhöhe. Im Rahmen des Monozyten-Adhäsions-Assays zeigt sich eine signifikant erhöhte Monozytenadhäsion, die in den Cell-Hesion-Messungen bestätigt wird. In der Gesamtschau kann dies als umfassender Schaden an der endothelialen Glykokalyx interpretiert werden.

Dies deckt sich mit den Erkenntnissen, dass die Aktivierung des Komplementsystems im Rahmen des akuten Myokardinfarktes neben dem hinlänglich bekannten Myokardschaden auch zu einem Endothelschaden führt [62,81]. Der Schaden äußert sich dabei in Form von Mikrozirkulationsstörungen mit einer erhöhten Permeabilität des Endothels, Ödemen und

einer verstärkten Monozytenadhäsion am Endothel [79,100,101]. Neben dem Komplementsystem mit seinen Anaphylatoxinen gibt es aber auch weitere, nachweislich schädigende Einflüsse im Rahmen des Myokardinfarkts. Zu nennen sind hier u.a. Akute-Phase-Protein wie das C-reaktive-Protein [102], Interleukine [79] und die Aktivierung des Sympathikus, die mit einer massiv gesteigerten Katecholaminfreisetzung einhergeht [53]. Beachtlich ist, dass die Anaphylatoxine C3a und C5a in vielen dieser immunologischen Kaskaden eine zentrale Rolle spielen. Sie können u.a. die Produktion von Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor α (TNF α) induzieren, was in beiden Fällen eine verstärkte Heparanase-Expression mit einhergehender Glykokalyxdegradation zur Folge hat [103–105]. Des Weiteren wirken die Anaphylatoxine aktivierend auf eine Reihe von Leukozyten und stimulieren den oxidativen Burst in Makrophagen und Granulozyten, bei dem Sauerstoffradikale freigesetzt werden [106,107]. All diese Kaskaden sind elementare Teile der Immunantwort, die bei überschießender Aktivierung vielfältige pathophysiologische Folgen haben können. C5a ist dabei der wesentlich potentere Mediator dieser Wirkungen. Demgegenüber steht die deutlich höhere Konzentration von C3a in den Serumproben (C3a: 676,0 ng/ml vs. C5a: 36,2 ng/ml) [81]. Diese könnte die schwächere Wirkung von C3a ausgleichen. Dies fand in den Stimulationen Berücksichtigung (C3a: 250 ng/ml vs. C5a: 50 ng/ml) und bestätigte die These der vergleichbaren Wirkung durch Konzentrationsunterschiede in vivo.

Darüber hinaus finden sich im Serum der Patientinnen und Patienten mit akutem Myokardinfarkt erhöhte Spiegel von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), die mit Kollagen und Proteoglykanen essentielle Bestandteile des Endothels und der Glykokalyx abbauen [79,108]. Diese und weitere Faktoren wirken nach Stimulation mit dem Myokardinfarkt-Serum auf unterschiedliche Weise schädigend auf die endotheliale Glykokalyx. Entsprechend schwer ist eine strikte Trennung der immunologischen Abläufe und eine sichere Zuteilung von beobachteten Effekten zu potenziell ursächlichen Faktoren. Die im Vorfeld durchgeführten Messungen nach alleiniger Stimulation mit den Anaphylatoxinen unterstreichen jedoch die Rolle, die das Komplementsystem im Rahmen des durch den akuten Myokardinfarkt entstandenen Endothelschaden einnimmt. Dabei sind die beschriebenen Effekte zwar nicht nachweislich komplementabhängig, aber in jedem Fall komplementbedingt. In einer Vielzahl der schädigenden Einflüsse spielen die Anaphylatoxine C3a und C5a eine Rolle oder sind sogar selbst der maßgeblich endothelschädigende Faktor.

4.4. Klinische Relevanz

Der akute Myokardinfarkt war und ist ein medizinisches und gesellschaftliches Problem. Trotz zahlreicher Aufklärungskampagnen und struktureller Verbesserungen in der Versorgung, führen die kardiovaskulären Erkrankungen in Deutschland noch immer die Todesursachenstatistik an. Sie machten im Jahr 2022 358.219 von 1.066.341 erfassten Todesfällen aus. Unter ihnen befinden sich sowohl die 46.608 akuten oder rezidivierenden Myokardinfarkte als auch dessen mögliche Folgen, z.B. die ischämischen Herzkrankheiten mit 125.984 Fällen [109]. Neben dem persönlichen Schicksal spielen auch große ökonomische Faktoren eine Rolle. Im von uns erhobenen Patientenkollektiv lag das Durchschnittsalter der Patientinnen und Patienten bei 64 Jahren (siehe Tabelle 7.5). Der Infarkt und die Folgen gehen bei einem großen Teil der Betroffenen mit einem Verlust von Arbeitsjahren einher.

Im Rahmen der Behandlung von Infarktpatientinnen und -patienten, aber auch der Prävention kardiovaskulärer Ereignisse, ist in den letzten Jahren viel passiert. Lange wurde von einem reinen Problem in einem oder mehreren der großen kardialen Gefäße ausgegangen. Daraus resultiert bis heute die gängige Therapie eines Herzinfarkts, bzw. dessen Vorstufe, der koronaren Herzkrankheit: Das Einbringen eines oder mehrerer Stents im Rahmen einer Herzkatheteruntersuchung, um den betroffenen Gefäßabschnitt langfristig offen zu halten. Im Rahmen der ISCHEMIA-Studie konnte jedoch Verblüffendes gezeigt werden. Bei Patientinnen und Patienten, die aufgrund einer stabilen koronaren Herzkrankheit eine Herzkatheteruntersuchung mit Intervention erhielten, zeigte sich nach 3 Jahren keine Reduktion der Zahl kardiovaskulärer Ereignisse oder Todesfälle im Vergleich zu konservativ behandelten Personen [110]. Eine Erkenntnis, die für viel Aufsehen sorgte, gleichzeitig aber auch den Blick schärfte, abseits der großen, bekannten Koronararterien nach etwas zu suchen, das das Risiko für einen Herzinfarkt bestimmt.

Kei et al. postulieren, dass der Blick auf das koronare Mikrogefäßsystem der richtige Ansatz sei. Unabhängig von großen Gefäßstenosen treten bei Patientinnen und -patienten mit koronaren Herzkrankheiten vor allem Schädigungen der endothelialen Glykokalyx, vermutlich durch Entzündungsreaktionen induziert, auf [111]. Die an diesem Punkt ansetzenden durchgeführten Versuche bestätigen diese These. Ohne eine Wichtung gegenüber dem Schaden an den Herzkranzgefäßen vornehmen zu können, ist ein erheblicher Schaden am Endothel aufgetreten, das einen Großteil des Mikrogefäßsystems bildet.

Darüber hinaus bestätigt sich dieser Verdacht laborchemisch im Patientinnen- und Patientenkollektiv. Endotheliale Marker, wie das Syndecan-1 mit 136,7 ng/ml im Durchschnitt, sind im Vergleich zur Kontrolle deutlich erhöht [81]. Wernly et al. definierten einen Cut-off von > 120 ng/ml Syndecan-1. Höhere Werte waren unabhängig assoziiert mit einer erhöhten Sechs-Monats-Sterblichkeit nach STEMI [112]. Dieser klinische Endpunkt korreliert mit von uns durchgeführten Messungen. Sowohl die Konzentration zirkulierender Anaphylatoxine als auch der Schaden an der endothelialen Glykokalyx unterscheiden sich signifikant in den Gruppen *Syn-1* < 120 ng/ml und *Syn-1* > 120 ng/ml [81].

Für die klinische Nutzung dieses Wissens bedarf es einer Messung der endothelialen Glykokalyx und deren Schaden direkt am Krankenbett.

Ein neuer Ansatz kann sein, neben den im Blut zu bestimmenden Glykokalyxbestandteilen auch direkt das Endothel von Patientinnen und Patienten sichtbar zu machen. Mittels sublingualer Messung der perfundierten Grenzregion lässt sich am lebenden Menschen eine Untersuchung der Glykokalyx durchführen. Ikonomidis et al. konnten in einer Studie an 600 gesunden Probanden die Glykokalyx als einen unabhängigen Prädiktor für die 6-Jahres-Wahrscheinlichkeit, an einem akuten Myokardinfarkt oder Schlaganfall zu erkranken, identifizieren [113]. Auch im Rahmen der Vorhersage von Komplikationen nach großen Operationen, wie z.B. herzchirurgischen Eingriffen, wird der Nutzen der sublingualen Messung der Mikrozirkulation und Monozytenadhäsion diskutiert [114]. Diese Beobachtungen zeigen einmal mehr den klinischen Einfluss einer Endothelschädigung und die Notwendigkeit, diese Schäden zuverlässig zu erkennen.

Neben der endothelialen Glykokalyx fiel in der letzten Zeit das Augenmerk im klinischen Setting auch immer wieder auf das Komplementsystem.

Dazu konnte von Kluge et al. gezeigt werden, dass der Grad der Komplementaktivierung, bestimmt mittels Quantifizierung der Genexpression für den C5aR1 und Menge des vorliegenden Membranangriffskomplexes, bei Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit mit dem Risiko eines zukünftigen Herzinfarkts in Zusammenhang steht [115].

Diese Erkenntnisse aus Endothel- und Komplementforschung schärfen den Blick für die Pathophysiologie des akuten Myokardinfarkts und lenken ihn zunehmend vom Großen zum Kleinen.

Mithilfe der durchgeführten Versuche konnten die oftmals beschriebenen Schäden der endothelialen Glykokalyx im Rahmen des akuten Myokardinfarkts auf eine neuartige Weise gezeigt werden. Konformationsänderungen und funktionelle Einschränkungen treten systemisch am Endothel auf. Sie werden unter anderem durch die Aktivierung des Komplementsystems und die dazu gehörenden Achsen C3a:C3aR und C5a:C5aR1 vermittelt. Eine Inhibierung von Anaphylatoxinen, anderen Komplementfaktoren und weiteren immunologischen Kaskaden stellt einen nicht zu unterschätzenden Ansatz in der Therapie und Prävention von kardiovaskulären Ereignissen dar. Diese Überlegungen sind in weitere Projekte unserer Arbeitsgruppe eingeflossen und werden auch in Zukunft zahlreiche Ansatzpunkte für Untersuchungen bieten. Neben der Bedeutung von Komplement-Inhibitoren [65] bietet auch die direkte Therapie von Glykokalyxschäden einen vielversprechenden Ansatz [18], um in Zukunft vielen Menschen mit kardiovaskulären Erkrankungen besser helfen zu können.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden die Auswirkungen der Komplementfaktoren C3a und C5a auf die endotheliale Glykokalyx im Rahmen des akuten Myokardinfarkts untersucht. Die Glykokalyx ist die negativ geladene, bürstenartige Schicht, die das Endothel aller Gefäße im menschlichen Körper bedeckt. Sie spielt eine zentrale Rolle als Barriere zwischen Blut und Gewebe und hat einen großen Einfluss auf die Steuerung von Körperfunktionen, wie die Blutdruckregulation und Immunantwort.

Im Rahmen von Ischämie/Reperfusion, wie es sie im Fall eines akuten Myokardinfarktes gibt, können zahlreiche lokale und systemische Schäden beobachtet werden. Einige von ihnen betreffen die endotheliale Glykokalyx. Dies geschieht u.a. durch Freisetzung von Zytokinen. Eine weitere Folge ist die systemische Aktivierung des angeborenen Immunsystems mit dem Komplementsystem und daraus resultierender Bildung der Anaphylatoxine C3a und C5a. Diese führen zu einem messbaren Endothelschaden.

Zum ersten Mal wurden in dieser Arbeit die Konformation und nanomechanischen Eigenschaften der Glykokalyx nach Schädigung durch C3a und C5a quantifiziert. Dazu wurde die Konformation mittels Rasterkraft-Mikroskopie (Atomic-Force-Microscopy, AFM) bestimmt. Funktionelle Schäden wurden zudem mittels Messung der immunvermittelten Monozytenadhäsion quantifiziert. Dies erfolgte mittels Monozyten-Adhäsions-Assay und quantitativ mit Hilfe der Cell-Hesion-Methode. In allen Versuchen wurden die Auswirkungen der Anaphylatoxine und ihrer Rezeptorspezifischen Antagonisten untersucht.

Im Rahmen dieser Versuche konnte gezeigt werden, dass eine Schädigung des Endothels mit einhergehender Einschränkung der nanomechanischen Eigenschaften sowohl über die C3a:C3aR als auch über die C5a:C5aR1-Achse vermittelt wird. Weitere Untersuchungen sind nötig, um den Stellenwert der C3a:C3aR- als auch der C5a:C5aR1-Achse im Rahmen des akuten Myokardinfarktes herauszuarbeiten.

Die Anwendung spezifischer Rezeptorantagonisten konnte diese Effekte stellenweise abschwächen. Das vorherrschende Wissen um den hohen Stellenwert der Komplementaktivierung im Rahmen der Endothelschädigungen nach einem akuten Myokardinfarkt unterstreicht den potenziellen therapeutischen Ansatz, der sich aus einer Blockierung verschiedener Komplementfaktoren oder Anaphylatoxinen ergibt.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Pugsley MK, Tabrizchi R. The vascular system. An overview of structure and function. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2000; 44:333–40.
- [2] Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S. *Physiologie*. 7. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart; 2014; 214-265
- [3] Lüllmann-Rauch R. *Histologie*. 4. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart; 2012; 302-317
- [4] Fels B, Kusche-Vihrog K. It takes more than two to tango: mechanosignaling of the endothelial surface. *Pflugers Arch* 2020; 472:419–33.
- [5] Hennigs JK, Matuszcak C, Trepel M, Körbelin J. Vascular Endothelial Cells: Heterogeneity and Targeting Approaches. *Cells* 2021; 10:2712.
- [6] Dominguez R, Holmes KC. Actin structure and function. *Annu Rev Biophys* 2011; 40:169–86.
- [7] Fels J, Jeggle P, Kusche-Vihrog K, Oberleithner H. Cortical actin nanodynamics determines nitric oxide release in vascular endothelium. *PLoS One* 2012; 7:e41520.
- [8] Cosgun ZC, Fels B, Kusche-Vihrog K. Nanomechanics of the Endothelial Glycocalyx: From Structure to Function. *Am J Pathol* 2020; 190:732–41.
- [9] Weinbaum S, Tarbell JM, Damiano ER. The Structure and Function of the Endothelial Glycocalyx Layer. *Annu Rev Biomed Eng* 2007; 9:121–67.
- [10] Lipowsky HH. Microvascular rheology and hemodynamics. *Microcirc N Y N* 1994 2005; 12:5–15.
- [11] Oberleithner H, Callies C, Kusche-Vihrog K, Schillers H, Shahin V, Riethmüller C, Macgregor GA, de Wardener HE. Potassium softens vascular endothelium and increases nitric oxide release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106:2829–34.
- [12] Oberleithner H, Peters W, Kusche-Vihrog K, Korte S, Schillers H, Kliche K, Oberleithner K. Salt overload damages the glycocalyx sodium barrier of vascular endothelium. *Pflugers Arch* 2011; 462:519–28.
- [13] Becker BF, Chappell D, Jacob M. Endothelial glycocalyx and coronary vascular permeability: the fringe benefit. *Basic Res Cardiol* 2010; 105:687–701.
- [14] Fels J, Kusche-Vihrog K. Endothelial Nanomechanics in the Context of Endothelial (Dys)function and Inflammation. *Antioxid Redox Signal* 2019; 30:945–59.
- [15] Matyjaszczyk-Gwarda K, Kij A, Olkowicz M, Fels B, Kusche-Vihrog K, Walczak M, Chlopicki S. Simultaneous quantification of selected glycosaminoglycans by butanolysis-based derivatization and LC-SRM/MS analysis for assessing glycocalyx disruption in vitro and in vivo. *Talanta* 2022; 238:123008.
- [16] Sarrazin S, Lamanna WC, Esko JD. Heparan Sulfate Proteoglycans. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011; 3:a004952–a004952.

- [17] Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MAMJ, oude Egbrink MGA. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflüg Arch - Eur J Physiol* 2007; 454:345–59.
- [18] Vahldieck C, Cianflone E, Fels B, Löning S, Depelmann P, Sabatino J, Salerno N, Karsten CM, Torella D, Weil J, Sun D, Goligorsky MS, Kusche-Vihrog K. Endothelial Glycocalyx and Cardiomyocyte Damage Is Prevented by Recombinant Syndecan-1 in Acute Myocardial Infarction. *Am J Pathol* 2023; S0002-9440(23)00025-1.
- [19] Tkachenko E, Rhodes JM, Simons M. Syndecans: new kids on the signaling block. *Circ Res* 2005; 96:488–500.
- [20] Fels J, Jeggle P, Liashkovich I, Peters W, Oberleithner H. Nanomechanics of vascular endothelium. *Cell Tissue Res* 2014; 355:727–37.
- [21] Yilmaz O, Afsar B, Ortiz A, Kanbay M. The role of endothelial glycocalyx in health and disease. *Clin Kidney J* 2019; 12:611–9.
- [22] Goligorsky MS. The Cell “Coat of Many Colors.” *Am J Pathol* 2020; 190:728–31.
- [23] Starling EH. On the Absorption of Fluids from the Connective Tissue Spaces. *J Physiol* 1896; 19:312–26.
- [24] Pillinger NL, Kam P. Endothelial glycocalyx: basic science and clinical implications. *Anaesth Intensive Care* 2017; 45:295–307.
- [25] Lieleg O, Baumgärtel RM, Bausch AR. Selective Filtering of Particles by the Extracellular Matrix: An Electrostatic Bandpass. *Biophys J* 2009; 97:1569–77.
- [26] Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol* 1986; 250:1145-9.
- [27] Lin PJ, Pearson PJ, Chang CH. Endothelium-derived relaxing factors. *Chang Yi Xue Za Zhi* 1993; 16:1–13.
- [28] Salek-Ardakani S, Arrand JR, Shaw D, Mackett M. Heparin and heparan sulfate bind interleukin-10 and modulate its activity. *Blood* 2000; 96:1879–88.
- [29] Shimada K, Kobayashi M, Kimura S, Nishinaga M, Takeuchi K, Ozawa T. Anticoagulant heparin-like glycosaminoglycans on endothelial cell surface. *Jpn Circ J* 1991; 55:1016–21.
- [30] Abassi Z, Armaly Z, Heyman SN. Glycocalyx Degradation in Ischemia-Reperfusion Injury. *Am J Pathol* 2020; 190:752–67.
- [31] Jackson-Weaver O, Friedman JK, Rodriguez LA, Hoof MA, Drury RH, Packer JT, Smith A, Guidry C, Duchesne JC. Hypoxia/reoxygenation decreases endothelial glycocalyx via reactive oxygen species and calcium signaling in a cellular model for shock. *J Trauma Acute Care Surg* 2019; 87:1070–6.
- [32] Mulivor AW, Lipowsky HH. Inflammation- and ischemia-induced shedding of venular glycocalyx. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286:1672-1680.

- [33] Becker BF, Chappell D, Bruegger D, Annecke T, Jacob M. Therapeutic strategies targeting the endothelial glycocalyx: acute deficits, but great potential. *Cardiovasc Res* 2010; 87:300–10.
- [34] Murphy K, Weaver C. *Janeway Immunologie*. 9. Auflage. Springer Spektrum-Verlag, Heidelberg; 2018; 47-173
- [35] Tarbell JM, Cancel LM. The glycocalyx and its significance in human medicine. *J Intern Med* 2016; 280:97–113.
- [36] Oberleithner H, Wälte M, Kusche-Vihrog K. Sodium renders endothelial cells sticky for red blood cells. *Front Physiol* 2015; 6:188.
- [37] Cancel LM, Ebong EE, Mensah S, Hirschberg C, Tarbell JM. Endothelial glycocalyx, apoptosis and inflammation in an atherosclerotic mouse model. *Atherosclerosis* 2016; 252:136–46.
- [38] Goldsmith HL, Spain S. Margination of leukocytes in blood flow through small tubes. *Microvasc Res* 1984; 27:204–22.
- [39] Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2011; 11:762–74.
- [40] Alon R, Feigelson SW. Chemokine-triggered leukocyte arrest: force-regulated bi-directional integrin activation in quantal adhesive contacts. *Curr Opin Cell Biol* 2012; 24:670–6.
- [41] Zhao Y, Chien S, Weinbaum S. Dynamic contact forces on leukocyte microvilli and their penetration of the endothelial glycocalyx. *Biophys J* 2001; 80:1124–40.
- [42] Vestweber D, Blanks JE. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev* 1999; 79:181–213.
- [43] da Costa Martins P, García-Vallejo J-J, van Thienen JV, Fernandez-Borja M, van Gils JM, Beckers C, Horrevoets AJ, Hordijk PL, Zwaginga J-J. P-selectin glycoprotein ligand-1 is expressed on endothelial cells and mediates monocyte adhesion to activated endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27:1023–9.
- [44] León B, Ardavín C. Monocyte migration to inflamed skin and lymph nodes is differentially controlled by L-selectin and PSGL-1. *Blood* 2008; 111:3126–30.
- [45] Galkina E, Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis. *Annu Rev Immunol* 2009; 27:165–97.
- [46] Mims C, Dockrell HM, Goering RV, Roitt I, Wakelin D, Zuckerman M. *Medizinische Mikrobiologie, Infektiologie*. 2. Auflage. Elsevier Verlag, München; 2004; 141-177
- [47] Lederhuber HC, Lange V. *Kardiologie*. 2. Auflage. Elsevier Verlag, München; 2010. 52-69
- [48] Deutsche Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung e.V. *Nationale Versorgungsleitlinie KHK* 2019.
- [49] Thiele H, Zahn R. Acute myocardial infarction-actual issues. *Herz* 2020; 45:507–8.

- [50] Deutsche Gesellschaft für Kardiologie – Herz-und Kreislaufforschung e.V. ESC Pocket Guidelines. Therapie des akuten Herzinfarktes bei Patienten mit ST-Streckenhebung (STEMI) 2017.
- [51] Bavia L, Lidani KCF, Andrade FA, Sobrinho MIAH, Nisihara RM, de Messias-Reason IJ. Complement activation in acute myocardial infarction: An early marker of inflammation and tissue injury? *Immunol Lett* 2018; 200:18–25.
- [52] Ghosh M, Rana S. The anaphylatoxin C5a: Structure, function, signaling, physiology, disease, and therapeutics. *Int Immunopharmacol* 2023; 118:110081.
- [53] Ostrowski SR, Pedersen SH, Jensen JS, Mogelvang R, Johansson PI. Acute myocardial infarction is associated with endothelial glycocalyx and cell damage and a parallel increase in circulating catecholamines. *Crit Care Lond Engl* 2013; 17:R32.
- [54] Jung C, Fuernau G, Muench P, Desch S, Eitel I, Schuler G, Adams V, Figulla HR, Thiele H. Impairment of the endothelial glycocalyx in cardiogenic shock and its prognostic relevance. *Shock Augusta Ga* 2015; 43:450–5.
- [55] Frydland M, Ostrowski SR, Møller JE, Hadziselimovic E, Holmvang L, Ravn HB, Jensen LO, Pettersson AS, Kjaergaard J, Lindholm MG, Johansson PI, Hassager C. Plasma Concentration of Biomarkers Reflecting Endothelial Cell- and Glycocalyx Damage are Increased in Patients With Suspected ST-Elevation Myocardial Infarction Complicated by Cardiogenic Shock. *Shock Augusta Ga* 2018; 50:538–44.
- [56] Bogner-Flatz V, Braunstein M, Ocker LE, Kusmenkov T, Tschöep J, Ney L, Böcker W, Anneck T. On-the-Scene Hyaluronan and Syndecan-1 Serum Concentrations and Outcome after Cardiac Arrest and Resuscitation. *Mediators Inflamm* 2019; 2019:8071619.
- [57] Pöss J, Fuernau G, Denks D, Desch S, Eitel I, de Waha S, Link A, Schuler G, Adams V, Böhm M, Thiele H. Angiotensin-2 in acute myocardial infarction complicated by cardiogenic shock—a biomarker substudy of the IABP-SHOCK II-Trial. *Eur J Heart Fail* 2015; 17:1152–60.
- [58] Zahn R, Schweppe F, Zeymer U, Schiele R, Gitt AK, Mark B, Frilling B, Seidl K, Winkler R, Heer T, Schneider S, Senges J. Reperfusion therapy for acute ST-elevation and non ST-elevation myocardial infarction: what can be achieved in daily clinical practice in unselected patients at an interventional center? *Acute Card Care* 2009; 11:92–8.
- [59] Chappell D, Jacob M, Hofmann-Kiefer K, Rehm M, Welsch U, Conzen P, Becker BF. Antithrombin reduces shedding of the endothelial glycocalyx following ischaemia/reperfusion. *Cardiovasc Res* 2009; 83:388–96.
- [60] Rehm M, Bruegger D, Christ F, Conzen P, Thiel M, Jacob M, Chappell D, Stoeckelhuber M, Welsch U, Reichart B, Peter K, Becker BF. Shedding of the endothelial glycocalyx in patients undergoing major vascular surgery with global and regional ischemia. *Circulation* 2007; 116:1896–906.
- [61] Warren OJ, Smith AJ, Alexiou C, Rogers PLB, Jawad N, Vincent C, Darzi AW, Athanasiou T. The inflammatory response to cardiopulmonary bypass: part 1—mechanisms of pathogenesis. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2009; 23:223–31.

- [62] Busche MN, Stahl GL. Role of the complement components C5 and C3a in a mouse model of myocardial ischemia and reperfusion injury. *Ger Med Sci* 2010; 8:Doc20.
- [63] Horn F, Moc I, Schneider N, Grillhösl, Berghold S, Lindenmeier G. *Biochemie des Menschen*. 3. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart; 2005; 700-727
- [64] Li K, Sacks SH, Zhou W. The relative importance of local and systemic complement production in ischaemia, transplantation and other pathologies. *Mol Immunol* 2007; 44:3866–74.
- [65] Lucchesi BR, Tanhehco EJ. Therapeutic potential of complement inhibitors in myocardial ischaemia. *Expert Opin Investig Drugs* 2000; 9:975–91.
- [66] West EE, Kemper C. Complosome - the intracellular complement system. *Nat Rev Nephrol* 2023; 19:426–39.
- [67] Peng Q, Li K, Sacks SH, Zhou W. The role of anaphylatoxins C3a and C5a in regulating innate and adaptive immune responses. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2009; 8:236–46.
- [68] Proctor LM, Arumugam TV, Shiels I, Reid RC, Fairlie DP, Taylor SM. Comparative anti-inflammatory activities of antagonists to C3a and C5a receptors in a rat model of intestinal ischaemia/reperfusion injury: C3a and C5a antagonism in intestinal ischaemia/reperfusion. *Br J Pharmacol* 2004; 142:756–64.
- [69] Schanzenbacher J, Köhl J, Karsten CM. Anaphylatoxins spark the flame in early autoimmunity. *Front Immunol* 2022; 13:958392.
- [70] Banz Y, Rieben R. Role of complement and perspectives for intervention in ischemia-reperfusion damage. *Ann Med* 2012; 44:205–17.
- [71] Jadczyk T, Baranski K, Syzdot M, Nabialek E, Wanha W, Kurzelowski R, Ratajczak MZ, Kucia M, Dolegowska B, Niewczas M, Zejda J, Wojakowski W. Bioactive Sphingolipids, Complement Cascade, and Free Hemoglobin Levels in Stable Coronary Artery Disease and Acute Myocardial Infarction. *Mediators Inflamm* 2018; 2018:2691934.
- [72] Wang X, Liu A-H, Jia Z-W, Pu K, Chen K-Y, Guo H. Evaluation of expression levels and mechanism of complement activation. *Exp Ther Med* 2017; 14:2493–6.
- [73] Bongoni AK, Lu B, McRae JL, Salvaris EJ, Toonen EJM, Vikstrom I, Baz Morelli A, Pearse MJ, Cowan PJ. Complement-mediated Damage to the Glycocalyx Plays a Role in Renal Ischemia-reperfusion Injury in Mice. *Transplant Direct* 2019; 5:e341.
- [74] Lewis AG, Köhl G, Ma Q, Devarajan P, Köhl J. Pharmacological targeting of C5a receptors during organ preservation improves kidney graft survival. *Clin Exp Immunol* 2008; 153:117–26.
- [75] Zhang H, Qin G, Liang G, Li J, Barrington RA, Liu D. C5aR-mediated myocardial ischemia/reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 357:446–52.
- [76] Monsinjon T, Richard V, Fontaine M. Complement and its implications in cardiac ischemia/reperfusion: strategies to inhibit complement. *Fundam Clin Pharmacol* 2001; 15:293–306.

- [77] Lillegard KE, Loeks-Johnson AC, Opacich JW, Peterson JM, Bauer AJ, Elmquist BJ, Regal RR, Gilbert JS, Regal JF. Differential Effects of Complement Activation Products C3a and C5a on Cardiovascular Function in Hypertensive Pregnant Rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2014; 351:344–51.
- [78] Bhatia K, Ahmad S, Kindelin A, Ducruet AF. Complement C3a receptor-mediated vascular dysfunction: a complex interplay between aging and neurodegeneration. *J Clin Invest* 2021; 131:e144348, 144348.
- [79] Wu Y, Pan N, An Y, Xu M, Tan L, Zhang L. Diagnostic and Prognostic Biomarkers for Myocardial Infarction. *Front Cardiovasc Med* 2020; 7:617277.
- [80] Passov A, Schramko A, Salminen U-S, Aittomäki J, Andersson S, Pesonen E. Endothelial glycocalyx during early reperfusion in patients undergoing cardiac surgery. *PLoS ONE* 2021; 16:e0251747.
- [81] Vahldieck C, Fels B, Löning S, Nickel L, Weil J, Kusche-Vihrog K. Prolonged Door-to-Balloon Time Leads to Endothelial Glycocalyx Damage and Endothelial Dysfunction in Patients with ST-Elevation Myocardial Infarction. *Biomedicines* 2023; 11:2924.
- [82] Schraufstatter IU, Trieu K, Sikora L, Sriramarao P, DiScipio R. Complement c3a and c5a induce different signal transduction cascades in endothelial cells. *J Immunol Baltim Md 1950* 2002; 169:2102–10.
- [83] Boeckel H, Karsten CM, Göpel W, Herting E, Rupp J, Härtel C, Hartz A. Increased Expression of Anaphylatoxin C5a-Receptor-1 in Neutrophils and Natural Killer Cells of Preterm Infants. *Int J Mol Sci* 2023; 24:10321.
- [84] Propson NE, Roy ER, Litvinchuk A, Köhl J, Zheng H. Endothelial C3a receptor mediates vascular inflammation and blood-brain barrier permeability during aging. *J Clin Invest* 2021; 131:e140966, 140966.
- [85] Wood AJT, Vassallo A, Summers C, Chilvers ER, Conway-Morris A. C5a anaphylatoxin and its role in critical illness-induced organ dysfunction. *Eur J Clin Invest* 2018; 48:e13028.
- [86] Lee S-J, Lee C-K, Kang S, Park I, Kim YH, Kim SK, Hong SP, Bae H, He Y, Kubota Y, Koh GY. Angiotensin-2 exacerbates cardiac hypoxia and inflammation after myocardial infarction. *J Clin Invest* 2018; 128:5018–33.
- [87] Mulivor AW, Lipowsky HH. Role of glycocalyx in leukocyte-endothelial cell adhesion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283:H1282-1291.
- [88] Schierke F, Wyrwoll MJ, Wisdorf M, Niedzielski L, Maase M, Ruck T, Meuth SG, Kusche-Vihrog K. Nanomechanics of the endothelial glycocalyx contribute to Na⁺-induced vascular inflammation. *Sci Rep* 2017; 7:46476.
- [89] Marki A, Esko JD, Pries AR, Ley K. Role of the endothelial surface layer in neutrophil recruitment. *J Leukoc Biol* 2015; 98:503–15.
- [90] Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 2007; 7:678–89.

- [91] Vahldieck C, Löning S, Hamacher C, Fels B, Rudzewski B, Nickel L, Weil J, Nording H, Baron L, Kleingarn M, Karsten CM, Kusche-Vihrog K. Dysregulated complement activation during acute myocardial infarction leads to endothelial glycocalyx degradation and endothelial dysfunction via the C5a:C5a-Receptor1 axis. *Front Immunol* 2024; 15:1426526.
- [92] Lee JD, Taylor SM, Woodruff TM. Is the C3a receptor antagonist SB290157 a useful pharmacological tool? *Br J Pharmacol* 2020; 177:5677–8.
- [93] Mathieu M-C, Sawyer N, Greig GM, Hamel M, Kargman S, Ducharme Y, Lau CK, Friesen RW, O'Neill GP, Gervais FG, Therien AG. The C3a receptor antagonist SB 290157 has agonist activity. *Immunol Lett* 2005; 100:139–45.
- [94] Rodriguez P, Laskowski LJ, Pallais JP, Bock HA, Cavalco NG, Anderson EI, Calkins MM, Razzoli M, Sham YY, McCorvy JD, Bartolomucci A. Functional profiling of the G protein-coupled receptor C3aR1 reveals ligand-mediated biased agonism. *J Biol Chem* 2024; 300:105549.
- [95] Li XX, Kumar V, Clark RJ, Lee JD, Woodruff TM. The “C3aR Antagonist” SB290157 is a Partial C5aR2 Agonist. *Front Pharmacol* 2020; 11:591398.
- [96] Dong Q, Sun L, Peng L, Yan B, Lv J, Wang G, Gong S. PMX53 protects spinal cord from ischemia-reperfusion injury in rats in the short term. *Spinal Cord* 2016; 54:254–8.
- [97] Toyama C, Maeda A, Kogata S, Takase K, Kodama T, Masahata K, Ueno T, Kamiyama M, Tazuke Y, Eguchi H, Matsunami K, Miyagawa S, Okuyama H. Effect of a C5a receptor antagonist on macrophage function in an intestinal transplant rat model. *Transpl Immunol* 2022; 72:101559.
- [98] Laumonnier Y, Karsten CM, Köhl J. Novel insights into the expression pattern of anaphylatoxin receptors in mice and men. *Mol Immunol* 2017; 89:44–58.
- [99] Seiler DL, Kähler KH, Kleingarn M, Sadik CD, Bieber K, Köhl J, Ludwig RJ, Karsten CM. The complement receptor C5aR2 regulates neutrophil activation and function contributing to neutrophil-driven epidermolysis bullosa acquisita. *Front Immunol* 2023; 14:1197709.
- [100] Puymirat E, Simon T, Cayla G, Cottin Y, Elbaz M, Coste P, Lemesle G, Motreff P, Popovic B, Khalife K, Labèque J-N, Perret T, Le Ray C, Orion L, Jouve B, Blanchard D, Peycher P, Silvain J, Steg PG, Goldstein P, Guéret P, Belle L, Aissaoui N, Ferrières J, Schiele F, Danchin N, USIK, USIC 2000, and FAST-MI investigators. Acute Myocardial Infarction: Changes in Patient Characteristics, Management, and 6-Month Outcomes Over a Period of 20 Years in the FAST-MI Program (French Registry of Acute ST-Elevation or Non-ST-Elevation Myocardial Infarction) 1995 to 2015. *Circulation* 2017; 136:1908–19.
- [101] Alexander Y, Osto E, Schmidt-Trucksäss A, Shechter M, Trifunovic D, Duncker DJ, Aboyans V, Bäck M, Badimon L, Cosentino F, De Carlo M, Dorobantu M, Harrison DG, Guzik TJ, Hofer I, Morris PD, Norata GD, Suades R, Taddei S, Vilahur G, Waltenberger J, Weber C, Wilkinson F, Bochaton-Piallat M-L, Evans PC. Endothelial function in cardiovascular medicine: a consensus paper of the European Society of Cardiology Working Groups on Atherosclerosis and Vascular Biology, Aorta and Peripheral Vascular Diseases, Coronary Pathophysiology and Microcirculation, and Thrombosis. *Cardiovasc Res* 2021; 117:29–42.

- [102] Kusche-Vihrog K, Urbanova K, Blanqué A, Wilhelmi M, Schillers H, Kliche K, Pavenstädt H, Brand E, Oberleithner H. C-reactive protein makes human endothelium stiff and tight. *Hypertens Dallas Tex* 1979 2011; 57:231–7.
- [103] Yan C, Gao H. New insights for C5a and C5a receptors in sepsis. *Front Immunol* 2012; 3:368.
- [104] Fels B, Acharya S, Vahldieck C, Graf T, Käding N, Rupp J, Kusche-Vihrog K. Mineralocorticoid receptor-antagonism prevents COVID-19-dependent glycocalyx damage. *Pflugers Arch* 2022; 474:1069–76.
- [105] Fischer WH, Jagels MA, Hugli TE. Regulation of IL-6 synthesis in human peripheral blood mononuclear cells by C3a and C3a(desArg). *J Immunol Baltim Md* 1950 1999; 162:453–9.
- [106] Murakami Y, Imamichi T, Nagasawa S. Characterization of C3a anaphylatoxin receptor on guinea-pig macrophages. *Immunology* 1993; 79:633–8.
- [107] Elsner J, Oppermann M, Czech W, Kapp A. C3a activates the respiratory burst in human polymorphonuclear neutrophilic leukocytes via pertussis toxin-sensitive G-proteins. *Blood* 1994; 83:3324–31.
- [108] Myasoedova VA, Chistiakov DA, Grechko AV, Orekhov AN. Matrix metalloproteinases in pro-atherosclerotic arterial remodeling. *J Mol Cell Cardiol* 2018; 123:159–67.
- [109] Statistisches Bundesamt. Todesursachenstatistik Deutschland 2023. <https://www.destatis.de> (Tag des Zugriffs: 11.06.2024)
- [110] Maron DJ, Hochman JS, Reynolds HR, Bangalore S, O’Brien SM, Boden WE, Chaitman BR, Senior R, López-Sendón J, Alexander KP, Lopes RD, Shaw LJ, Berger JS, Newman JD, Sidhu MS, Goodman SG, Ruzyllo W, Gosselin G, Maggioni AP, White HD, Bhargava B, Min JK, Mancini GBJ, Berman DS, Picard MH, Kwong RY, Ali ZA, Mark DB, Spertus JA, Krishnan MN, Elghamazy A, Moorthy N, Hueb WA, Demkow M, Mavromatis K, Bockeria O, Peteiro J, Miller TD, Szwed H, Doerr R, Keltai M, Selvanayagam JB, Steg PG, Held C, Kohsaka S, Mavromichalis S, Kirby R, Jeffries NO, Harrell FE, Rockhold FW, Broderick S, Ferguson TB, Williams DO, Harrington RA, Stone GW, Rosenberg Y, ISCHEMIA Research Group. Initial Invasive or Conservative Strategy for Stable Coronary Disease. *N Engl J Med* 2020; 382:1395–407.
- [111] Kei CY, Singh K, Dautov RF, Nguyen TH, Chirkov YY, Horowitz JD. Coronary “Microvascular Dysfunction”: Evolving Understanding of Pathophysiology, Clinical Implications, and Potential Therapeutics. *Int J Mol Sci* 2023; 24:11287.
- [112] Wernly B, Fuernau G, Masyuk M, Muessig JM, Pfeiler S, Bruno RR, Desch S, Muench P, Lichtenauer M, Kelm M, Adams V, Thiele H, Eitel I, Jung C. Syndecan-1 Predicts Outcome in Patients with ST-Segment Elevation Infarction Independent from Infarct-related Myocardial Injury. *Sci Rep* 2019; 9:18367.
- [113] Ikonomidis I, Thymis J, Simitsis P, Koliou G-A, Katsanos S, Triantafyllou C, Kousathana F, Pavlidis G, Kountouri A, Polyzogopoulou E, Katogiannis K, Vlastos D, Kostelli G, Triantafyllidi H, Parissis J, Papadavid E, Lekakis J, Filippatos G, Lambadiari V. Impaired Endothelial Glycocalyx Predicts Adverse Outcome in Subjects Without Overt Cardiovascular Disease: a 6-Year Follow-up Study. *J Cardiovasc Transl Res* 2022; 15:890–902.

- [114] Shen L, de Vries J, Ince C, van Boven WJ. Novel non-invasive imaging method for baseline risk stratification in cardiac surgery patients. *BMJ Case Rep* 2020; 13:e234950.
- [115] Kluge KE, Langseth MS, Opstad TB, Pettersen AÅ, Arnesen H, Tønnessen T, Seljeflot I, Helseth R. Complement Activation in Association with Markers of Neutrophil Extracellular Traps and Acute Myocardial Infarction in Stable Coronary Artery Disease. *Mediators Inflamm* 2020; 2020:5080743.

7. Anhang

7.1. Tabellen

PBS

Phosphate buffered saline -/- (PBS^{-/-}) ist eine Salzlösung mit einem pH-Wert von 7,4 und einem osmotischen Druck, der dem des menschlichen Organismus gleicht. Die Zusätze zur Herstellung sind in folgender Tabelle aufgeführt.

Tabelle 7.1 PBS -/-

	Zusatz	Konzentration (mM)	Gewicht (g/l)
+	Natriumchlorid (NaCl)	137	8,0
+	Kaliumchlorid (KCl)	2,7	0,2
+	Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	12	1,44
+	Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Gesamt-Phosphat	0,24

PBS^{+/+} enthält zusätzlich Ca²⁺ und Mg²⁺ Ionen. Die positiven Ladungsträger wirken auf die negativ geladenen Bestandteile der Glykokalyx aufrichtend.

Tabelle 7.2 PBS +/+

+	Calciumchlorid (CaCl ₂)	10	0,133
+	Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	5	0,1

Alle Zusätze wurden in 1.000 ml Bidest-Wasser gelöst.

HUVEC-Medium

Das HUVEC-Medium liefert den Zellen alle notwendigen Bedingungen und Nährstoffe für ihr Wachstum. Die Zusammensetzung ist in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 7.3 HUVEC-Medium

	Zusatz	Volumen
	Medium 200 (HEPES, Fa. Gibco) (essenzielle und nicht-essenzielle Aminosäuren, Vitamine, andere organische Verbindungen, Spurenelemente und anorganische Salze)	500 ml
+	10 % Fetales Kälberserum (FCS) (enthält Wachstumsfaktoren, genaue Zusammensetzung nicht bekannt)	50 ml
+	1 % Penicillin / Streptomycin (P/S) (Breitband-Antibiotika zur Prävention von Zellkultur-Kontaminationen)	5 ml
+	1 % Large Vessel Endothelias Supplement (LVES) (FCS, Hydrocortison, humaner epidermaler Wachstumsfaktor, Fibroblasten-Wachstumsfaktor, Heparin und Ascorbinsäure)	5,5 ml
+	1 % Heparin (5.000 U/ml) (Antikoagulanzen)	5 ml

Alle Bestandteile wurden steril zusammen pipettiert und anschließend steril filtriert.

HEPES-Puffer

(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) wird als Puffersubstanz für mikrobiologische Zwecke verwendet. Er hat einen Pufferbereich zwischen pH 6,8 und 8,2 und deckt somit den physiologischen pH von 7,4 ab. Die Zusammensetzung ist in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 7.4 HEPES-Puffer

	Inhaltsstoff	Konz. (mmol / l)	Mol. Masse (g / mol)	Zielvol. (l)	Masse (g)
+	HEPES	10	238,31	0,5	1,1915
+	Glukose	5	180,16	0,5	0,45
+	KCl	5	74,55	0,5	0,1863
+	CaCl ₂	1	111,0	0,5	0,0555
+	MgCl ₂	1	95,21	0,5	0,0476
+	NaCl	135 - 140	58,44	0,5	3,7986

Alle abgewogenen Substanzen wurden in 200 ml Bidest-Wasser gelöst. Der pH-Wert wurde mittels pH-Sonde bei 37° C (Messpuffer), bzw. Raumtemperatur (20° C) (Transportpuffer) durch Zugabe von HCl und NaOH auf 7,4 eingestellt. Die anschließende Kontrolle der Natrium-Konzentration erfolgte am BGA-Gerät. Das Volumen wurde auf 500 ml aufgefüllt und der HEPES-Puffer steril filtriert.

Patientenkollektiv

Tabelle 7.5 Übersicht Patientenkollektiv

		STEMI-Gruppe (n = 63)
Alter (Jahre)		64 (13)
Männliches Geschlecht (%)		76.2
Troponin max. (pg/ml)	[Ref.: 0-14]	3053.0 (2653)
CK max. (U/l)	[Ref.: 20-200]	1100.8 (1464)
LDH max. (U/l)	[Ref.: 135-225]	446.6 (318.9)
Pro BNP II (pg/ml)	[Ref.: 0-121]	1972.7 (2614)
Creatinine (mg/dl)	[Ref.: 0.7-1.2]	2.19 (0.9)
Entzündungsmarker		
CRP max. (mg/l)	[Ref.: 0-5]	45.4 (48.0)
Leukozyten (Gpt/l)	[Ref.: 4-9]	17.41 (4.6)
eGC Höhe (nm)		125.9 (32.8)
eGC Steifigkeit (pN/nm)		0.34 (0.05)
Syndecan-1 (ng/ml)		136.72 (69.3)
Heparansulfat (ng/ml)		10.82 (8.6)
Hyaluronsäure (µg/ml)		182.9 (85.9)
Stickstoffmonoxid (mM)		6.39 (2.3)
Angiopoetin-2 (ng/ml)		18.5 (8.7)
C3a (ng/ml)		676.0 (343.4)
C5a (ng/ml)		36.2 (27.0)

Tabelle entnommen und gekürzt aus Vahldieck et al. (2023) [81].

7.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Schematische Darstellung eines Blutgefäßes	1
Abbildung 1.2 Schematische Darstellung der eGC in verschiedenen Konformationen	4
Abbildung 1.3 Abspaltung der Anaphylatoxine C3a und C5a im Rahmen der Komplementaktivierung	10
Abbildung 2.1 Schematische Darstellung des Nanoindentationsverfahrens.	22
Abbildung 2.2 AFM Kraft-Distanz-Kurve mit angelegter Steigung	22
Abbildung 2.3 Schematische Darstellung des Cell-Hesion-Verfahrens	24
Abbildung 2.4 Ergebnis einer Cell-Hesion-Messung.....	25
Abbildung 2.5 HUVEC-Zellkerne und Monozyten unter dem Fluoreszenzmikroskop	27
Abbildung 3.1 AFM-Messung nach Stimulation mit C3a und Rezeptorantagonist.....	29
Abbildung 3.2 Monozyten-Adhäsions-Assay nach Stimulation mit C3a und Rezeptorantagonist.....	30
Abbildung 3.3 Cell-Hesion-Messung nach Stimulation C3a und Rezeptorantagonist.....	31
Abbildung 3.4 Cell-Hesion-Messung nach Stimulation mit C3a und Rezeptorantagonist	32
Abbildung 3.5 AFM-Messung nach Stimulation mit Infarkt-Serum mit hoher C3a-Konzentration und RA	33
Abbildung 3.6 Monozyten-Adhäsions-Assay nach Stimulation mit Serum (hohe C3a Konzentration) und RA	34
Abbildung 3.7 Cell-Hesion Messung nach Stimulation mit Infarkt-Serum (hohe C3a-Konzentration) und RA	35
Abbildung 3.8 Cell-Hesion-Messung nach Stimulation mit Infarkt-Serum (hohe C3a-Konzentration) und RA	36
Abbildung 3.9 AFM-Messung nach Stimulation mit C5a und Rezeptorantagonist.....	37
Abbildung 3.10 Monozyten-Adhäsions-Assay nach Stimulation mit C5a und Rezeptorantagonist.....	38
Abbildung 3.11 Cell-Hesion-Messung nach Stimulation mit C5a und Rezeptorantagonist	39
Abbildung 3.12 Cell-Hesion-Messung nach Stimulation mit C5a und Rezeptorantagonist	40
Abbildung 3.13 AFM-Messung nach Stimulation mit Infarkt-Serum mit hoher C5a-Konzentration und RA ...	41
Abbildung 3.14 Monozyten-Adhäsions-Assay nach Stimulation mit Serum (hohe C5a-Konz.) und RA.....	42
Abbildung 3.15 Cell-Hesion-Messung nach Stimulation mit Serum mit hoher C5a-Konzentration und RA	43
Abbildung 3.16 Cell-Hesion-Messung nach Stimulation mit Serum mit hoher C5a-Konzentration und RA	44

7.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 Stimulation C3a + RA.....	19
Tabelle 2.2 Stimulation C5a + RA.....	19
Tabelle 2.3 Stimulation Patientenserum + RA	20
Tabelle 2.4 Stimulation Patientenserum + RA	20
Tabelle 7.1 PBS -/-.....	64
Tabelle 7.2 PBS +/-	64
Tabelle 7.3 HUVEC-Medium.....	65
Tabelle 7.4 HEPES-Puffer	65
Tabelle 7.5 Übersicht Patientenkollektiv	66

8. Danksagung

Ich danke Frau Prof. Dr. Kristina Kusche-Vihrog für die Möglichkeit der Anfertigung meiner Promotion im Institut für Physiologie, die durchgehende Betreuung auf Augenhöhe, die Bereitstellung von Räumlichkeiten und Materialien, ihren unermüdlichen Einsatz für uns Doktoranden und die vielfältigen Erfahrungen, die ich im Rahmen der Dissertation sammeln durfte.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Christian Karsten für die Übernahme der Kobetreuung.

Mein Dank gilt überdies meinem Mentoren Herrn Dr. Carl Vahldieck, von dem ich die Grundlagen des wissenschaftlichen Arbeitens und die Methodiken der Zellkultur und Versuchsaufbauten lernte, der mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand und immer ein offenes Ohr und eine offene Tür hatte.

Darüber hinaus danke ich dem gesamten Institut für Physiologie, allen voran Herrn Dr. Benedikt Fels, Bettina Rudzewski und Patricia Rouina aus der Arbeitsgruppe Endothelfunktion für die unermüdliche Unterstützung und den produktiven Austausch.

Ein besonderer Dank geht an meinen Freund und Kommilitonen Erik Hertel, mit dem ich mir ein Büro teilte, große Schritte gemeinsam erlernte und erlebte und den ich immer um Hilfe bitten konnte.

Für ihre Unterstützung vor, während und nach meiner Doktorarbeit möchte ich meiner Familie danken. Meinen Eltern und meiner Schwester, die mich von Anfang an begleiten, zu jeder Zeit hinter mir stehen und mir vieles von dem mitgegeben haben, was mir das Studium der Humanmedizin und das Verfassen meiner Dissertation ermöglichte. Und meiner zukünftigen Frau, die mich von Beginn an darin bestärkt hat, mich auf die mit der Dissertation verbundenen Herausforderungen einzulassen, auf die ich mich zu jeder Zeit verlassen kann, die mir oft eine andere Sichtweise auf die Dinge zeigte und zeigt und bei der ich auch in herausfordernden Zeiten immer wieder neue Kraft tanken kann.

Publikationen und Vorträge

„Dysregulated complement activation during acute myocardial infarction leads to endothelial glycocalyx degradation and endothelial dysfunction via the C5a:C5a-Receptor1 axis“

Vahldieck, C.; Löning, S.; Hamacher, C.; Fels, B.; Rudzewski, B.; Nickel, L.; Weil, J. Kleingarn, Karsten, C.M.; Kusche-Vihrog, K

Frontiers in Immunology, 11. Juli 2024

„Prolonged Door-to-Balloon Time Leads to Endothelial Glycocalyx Damage and Endothelial Dysfunction in Patients with ST-Elevation Myocardial Infarction“

Vahldieck, C.; Fels, B.; Löning, S.; Nickel, L.; Weil, J.; Kusche-Vihrog, K.

Biomedicines, 29. Oktober 2023

„Endothelial Glycocalyx and Cardiomyocyte Damage Is Prevented by Recombinant Syndecan-1 in Acute Myocardial Infarction“

Vahldieck, C.; Cianflone, E.; Fels, B.; Löning, S.; Depelmann, P.; Sabatino, J.; Salerno, N.; Karsten, C.M.; Torella, D.; Weil, J.; Sun, D.; Goligorsky, M.S.; Kusche-Vihrog, K.

American Journal of Pathology, 18. Januar 2023

“Effects of anaphylatoxins C3a and C5a on the endothelial glycocalyx in acute myocardial infarction”

Löning, S.; Vahldieck, C.; Fels, B.; Hamacher, C.; Weil, J.; Kusche-Vihrog, K.

Poster-Präsentation auf der Europhysiology, Kopenhagen, 22. September 2022