

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR HERZ-, THORAX- UND HERZNAHE GEFÄSSCHIRURGIE
PROF. DR. CHRISTOF SCHMID
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON ZIRKULIERENDEN
ENDOTHELZELLEN AUS PATIENTENPROBEN BEI OPERATION MIT
EXTRAKORPORALER ZIRKULATION

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Eva Hagemeister

aus Regensburg

2008

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Weber
1. Berichterstatter: PD Dr. Karla Lehle
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Rainer Straub
Tag der mündlichen Prüfung: 10.12.2008

In Liebe meinen Eltern
und meinem Mann Alexander gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
Begriffserklärungen	VI
I. Einleitung	1
I.1 Vorkommen zirkulierender Endothelzellen	1
I.2 Darstellung des endothelialen Schadens bei Herzpatienten	2
I.3 Systemische Reaktionen auf operative Eingriffe	3
I.4 Einfluss der extrakorporalen Blutzirkulation	3
I.5 Herkunft und Funktion zirkulierender Endothelzellen	4
I.6 Zielsetzung und Fragestellung der vorliegenden Arbeit	7
II. Methoden	8
II.1 Isolierung und Kultivierung verschiedener Zelltypen	8
II.1.1 Gewinnung von Vollblutproben gesunder Probanden	8
II.1.2 Gewinnung von Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen	8
II.1.2.1 Präparation der HUVEC aus Nabelschnurvenen	9
II.1.2.2 Kryokonservierung der HUVEC	10
II.1.2.3 Kultivierung der HUVEC	10
II.2 Zellzählung mit automatischem Zellzähler	11
II.3 Identifizierung von Zellpopulationen mit spezifischen Antikörpern	13
II.3.1 Markierung mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpern	14
II.3.2 Durchfluszytometrie – FACS (= fluorescence activated cell sorting)	15
II.3.3 Ermittlung der optimalen Antikörperkonzentration	18
II.4 Methoden zur Isolierung von Endothelzellen aus Vollblut	20
II.4.1 Erythrozytenlyse und Dichtegradientenzentrifugation	21
II.4.1.1 Anreicherung von EC mit Ammoniumchloridlyse	21

II.4.1.2	Anreicherung von EC mit „BD FACS Lysing Solution“	22
II.4.1.3	Anreicherung von EC mit Dichtegradientenzentrifugation	22
II.4.2	Zellsortierung mit magnetischen Partikeln	26
II.4.2.1	Isolierung von EC mit „DynaBeads Pan Mouse IgG“	26
II.4.2.2	Isolierung von EC mit „Collection Pan Mouse IgG Kit“	29
II.4.2.3	Isolierung von EC mit „BD Imag Anti-MausIgG1 Particles-DM“	31
II.4.2.4	Zellsortierung mit dem „MACS-System“	33
II.4.2.4.1	Einschub: „FcR-Blockierung“	33
II.4.2.4.2	Depletion von PBMC mit dem „MACS-System“	34
II.4.2.4.3	Positiv-Selektion von EC mit dem „MACS-System“	36
II.5	Weitere Optionen zum Nachweis von CEC im peripheren Vollblut	41
II.5.1	Einzeitige Markierung von CEC durch Antikörper und Erythrozytenlyse	41
II.5.2	Kultivierung von CEC nach Anreicherung aus Vollblut	45
III.	Ergebnisse	53
III.1	Isolierung von HUVEC aus Vollblut	53
III.1.1	Erythrozytenlyse und Zellanreicherung	53
III.1.1.1	Optimierung der Erythrozytenlyse	54
III.1.1.2	Anreicherung von HUVEC mit Dichtegradientenzentrifugation	57
III.1.2	Zellsortierung mit magnetischen Partikeln	58
III.1.2.1	Isolierung von HUVEC mit „DynaBeads Pan Mouse IgG“	58
III.1.2.2	Isolierung von HUVEC mit „Collection Pan Mouse IgG Kit“	59
III.1.2.3	Isolierung von HUVEC mit „BD Imag Anti-MausIgG1 Particles-DM“	60
III.1.2.4	Zellsortierung mit dem „MACS-System“	61
III.1.2.4.1	Depletion von PBMC mit dem „MACS-System“	62
III.1.2.4.2	Positiv-Selektion von HUVEC mit dem „MACS-System“	64
III.2	Isolierung von CEC aus peripherem Blut	65
III.3	Weitere Optionen zum Nachweis von CEC im peripheren Vollblut	66
III.3.1	Einzeitige Markierung von CEC durch Antikörper und Erythrozytenlyse	66
III.3.2	Kultivierung von CEC nach Anreicherung aus Vollblut	69
III.4	Ergebnisse im Überblick	72

IV.	Diskussion	73
V.	Ausblick für den klinischen Einsatz von CEC	85
VI.	Anhang	87
VI.1	Hilfs- und Analysengeräte	87
VI.2	Einwegmaterialien	88
VI.3	Antikörper, antikörperbeschichtete Partikel (Beads)	89
VI.3.1	Antikörper	89
VI.3.2	Antikörperbeschichtete Partikel (Beads)	89
VI.3.3	Sonstiges	90
VI.4	Chemikalien, Puffer, Medien, weitere Reagenzien	90
VI.4.1	Chemikalien	90
VI.4.2	Puffer, Medien, Reagenzien	90
VI.4.3	Weitere Medien, Puffer, Gebrauchslösungen	91
VI.5	Daten und Einstellungen von Analysengeräten	94
VI.5.1	Automatischer Zellzähler CASY1	94
VI.5.2	Durchflusszytometer	94
VI.5.3	Fluoreszenzmikroskop	95
VI.6	Software	95
VII.	Literaturverzeichnis	VII
VIII.	Danksagung	XIII
IX.	Lebenslauf	XIV

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Detachment von Endothelzellen	5
Abb. 2:	Beispiel für ein CASYgramm der Zellzahlbestimmung einer HUVEC-Zellsuspension	12
Abb. 3:	Prinzip einer Zellmarkierung mit fluoreszierenden Antikörpern	13
Abb. 4:	Darstellung einer durchflusszytometrischen Messung von nativen HUVEC	16
Abb. 5:	Zweidimensionale Darstellung einer FACS-Analyse von HUVEC und TruCOUNT-Röhrchen	17
Abb. 6a:	Darstellung von HUVEC	19
Abb. 6b:	Darstellung von PBMC	19
Abb. 7:	Prinzip der Ammoniumchloridlyse	21
Abb. 8:	Leukosep Separationsröhren	23
Abb. 9:	CPT-Röhrchen	24
Abb. 10:	Prinzip der Isolierung mit DynaBeads	26
Abb. 11a:	Nageotte-Zählkammer, unbeschickt	28
Abb. 11b:	Nageotte-Zählkammer, beschickt	28
Abb. 12a:	Beschichtung DynaBeads _{DNAlinked}	29
Abb. 12b:	Enzymatischer Abbau des DNA-linkers	29
Abb. 13:	Prinzip der Isolierung mit BD-Partikeln	31
Abb. 14:	Depletion der PBMC mit dem MACS-System	34
Abb. 15:	Positiv-Selektion der Endothelzellen mit dem MACS-System	36
Abb. 16:	MACS-Separator	38
Abb. 17	Darstellung der FACS-Messung der HUVEC-gespinkten Vollblutprobe eines Probanden	44
Abb. 18:	Zweidimensionale Darstellung der Zellpopulationen einer FACS-Analyse nach unzureichender Ammoniumchloridlyse	54
Abb. 19:	Zweidimensionale Darstellung der Zellpopulationen einer FACS-Analyse nach erfolgreicher Ammoniumchloridlyse	55

Abb. 20: Zweidimensionale Darstellung nur der Population der HUVEC einer FACS-Analyse	56
Abb. 21: Optimierung der Endothelzell-Anreicherung mittels Ammoniumchloridlyse	56
Abb. 22: Ergebnisse der Dichtegradientenzentrifugation	57
Abb. 23: Ergebnisse der HUVEC-Isolierung aus Vollblut mit dem „DynaBeads Pan Mouse IgG“-System	58
Abb. 24: Ergebnisse der HUVEC-Isolierung mit dem „Collection Pan Mouse IgG“-Kit.	60
Abb. 25: Ergebnisse der HUVEC-Isolierung mit den „BD Imag Anti-MausIgG1 Particles-DM“	61
Abb. 26: Ergebnisse der Depletion CD45-positiver PBMC mit dem „MACS-System“	62
Abb. 27: Ergebnisse nach Depletion der CD45-positiven PBMC	63
Abb. 28: Ergebnisse der Positiv-Selektion von HUVEC mit dem „MACS-System“	64
Abb. 29: CEC-Nachweis im Vollblut (Patient 8)	67
Abb. 30: CEC-Nachweis im Vollblut (Patient 9)	68
Abb. 31: Kultivierte CEC nach Anreicherung aus peripherem Vollblut	70
Abb. 32: Darstellung von Endothelzellen im Fluoreszenzlicht	70
Abb. 33: Darstellung einer FACS-Analyse von kultivierten CEC nach Anreicherung (Patient 30)	71

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Volumenangaben zur Kultivierung von Zellen	11
Tab. 2:	Verdünnungen der Zellsuspensionen für CASY1-Messungen	12
Tab. 3a:	Verwendete Antikörper und ihre Spezifitäten	13
Tab. 3b:	Weitere Reagenzien zur Zellmarkierung	14
Tab. 4:	Definierende, charakteristische Epitope für Endothelzellen und PBMC	14
Tab. 5:	Eigenschaften der zur Durchflusszytometrie verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe	15
Tab. 6:	Optimale Menge der Antikörper	18
Tab. 7:	Prinzipien der Anreicherungs- und Isolierungsmethoden im Überblick	20
Tab. 8:	Sieben herzchirurgische Patienten	39/40
Tab. 9:	Epitope auf Endothelzellen und PBMC	41
Tab. 10	Patient 8 und 9	42
Tab. 11:	Eigenschaften der Farbstoffe DAPI, Dil-Ac-LDL und UEA-1-FITC	47
Tab. 12:	Patient 10 bis 36	48-52
Tab. 13:	Isolierung von zirkulierenden Endothelzellen (CEC) aus Patienten-Vollblut	65
Tab. 14:	Inkonstante Zuordnung verschiedener Oberflächenmarker Uneinheitliche Definition von EPC bzw. CEC	81
Tab. 15:	Auswahl nicht-endothelialer, CD146-positiver Zellen	82

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Amino-Actinomycin D (Fluoreszenzfarbstoff)
ACVB	Aorto-koronarer Venenbypass
Ak	Antikörper
APC	Allophycocyanin (Fluoreszenzfarbstoff)
aqua dest.	aqua destillata = destilliertes Wasser
aqua bidest.	aqua bidestillata = zweifach destilliertes Wasser
ARDS	Adult Respiratory Distress Syndrome = Atemnotsyndrom
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of Differentiation = Zell-Oberflächen-Antigene
CEC	Circulating Endothelial Cells = zirkulierende Endothelzellen
CASY	Cell Counter and Analyzer System = automatischer Zellzähler
CO ₂	Kohlendioxid
CRP	C-reaktives Protein (Akute-Phase-Protein)
DAPI	Diamidinophenylindol (Fluoreszenzfarbstoff)
Dil	DiOctadecyl-tetramethylindo-carbocyanine perchlorate (Fluoreszenzfarbstoff)
Dil-Ac-LDL	Azetyliertes Low Density Lipoprotein, konjugiert mit Dil
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC	Endothelial Cells = Endothelzellen
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid = Antikoagulanz
EPC	Endothelial Progenitor Cells = endotheliale Vorläuferzellen
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter = Durchflusszytometer
Fc	Fragment Crystalizable = konstanter Antikörper-Abschnitt
FCS	Fetal Calf Serum = fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat (Fluoreszenzfarbstoff)
FKS	Fetales Kälberserum
FMD	Flow Mediated Dilatation = durchflussabhängige Dilatation
FSC	Forward Light Scatter = Vorwärtslichtstreuung
HCI	Salzsäure
HLM	Herz-Lungen-Maschine
HTC	Herz-Thorax-Chirurgie
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells = Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen
Ig	Immunglobulin = Antikörper

IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukine 1-18 = Zytokine, Entzündungsmediatoren
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LBP	Lipoprotein Binding Protein
MACS	Magnetic Affinity Cell Sorting = magnetische Zelltrennung
N ₂	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid = Kochsalz
NaOH	Natriumhydroxid = Natronlauge
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
OPCAB	Off-Pump Coronar-Arterial Bypass = Bypass-OP ohne HLM
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells = mononukleäre Zellen aus peripherem Blut
PBS	Phosphate Buffered Saline = Phosphatpuffer
PBS-AZ	PBS-Puffer mit Azid- und Zitrat-Zusatz
PBS-BSA(0,5 %)	PBS-Puffer mit 0,5 % BSA
PBS-BSA-A	PBS-Puffer mit BSA-und Azid-Zusatz
PBS-EDTA	PBS-Puffer mit EDTA-Zusatz
PBS-EDTA-BSA	PBS-Puffer mit EDTA- und BSA-Zusatz
PCT	Procalcitonin
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
TF	Tissue Factor = gerinnungsaktivierender Gewebefaktor
TNF	Tumornekrosefaktoren α und β = Zytokine
UEA-1-FITC	Ulex europeus-Agglutinin (Lectin), konjugiert mit FITC
UpM	Umdrehungen pro Minute
PE	Phycoerythrin (Fluoreszenzfarbstoff)
SSC	Sideward Light Scatter = Seitwärtslichtstreuung
VEGF-R2	Vascular Endothelial Growth Factor-Receptor 2 = Oberflächenmolekül auf Endothelzellen u.a. Zellen
vWF	von Willebrand-Faktor (Endothelzellmarker)
ZVK	Zentralvenenkatheter

Begriffserklärungen

Anreicherung:

Behandlung einer Zellsuspension mit dem Ziel, eine höhere Konzentration der gesuchten Zielzellpopulation in der Suspension (Zellzahl/Volumen) zu erhalten.

Beads:

Paramagnetische kleinste Partikel (nm bis μm), die als Bestandteil von Zell-Isolierungs-Systemen zur Auf trennung von Zellgemischen dienen.

Cell-Sorting:

Zuordnung von Zellen zu einer bestimmten Zellpopulation anhand von definierten Zelleigenschaften (zum Beispiel Oberflächen-Antigenen). Im engeren Sinne aktive tatsächliche Trennung von Zellpopulationen (zum Beispiel im Rahmen einer durchflusszytometrischen Analyse).

Debris:

In einer Probe enthaltene Verunreinigungen in Form von Zelltrümmern, Staub, Fasern, Schmutzpartikeln, die bei bestimmten Analysen stören können (zum Beispiel bei der automatischen Zellzählung oder der Durchflusszytometrie).

Depletion:

Entfernung einer oder mehrerer unerwünschter Zellpopulationen aus einer gemischten Zellsuspension.

Positiv-Selektion:

Gezielte Extraktion der gesuchten Zielzellpopulation aus einer gemischten Zellsuspension.

Reinheit:

Prozentualer Anteil der gesuchten Zielzellen in einer Zellsuspension nach Durchführung einer Methode zur Isolierung. Größe zur Überprüfung/Validierung einer Methode.

Reproduzierbarkeit:

Wiederholbarkeit einer bestimmten Methode zur Zellisolierung unter den gleichen Versuchsbedingungen mit jeweils gleichen Ergebnissen. Maß für die Güte einer Methode zur Zellisolierung. Größe zur Überprüfung/Validierung einer Methode.

Vitalität:

Prozentualer Anteil intakter, lebender Testzellen der gesamten Testzellen, die nach Durchführung einer Methode zur Isolierung nachgewiesen werden. Größe zur Überprüfung/Validierung einer Methode.

Wiederfindung:

Prozentualer Anteil der eingesetzten Testzellen, der nach Durchführung einer Methode zur Zellisolierung noch nachgewiesen werden kann. Größe zur Überprüfung/Validierung einer Methode.

Zell-Isolierung:

Allgemein Trennung einer definierten Zellpopulation von den restlichen Zellen einer gemischten Zellsuspension.

I. Einleitung

I.1 Vorkommen zirkulierender Endothelzellen

Das Phänomen der zirkulierenden Endothelzellen (CEC, circulating endothelial cells) im peripheren Blut wurde vor mehr als 30 Jahren erstmals beschrieben (Paul et al. 1974, Wright et al. 1972, Goette 1964). Ihr Auftreten wird im Zusammenhang mit mannigfaltigen Erkrankungen diskutiert, darunter akute Leiden wie Myokardinfarkt (Mutin et al. 1999), oder akutes Atemnotsyndrom (He et al. 2004), als auch chronische wie Systemische Sklerose (Del Papa et al. 2005), hepatzelluläres Karzinom (Ho et al. 2006) und progressive Tumorerkrankungen allgemein (Beerepoot et al. 2004, Mancuso et al. 2001). Vor allem bei gefäßschädigenden Erkrankungen wie Vaskulitis (Woywodt et al. 2003, Haubitz et al. 2004), Atherosklerose (Makin et al. 2004), Diabetes mellitus Typ II (McClung et al. 2005) und arterieller Hypertonie (Zhu 1991) finden sich erhöhte CEC-Level, ebenso bei Patienten mit atherogenen Risikofaktoren, zum Beispiel Nikotin-Abusus (Blache et al. 1992, Sinzinger et al. 1988), oder Hyperlipoproteinämie (Sinzinger et al. 1988). Nicht zuletzt kann das Alter der Patienten die CEC-Konzentration beeinflussen (Scheubel et al. 2003).

Darüber hinaus wird ein Anstieg der zirkulierenden Endothelzellen bei Verabreichung diverser Medikamente (Ketamin - Bartoc et al. 2005, Cyclosporin - Woywodt et al. 2003, Chemotherapeutika - Beerepoot et al. 2004), nach Radiotherapie (Palumbo et al. 2003), nach allogener Stammzelltransplantation (Woywodt et al. 2004), oder nach operativen Eingriffen (Yang et al. 1992, Schmid et al. 2006) beobachtet. Bei herzchirurgischen Eingriffen werden unter anderem die Auswirkungen der Anästhesie (Elhendy et Hamby 2007), des Operationstraumas (Elhendy et Hamby 2007, Shah 1999) und weitere Einflüsse im Rahmen der Operation wie die extrakorporale Zirkulation (Schmid et al. 2006, Skrabal et al. 2006) dafür verantwortlich gemacht. Sie werden in der Summe als Ursache für postoperativ auftretende Reaktionen angesehen. Zu diesen Reaktionen gehört auch der Anstieg der CEC.

I.2 Darstellung des endothelialen Schadens bei Herzpatienten

Das Auftreten von CEC bei herzchirurgischen Patienten wird mit einem Defekt der endothelialen Gefäßauskleidung in Verbindung gebracht (siehe I.5). Bisher wurden solche Läsionen indirekt über die Bestimmung löslicher Plasmafaktoren verifiziert. Hirai et al. haben beispielsweise unter anderem den zeitlichen Verlauf von Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8) und Interleukin-10 (IL-10) gemessen, um die Auswirkungen von Operationen am Herzen zu untersuchen (Hirai et al. 2001). Dabei wurde der maximale Anstieg aller Faktoren direkt nach Öffnen der Cross-Klemme verzeichnet. Franke et al. untersuchten bei Patienten der Herz-Thorax-Chirurgie (HTC) die post-operativen Level folgender Parameter: IL-6, IL-8, Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), C-reaktives Protein (CRP), Lipoprotein-binding protein (LBP) und Procalcitonin (PCT). Sie fanden bei den herzchirurgischen Patienten einen unmittelbaren Anstieg von IL-6 und IL-8 mit einem Maximum bei sechs Stunden nach Operation. Die Serum-Spiegel von CRP, LBP und PCT waren ab der sechsten post-operativen Stunde, mit einem Peak von CRP und LBP am dritten Tag, erhöht (Franke et al. 2005).

Obwohl Parameter wie Interleukine und TNF (Zytokine), oder CRP (akute Phase-Protein) seit Jahren auch als Zeichen endothelialer Aktivierung gewertet werden, handelt es sich bei ihnen ursprünglich um allgemeine Marker einer Entzündungsreaktion. Von ihrem vermehrten Auftreten wurde auf eine Endothelläsion zurückgeschlossen. Dabei konnte nicht mit Sicherheit festgelegt werden, dass die Entzündungsreaktion direkt mit dem vermuteten Endothelschaden korreliert.

In Ergänzung zu den löslichen Endothelmarkern wurden die CEC in den letzten Jahren als zelluläre endotheliale Marker entdeckt (Haubitz et al. 2004, Woywodt et al. 2003). Erst durch die CEC war ein direkter Rückschluss auf einen Endothelschaden möglich. Ihr Auftreten ist eng mit dem der bekannten Plasmafaktoren bei unterschiedlichen Erkrankungen verknüpft. Zum Beispiel zeigten Wang et al. eine signifikante positive Korrelation von CEC und CRP bei akutem Myokardinfarkt, sowie von CEC und IL-6 beziehungsweise TNF-alpha bei multiplem Organversagen (Wang et al. 2005 und 2006). Weiterhin wurde bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom (Myokardinfarkt oder instabile Angina pectoris) ein signifikanter Zusammenhang zwischen CEC (kennzeichnend für einen Endothelschaden), von Willebrand-Faktor (vWF, ebenso kennzeichnend für einen Endothelschaden), tissue factor (TF, Gerinnungsmarker), IL-6 (Entzündungsmarker) und durchflussvermittelter Vasodilatation (FMD, flow mediated dilatation, kennzeichnend für eine endotheliale Dysfunktion)

I. Einleitung

nachgewiesen (Lee et al. 2006). Auch Patienten mit akutem Herzversagen wiesen sowohl erhöhte CEC-Level als auch positiv korrelierende erhöhte vWF-Werte auf (Chong et al. 2006). Endotheliale Schäden in der Folge von Operationen wurden bereits ebenso durch das Auftreten von CEC nachgewiesen. Nach Herzoperationen ist ein Anstieg der CEC sechs Stunden nach dem Eingriff mit einem Peak bei zwölf Stunden bekannt (Schmid et al. 2006, Skrabal et al. 2006, Gill et al. 2001). Gill et al. zeigten einen parallelen Anstieg von löslichem VEGF (vascular endothelial growth factor) zur Erhöhung der CEC mit einem Maximum bei sechs bis zwölf Stunden nach Bypass-Operation (Gill et al. 2001). Der zeitliche Verlauf des CEC-Anstiegs korreliert also mit dem von VEGF und dem der von Franke et al. untersuchten löslichen Plasmasfaktoren (IL-6, IL-8, CRP, LBP und PCT).

I.3 Systemische Reaktionen auf operative Eingriffe

Die beschriebenen positiven Korrelationen von Gerinnungsmarkern, Entzündungsmarkern und Faktoren einer endothelialen Schädigung bzw. Dysfunktion stimmen mit dem Bild der allgemeinen Reaktionen auf operative Eingriffe überein. Es wird vom sogenannten SIRS (systemic inflammatory response syndrome) gesprochen, einer systemischen Entzündungsreaktion nicht-infektiöser Genese, die in ihrer Ausprägung stark variieren kann. Es handelt sich um ein komplexes Geschehen, bei dem es zur Aktivierung unterschiedlicher Systeme wie der Komplement-, Gerinnungs-, Fibrinolyse- und Kallikrein-Kaskade, sowie der Aktivierung verschiedener Zellen des Immunsystems, aber auch des Endothels kommt (Raja et al. 2005, Paparella et al. 2002, Defraigne et al. 1999, Brtko et al. 1999, Miller et al. 1997, Butler et al. 1993).

I.4 Einfluss der extrakorporalen Blutzirkulation

Das Auftreten einer SIRS wird insbesondere bei Patienten der Herz-Thorax-Chirurgie (HTC) beschrieben. Hierbei scheint der Einsatz einer Herz-Lungen-Maschine (HLM) während der Operation eine große Rolle zu spielen: Der Kontakt von Patientenblut zu Fremdroberflächen der HLM kann zu einem sogenannten Postperfusionssyndrom oder post-pump-Syndrom führen (Brtko et al. 1999, Defraigne et al. 1999, Miller et al. 1997). Klinisch bietet dieses Syndrom durch Beeinträchtigung verschiedener Organsysteme ein buntes Bild. Es sind vor allem Lungen

I. Einleitung

(Ödeme, akutes Atemnotsyndrom, respiratorische Insuffizienz), Nieren (Nierenversagen) und Gehirn (Verwirrtheit, Gedächtnisverlust) betroffen. Da den Organausfällen eine erhöhte Kapillarpermeabilität und Endothelschädigung zugrunde liegt, können aber prinzipiell alle Organe in Mitleidenschaft gezogen werden (Elhendy et Hamby 2007, Shah 1999, Asimakopoulos et al. 1999). Für die Störung der Funktion und Integrität der Kapillargefäße werden Mikro-Luftembolien (Elhendy et Hamby 2007), freie Radikale und gewebszerstörende Mediatoren aktiverter neutrophiler Granulozyten, Proteasen und weitere, noch unklare Größen verantwortlich gemacht (Elhendy et Hamby 2007, Shah 1999, Asimakopoulos et al. 1999).

In Abhängigkeit von der Verwendung einer HLM wird beim postoperativen Anstieg der CEC ein signifikanter Unterschied beschrieben. So fanden Schmid et al. eine deutliche Erhöhung der CEC im peripheren Blut von Patienten nach einer Bypass-Operation. Dies bezog sich zwar sowohl auf Patienten, die temporär an eine HLM angeschlossen, als auch auf diejenigen, die mit der sogenannten off-pump-Methode operiert worden waren. Dabei konnten jedoch signifikant höhere Werte bei Patienten mit vorangegangener extrakorporaler Zirkulation (EKZ) festgestellt werden (Schmid et al. 2006). Skrabal et al. untersuchten das Ausmaß der endothelialen Schädigung bei Verwendung einer herkömmlichen HLM und bei minimierter EKZ. Das Ergebnis zeigte eine Verringerung des postoperativen Anstiegs zirkulierender Endothelzellen bei minimierter EKZ gegenüber der konventionellen HLM im Sinne einer geringeren endothelialen Läsion (Skrabal et al. 2006). Bei vergleichenden Untersuchungen von CEC nach Bypass-Operationen mit und ohne HLM verzeichneten Ruel et al. hingegen weniger große Unterschiede in der Anzahl der CEC als vielmehr in ihrer Funktion. Während die Proliferationsfähigkeit der CEC bei beiden Patientengruppen als gleichartig zu bewerten war, konnte eine verminderte Migrationsfähigkeit und Vitalität der CEC derjenigen Patienten festgestellt werden, die unter Einsatz einer HLM operiert worden waren (Ruel et al. 2005).

I.5 Herkunft und Funktion zirkulierender Endothelzellen

Durch Bestimmung der Zellzahl und des Phänotyps zirkulierender Endothelzellen ist also ein direkter Nachweis von Endothelschäden möglich (Skrabal et al. 2006).

Die Bedeutung des vermehrten Auftretens endothelialer Zellen im peripheren Blut bei Endothelschäden wird allerdings noch diskutiert, da die Herkunft der Zellen bis dato nicht einwandfrei geklärt werden konnte. Es existieren zwei unterschiedliche Auffassungen über den Ursprung der zirkulierenden Endothelzellen:

I. Einleitung

1. Hypothese: CEC treten primär durch einen endothelialen Schaden im peripheren Blut auf.

Eine endogene oder exogene Noxe induziert die Apoptose/Nekrose reifer Endothelzellen in der Gefäßwand. Diese lösen sich daraufhin aus dem Zellverband (endothiales Detachment). Folglich stellen die im Blut zirkulierenden Endothelzellen geschädigte, absterbende Zellen dar (Bonello et al. 2006, Delorme et al. 2005, Petrishchev et al. 2001).

2. Hypothese: CEC treten sekundär als Reaktion auf einen endothelialen Schaden im peripheren Blut auf.

Eine Endothelläsion induziert über Zytokine und andere Mediatoren die Mobilisation von Vorläuferzellen (Progenitorzellen) aus dem Knochenmark. Diese werden in das periphere Blutgefäßsystem ausgeschwemmt und sollen dort für die Deckung des endothelialen Defekts sorgen. Demnach sind die infolge einer Endothelläsion auftretenden zirkulierenden Endothelzellen Ausdruck eines Reparaturmechanismus (Bonello et al. 2006, Delorme et al. 2005, Hunting et al. 2005, Schmidt-Lucke et al. 2005, Gill et al. 2001).

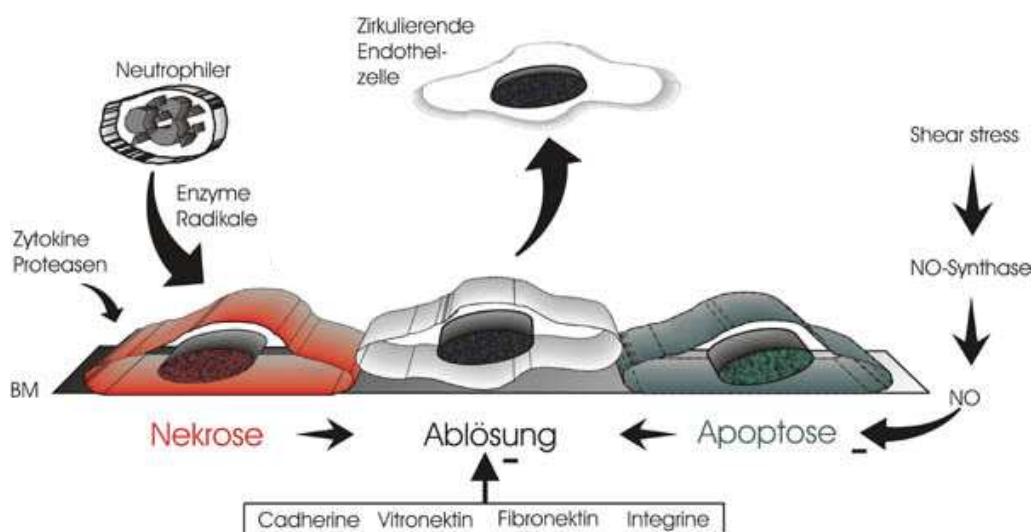


Abb. 1: **Detachment von Endothelzellen** (Skizze aus Woywodt et al. 2002 entnommen).

I. Einleitung

Während bisher von einem direkten Schaden der Endothelzellen ausgegangen wurde (Traumata, Operationen, Medikamente, Strahlen als exogene, vaskuläre Erkrankungen als endogene Noxen), gibt es zunehmend Hinweise, die für einen Reparaturmechanismus sprechen. Gill et al. (2001) haben bei Patienten mit Gefäßverletzung nach Verbrennungsunfällen und nach Bypass-Operationen festgestellt, dass beide Patientengruppen einen markanten Anstieg von CEC nach dem betreffenden Ereignis aufweisen. Aufgrund der Oberflächenmarker der untersuchten Zellen (VEGF-R2, CD133, VE-Cadherin) schlagen sie vor, die endothelialen Zellen im peripheren Blut als aus dem Knochenmark mobilisierte Vorstufen (EPC) zur Reparatur von Endothelschäden anzusehen.

Hunting et al. (2005) sehen die CEC und ihre Vorstufen EPC als Abbild des Zustands des Endothels im peripheren Blut, sie spiegelten Verletzung, Reparatur und Gefäßneubildung wider. Die Bestimmung der Anzahl und des Phänotyps der CEC/EPC könne aufgrund dessen als Diagnostikum und zur Prognose von Gefäßverletzungen und Tumorwachstum verwendet werden. Es ist also von zwei Populationen die Sprache, die nebeneinander her existieren. Dieser Meinung scheinen sich immer mehr Arbeitsgruppen anzuschließen. Auch Delorme et al. (2005) sprechen von den zirkulierenden Endothelzellen als einer gemischten Population, die sich aus reifen apoptotischen CEC und unreifen EPC aus dem Knochenmark zusammensetzt. Ebenso fanden Bonello et al. (2006) zwei Zellpopulationen. Sie untersuchten Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen und kamen zu dem Schluss, dass die CEC und EPC Bestandteile einer „endothelialen Homöostase“ zwischen Verletzung und Reparatur des Endothels darstellen.

Um eine individuelle Antwort auf die Frage nach Herkunft und Funktion der CEC bei herzchirurgischen Patienten geben zu können, müssen diese Zellen direkt aus dem Patienten-Vollblut gewonnen und untersucht werden. Für eine entsprechende Charakterisierung der CEC ist eine geeignete Methode zwingend erforderlich.

I.6 Zielsetzung und Fragestellung der vorliegenden Arbeit

1. Charakterisierung von CEC direkt aus dem Vollblut von HTC-Patienten

Die bereits etablierte (Schmid et al. 2006) immunomagnetische Methode zur Isolierung von CEC aus Vollblut mithilfe des DynaBeads Pan Mouse IgG (Dynal) erlaubt einen diagnostischen Nachweis (Quantifizierung und Zeitverlauf), aber keine multiparametrische Charakterisierung der Zellen. Eine durchflusszytometrische Analyse (FACS, fluorescence activated cell sorting) ermöglicht hingegen die Darstellung der CEC über verschiedene endotheliale Marker.

Aufgrund der zu erwartenden sehr kleinen CEC-Population unserer Patienten ist eine vorherige Anreicherung und/oder Isolierung der CEC notwendig.

2. Anreicherung und/oder Isolierung von CEC direkt aus dem Patienten-Vollblut für anschließende durchflusszytometrische Analysen

Die anreichernden Methoden müssen zwingend mit der anschließenden durchflusszytometrischen Untersuchung kompatibel sein. Zur Definition und Identifizierung der Endothelzellen soll der Oberflächenmarker CD146 verwendet werden (historisch etablierter Marker für Isolierung von CEC). Zur Validierung einer Methode sollen ausdifferenzierte endotheliale Testzellen verwendet werden: HUVEC. Als Referenz dient die etablierte Methode der DynaBeads Pan Mouse IgG (Dynal), die parallel aus denselben Patientenproben mitgeführt wird.

II. Methoden

Die verwendeten Laborgeräte, Einwegmaterialien, Antikörper, antikörperbeschichteten Partikel (Beads) sowie die im Folgenden beschriebenen Chemikalien und Reagenzien sind im Anhang alphabetisch gelistet.

Für die Etablierung einer Methode zur Zell-Anreicherung-/Isolierung wurden zunächst mit ausdifferenzierten humanen Endothelzellen gespikte¹ Vollblutproben von gesunden Probanden verwendet. Nach Optimierung wurde die Methode zur Isolierung von endothelialen Zellen aus dem Vollblut von Patienten verwendet.

II.1 Isolierung und Kultivierung verschiedener Zelltypen

Im Folgenden ist die Gewinnung und Behandlung der verwendeten Zelltypen beschrieben.

II.1.1 Gewinnung von Vollblutproben gesunder Probanden

Um eine Aktivierung von Granulozyten/Thrombozyten zu vermeiden, ist eine vorsichtige Entnahme des venösen Blutes aus der Kubitalregion in EDTA-Monovetten und das Einhalten von 15 Minuten Ruhezeit der Blutröhrchen bei Raumtemperatur vor der weiteren Verarbeitung erforderlich.

II.1.2 Gewinnung von Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen

Zum Spiken des Vollbluts wurden Testzellen ausgewählt, die in ihren Eigenschaften den Endothelzellen aus Patientenblut vergleichbar sind und in ausreichender Menge jederzeit im Labor zur Verfügung stehen. Humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC, human umbilical vein endothelial cells) werden diesen Ansprüchen gerecht.

¹ Unter Spiken versteht man das Zusetzen einer definierten Anzahl von (hier: endothelialen) Testzellen zu einem bestimmten Volumen Vollblut.

II. Methoden

II.1.2.1 Präparation der HUVEC aus Nabelschnurvenen

Die Nabelschnüre wurden freundlicherweise von der Klinik für Geburtshilfe (Prof. Dr. Seelbach-Göbel) St. Hedwig, Uniklinikum Regensburg und der Frauenklinik (PD Dr. Jakob) TU München zur Verfügung gestellt. Ein entsprechender Ethikantrag wurde im Rahmen des STEMMAT-Projektes gestellt. Die Venen wurden unter sterilen Bedingungen von der Wharton-Sülze befreit, anschließend in Ethanol (70 %) gewaschen und in PBS (1 x) überführt.

Präparation der Zellen unter sterilen Bedingungen (Sterilwerkbank):

- T75-Zellkulturflasche mit 6 ml Gelatine für 30 Minuten bei 37 °C beschichten
- Nabelschnurvene kanülieren und mit 2 x 20 ml Hepes-Puffer spülen
- Vene abklemmen, mit Kollagenase füllen, zweite Seite abklemmen
- Brutschrank: 20 Minuten, 37°C/5 % CO₂ (abgedeckt im Becherglas) inkubieren
- mit Pinzette vorsichtig die Venenwand von außen massieren
- Vene aufschneiden, Veneninhalt in Falconrörchen steril auffangen
- Vene mit 2 x 20 ml Hepes-Puffer durchspülen, Spülösung im gleichen Falcon sammeln
- Zentrifuge: 5 Minuten, 250 x g, 4 °C, Überstand absaugen und verwerfen
- Zellpellet in 2 x 5 ml Medium (M199 + 20 % FKS, im Folgenden M199) resuspendieren
- T75-Zellkulturflasche: Gelatine absaugen, 5 ml M199 vorlegen
- resuspendierte Zellen in T75-Zellkulturflasche überführen
- Brutschrank: 37 °C/5 % CO₂
- nach einem Tag: mit 5 ml PBS spülen und Medienwechsel
- anschließend alle 2–4 Tage Medienwechsel (mikroskopische Kontrolle)

Nach Erreichen der Konfluenz¹ (nach 3–7 Tagen) können die Zellen der Primärpassage (p0) eingefroren (II.1.2.2), vermehrt (II.1.2.3) oder weiterverarbeitet (II.4) werden. In jedem Fall müssen die Zellen hier abgelöst und resuspendiert werden.

Ablösen der HUVEC von der Kulturfäche:

- Überstand aus Zellkulturgefäß absaugen, 2 x mit PBS waschen (siehe Tab. 1, S. 11)
- Kollagenase zupipettieren (siehe Tab. 1, S. 11),
Brutschrank: 2-5 Minuten, 37 °C (mikroskopische Kontrolle: Abkugeln der Zellen)
- 1 Teil M199 in Falconrörchen vorlegen (siehe Tab. 1, S. 11)

¹ Die Konfluenz der Zellen beschreibt den Zeitpunkt im Wachstum einer Zellkultur, zu dem die ausbreiteten Zellen sich an ihren Rändern gegenseitig berühren und eben die gesamte Kulturfäche bedecken.

II. Methoden

- in 2 Teilen M199 Zellen in Flasche/Well resuspendieren und in Falconrörchen überführen
- Zentrifuge: 10 Minuten, 290 x g, 4 °C, Überstand absaugen
- Zellpellet mit 0,5–1 ml M199 resuspendieren
- Volumen bestimmen, Zellzahl bestimmen (CASY, siehe II.2)
- aliquotieren → einfrieren/ weiter kultivieren/ weiterverarbeiten

II.1.2.2 Kryokonservierung der HUVEC

- 5×10^5 HUVEC in 500 µl Einfriermedium I (2 ml-Kryorörchen), 30 Minuten auf Eis
- 500 µl Einfriermedium II zugeben, weitere 30 Minuten auf Eis
- in vorgekühlte Kryobox (4 °C, mit 250 ml Isopropanol gefüllt) stellen,
- Kryobox über Nacht bei –80 °C lagern (Abkühlung ca. –1 °C/Minute)
- am nächsten Tag in Flüssigstickstofftank bei –192 °C überführen und lagern

II.1.2.3 Kultivierung der HUVEC

Zum Kultivieren können frische HUVEC direkt aus der Nabelschnurvene oder Zellen nach Kryokonservierung verwendet werden. Letztere müssen zuvor aufgetaut werden. Dabei ist zu beachten, dass das Auftauen der Zellen möglichst zügig nach Entnahme aus dem Stickstofftank erfolgt, um die Zellen durch im Einfriermedium enthaltenes DMSO (Dimethylsulfoxid) nicht zu schädigen (2 Minuten bei 37 °C im Wasserbad).

Aussäen der HUVEC unter der Sterilbank:

- Gelatinieren der Kulturflaschen/Well-Platten für 30 Minuten bei 37 °C (siehe Tab. 1, S. 11)
- 3 ml M199 in 15 ml-Falconrörchen vorlegen, aufgetaute Zellsuspension überführen
- Zentrifuge: 5 Minuten, 250 x g, 4 °C
- gelatinierte Flaschen/Platten absaugen, 1 ml M199 vorlegen
- Zell-Überstand absaugen, Zellpellet in 2 x 500 µl M199 in Flaschen/auf Platten pipettieren (erforderliche Mindestmenge an Zellen siehe Tab. 1, S. 11)
- M199 auf erforderliches Volumen auffüllen (siehe Tab. 1, S. 11)
- Brutschrank: 37 °C/5 % CO₂
- alle 2-5 Tage Medienwechsel (mikroskopische Kontrolle)

II. Methoden

Well-Platten/ Kulturflaschen	6-Well-Platte (pro Well)	T25-Flasche	T75-Flasche	T175-Flasche
Kulturfläche [cm ²]	9,6	25	75	175
Gelatine(0,25 %) (Beschichten) [ml]	1,5	3	6	12
Medium M199 (Wachsen) [ml]	3	5	15	25
Kollagenase (Ablösen) [ml]	0,5	1	1,5	2
PBS (Spülen) [ml]	1	2	5	10
Minimal auszusäende Zellzahl	$5,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^5$	$5,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^6$
Maximal zu erwartende Zellzahl	$4,5 \times 10^5$	$1,0 \times 10^6$	$3,0 \times 10^6$	$5,0 \times 10^6$

Tab. 1: Volumenangaben zur Kultivierung von Zellen in Zellkulturflaschen oder Well-Platten.

II.2 Zellzählung mit automatischem Zellzähler

Die Quantifizierung der Zellzahl erfolgte durch automatisierte Zellzählung mit dem „Cell Counter and Analyzer System“ (CASY1, Schärfe System, Reutlingen).

Das CASY1 wurde für alle Zellzählungen benutzt. Die gültigen Geräteeinstellungen sind im Anhang verzeichnet.

Messprinzip des CASY1:

Diese Methode der Zellzählung basiert auf Verfahren aus dem Bereich der Partikelmesstechnik. Hierbei findet eine Widerstandsmessung sowie eine Pulsnachanalyse statt. Die Zellen werden in schwachen Elektrolyten (CASYton, Schärfe Systems GmbH) suspendiert und durch eine Messspore innerhalb einer Kapillare gesaugt. Es kommt durch die Zellen zu einer Widerstandserhöhung in der Kapillare. Diese Impedanzerhöhung ist ein Maß für das Zellvolumen. Über die Programm-Software erfolgt eine Integration des gesamten Messsignals.

Vorgehen zur Zellzahlbestimmung aus einer Zellsuspension:

- Zellsuspension mit CASYton verdünnen (siehe Tab. 2, S. 12)
 - es soll eine Konzentration von 1×10^4 bis 1×10^5 Zellen/ml vorliegen
- Verdünnung direkt vor Messung mischen, messen
- Messgrenzen, Spreizung der y-Achse, Verdünnung, eingeben (siehe Abb. 2, S. 12)
- Ablesen der Zellzahl/ml (Abb. 2, S. 12), grobe Einschätzung von Aggregatabildungen, Beurteilung der Zellverteilung anhand des Graphen und der Standardabweichung

II. Methoden

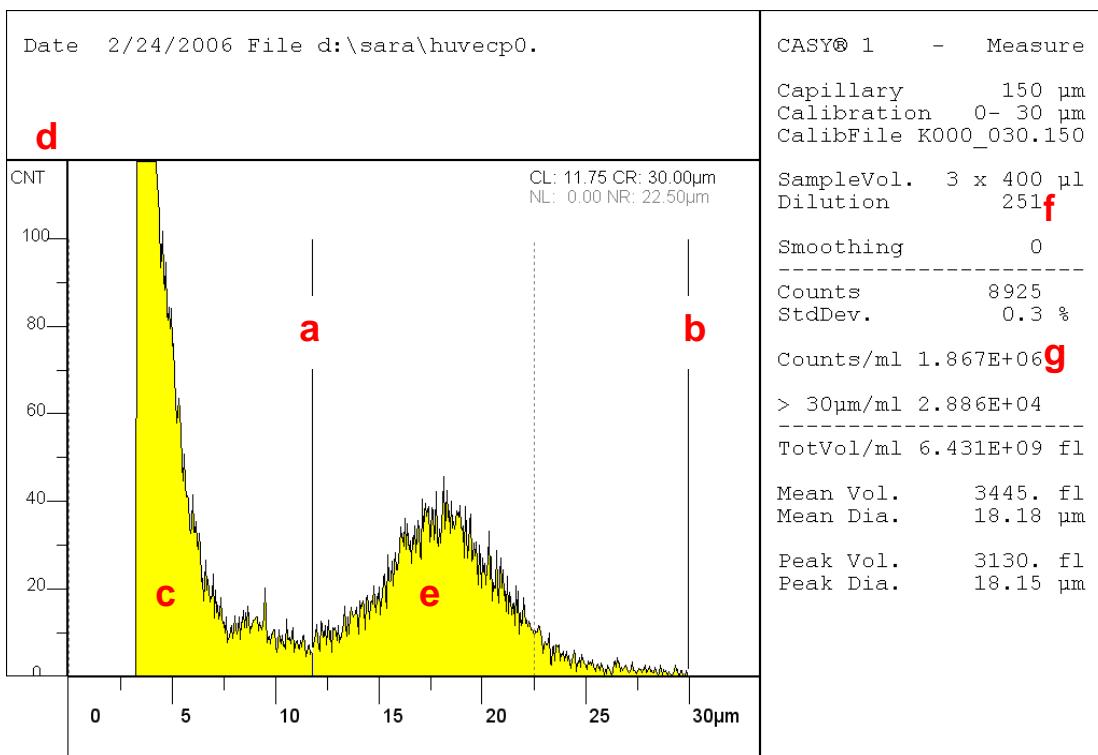


Abb. 2: Beispiel für ein CASYgramm der Zellzahlbestimmung einer HUVEC-Zellsuspension.

Untere (a) und obere (b) Messgrenze auf der x-Achse (Zellgröße in μm) schließen große Zellaggregate, oder Debris (c) von der Zählung aus. (Für die Zellzählung von HUVEC wurde die untere Grenze bei etwa 12 μm und die obere bei etwa 30 μm gewählt.)

Die Spreizung der y-Achse (d) (CNT = Counts = Ereignisse) wird so eingestellt, dass der Peak der gemessenen Zellen (e) optimal auf dem Bildschirm zu sehen ist. (Bei niedrigen Zellzahlen/ml erwies sich 30 bis 60 als passend, bei höheren Zellzahlen/ml eher 80 bis 120 - hier 100.)

Die Verdünnung (f) der Zellsuspension mit CASYton (hier 1:251) muss für die automatische Berechnung der Zellzahl/ml (g) eingegeben werden (hier $1,867 \times 10^6$ HUVEC/ml).

Zellsuspension [μl]	CASYton [ml]	Resultierende Verdünnung
100	5	1: 51
20	5	1: 251
20	10	1: 501
10	10	1:1001

Tab. 2: Verdünnungen der Zellsuspensionen für CASY1-Messungen.

II.3 Identifizierung von Zellpopulationen mit spezifischen Antikörpern

Spezifische Antikörper, die Fluoreszenzfarbstoffe tragen, binden an Oberflächenmoleküle (Epitope) der Zielzellen (Abb. 3). Diese Markierung der Zellen wird auch „Antikörper-Färbung“ genannt. Durch diese Färbung können die Zellen im Fluoreszenzmikroskop oder Durchflusszytometer von anderen Zellpopulationen unterschieden und quantifiziert werden.

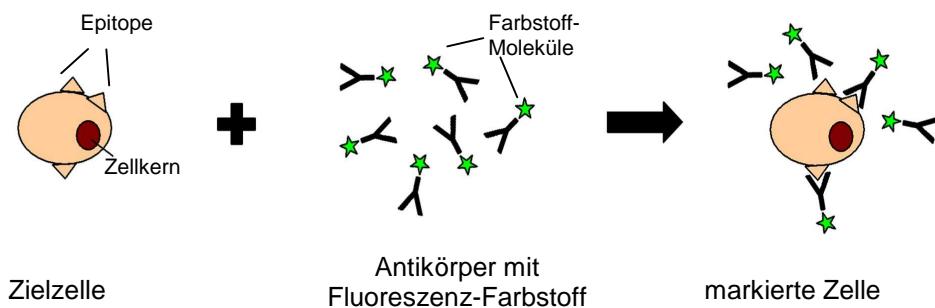


Abb. 3: Prinzip einer Zellmarkierung mit fluoreszierenden Antikörpern, die spezifisch an Oberflächenmoleküle der Zielzellen binden (Antikörper-Färbung).

Jede Zellpopulation wird über ihre individuelle Kombination an Oberflächenmolekülen charakterisiert (Tab. 4). Danach werden Antikörper zur Markierung ausgewählt (siehe Tab. 3). In der vorliegenden Arbeit wurden Endothelzellen über ihr Epitop CD146 isoliert und PBMC über das Epitop CD45 abgegrenzt, das Blutzellen charakterisiert.

Antikörper	Spezifität
Maus-Anti-HumanCD14	Monozyten
Maus-Anti-HumanCD15	Granulozyten, Monozyten
Maus-Anti-HumanCD31	Granulozyten, Monozyten, Thrombozyten, B-Zellen
Maus-Anti-HumanCD34	Hämatopoetische Progenitorzellen
Maus-Anti-HumanCD45	Leukozyten
Maus-Anti-HumanCD62L	Lymphozyten, Monozyten, NK-Zellen
Maus-Anti-HumanCD146	Endothelzellen, aktivierte T-Zellen
Maus-Anti-HumanCD184	T-Zell-Subpopulationen, B-Zellen, Monozyten, Endothelzellen
Maus-Anti-HumanVEGF-R2	Endothelzellen

Tab. 3a: Verwendete Antikörper und ihre Spezifitäten; (Serotec, „CD Antigen Expression“, from HLDA8, 2004).

II. Methoden

Reagenz	Zielstrukturen
7-AAD (7-Amino-Actinomycin D)	Apoptotische Zellen
DAPI (Diamidinophenylindol)	DNA und RNA in allen Zellen
Dil-Ac-LDL (Dil-konjugiertes azetyliertes Lipoprotein)	Endothelzellen
Ulex europaeus (UEA1)-Lektin	Endothelzellen

Tab. 3b: Weitere Reagenzien zur Zellmarkierung, die selbständig mit Zellbestandteilen reagieren und nicht der indirekten Bindung über Antikörper bedürfen.

Zelltyp	Epitope
Endothelzellen	CD146 positiv, CD45 negativ
PBMC	CD146 negativ, CD45 positiv

Tab. 4: Definierende, charakteristische Epitope für Endothelzellen und PBMC.

In Abhängigkeit der Fluoreszenzspektren der Farbstoffe erfolgt die Messung in unterschiedlichen Fluoreszenzkanälen des Durchflusszytometers. Bei entsprechender Auswahl der Farbstoffe können somit mehrere in Kombination zur Detektion von Zellen verwendet werden (siehe Tab.5, S. 15).

II.3.1 Markierung mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpern

Im Folgenden ist ein Beispiel für die Handhabung von Farbstoff-konjugierten Antikörpern dargestellt. Die einzelnen Farbstoffe bedürfen unterschiedlich langer Inkubationszeiten, die von 10 bis 45 Minuten reichen. Falls nicht anders vermerkt wird bei 4 °C inkubiert. Die optimale Menge und Konzentration der Antikörper-Lösung muss für die entsprechenden Zellen titriert werden (siehe II.3.3).

- 100 µl Suspension mit 1×10^7 Zellen
+ 20 µl Antikörper
- 15 Minuten bei 4 °C inkubieren (dunkel)
1 x mit PBS-EDTA-BSA waschen

II.3.2 Durchflusszytometrie – FACS (= fluorescence activated cell sorting)

Das Durchflusszytometer zählt und analysiert Zellen, die einzeln einen fokussierten Laserstrahl passieren. Dabei wird der Laserstrahl unterbrochen und gestreut. Die Streuung wird als Vorwärts-(FSC, forward scatter) und Seitwärts-Streuung (SSC, sideward scatter) detektiert. Die Vorwärtsstreuung steht in Beziehung zur Zellgröße, die Seitwärtsstreuung ist abhängig von der Beschaffenheit des Zellinneren (Granularität, Zellkernmorphologie). Zusätzlich kann in vier Kanälen Fluoreszenz gemessen werden (FL-1 bis FL-4). Die Zellen sind mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert, die Laserlicht einer bestimmten Wellenlänge absorbieren und in einer anderen, charakteristischen Wellenlängen emittieren (siehe Tab. 5).

Die elektronischen Signale eines jeden Parameters jeder einzelnen Zelle (Größe, Granularität, Fluoreszenz) werden verarbeitet, die Werte den Kanälen zugeordnet und an den Computer weitergeleitet. Dieser analysiert die Werte und produziert das entsprechende Bild auf den Bildschirm.

Fluoreszenzfarbstoff	Ex (Laserlicht) [nm]	Em (Fluoreszenzlicht) [nm]	FACS-Kanal
FITC	495 (blau)	519 (grün)	FL-1
PE	780; 565 (blau)	578 (gelb)	FL-2
7-AAD	546 (blau)	647 (orange)	FL-3
APC	650 (rot)	660 (rot)	FL-4

Tab. 5: Eigenschaften der zur Durchflusszytometrie verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe: anregende (Ex) und emittierte (Em) Wellenlängen der Fluoreszenzfarbstoffe, darstellende Kanäle der Farbstoffe im FACS.

Vor der eigentlichen Messung werden die Photomultiplier des Durchflusszytometers mit Suspensionen entsprechender Kontrollzellen korrekt eingestellt. Damit wird eine Grundeinstellung der darzustellenden Zellen festgelegt. Um Einstrahlungen eines Fluoreszenzfarbstoffs in die Fluoreszenz-Kanäle benachbarter Wellenlängen zu verhindern, müssen die verwendeten Fluoreszenz-Kanäle untereinander kompensiert werden. Dazu werden Zellsuspensionen benutzt, die jeweils mit nur einem fluoreszierenden Farbstoff versehen sind.

II. Methoden

Kontrollen zur FACS-Einstellung:

- HUVEC nativ (ohne Antikörper-Färbung), HUVEC-CD146-PE, apoptotische HUVEC-7-AAD

- PBMC nativ (ohne Antikörper-Färbung), PBMC-CD45-FITC, apoptotische PBMC-7-AAD

Zur Induktion der Apoptose wurden die Zellen zwei Tage bei 4 °C gelagert oder mit 70 % Ethanol versetzt.

Mit den nativen Zellen wurde jeweils zuerst die Einstellung der Photomultiplier vorgenommen. Darauf folgte die Kompensation der entsprechenden Fluoreszenzkanäle mit den Suspensionen der einfach gefärbten Zellen.

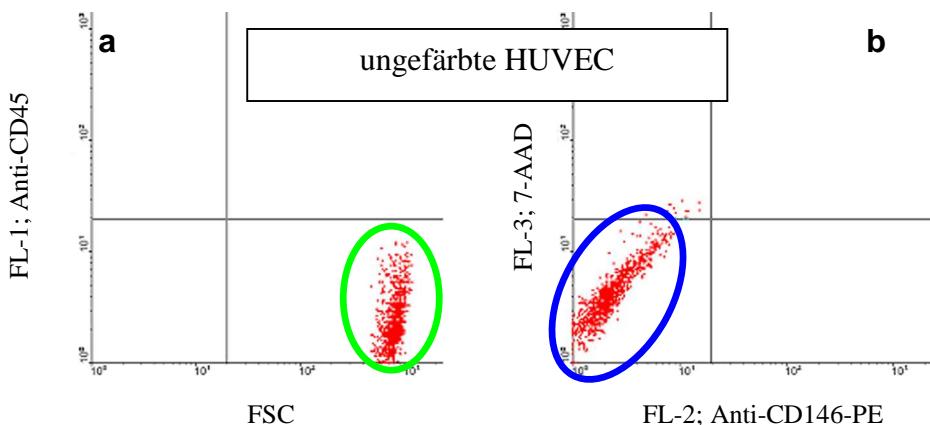


Abb. 4: Darstellung einer durchflusszytometrischen Messung von nativen HUVEC nach korrekter Einstellung der Photomultiplier und Kompensation der verschiedenen Fluoreszenzkanäle (a FL-1, b FL-2 und FL-3).

In der zweidimensionalen Darstellung der Zellgröße gegen die Fluoreszenzintensität im Fluoreszenzkanal 1 (FSC-FL-1, Abb. 4a), muss die Population der ungefärbten HUVEC klar umschrieben im rechten unteren Quadranten zu sehen sein (grün umrandet). Werden die vitalen ungefärbten Zellen in den Fluoreszenzkanälen 2 und 3 gezeigt (FL-2-FL-3, Abb. 4b), so müssen sie sich im linken unteren Quadranten befinden, der die Abwesenheit jeglicher Fluoreszenz bedeutet (blau umrandet).

Messdaten:

PBMC und HUVEC/CEC stellen sich im FACS unterschiedlich dar. Um beide Zellsorten korrekt zu zählen, wurden die Zellesuspensionen je einmal mit einem Protokoll für PBMC und einem für HUVEC gemessen. Für beide Protokolle wurden die Photomultiplier neu justiert und die Fluoreszenz-Kanäle erneut kompensiert. Es wurden durchschnittlich 200.000 Zellen aus einer Probe gezählt.

Die Daten der jeweiligen Protokolle für die Messungen der PBMC bzw. HUVEC sind dem Anhang zu entnehmen.

II. Methoden

Quantifizierung:

Die Bilanzierung der Ergebnisse erfolgte durch die Verwendung von sogenannten TruCOUNT-Tubes der Firma BD.

Die Probe wird in ein TruCOUNT-Röhrchen gegeben. Das Lyophilisat im Röhrchen wird gelöst und setzt eine bekannte Menge (variiert je nach Charge) fluoreszierender Partikel frei, die bei der FACS-Analyse als eigene „Population“ gemessen werden. Da die absolute Zahl der Partikel pro TruCOUNT-Röhrchen bekannt ist, kann die absolute Zellzahl in der Probe berechnet werden:

$$\text{Zellzahl (absolut)/}\mu\text{l} = \frac{\text{gemessene Zellen}}{\text{gemessene Partikel}} \times \text{Partikel (absolut)} \times \frac{1}{\text{Probenvolumen (}\mu\text{l)}}$$

Die fluoreszierenden Beads der TruCOUNT-Röhrchen sind in einer zweidimensionalen FACS-Darstellung leicht von den übrigen Zellen abzugrenzen.

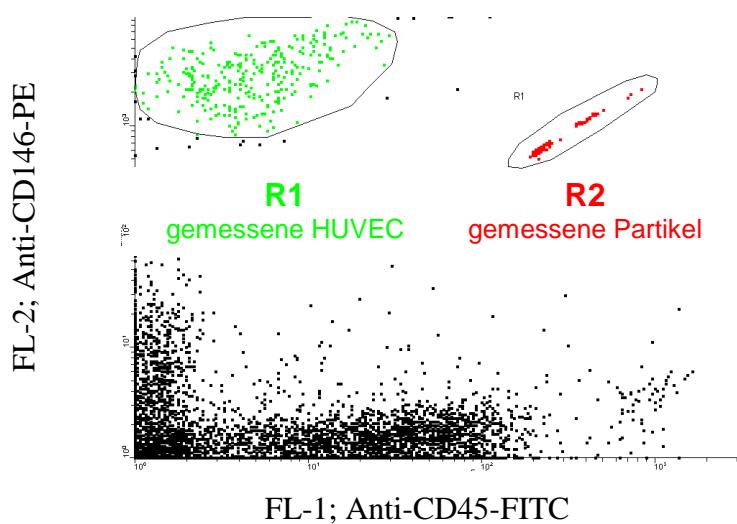


Abb. 5: Zweidimensionale Darstellung einer FACS-Analyse von HUVEC und TruCOUNT-Röhrchen.

Auswertung:

Die Messdaten wurden mit den Programmen Win MDI 2.8 (J. Trotter) und Cell Quest Pro 5.2 (BD Biosciences) aufbereitet (siehe Beispiel unter III.3.1).

II. Methoden

II.3.3 Ermittlung der optimalen Antikörperkonzentration

Um ein bestmögliches Färbeergebnis zu erhalten, ist es sinnvoll, die optimale Menge an Antikörpern für die Färbung in Vorversuchen zu ermitteln. Andernfalls ist nicht auszuschließen, dass falsch positive (unspezifisch angefärbte Zellen) bzw. falsch negative (ungenügend gefärbte Zellen) Ergebnisse resultieren.

Dazu wird der Farbstoff-konjugierte Antikörper in verschiedenen Konzentrationen (Verdünnungsreihe) zu einer konstant bleibenden Anzahl Testzellen gegeben. Vom Hersteller ist ein bestimmter Konzentrationsbereich als Anhaltspunkt vorgeschlagen. Dieser Bereich und jeweils eine Konzentration darüber und zwei darunter wurden ausgetestet. Die Stärke der Fluoreszenz wurde mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Aus der sich ergebenden Sättigungskurve wurde diejenige Antikörper-Konzentration gewählt, die gerade im Bereich der Sättigung liegt. Die ausgewählten Testzellen tragen das Epitop, die Kontrollzellen exprimieren das Epitop nicht, gegen das der Antikörper gerichtet ist. Dadurch wurde die Spezifität des Antikörpers überprüft.

Untersuchter Antikörper	Original-lösung [µl]	Zell-Suspension	Testzellen	Kontroll-zellen
Maus-Anti-HumanCD15-FITC	10	1×10^6 Zellen in 100 µl	PBMC	HUVEC
Maus-Anti-HumanCD45-PE	20	1×10^6 Zellen in 100 µl	PBMC	HUVEC
Maus-Anti-HumanCD146-PE	20	1×10^7 Zellen in 100 µl	HUVEC	PBMC
Ulex europaeus (UEA1)-Lektin-FITC	10	1×10^5 Zellen in 100 µl	HUVEC	PBMC

Tab. 6: **Optimale Menge der Antikörper:** Es ist das jeweils optimale Volumen der Originallösung des Antikörpers gezeigt, das zur "Antikörper-Färbung" eingesetzt werden soll.

II. Methoden

Bei Färbungen mit dem Endothelzellmarker UEA1-FITC fiel eine unerwarteterweise angefärbte Population innerhalb der PBMC auf.

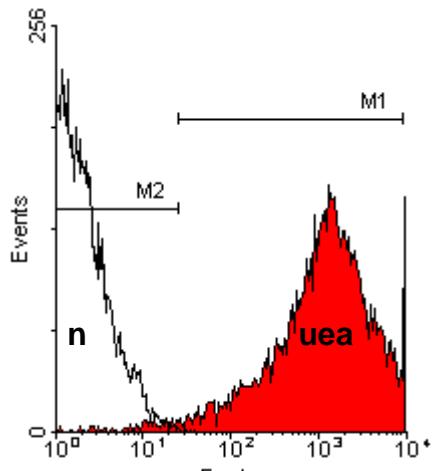


Abb. 6a Darstellung von HUVEC
nativ (**n**, weiße Fläche),
nach Behandlung (**uea**, rote Fläche)
mit UEA1-FITC

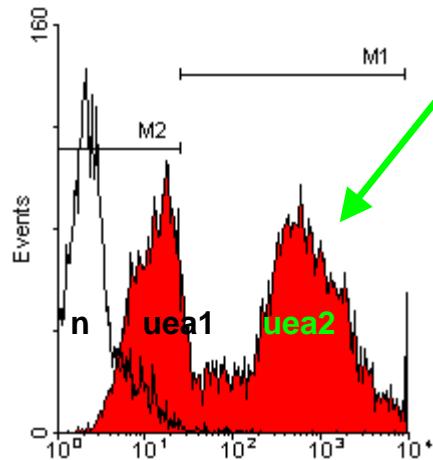


Abb. 6b: Darstellung von PBMC
nativ (**n**, weiße Fläche),
nach Behandlung (**uea**, rote Fläche)
mit UEA1-FITC
grüner Pfeil: unerwartete Population

Abb. 6a und b zeigen in eindimensionalen Darstellungen (Histogrammen) jeweils eine native, ungefärbte Zellpopulation (weiße Fläche) und eine Zellpopulation, die mit dem Lektin UEA1-FITC behandelt wurde (rote Fläche). Abb. 6a zeigt native und behandelte HUVEC, Abb. 6b zeigt native und behandelte PBMC. Die Zellpopulationen unter dem Marker M2 werden als negativ definiert. Der Marker M1 kennzeichnet den positiven Bereich: gemessene Fluoreszenz.

In Abb. 6a ist zu erkennen, dass native HUVEC nicht fluoreszieren (**n**, weiße Fläche unter M2) und nach Behandlung mit UEA-1-FITC fluoreszieren (**uea**, rote Fläche unter M1). UEA-1-FITC bindet also an HUVEC.

Da es sich bei UEA-1 um einen Endothelzellmarker handelt, sollten sowohl native als auch behandelte PMBC nicht fluoreszieren. Wie aus Abb. 6b hervorgeht, taucht neben der nativen, nicht fluoreszierenden (**n**, weiße Fläche unter M2) und der behandelten, aber nicht fluoreszierenden Population (**uea1**, rote Fläche unter M2) eine dritte Population auf (grüner Pfeil): behandelt und fluoreszierend (**uea2**, rote Fläche unter M1). Das spricht für eine unspezifische Anfärbung einer Population von PBMC durch UEA-1.

UEA-1-FITC eignet sich somit nicht zur alleinigen Definition von Endothelzellen und nicht zur Anfärbung von Endothelzellen im Vollblut.

II. Methoden

II.4 Methoden zur Isolierung von Endothelzellen aus Vollblut

Um vitale Endothelzellen aus Vollblut anzureichern/zu isolieren, wurden verschiedene Methoden verfolgt und optimiert.

Methode	Prinzip
II.4.1.1: Ammoniumchloridlyse	Erythrozytenlyse, Anreicherung von Leukozyten, Thrombozyten und Endothelzellen
II.4.1.2: BD FACS Lysing Solution	BD-FACS Lysing Solution (BD Biosciences Pharmingen), Erythrozytenlyse dito, Fixierung der angereicherten Zellen
II.4.1.3: Dichtegradientenzentrifugation	Ansammlung von Zellen gleicher Dichte in Schichten, Anreicherung von PBMC und Endothelzellen in der Interphase
II.4.2: Sortierung spezifischer Zelltypen mit paramagnetischen Partikeln	Bindung paramagnetischer Partikel über spezifische Antikörper an Oberflächenantigene der Zielzellen. Isolierung der Zellen im magnetischen Feld.
II.4.2.1: DynaBeads-System	DynaBeads Pan Mouse IgG (Dynal), superparamagnetische Polystyrolpartikel, $\varnothing 4,5 \pm 0,2 \mu\text{m}$, Beschichtung mit monoklonalem Human-Anti-Maus-Antikörper, Konzentration 4×10^8 Beads/ml
II.4.2.2: DynaBeads_{DNAlinked}	Collection Pan Mouse IgG (Dynal), Partikel wie oben, Verankerung der Antikörper über einen DNA-linker an den DynaBeads
II.4.2.3: BD-Partikel	BD Imag Anti-MausIgG1 Particles-DM (BD Biosciences Pharmingen), magnetische "Nanopartikel", $\varnothing 0,1\text{-}0,45 \mu\text{m}$, Beschichtung mit monoklonalem Antikörper gegen Maus-IgG1-Antikörper, Haplotyp Igh-C1a und Igh-Cb
II.4.2.4: MACS-System	Maus-Anti-HumanCD45- und Maus-Anti-PE-MicroBeads (Miltenyi Biotec) mit Antikörpern gegen HumanCD45 bzw. PE beschichtet, $\varnothing \sim 50\text{nm}$

Tab. 7: Prinzipien der Anreicherungs- und Isolierungsmethoden im Überblick.

II.4.1 Erythrozytenlyse und Dichtegradientenzentrifugation

Der rote Blutfarbstoff Hämoglobin weist als Porphyrin eine charakteristische Autofluoreszenz auf, die die durchflusszytometrische Messung der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe stört. Zudem wird vor jeder FACS-Messung die sogenannte Count-Zahl festgelegt (= Gesamtheit aller zu messenden Ereignisse, zum Beispiel $1,0 \times 10^6$ Zellen). Ein prozentual großer Anteil an Erythrozyten in der Probe sorgt für eine geringe Anzahl gezählter Endothelzellen und PMBC. Somit führen in der Probe belassene Erythrozyten letztlich zu einer Verfälschung der Ergebnisse hinsichtlich Wiederfindung und Reinheit. Eine vollständig Erythrozyten-freie Zellsuspension vor der FACS-Analyse ist wünschenswert. Die Erythrozytenlyse in der Vollblutprobe oder die Dichtegradientenzentrifugation stellen Optionen zur Endothelzell-Anreicherung und gleichzeitigen Entfernung der Erythrozyten dar.

II.4.1.1 Anreicherung von EC mit Ammoniumchloridlyse

Ammoniumchlorid als Lysereagenz verschafft den Vorteil, dass die gesuchten Endothelzellen nicht fixiert werden und infolgedessen immer noch die Möglichkeit der anschließenden Zellkultivierung besteht (Lysereagenz siehe V.4.3).

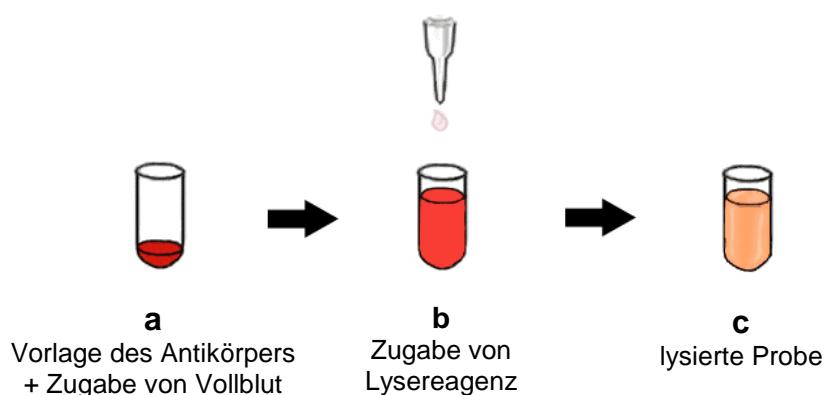


Abb. 7a-c: **Prinzip der Ammoniumchloridlyse:** a) Fluoreszenzmarkierung der Endothelzellen, b) Lyse der Erythrozyten durch Ammoniumchlorid, c) rötlich opaleszente lysierte Probe.

II. Methoden

Vorgehensweise zur Ammoniumchloridlyse:

- 20 µl Antikörper (Maus-Anti-HumanCD146-PE) vorlegen (Abb. 7a)
- 300 µl Vollblut zupipettieren, 15 Minuten bei 4 °C inkubieren (dunkel!)
- 4 ml Lysereagenz zugeben (Vortex!), 8 Minuten inkubieren (Raumtemperatur) (Abb. 7b)
- mit 8 ml PBS Lyse-Vorgang stoppen
- Zentrifuge: 10 Minuten, 350 x g, 4 °C, Überstand verwerfen, Zellpellet resuspendieren
- 4 ml Lysereagenz zugeben und Lyse wiederholen
- Zellpellet in 500 µl PBS-BSA aufnehmen, FACS-Analyse anschließen

II.4.1.2 Anreicherung von EC mit „BD FACS Lysing Solution“

Diese Erythrozytenlyse beruht auf dem gleichen Prinzip wie die Ammoniumchloridlyse, die Vorgehensweise ist ebenfalls identisch. Als Lysereagenz wird hier Ethylenglykol verwendet und der Zusatz von Formaldehyd dient der gleichzeitigen Fixierung der persistierenden Zellen.

II.4.1.3 Anreicherung von EC mit Dichtegradientenzentrifugation

Die Zentrifugation in speziellen Trennmedien bewirkt eine Ansammlung von Zellen gleicher Dichte in Schichten. Die gesuchten Endothelzellen sammeln sich zusammen mit den mononukleären Zellen (PBMC, peripheral blood mononuclear cells) an (Woywodt et al. 2006), während die restlichen Blutzellen davon getrennt werden.

Es wurden zwei verschiedene Systeme zur Dichtegradientenzentrifugation getestet.

Anreicherung von EC mit „Ficoll Paque Plus“ in Leukosep Separationsröhrenchen

Leukosep Separationsröhrenchen enthalten eine poröse Filterscheibe aus inertem Polyethylen, die eine Durchmischung von Probenmaterial und Trennmedium beim Befüllen verhindert. Das verwendete Medium „Ficoll Paque Plus“ hat eine Dichte von 1,077 g/ml (20 °C). Es wird hochtourig unter die Filterscheibe zentrifugiert. Das Probenmaterial wird auf die Filterscheibe gegeben. Durch Zentrifugation wird eine Vorselektion und Anreicherung der gesuchten Endothelzellen in der Interphase erhalten. Ihre Anzahl pro Volumeneinheit ist anschließend um ein

II. Methoden

Vielfaches größer (abhängig vom Resuspensionsvolumen der Interphase). Im Anschluss können weitere Methoden zur Isolierung durchgeführt werden, um sie von den PBMC zu trennen.

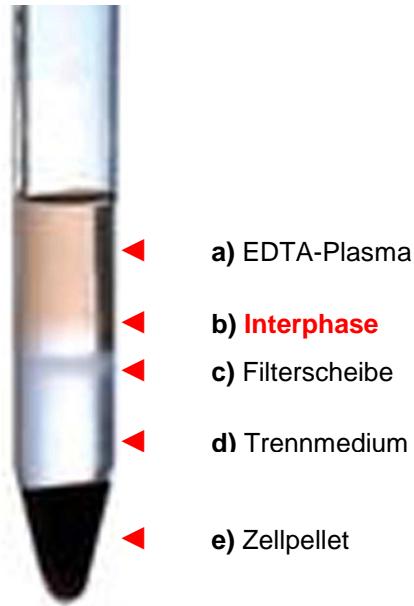


Abb. 8: **Leukosep Separationsröhren**, Darstellung der verschiedenen Schichten nach Zentrifugation von 8 ml EDTA-Vollblut mit „Ficoll Paque Plus“;
a) EDTA-Plasma mit Thrombozyten –
b) Interphase mit PBMC und Endothelzellen –
c) Polyethylen-Filterscheibe –
d) Trennmedium „Ficoll Paque Plus“ –
e) Zellpellet mit Erythrozyten, Granulozyten und Debris.

Vorgehensweise Ficoll-Isolierung:

- 15 ml Ficoll Paque Plus (Raumtemperatur!) in 50 ml-Leukosep-Röhrchen geben, Zentrifuge: 30 Sekunden, 1000 x g, Raumtemperatur → Medium unter dem Filter
- 20 ml Vollblut auf die Filterscheibe geben
Zentrifuge: 15 Minuten, 650 x g, Raumtemperatur (ohne Bremse!)
- Interphase in frisches Falconröhren überführen
- waschen: mit PBS, Zentrifuge: 10 Minuten, 290 x g, 4 °C, Überstand verwerfen
- Zellpellet in 10 ml PBS-BSA resuspendieren
- Bestimmung der Zellzahl mit CASY1 (siehe II.2)
- noch einmal waschen: mit PBS-EDTA, Überstand verwerfen
- sofort weitere Verarbeitung (z.B. Antikörper-Färbung, siehe II.3)

II. Methoden

Anreicherung von EC mit dem „Vacutainer CPT-System“

Das BD Vacutainer CPT-System ermöglicht sowohl Blutentnahme als auch Zentrifugation und Zellisolierung ohne Zwischenschritt. Dadurch bietet es den großen Vorteil, den Kontakt zu potentiell infektiösem Patientenmaterial möglichst gering zu halten. Die Dichte des Trennmediums beträgt auch hier 1,077 g/ml. Die zusätzlich zum Trennmedium enthaltene feste Gelschicht garantiert ein Abpipettieren der Zellen nach Zentrifugation ohne versehentliche Durchmischung. In den CPT-Röhrchen ist Natriumcitrat als Antikoagulanz enthalten.



- ◀ a) Citrat-Plasma
- ◀ b) PBMC + Endothelzellen
- ◀ c) Trennmedium
- ◀ d) Gelschicht
- ◀ e) Zellpellet

Abb. 9: CPT-Röhrchen mit Natriumcitrat, Darstellung der verschiedenen Schichten nach Zentrifugation von 8 ml Vollblut mit dem Vacutainer-System;
a) Citratplasma mit Thrombozyten –
b) „Wolke“ aus PBMC und Endothelzellen –
c) Trennmedium –
d) feste, wachsartige Gelschicht –
e) Zellpellet mit Erythrozyten, Granulozyten und Debris.

Vorgehensweise mit dem BD Vacutainer CPT-System:

- 6-8 ml Vollblut direkt in das CPT-Röhrchen entnehmen (laut Vorschrift des Herstellers)
- Zentrifuge: 20 Minuten, 1650 x g, Raumtemperatur (mit Bremse!)
- etwas Plasma abpipettieren, PBMC und EC in restlichem Plasma resuspendieren
- Zellsuspension in frisches Falconrörchen überführen
- waschen: mit PBS, Zentrifuge: 10 Minuten, 250 x g, Raumtemperatur
- Überstand verwerfen, Zellpellet resuspendieren
- sofort weitere Verarbeitung (z.B. „Antikörper-Färbung“, siehe II.3)

II. Methoden

Zum Vergleich der beiden Systeme wurden die isolierten Zellpopulationen untersucht und die Wiederfindung von Endothelzellen nach Auftrennung bestimmt. Beide Methoden wurden zum gleichen Zeitpunkt mit dem Vollblut derselben Probanden durchgeführt ($n = 2$). Es wurde jeweils das gleiche Volumen Vollblut eingesetzt und je 1×10^6 HUVEC-CD146-PE zugespikt. Die Auftrennung erfolgte nach obigen Protokollen mit anschließenden FACS-Analysen. Die Ergebnisse zeigten, es werden die gleichen Zellpopulationen mit beiden Systemen angereichert (CD45-positive PBMC und CD146-positive EC). Mit einer Wiederfindungsrate der Endothelzellen von $109 \pm 3\%$ bei der Auftrennung mit Ficoll und $111 \pm 17\%$ mit den CPT-Röhrchen war kein Verlust durch die Zentrifugation zu verzeichnen.

II.4.2 Zellsortierung mit magnetischen Partikeln

Das Prinzip der Zellsortierung mit magnetischen Partikeln beruht auf der Markierung der Zellen mit Antikörpern, an die paramagnetische Partikel (Beads: DynaBeads, MicroBeads, o.ä.) gekoppelt sind. Die Separation des Zellgemisches aus markierten und unmarkierten Zellen geht in einem magnetischen Feld vonstatten. Diejenigen Zellen, die mit den Beads-gekoppelten Antikörpern besetzt sind, werden im magnetischen Feld zurückgehalten, wohingegen die unmarkierten Zellen entfernt werden. So lassen sich über spezifische Antikörper definierte Zelltypen aus Mischpopulationen isolieren und anreichern. Für die Zellsolierung mit paramagnetischen Beads stehen unterschiedliche Systeme zur Verfügung.

II.4.2.1 Isolierung von EC mit „DynaBeads Pan Mouse IgG“

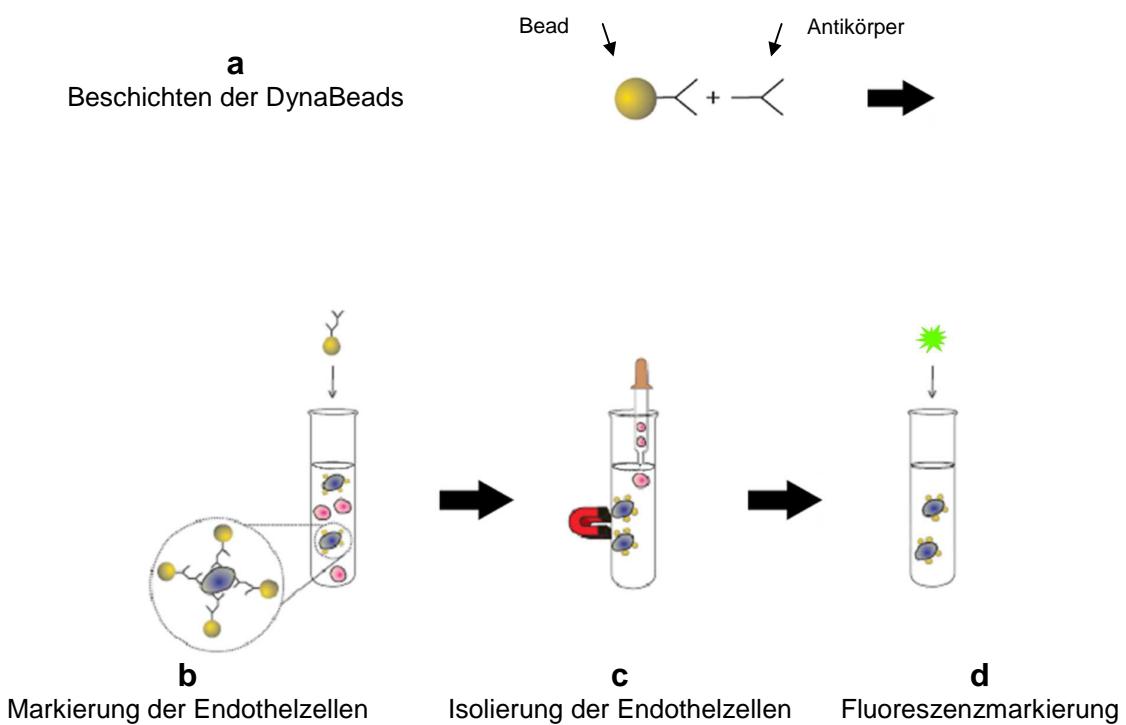


Abb. 10a-d: **Prinzip der Isolierung mit DynaBeads:** a) Beschichtung mit monoklonalem Maus-Anti-HumanCD146, b) DynaBeads binden über den Antikörper an CD146 der gesuchten Endothelzellen, c) Im magnetischen Feld bleiben die DynaBeads-markierten Endothelzellen an der Röhrchenwand haften, die übrigen Zellen werden entfernt, d) Fluoreszenz-Markierung der isolierten Endothelzellen mit UEA-1-FITC.

II. Methoden

Vorgehensweise zur Beschichtung der DynaBeads mit Antikörpern (Abb. 10a):

- 350 µl resuspendierte **DynaBeads** in ein 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß geben waschen:
 - Reaktionsgefäß 1 Minute in MCP-Magneten stellen, Überstand verwerfen,
 - aus Magnet herausnehmen, mit 1 ml PBS-BSA-A resuspendieren
- Antikörper-Beschichtung:
- 1 Minute MCP-Magnet, Überstand verwerfen,
 - aus Magnet herausnehmen, mit 950 µl PBS-BSA-A resuspendieren,
 - Zugabe von 400 µl **Maus-Anti-HumanCD146-Antikörper** (unkonjugiert),
 - über Kopf mischen (Head-over-Head-Schüttler) 2 Stunden, 4 °C
- waschen: 3 x, wie oben
- DynaBeads in 1 ml PBS-BSA-A resuspendieren und bei 4 °C lagern (Ansatz von 1 ml ausreichend für 20 Isolierungsvorgänge).

Vorgehensweise zur Endothelzell-Isolierung mit DynaBeads (Abb. 10b und c):

- 1 ml PBS-BSA-AZ in ein 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettieren
 - Zugabe von 1 ml **EDTA-Vollblut**, mischen
 - Zugabe von 20 µl **Oktagam** und 50 µl **DynaBeads** (beschichtet)
 - über Kopf mischen (Head-over-Head-Schüttler) 30 Minuten, 4 °C
- waschen: 3 x, wie oben
- markierte Zellen in 200 µl PBS-BSA-AZ resuspendieren, (Lagerung bei 4 °C möglich)

Vorgehensweise zur UEA-1-FITC-Markierung der isolierten Endothelzellen (Abb. 10d):

- 1 Minute MCP-Magnet, Überstand verwerfen,
 - Zugabe von 100 µl **UEA-1-FITC** (1:10 mit PBS-AZ verdünnt), resuspendieren,
 - über Kopf mischen (Head-over-Head-Schüttler) 1 Stunde, 4 °C (dunkel!)
- waschen: 3 x, wie oben
- markierte Zellen in 200 µl PBS-BSA-AZ resuspendieren

Analyse und Quantifizierung der isolierten Endothelzellen:

Da die DynaBeads mit $4,5 \pm 0,2 \mu\text{m}$ im Durchmesser zu groß für die Kapillaren des Durchfluszytometers sind, erfolgt die Auswertung in der Nageotte-Zählkammer unter dem Fluoreszenzmikroskop. Dies wird durch die Fluoreszenz-Markierung der Endothelzellen mit UEA-1-FITC ermöglicht.

II. Methoden

Für diese Arbeit wurde das Fluoreszenzmikroskop Leica DMRE der Firma Leica Mikroskopie und Systeme GmbH (Wetzlar, Deutschland) in gekühltem Zustand verwendet.

Die Einstellungen des Mikroskops sind im Einzelnen im Anhang verzeichnet.

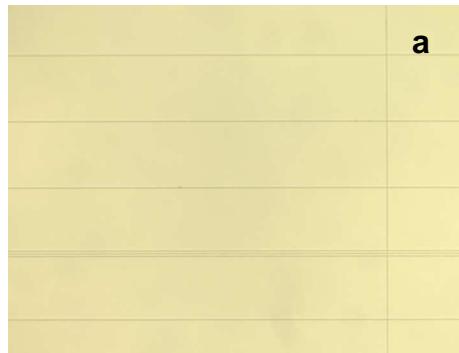
Nageotte-Zählkammer:

Verdünnung der isolierten Zellen 1:4 mit PBS-BSA-AZ (30 µl Zellsuspension + 90 µl Puffer).

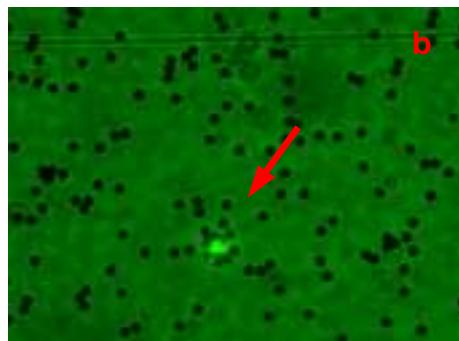
Beschickung der Nageotte- Zählkammer mit 100 µl der Verdünnung.

Definition positiver Zellen: deutlich fluoreszierende Zellen mit mindestens vier gebundenen DynaBeads (unter dem Fluoreszenzlicht) und zugleich intakte Zellen (unter dem Auflicht).

Es wurden alle positiven Zellen in der vorgegebenen Kammer gezählt (siehe Abb. 11 a und b).



*Abb. 11a: Nageotte-Zählkammer, unbeschickt,
10 x Objektiv, Auflicht;
Beschickungsvolumen 100 µl, Kamervolumen 50µl, 2 x 20
Rechtecke, Kennzeichnung der Rechtecksgrenzen durch
Einfachlinien und der Kammerhälften durch eine Doppellinie.*



*Abb. 11b: Nageotte-Zählkammer, beschickt
mit HUVEC nach Isolierung mittels DynaBeads und
UEA-1-FITC-Färbung; 40 x Objektiv, Fluoreszenzlicht;
deutliche Fluoreszenz und Beladung mit mindestens vier
DynaBeads definieren positive Zellen (Pfeil).*

Die Gesamzellzahl GZ an Endothelzellen pro ml Vollblut wurde wie folgt berechnet:

$$GZ = \frac{\text{Zellzahl in der Zählkammer}}{\text{Kamervolumen}} \times \text{Volumen der Zellsuspension} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

II. Methoden

Folgt man dem oben beschriebenen Isolierungsprotokoll (II.4.2.1) so entspricht bei einem Kamervolumen von 50 µl, einem Volumen der Zellsuspension von 200 µl sowie einem Verdünnungsfaktor von 4 die Gesamtzahl GZ der isolierten Endothelzellen pro ml Vollblut dem 16fachen der Zellzahl in der Zählkammer:

$$GZ = \frac{\text{Zellzahl in der Zählkammer}}{50 \mu\text{l}} \times 200 \mu\text{l} \times 4 = \text{Zellzahl in der Zählkammer} \times 16.$$

II.4.2.2 Isolierung von EC mit „Collection Pan Mouse IgG Kit“

Das Prinzip dieser Isolierungsmethode entspricht dem unter II.4.2.1 beschriebenen. Der DNA-linker zwischen Bead und Antikörper (Abb. 12a) ermöglicht im Anschluss an die Isolierung der Endothelzellen die Abtrennung der DynaBeads_{DNAlinked} durch einen DNase-Verdau.

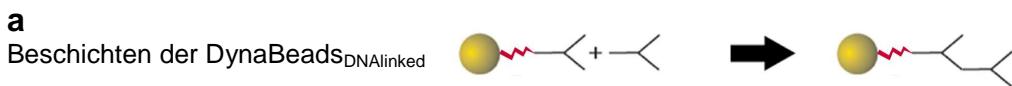


Abb. 12a: **Beschichtung DynaBeads_{DNAlinked} mit monoklonalem Maus-Anti-HumanCD146**

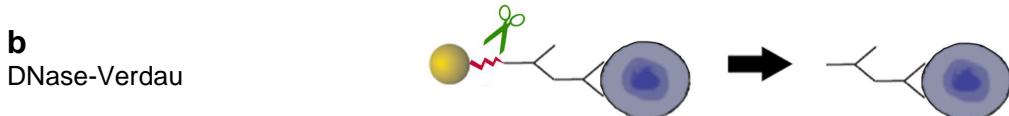


Abb. 12b: **Der enzymatische Abbau des DNA-linkers durch DNase bewirkt die Ablösung der DynaBeads_{DNAlinked} von den isolierten Endothelzellen.**

Vorgehensweise zur Beschichtung der DynaBeads_{DNAlinked} (Abb. 12a): (wie unter II.4.2.1)

- 250 µl **DynaBeads_{DNAlinked}** einsetzen
- waschen mit PBS-BSA
- 280 µl **Maus-Anti-CD146-Antikörper** (unkonjugiert) einsetzen
- Head-over-Head-Schüttler: 30 Minuten, Raumtemperatur
- zuletzt in 250 µl PBS-BSA resuspendieren

II. Methoden

Vorgehensweise zur Isolierung der Endothelzellen mit DynaBeads_{DNAlinked} (Abb. 10b/c, S. 26):

- 1 ml **EDTA-Vollblut** in ein 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß (A) pipettieren
Zugabe von 25 µl **DynaBeads_{DNAlinked}** (beschichtet)
über Kopf mischen (Head-over-Head-Schüttler) 15 Minuten bei 4 °C
- waschen: 1 Minute MCP-Magnet, Überstand verwerfen
aus Magnet herausnehmen, mit 500 µl RPMI-FKS resuspendieren
- auf und ab pipettieren und in ein frisches 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß (B)
überführen (Entfernung adhärenter Monozyten!),
Reaktionsgefäß (A) mit weiteren 500 µl RPMI-FKS spülen und in (B) überführen
- waschen: 3 x, wie oben, letztlich in 600 µl RPMI-FKS resuspendieren

Vorgehensweise zur Abtrennung der DynaBeads_{DNAlinked} (Abb. 12b, S. 29):

- 10 µl der isolierten Endothelzellen in Reaktionsgefäß (C) überführen,
Zugabe von 100 µl vorgewärmttem RPMI-FKS (37 °C!),
Zugabe von 4 µl **DNase** (erst direkt vor Gebrauch auftauen!),
auf Schüttler (geringste Stufe) 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- vom Schüttler nehmen, 8 x auf und ab pipettieren
- waschen: 1 Minute MCP-Magnet,
200 RPMI-FKS **10 %** in 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß (D) vorlegen
Überstand aus (C) in dieses Gefäß (D) überführen
- Reaktionsgefäß aus Magnet nehmen, Zugabe von 200 µl RPMI-FKS,
5 x auf und ab pipettieren
- 1 Minute MCP-Magnet, Überstand ebenfalls in Reaktionsgefäß (D) überführen

Vorgehensweise zur UEA-1-FITC-Markierung der isolierten EC (Abb. 10d, S. 26):

- Zentrifuge: 10 Minuten, 290 x g, 4 °C
- 500 µl Überstand verwerfen, restliche 100 µl resuspendieren
- Zugabe von 10 µl **UEA-1-FITC**
- über Kopf mischen (Head-over-Head-Schüttler) 1 Stunde bei 4 °C (dunkel!)
- Zugabe von 1,6 ml RPMI-FKS
- Zentrifuge: 10 Minuten, 290 x g, 4 °C, Überstand verwerfen
- in 200 µl RPMI-FKS resuspendieren

Die Auswertung kann mittels Durchflusszytometer erfolgen, da keine störenden Beads mehr in der Probe enthalten sind.

II.4.2.3 Isolierung von EC mit „BD Imag Anti-MausIgG1 Particles-DM“

Die Isolierung mit den BD-Partikeln kann im Gegensatz zu der DynaBeads-Methode nicht aus Vollblut erfolgen. Mithilfe einer Dichtegradientenzentrifugation (siehe II.4.1.3) werden Erythrozyten und Granulozyten entfernt und gleichzeitig die verbleibenden Zellen angereichert.

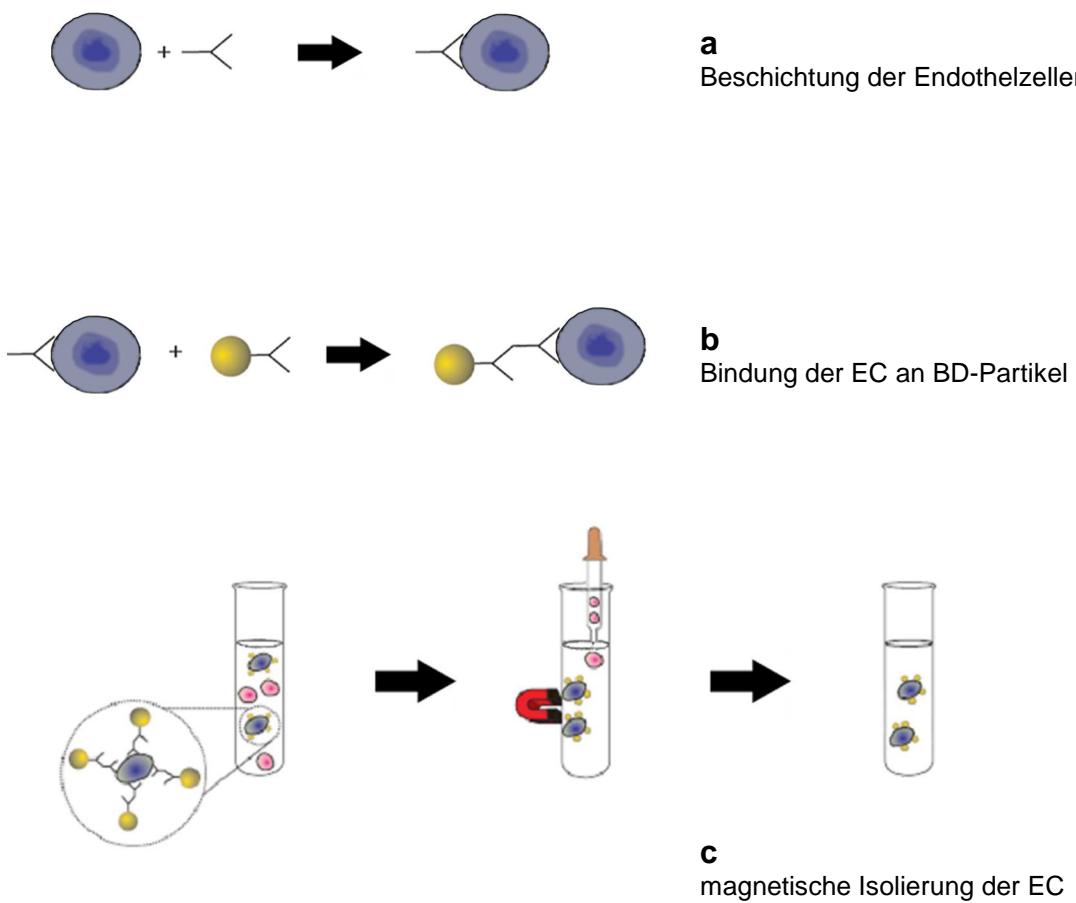


Abb. 13a-c: Prinzip der Isolierung mit BD-Partikeln: a) Zuerst erfolgt die Beladung der Endothelzellen mit Anti-HumanCD146-PE (beachte: beim DynaBeads-System werden die Beads mit Antikörper versehen!). Dieser Antikörper muss von der Maus stammen mit einem bestimmten Haplotypen (siehe Tab. 7, S. 20). b) Die Antikörper-beladenen Endothelzellen binden an die BD-Partikel c) Im magnetischen Feld bleiben die BD-Partikel-markierten Endothelzellen an der Röhrchenwand hängen, die restlichen Zellen werden entfernt.

II. Methoden

Vorbereitende Maßnahmen:

- Cell-Staining Buffer und BD Imag Buffer ansetzen, auf Eis stellen (siehe VI.4.3)
- 45 ml **EDTA-Vollblut**: Dichtegradientenzentrifugation (siehe II.4.1.3),
Interphase-Zellen filtern (70 µm-Filter), Zellzahlbestimmung (CASY1, siehe II.2),
Zellsuspension mit 2×10^7 Zellen/ml in Cell-Staining Buffer herstellen

Vorgehensweise zur Positiv-Selektion der Endothelzellen mit BD-Partikeln:

- 500 µl Zellsuspension mit **Maus-Anti-HumanCD146-PE** färben (siehe II.3.1)
- waschen: mit BD Imag Buffer auf 3,5 ml auffüllen,
Zentrifuge: 10 Minuten, 290 x g, 4 °C, Überstand verwerfen (trocken!)
- Zugabe von 50 µl **BD-Partikel**, sorgfältig mischen,
30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren (dunkel!)
- Positiv-Selektion:
Zugabe von 450 µl BD Imag Buffer, 8 Minuten BD-Imagnet, Überstand verwerfen
- waschen: Röhrchen aus Magnet entfernen
Zugabe von 450 µl BD Imag Buffer, durch pipettieren resuspendieren,
4 Minuten BD-Imagnet, Überstand verwerfen
- waschen 1 x wiederholen, Zellpellet in 600 µl resuspendieren,
FACS-Analyse anschließen

II. Methoden

II.4.2.4 Zellsortierung mit dem „MACS-System“

Das MACS-System besteht aus MACS-Separator, Trennsäule, MicroBeads und spezifischen Antikörpern gegen entsprechende Oberflächenstrukturen der Zielzellen. Die einzelnen Bestandteile werden je nach Fragestellung aufeinander abgestimmt. Bei der Auswahl der Säulen ist die Art der Auftrennung und die Größe der Zielzellpopulation ausschlaggebend.

Ein Epitop der Zielzellen dient als Zielstruktur für die Antikörper-beschichteten MicroBeads. Antikörper-beschichtete Zellen werden mit den entsprechenden MicroBeads beladen (sogenanntes Labeln der Zellen). Bei der darauf folgenden Wanderung der Zellen durch die Trennsäule im magnetischen Feld bleiben die MicroBeads-markierten Zellen haften, die nicht-markierten Zellen durchlaufen die Säule. Die markierten Zellen müssen außerhalb des Magnetfeldes eluiert werden.

Es stehen zwei grundlegende Optionen zur Wahl: Depletion (= Entfernung) störender Zellpopulationen oder Positiv-Selektion (= Extraktion) gesuchter Zellen.

Auch den Separationsmethoden mit dem MACS-System wurde jeweils eine Dichtegradientenzentrifugation zur Anreicherung und Vor-Isolierung vorangestellt. Suspensionen der Interphase-Zellen wurden als Proben für die Depletion der CD45-positiven Blutzellen bzw. Positiv-Selektion der CD146-positiven Endothelzellen eingesetzt.

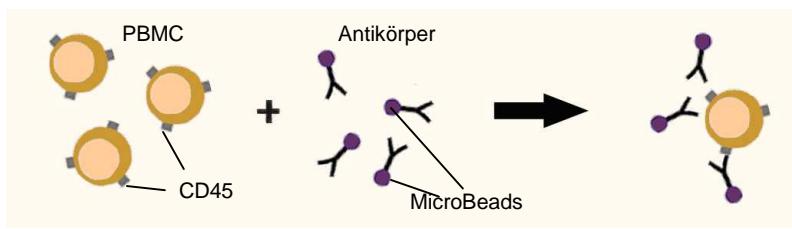
II.4.2.4.1 Einschub: „FcR-Blockierung“

Einige körpereigene Zellen (z.B. Monozyten, Makrophagen) exprimieren Oberflächenmoleküle, die in ihrer Funktion als sogenannte Fc-Rezeptoren den konstanten Abschnitt von Antikörpern (Fc-Abschnitt, fragment crystallizable) binden. Bei Zellmarkierungen mittels Antikörper kann diese Eigenschaft durch unspezifische Bindungen falsch positive Ergebnisse verursachen. Um diesen Störfaktor zu minimieren, werden die Fc-Rezeptoren der betreffenden Zellen blockiert: Der sogenannte Fc-Rezeptor-Blocker (FcR-Blocker) besteht aus polyklonalen IgG-Molekülen, die aus humanem Poolserum gewonnen werden. Bringt man die Zellen damit in Kontakt, besetzen die IgG-Antikörper alle Fc-Rezeptoren.

Um die Spezifität der Zellseparation mit dem MACS-System zu steigern, wurde sowohl bei der Depletion als auch der Positiv-Selektion mit einem Fc-Rezeptor-Blocker gearbeitet.

II. Methoden

II.4.2.4.2 Depletion von PBMC mit dem „MACS-System“



a
Bindung der
Anti-CD45-
MicroBeads an
die PMBC

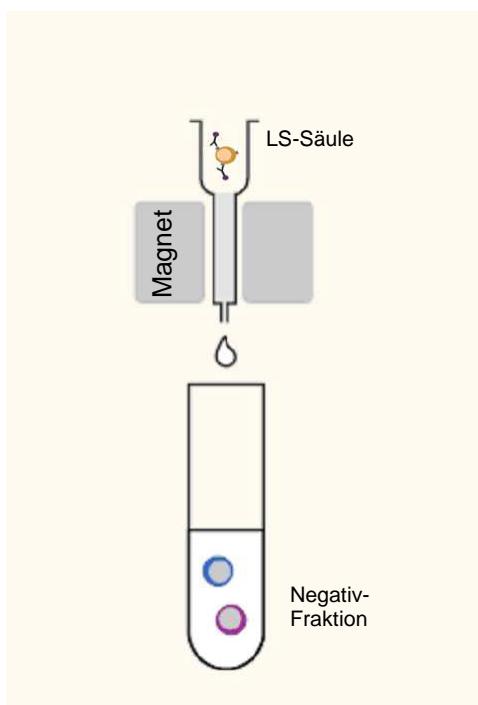


Abb. 14a und b: Depletion der PBMC mit dem MACS-System:

- PBMC tragen das Oberflächenmerkmal CD45. Anti-CD45-MicroBeads binden direkt an PBMC.
- Die Zellsuspension durchläuft eine LS-Säule, welche in einem magnetischen Feld in den MACS-Separator eingespannt ist. Die PBMC werden in der Säule zurückgehalten, die nicht-markierten Endothelzellen passieren ungehindert und werden aufgefangen.
(Durchlauf = Negativ-Fraktion)

b
magnetische Depletion der PBMC

Vorbereitende Maßnahmen:

- Puffer für Säulen herstellen: PBS-EDTA entgasen¹, BSA zusetzen, auf Eis stellen
- Zellsuspension präparieren:
15 ml EDTA-Vollblut: Dichtegradientenzentrifugation (siehe II.1.4)
Zellzahlbestimmung der Interphase-Zellen (CASY1, siehe II.2),

¹ Nur entgasten Puffer auf die Säulen auftragen: kleinste Gasblaschen führen zur Funktionsuntüchtigkeit der Säule.

II. Methoden

Vorgehensweise zur Depletion von PBMC:

- Zellen der Interphase FcR-blockieren und mit Maus-Anti-HumanCD146-PE färben

je 10^7 Zellen: 80 µl PBS-EDTA-BSA
+ 20 µl **Fc-Blocking-Reagenz**
+ 20 µl **Maus-Anti-HumanCD146-PE**

15 Minuten bei 4 °C inkubieren (dunkel!), 1 x mit PBS-EDTA-BSA waschen

- Labeln mit MicroBeads

je 10^7 Zellen: 80 µl PBS-EDTA-BSA
+ 20 µl **Anti-CD45-MicroBeads**

15 Minuten bei 4 °C inkubieren (dunkel!), 1 x mit PBS-EDTA-BSA waschen

- Depletion der PBMC mit 2 LS-Säulen¹

je 10^8 Zellen: 500 µl PBS-EDTA-BSA (entgast!)

- MACS-Separator mit großer Halterung, 2 LS-Säulen, 30 µm-Pre-Separationsfilter
- Filter und 1. LS-Säule mit 3 ml entgastem PBS-EDTA-BSA spülen² (wichtig!)
- **Negativ-Fraktion1:** 500 µl Probe auf Filter auftragen, Durchlauf auffangen,
warten bis Säule „steht“ (kein Tropfen mehr),
3 x 3 ml PBS-EDTA-BSA zum Spülen auftragen, auffangen
- Filter und 1. LS-Säule verwerfen, 2. LS-Säule mit entgastem Puffer spülen (wichtig!)
- **Negativ-Fraktion2:** 9,5 ml Durchlauf auf 2. LS-Säule auftragen, Durchlauf auffangen
- FACS-Analyse anschließen (Negativ-Fraktion2 enthält gesuchte Endothelzellen).

¹ Die nachgeschaltete zweite Säule soll die Reinheit der separierten Endothelzellen erhöhen.

² Das Anfeuchten von Filtern und Säulen ist vor Auftragen der Zellsuspension notwendig, um eine ungestörte Passage zu gewährleisten. Die Säuleninnenseiten sind zudem mit einer hydrophilen Hülle überzogen, die vor Benutzung ausgewaschen werden muss.

II. Methoden

II.4.2.4.3 Positiv-Selektion von EC mit dem „MACS-System“

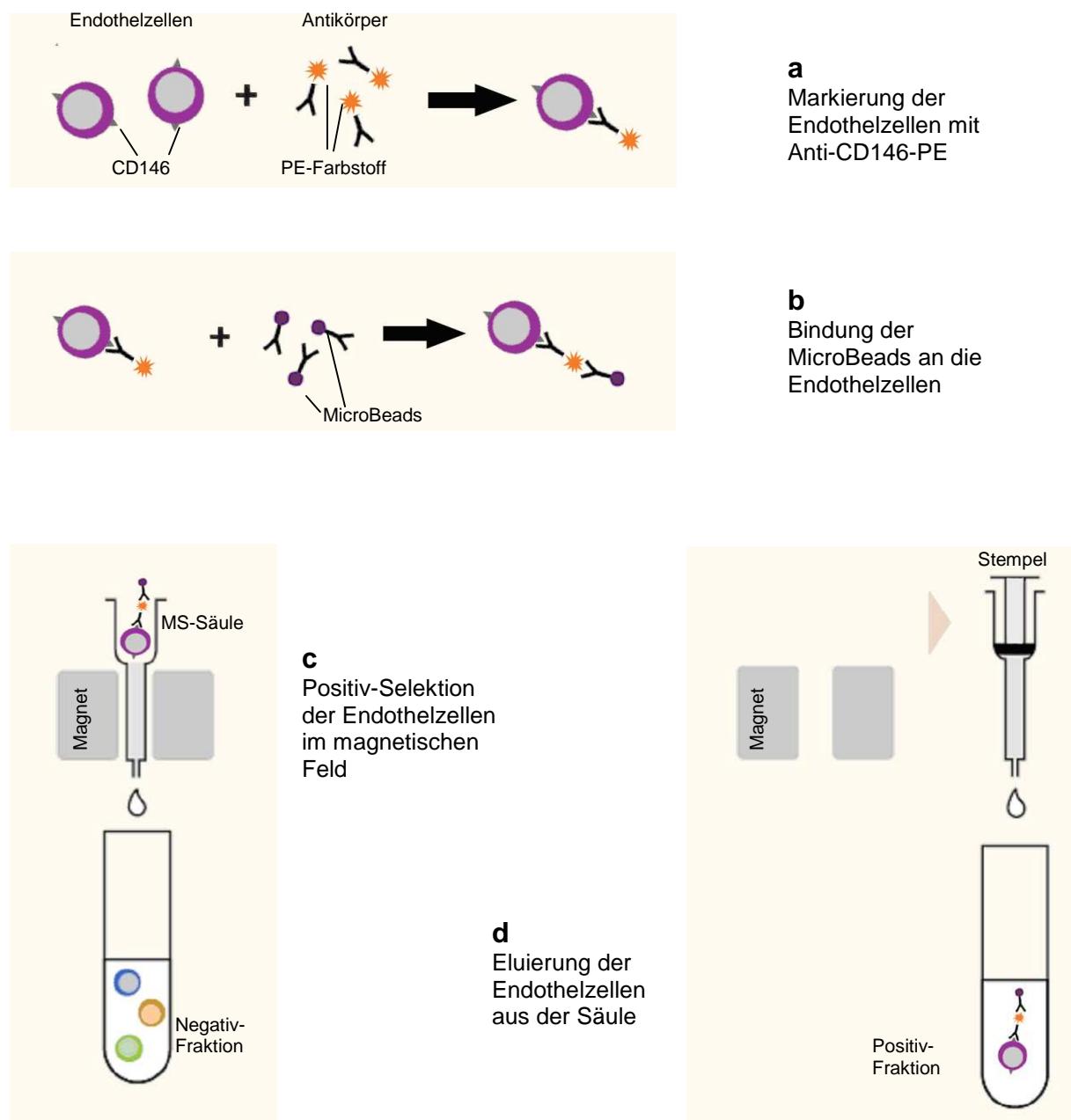


Abb. 15a-d: **Positiv-Selektion der Endothelzellen mit dem MACS-System:** a) Die Endothelzellen werden mit Maus-Anti-HumanCD146-PE markiert. b) Anti-PE-MicroBeads binden indirekt über die Antikörper an die Zielzellen. c) Die Zellsuspension durchläuft eine MS-Säule (geeignet für Positiv-Selektionen besonders kleiner Zellpopulationen), welche in einem magnetischen Feld in den MACS-Separator eingespannt ist. Die Endothelzellen werden in der Säule zurückgehalten, die nicht-markierten Zellen passieren ungehindert (Durchlauf = Negativ-Fraktion). d) Die selektierten Endothelzellen werden außerhalb des magnetischen Feldes mit Puffer aus der Säule gewaschen (Eluat = Positiv-Fraktion).

II. Methoden

Vorbereitende Maßnahmen:

Exakt wie zur Depletion (siehe II.4.2.4.2)

Vorgehensweise zur Positiv-Selektion von Endothelzellen:

- Zellen der Interphase FcR-blockieren und mit Maus-Anti-HumanCD146-PE färben

je 10^7 Zellen: 80 µl PBS-EDTA-BSA
+ 20 µl **Fc-Blocking-Reagenz**
+ 20 µl **Maus-Anti-HumanCD146-PE**

15 Minuten bei 4 °C inkubieren (dunkel!), 1 x mit PBS-EDTA-BSA waschen

- Labeln mit MicroBeads

je 10^7 Zellen: 80 µl PBS-EDTA-BSA
+ 20 µl **Anti-PE-MicroBeads**

15 Minuten bei 4 °C inkubieren (dunkel!), 1 x mit PBS-EDTA-BSA waschen

- Isolierung der Endothelzellen mit 2 MS-Säulen¹

je 10^8 Zellen: 500 µl PBS-EDTA-BSA (entgast!)

- MACS-Separator mit kleiner Halterung, 2 MS-Säulen, 30 µm-Pre-Separationsfilter
- Filter und 1. MS-Säule mit 500 µl entgastem PBS-EDTA-BSA spülen² (wichtig!)
- **Negativ-Fraktion1:** 500 µl Probe auf Filter auftragen, Durchlauf verwerfen,
warten bis Säule „steht“ (kein Tropfen mehr),
3 x 500 µl PBS-EDTA-BSA zum Spülen auftragen
- Filter verwerfen

¹ Die nachgeschaltete zweite Säule soll die Reinheit der separierten Endothelzellen erhöhen.

² Das Anfeuchten von Filtern und Säulen ist vor Auftragen der Zellsuspension notwendig, um eine ungestörte Passage zu gewährleisten. Die Säuleninnenseiten sind zudem mit einer hydrophilen Hülle überzogen, die vor Benutzung ausgewaschen werden muss.

II. Methoden

- **Positiv-Fraktion1:** 1. MS-Säule aus Halterung und Magnetfeld nehmen (wichtig!),
1 ml PBS-EDTA-BSA zum Eluieren auf 1. MS-Säule geben,
mit Stempel gesamten Puffer durch drücken, Eluat auffangen
- 1. MS-Säule verwerfen, 2. MS-Säule mit entgastem Puffer spülen (wichtig!)
- **Negativ-Fraktion2:** 1 ml Eluat auf 2. MS-Säule auftragen, Durchlauf verwerfen,
weiteres Vorgehen wie bei 1. MS-Säule
- **Positiv-Fraktion2:** Vorgehen wie bei 1. MS-Säule, Eluat auffangen
- FACS-Analyse anschließen (Positiv-Fraktion2 enthält gesuchte Endothelzellen).

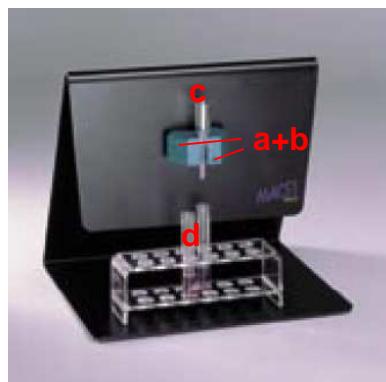


Abb. 16: **MACS-Separator:**
a+b) der Magnet dient zugleich als
kleine Halterung
c) MS-Säule
d) Polyethylenröhrchen

Die Methode der Positiv-Selektion (MACS-System, Miltenyi) der Endothelzellen aus einer gemischten Zellsuspension von Interphase-Zellen zeigte die besten Werte bezüglich Ausbeute und Reinheit (siehe Ergebnisse III.1.2.4.2). Sie wurde anschließend zur Isolierung von zirkulierenden Endothelzellen aus peripherem Blut von herzchirurgischen Patienten verwendet.

II. Methoden

Rekrutierung von Patienten der Herz-Thorax-Chirurgie:

Die Blutentnahmen von Patienten, die sich an der Klinik für Herz-, Thorax- und herznahe Gefäßchirurgie der Universität Regensburg einer Herzoperation unterziehen mussten, erfolgte jeweils sechs Stunden post-operativ, da zu diesem Zeitpunkt die größte Anzahl zirkulierender Endothelzellen in peripherem Blut gefunden wurde (Schmid et al. 2006). Die Patienten wurden entsprechend eines Ethikvotums (eingereicht durch Prof. G. Eissner, Innere Med I) aufgeklärt. Bei liegendem arteriellen Katheter (radial/femoral) wurden 20 ml arterielles Vollblut in EDTA-Monovetten entnommen; andernfalls wurde auf 20 ml venöses Vollblut zurückgegriffen (ZVK). Zur Vermeidung einer Aktivierung von Granulozyten/ Thrombozyten wurden die Blutentnahmen möglichst schonend durchgeführt und eine Ruhezeit der Blutröhrchen von 15 Minuten vor der weiteren Verarbeitung eingehalten.

Im Rahmen von Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe (Schmid et al. 2006) wurden bereits Blutentnahmen wie beschrieben durchgeführt. Es konnten CEC erfolgreich daraus isoliert werden. Die etablierte Methode mit dem „DynaBeads Pan Mouse IgG“ (Dynal) diente uns als Referenzmethode. Folgende sieben Patienten der Herz-Thorax-Chirurgie des Klinikums der Universität Regensburg wurden für die Versuchsreihe der Positiv-Selektion („MACS-System“, Miltenyi) von CEC aus Vollblut eingeschlossen:

Patient 1	Geschlecht ♀	Alter 76 Jahre
Risikofaktoren	Adipositas ¹ (BMI = 28), Diabetes mellitus II, Hypercholesterinämie, Z. n. Myokardinfarkt	
Grunderkrankung	Koronare 3-Gefäßerkrankung, Aneurysma des linken Ventrikels, Herzinsuffizienz, Ventrikuläre Tachyarrhythmie	
Operation	Aortokoronarer Venenbypass, Aneurysmektomie linker Ventrikel (nach Dor)	
Bypass-Zeit [min]	145	
Besonderheiten	Diabetische Nephropathie mit terminaler Niereninsuffizienz und Dialysepflicht (3 x/Woche), pAVK, Carotis interna-Stenose	

Patient 2	Geschlecht ♀	Alter 35 Jahre
Risikofaktoren	Positive Familienanamnese ²	
Grunderkrankung	Kombinierte Aortenklappenstenose und –insuffizienz (postinfektiös) Ektasie der Aorta ascendens	
Operation	Ross-Operation (Homograft) Aorta ascendens-Rekonstruktionsplastik	
Bypass-Zeit [min]	148	

¹ Adipositas: BMI ≥25

² Positive Familienanamnese: Verwandte ersten Grades mit Herz-/Gefäßerkrankungen

II. Methoden

Patient 3	Geschlecht ♀	Alter 79 Jahre
Risikofaktoren	Adipositas ¹ (BMI = 32), Diabetes mellitus II, Hyperlipidämie, Hypertonie, Z. n. Hinterwandinfarkt, positive Familienanamnese ²	
Grunderkrankung	Aortenklappenstenose, koronare 3-Gefäßerkrankung, absolute Arrhythmie bei Vorhofflimmern	
Operation	Biologischer Aortenklappenersatz, Carotis-TEA mit Patch-Plastik	
Bypass-Zeit [min]	88	
Besonderheiten	Marcumar-Medikation, chronische Niereninsuffizienz II, Varicosis, Z. n. Thrombendarteriektomie A. carotis interna links Z. n. aortokoronarer Bypass-Operation	

Patient 4	Geschlecht ♂	Alter 66 Jahre
Risikofaktoren	Adipositas ¹ (BMI = 40), Diabetes mellitus II, Hyperlipidämie, Hypertonie, Z. n. Myokardinfarkt	
Grunderkrankung	Koronare 3-Gefäßerkrankung	
Operation	Aortokoronarer Venenbypass	
Bypass-Zeit [min]	0 (OPCAB-Technik)	

Patient 5	Geschlecht ♂	Alter 68 Jahre
Risikofaktoren	Adipositas ¹ (BMI = 29), Hyperlipidämie, Hypertonie, positive Familienanamnese ²	
Grunderkrankung	Koronare 3-Gefäßerkrankung, Mitralklappeninsuffizienz Ⅰ	
Operation	Aortokoronarer Venenbypass	
Bypass-Zeit [min]	138	
Besonderheiten	pAVK Ⅱ	

Patient 6	Geschlecht ♂	Alter 65 Jahre
Risikofaktoren	Diabetes mellitus II, Hyperlipidämie, Hypertonie, ehemaliger Nikotin-Abusus (10 packyears, seit 36 Jahren Exraucher), positive Familienanamnese ²	
Grunderkrankung	Koronare 3-Gefäßerkrankung	
Operation	Aortokoronarer Venenbypass	
Bypass-Zeit [min]	140	
Besonderheiten	Z. n. Stent-Implantation	

Patient 7	Geschlecht ♀	Alter 45 Jahre
Risikofaktoren	Adipositas ¹ (BMI = 28), positive Familienanamnese ²	
Grunderkrankung	Aortenklappeninsuffizienz II° bei Endokarditis, KHK	
Operation	Ross-Operation (Homograft)	
Bypass-Zeit [min]	148	
Besonderheiten	Septische Embolien im Rahmen der Endokarditis (Beine bds., Milz, Niere), Schrumpfniere links, Aneurysma spurium Leiste links	

Tab. 8: Sieben herzchirurgische Patienten für die Versuchsreihe Positiv-Selektion mit dem „MACS-System“ (Miltenyi) von CEC aus peripherem Vollblut.

² Adipositas: BMI ≥ 25

² Positive Familienanamnese: Verwandte ersten Grades mit Herz-/Gefäßerkrankungen

II. Methoden

II.5 Weitere Optionen zum Nachweis von CEC im peripheren Vollblut

Im Folgenden werden zwei Strategien zum Nachweis von zirkulierenden Endothelzellen im Vollblut vorgestellt, die ohne Verwendung magnetischer Partikel arbeiten.

II.5.1 Einzeitige Markierung von CEC durch Antikörper und Erythrozytenlyse

Bei dieser Methode werden die gesuchten Zellen direkt in der Vollblutprobe mit Antikörpern angefärbt und nach einer Erythrozytenlyse mittels FACS-Messung analysiert. Der Vorteil besteht darin, dass diverse Zwischenschritte (zum Beispiel Waschschrifte) und damit Zellverluste vermieden werden. Leider können die gesuchten Zellen bei dieser Methode nicht angereichert werden.

Die Identifizierung der CEC als endotheliale Progenitorzellen sollte mit folgender Antikörper-Kombination durchgeführt werden:

Antikörper	Spezifität
Maus-Anti-HumanCD31-FITC	endothelialer Marker
Maus-Anti-HumanCD146-PE	endothelialer Marker
Maus-Anti-HumanCD34-APC	Stammzell-Marker
Maus-Anti-HumanCD45-PerCP	Leukozyten-Marker

Tab. 9: *Epitope auf Endothelzellen und PBMC.*

Die Zusammenstellung der Farbstoffe erlaubte eine zeitgleiche Vierfach-Färbung und Messung in allen vier Fluoreszenzkanälen in der Durchflusszytometrie. Außerdem lassen sich Blutzellen gut abgrenzen (nach Fürstenberger et al. 2005).

Gesuchte Population:

CD31-positiv, CD146-positiv, CD34-positiv und CD45-negativ.

Blutzellen:

CD31-negativ, CD146-negativ, CD34-negativ und CD45-positiv.

II. Methoden

Das im Lysepuffer („Simultest IMK-Lymphocyte Lysing Solution“, BD) enthaltene Diethylenglykol sorgte für die Lyse der Erythrozyten, das Formaldehyd für die Fixierung aller vorhandenen Zellen. Die Lyse folgte dem gleichen Prinzip wie unter II.4.1.1 beschrieben.

Vorbereitenden Maßnahmen:

Lysepuffer (10 x konzentriert) 1:10 mit aqua dest. Verdünnen → Lysepuffer (1 x)

Vorgehensweise zur einzeitigen Markierung der Endothelzellen und Lyse der Erythrozyten:

- 2 µl Maus-Anti-HumanCD31-FITC vorlegen
- 10 µl Maus-Anti-HumanCD34-APC zupipettieren
- 10 µl Maus-Anti-HumanCD45-PerCP zupipettieren
- 10 µl Maus-Anti-HumanCD146-PE zupipettieren
- 500 µl EDTA-Vollblut zugeben, 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren (dunkel!)
- 1 ml Lysepuffer (1 x) zugeben (dabei Vortex),
 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren (dunkel!)
- Zentrifuge: 5 Minuten, 290 x g, Raumtemperatur,
 Überstand verwerfen, Zellpellet resuspendieren
- Lyse mit 1 ml Lysereagenz (1 x) wiederholen, zentrifugieren (wie oben)
- Lyse mit 2 ml Lysereagenz (1 x) wiederholen, zentrifugieren (wie oben)
- 2 x mit PBS-BSA waschen, Zellpellet in 500 µl PBS-BSA resuspendieren
- FACS-Analyse anschließen

Patient 8	Geschlecht ♀	Alter 51 Jahre
Risikofaktoren	Hypertonie, gemischte Hyperlipidämie, ehemaliger Nikotin-Abusus	
Grunderkrankung	Trikuspidal- und Mitralklappeninsuffizienz, dilative Kardiomyopathie, Linksschenkelblock	
Operation	INCOR-Implantation	
Bypass-Zeit [min]	158	

Patient 9	Geschlecht ♀	Alter 50 Jahre
Risikofaktoren	Adipositas, Hypertonie	
Grunderkrankung	Degenerative Aortenklappenstenose	
Operation	Ross-Operation (Xenograft)	
Bypass-Zeit [min]	185	

Tab. 10: **Patient 8 und 9**, die für die CEC-Isolierung aus Vollblut durch einzeitige Erythrozytenlyse und Antikörper-Färbung eingeschlossen wurden.

II. Methoden

Vorgehensweise zur Identifizierung der gesuchten Zellpopulation im FACS:

Um die gesuchte kleine Population der CEC unter den Leukozyten sichtbar zu machen, wurden folgende Definitionen festgelegt, die in Abb. 17 verdeutlicht werden sollen.

Erster Schritt: Definition verschiedener Regionen innerhalb der zweidimensionalen FACS-Abbildungen (DotPlots), welche jeweils eine oder mehrere bestimmte Zellpopulationen beinhalten (beispielhaft dargestellt anhand der Daten einer Probanden-Probe, Abb. 17a-c, S.44).

1. Darstellung der CD45-positiven Zellen entsprechend ihrer Granularität (SSC) (Abb. 17a):

DotPlot: Maus-Anti-HumanCD45-APC (FL-3) gegen Granularität (SSC).

Es ist eine Unterscheidung der einzelnen Leukozytenpopulationen anhand ihrer Granularität und CD45-Färbung möglich (sichtbar als verschiedene „Zellhaufen“). Die Region R1 umfasst die CD45-positiven Leukozyten.

Forderung: die gesuchten CEC sind CD45-negativ, also „Ausschluss von Zellen in R1“.

2. Auf trennung der Zellen nach Größe (FSC) und Granularität (SSC) (Abb. 17b):

DotPlot: Größe (FSC) gegen Granularität (SSC).

Hier werden alle Zellen nach Größe und Granularität sortiert abgebildet. In Region R2 sind Lymphozyten und Monozyten als Zellen geringer Granularität lokalisiert, die Granulozyten liegen außerhalb von R2 (stark granuliert).

Forderung: die gesuchten CEC sind mononukleäre Zellen, liegen also innerhalb von R2.

3. Darstellung von CD45-negativen, aber CD146-positiven Zellen (Abb. 17c):

DotPlot: Maus-Anti-HumanCD45-APC (FL3) gegen -CD146-PE (FL-2).

Die Lokalisation der Zellpopulationen in dieser Abbildung wird durch die Expression der Oberflächenmarker CD45 und CD146 auf den Zellen bestimmt. Region R3 identifiziert CD45-negative und zugleich CD146-positive Zellen.

Forderung: CEC sind CD45-negative und zugleich CD146-positive Zellen, somit innerhalb R3 gelegen.

- gesuchte Endothelzellen liegen nicht in R1, aber in R2 und gleichzeitig in R3.
- Gating (R2 + R3 ohne R1)
- = CD45-negative, CD146-positive mononukleäre Zellen.

II. Methoden

Beispiel für das Setzen von Regionen zur Analyse und Auswertung der Daten:

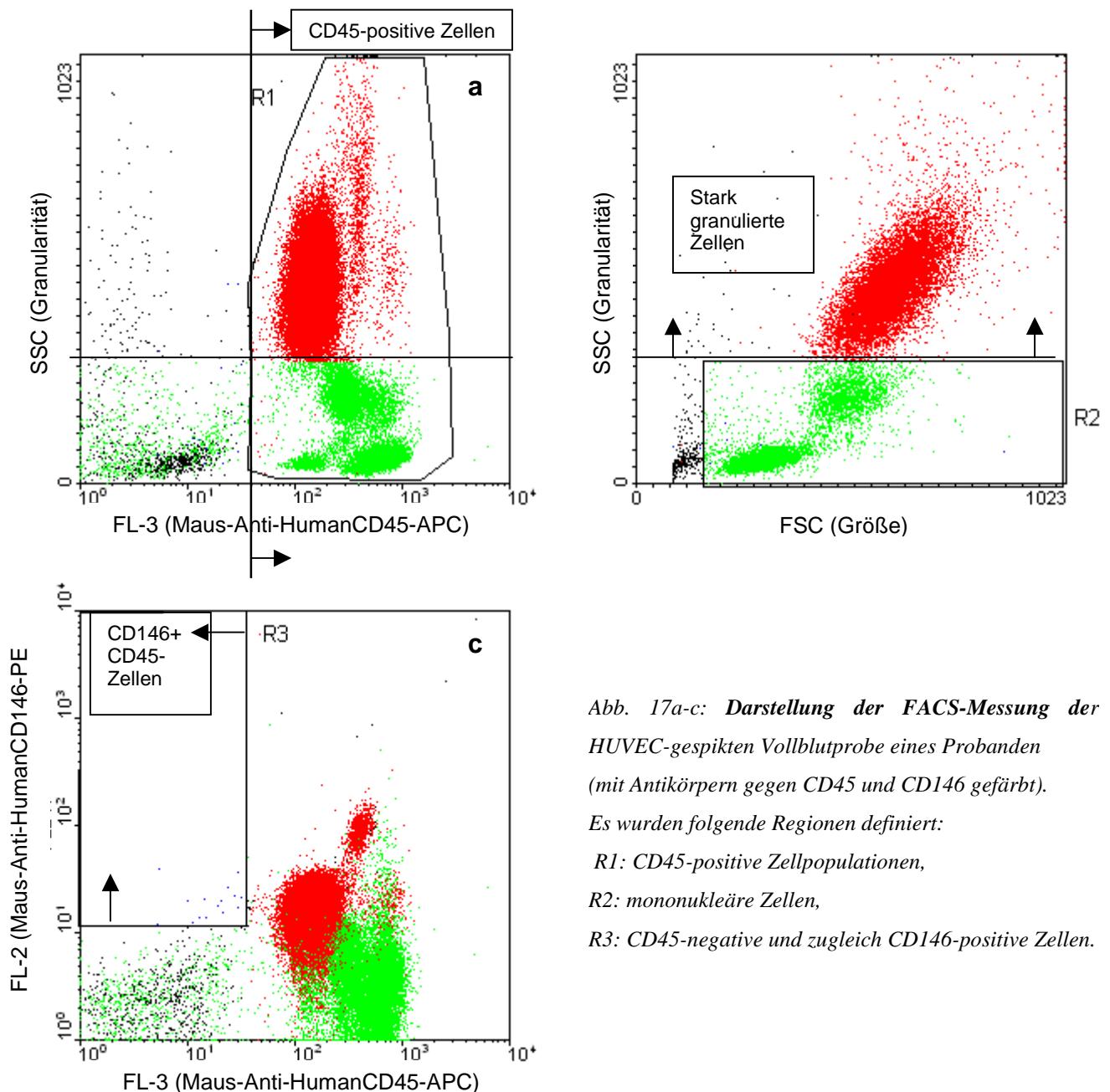


Abb. 17a-c: Darstellung der FACS-Messung der HUVEC-gespikten Vollblutprobe eines Probanden (mit Antikörpern gegen CD45 und CD146 gefärbt). Es wurden folgende Regionen definiert:
 R1: CD45-positive Zellpopulationen,
 R2: mononukleäre Zellen,
 R3: CD45-negative und zugleich CD146-positive Zellen.

II. Methoden

Zweiter Schritt: Durch Gating können diese Regionen in neuen DotPlots entweder einzeln oder in Kombinationen dargestellt, bzw. von der Darstellung ausgeschlossen werden.

4. Zusätzliche Abgrenzung über Maus-Anti-HumanCD31-FITC (FL-1) und Maus-Anti-HumanCD34-APC (FL-4):

Die in Schritt 1-3 definierte Zellpopulation (CD45-negative/CD146-positive/mononukleäre Zellen) wird in einem neuen DotPlot dargestellt (siehe Beispiele Abb. 28/29, S. 67/68).

Forderung: Die gesuchten CEC sind CD31-positiv und zugleich CD34-positiv.

Diese Darstellung und gleichzeitig weitere Charakterisierung der Zellen gelingt durch Gating (R2 + R3 ohne R1) der zuvor (Abb. 27a-c) gesetzten Regionen. Es werden diejenigen Zellen dargestellt, die sowohl in R2 als auch in R3, aber nicht in R1 liegen: also CD45-negative, CD146-positive mononukleäre Zellen, entsprechend der Definition der gesuchten endothelialen Zellen.

II.5.2 Kultivierung von CEC nach Anreicherung aus Vollblut

Durch das Auswachsen sollte es möglich sein, die CEC ausreichend zu vermehren, um die ursprünglich sehr kleine Zellpopulation anschließend per FACS-Analyse zu charakterisieren. Nach Abgang von der HLM entnommene Vollblutproben von 27 herzchirurgischen Patienten (Patientendaten siehe unten) wurden folgendermaßen vorbereitet:

1. 2 x 1 ml Blut wurden einer Erythrozytenlyse (Ammoniumchlorid) unterzogen (II.4.1.1)
2. 2 x 5 ml Blut wurden einer Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll) unterzogen (II.4.1.3).

Die resuspendierten Zellen nach Erythrozytenlyse bzw. Interphasezellen nach Dichtegradientenzentrifugation wurden kultiviert.

II. Methoden

Vorgehensweise zur Kultivierung von CEC nach Anreicherung:

- 5×10^6 Zellen in 3 ml Endothelzellmedium mit Wachstumsfaktoren VEGF und IGF-1 (EBM-2 MV für mikrovaskuläre Endothelzellen, Lonza) auf Fibronektin-beschichtete Zellkulturobjektträger (Kulturfläche = 10 cm², Nunc) aussäen
- Brutschrank: 37 °C/5 % CO₂, bis zur Konfluenz der Zellen (zehn bis 21 Tage)
- Ablösen der Zellen mit Kollagenase (siehe II.1.2.3)
- Weiterkultivieren bis Passage p2 in EBM-2 MV (siehe II.1.2.3)
- Ablösen der Zellen und sofort Färbung für weitere Untersuchung

Die beiden Methoden der Zellanreicherung wurden einander gegenüber gestellt und hinsichtlich des Zellwachstums quantifiziert. Erste Auswertungen erfolgten nach immunhistochemischer Färbung mit Dil-Ac-LDL, UEA-1-FITC und DAPI unter dem Fluoreszenzmikroskop. Eine zweite Auswertung wurde bei ausgewählten Patienten durchflusszytometrisch nach spezifischer Antikörper-Färbung (Anti-CD31-APC, Anti-CD34-PerCP, Anti-CD146-PE und Anti-E-Selektin-FITC) angeschlossen.

Vorgehensweise zur Färbung von CEC nach Kultivierung (für Fluoreszenzmikroskopie):

- Objektträger (OT) mit PBS waschen,
500 µl Dil-Ac-LDL zupipettieren (1:20 in RPMI und mit 5 % FKS)
1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubieren
20 µl UEA-1-FITC zum ersten Reagenz pipettieren
30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- waschen mit PBS-BSA (0,2 %), Kammer über OT abnehmen
- Fixieren der Zellen mit Paraformaldehyd (1 %)
- waschen mit PBS-BSA (0,2 %), trocknen lassen
- 25 µl Eideckmedium mit DAPI (Vectashield Mounting Medium, Linaris) und Deckglas auf OT geben

II. Methoden

Qualitative Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop:

Beurteilung der Zellmorphie und der Anfärbung der Zellen mit Dil-Ac-LDL und UEA-1-FITC (siehe Tab. 11).

Fluoreszenz -Farbstoff	Reaktion	Färbeergebnis
DAPI	Färbung der DNA/RNA aller Zellen	Zellkerne blau
Dil-Ac-LDL	Aufnahme ins Zellinnere von EC	Zytoplasma rot
UEA-1-FITC	Verbindung mit Kohlenhydraten der Zellmembran von EC	Zelloberfläche gelbgrün

Tab. 11: Eigenschaften der Farbstoffe DAPI, Dil-Ac-LDL und UEA-1-FITC.

Vorgehensweise zur Antikörper-Färbung von CEC nach Kultivierung (für FACS-Analyse):

Anti-CD31, Anti-CD34, Anti-CD146 und Anti-E-Selektin gefärbt (Vorgehensweise siehe II.3.1).

Die ausgewachsenen Zellen sollten folgende Eigenschaften aufweisen:

CD31-positiv, CD146-positiv, E-Selektin-positiv

Für die Versuchsreihe der Kultivierung von CEC nach Anreicherung aus Vollblut wurden Blutproben von 27 herzchirurgischen Patienten untersucht, die im Folgenden kurz vorgestellt werden.

Mit den Blutproben der Patienten 10 mit 18 wurde die Kultivierbarkeit von CEC sowohl nach Ammoniumchloridlyse als auch nach Dichtegradientenzentrifugation überprüft. Die Zellen wurden wie oben beschrieben angereichert und für drei Wochen in EBM-2 MV kultiviert. Das Vorhandensein von Zellen wurde zunächst im Phasenkontrast dokumentiert, anschließend wurde die Beschreibung der Zellen über immunhistochemische Verfahren oder spezifische Antikörperfärbungen erweitert (siehe oben).

II. Methoden

Die Proben der Patienten 19 mit 36 wurden einer Dichtegradientenzentrifugation vor Kultivierung unterzogen. Die ausgewachsenen CEC wurden über spezifische Antikörperfärbungen im FACS charakterisiert.

Patient 10	Geschlecht ♂	Alter 68 Jahre
Risikofaktoren	Diabetes mellitus II, Hyperlipidämie, Hypertonie	
Grunderkrankung	Koronare 3-Gefäßerkrankung, Linksherzinsuffizienz, paroxysmales Vorhofflimmern	
Operation	Aortokoroner Bypass	
Bypass-Zeit [min]	62	
Besonderheiten	Diabetische Polyneuropathie und Glomerulopathie, chronische Niereninsuffizienz	

Patient 11	Geschlecht ♂	Alter 59 Jahre
Risikofaktoren	Hyperlipidämie, Hypertonie	
Grunderkrankung	Vorhofflimmern, Z.n. aortokoroner Bypass-Operation	
Operation	Aortokoroner Bypass, Mitralklappenrekonstruktion (Re-OP)	
Bypass-Zeit [min]	257	

Patient 12	Geschlecht ♀	Alter 76 Jahre
Risikofaktoren	Hypercholesterinämie, Hypertonie	
Grunderkrankung	Koronare 3-Gefäßerkrankung, Linksherzinsuffizienz, Trikuspidal- und Mitralklappeninsuffizienz, absolute Arrhythmie	
Operation	Aortokoroner Bypass, Mitralklappenersatz	
Bypass-Zeit [min]	188	
Besonderheiten	Chronische Niereninsuffizienz, Schock und Tod post-operativ	

Patient 13	Geschlecht ♀	Alter 76 Jahre
Risikofaktoren	Diabetes mellitus II, Hypertonie	
Grunderkrankung	Koronare 3-Gefäßerkrankung, Mitralklappenstenose, Aortenklappenstenose und -insuffizienz	
Operation	Aortokoroner Bypass, biologischer Aortenklappenersatz	
Bypass-Zeit [min]	160	
Besonderheiten	Z.n. Schrittmacher-Implantation	

Patient 14	Geschlecht ♂	Alter 67 Jahre
Risikofaktoren	Fettstoffwechselstörung, Hypertonus, positive Familienanamnese ¹	
Grunderkrankung	Koronare 3-Gefäßerkrankung, instabile Angina pectoris	
Operation	Aortokoroner Bypass	
Bypass-Zeit [min]	94	

Patient 15	Geschlecht ♂	Alter 59 Jahre
Risikofaktoren	Keine	
Grunderkrankung	Linksherzinsuffizienz IV	
Operation	INCOR-Implantation, Aortenklappenersatz-Revision (Re-OP)	
Bypass-Zeit [min]	172	

¹ Positive Familienanamnese: Verwandte ersten Grades mit Herz-/Gefäßerkrankungen

II. Methoden

Patient 16	Geschlecht ♀	Alter 81 Jahre
Risikofaktoren	Hypertonie, Hyperlipidämie	
Grunderkrankung	Koronare 3-Gefäßerkrankung, Mitralklappeninsuffizienz, paroxysmales Vorhofflimmern	
Operation	Aortokoroner Bypass, Mitralklappenrekonstruktion	
Bypass-Zeit [min]	127	
Besonderheiten	Chronische Niereninsuffizienz	

Patient 17	Geschlecht ♀	Alter 78 Jahre
Risikofaktoren	Hypertonie	
Grunderkrankung	Koronare 1-Gefäßerkrankung, Aortenklappenstenose und –insuffizienz, Mitralklappenstenose und- insuffizienz, Trikuspidalklappeninsuffizienz, Vorhofflimmern	
Operation	Aortokoroner Bypass, Aortenklappenersatz, Mitralklappenersatz, Trikuspidalklappenrekonstruktion	
Bypass-Zeit [min]	175	
Besonderheiten	Stenose der A. carotis	

Patient 18	Geschlecht ♂	Alter 75 Jahre
Risikofaktoren	Hyperlipidämie, Hypertonie, positive Familienanamnese ¹	
Grunderkrankung	Koronare 2-Gefäßerkrankung	
Operation	Aortokoroner Bypass	
Bypass-Zeit [min]	81	

Patient 19	Geschlecht ♂	Alter 71 Jahre
Risikofaktoren	Diabetes mellitus II, Hyperlipidämie, Hypertonie, ehemaliger Nikotin-Abusus	
Grunderkrankung	Koronare 3-Gefäßerkrankung	
Operation	Aortokoroner Bypass	
Bypass-Zeit [min]	109	
Besonderheiten	Atherosklerose Becken-Bein-Typ mit Gangrän, Z.n. Apoplex, diabetische Nephropathie und Neuropathie	

Patient 20	Geschlecht ♀	Alter 58 Jahre
Risikofaktoren	Hypercholesterinämie, Hypertonie	
Grunderkrankung	Koronare 3-Gefäßerkrankung, Linksherzinsuffizienz 1 I	
Operation	Aortokoroner Bypass	
Bypass-Zeit [min]	107	
Besonderheiten	Chronische Niereninsuffizienz 1 II	

Patient 21	Geschlecht ♂	Alter 68 Jahre
Risikofaktoren	Hyperlipidämie, Hypertonie, ehemaliger Nikotin-Abusus, positive Familienanamnese ¹	
Grunderkrankung	Koronare 3-Gefäßerkrankung	
Operation	Aortokoroner Bypass, Aortenklappenersatz	
Bypass-Zeit [min]	127	
Besonderheiten	Stenose der A. carotis interna links	

¹ Positive Familienanamnese: Verwandte ersten Grades mit Herz-/Gefäßerkrankungen

II. Methoden

Patient 22	Geschlecht ♂	Alter 75 Jahre
Risikofaktoren	Hyperlipidämie, Hypertonie, ehemaliger Nikotin-Abusus, positive Familienanamnese ¹	
Grunderkrankung	Koronare 2-Gefäßerkrankung, Aortenklappenstenose, Angina pectoris, chronisches Vorhofflimmern	
Operation	Aortokoronarer Bypass, Aorten-Ummantelung	
Bypass-Zeit [min]	123	

Patient 23	Geschlecht ♂	Alter 67 Jahre
Risikofaktoren	Diabetes mellitus II, Hyperlipidämie, Hypertonie, ehemaliger Nikotin-Abusus, positive Familienanamnese ¹	
Grunderkrankung	Koronare 3-Gefäßerkrankung, Linksherzinsuffizienz 1 I, instabile Angina pectoris, Z.n. Gefäß-Operation peripher/Aorta/A. carotis	
Operation	Aortokoronarer Bypass (Re-Re-Operation)	
Bypass-Zeit [min]	90	
Besonderheiten	Diabetische periphere Gefäßerkrankung	

Patient 24	Geschlecht ♀	Alter 64 Jahre
Risikofaktoren	Hypertonie	
Grunderkrankung	Koronare 1-Gefäßerkrankung, Angina pectoris	
Operation	Aortokoronarer Bypass	
Bypass-Zeit [min]	68	

Patient 25	Geschlecht ♂	Alter 71 Jahre
Risikofaktoren	Hypertonie	
Grunderkrankung	Koronare 3-Gefäßerkrankung, instabile Angina pectoris, paroxysmales Vorhofflimmern	
Operation	Aortokoronarer Bypass	
Bypass-Zeit [min]	93	

Patient 26	Geschlecht ♂	Alter 68 Jahre
Risikofaktoren	Diabetes mellitus II, Hyperlipidämie, Hypertonie	
Grunderkrankung	Koronare 3-Gefäßerkrankung, Angina pectoris, akuter Myokardinfarkt, paroxysmales Vorhofflimmern	
Operation	Aortokoronarer Bypass	
Bypass-Zeit [min]	92	
Besonderheiten	Stenose der A. carotis, Atherosklerose Becken-Bein-Typ	

Patient 27	Geschlecht ♂	Alter 61 Jahre
Risikofaktoren	Diabetes mellitus II, Hyperlipidämie, Hypertonie, ehemaliger Nikotin-Abusus, positive Familienanamnese ²	
Grunderkrankung	Koronare 3-Gefäßerkrankung, Angina pectoris, paroxysmales Vorhofflimmern	
Operation	Aortokoronarer Bypass	
Bypass-Zeit [min]	56	
Besonderheiten	Chronische Niereninsuffizienz 1	

¹ Positive Familienanamnese: Verwandte ersten Grades mit Herz-/Gefäßerkrankungen

² Positive Familienanamnese: Verwandte ersten Grades mit Herz-/Gefäßerkrankungen

II. Methoden

Patient 28	Geschlecht ♂	Alter 67 Jahre
Risikofaktoren	Hyperlipidämie, Hypertonie, ehemaliger Nikotin-Abusus, positive Familienanamnese ¹	
Grunderkrankung	Koronare 3-Gefäßerkrankung, Angina pectoris, paroxysmales Vorhofflimmern	
Operation	Aortokoronarer Bypass	
Bypass-Zeit [min]	110	

Patient 29	Geschlecht ♂	Alter 65 Jahre
Risikofaktoren	Hyperlipidämie, Hypertonie, ehemaliger Nikotin-Abusus	
Grunderkrankung	Koronare 3-Gefäßerkrankung, Linksherzinsuffizienz I II, paroxysmale Tachykardie	
Operation	Aortokoronarer Bypass	
Bypass-Zeit [min]	82	

Patient 30	Geschlecht ♂	Alter 69 Jahre
Risikofaktoren	Diabetes mellitus II, Hypertonie	
Grunderkrankung	Koronare 3-Gefäßerkrankung, instabile Angina pectoris, akuter Myokardinfarkt, Mitralklappeninsuffizienz, Bradykardie, paroxysmales Vorhofflimmern	
Operation	Aortokoronarer Bypass	
Bypass-Zeit [min]	44	

Patient 31	Geschlecht ♂	Alter 50 Jahre
Risikofaktoren	Hypercholesterinämie, Hypertonie	
Grunderkrankung	Koronare 3-Gefäßerkrankung, instabile Angina pectoris	
Operation	Aortokoronarer Bypass	
Bypass-Zeit [min]	44	

Patient 32	Geschlecht ♂	Alter 74 Jahre
Risikofaktoren	Diabetes mellitus II, Hypertonie, ehemaliger Nikotin-Abusus	
Grunderkrankung	Koronare 3-Gefäßerkrankung, Angina pectoris, paroxysmales Vorhofflimmern	
Operation	Aortokoronarer Bypass	
Bypass-Zeit [min]	105	
Besonderheiten	Stenose der A. carotis, Atherosklerose Becken-Bein-Typ	

Patient 33	Geschlecht ♀	Alter 38 Jahre
Risikofaktoren	Keine	
Grunderkrankung	Primäre pulmonale Hypertonie, akute respiratorische Insuffizienz, akutes Leber- und Nierenversagen, Pneumonie, Emphysem	
Operation	Peripheral lung assist, passive extracorporeal lung assist (PECLA)	
Bypass-Zeit [min]	111	

Patient 34	Geschlecht ♂	Alter 76 Jahre
Risikofaktoren	Hypercholesterinämie, Hypertonie, ehemaliger Nikotin-Abusus	
Grunderkrankung	Koronare 3-Gefäßerkrankung, Angina pectoris	
Operation	Aortokoronarer Bypass	
Bypass-Zeit [min]	94	

II. Methoden

Patient 35	Geschlecht ♂	Alter 72 Jahre
Risikofaktoren	Diabetes mellitus II, ehemaliger Nikotin-Abusus, positive Familienanamnese ¹	
Grunderkrankung	Koronare 3-Gefäßerkrankung	
Operation	Aortokoronarer Bypass (Re-Operation)	
Bypass-Zeit [min]	65	

Patient 36	Geschlecht ♂	Alter 72 Jahre
Risikofaktoren	Hyperlipidämie, Hypertonie, positive Familienanamnese ¹	
Grunderkrankung	Koronare 2-Gefäßerkrankung, Aortenklappenstenose, Angina pectoris, paroxysmales Vorhofflimmern	
Operation	Aortokoronarer Bypass, Aortenklappenersatz	
Bypass-Zeit [min]	112	
Besonderheiten	Stenose der A. carotis	

Tab. 12: Patienten 10 bis 36, die für die Versuche der CEC-Anreicherung und Kultivierung eingeschlossen wurden.

¹ Positive Familienanamnese: Verwandte ersten Grades mit Herz-/Gefäßerkrankungen

III. Ergebnisse

Vor der Isolierung zirkulierender Endothelzellen aus dem Vollblut von Patienten war es zunächst notwendig, eine Methode zur Separation endothelialer Zellen mit bekannten Oberflächenmarkern aus Vollblut zu etablieren.

III.1 Isolierung von HUVEC aus Vollblut

Vollblut oder PBMC-Suspensionen gesunder Probanden wurden mit einer definierten Zahl an HUVEC versetzt und anschließend aufgereinigt. Die Optimierung der Methode erfolgte über die Darstellung der Wiederfindung, Vitalität und Reinheit der HUVEC nach den verschiedenen Separationsmethoden (siehe Begriffserklärungen S. VI).

III.1.1 Erythrozytenlyse und Zellanreicherung

Aus Vorversuchen war bekannt, dass zirkulierende Endothelzellen eine sehr kleine Population im peripheren Blut von koronaren Bypass-Patienten darstellten (Schmid et al. 2006a). Bei einer zu erwartenden Zahl von maximal 200 CEC pro ml Blut und einer für die durchflusszytometrische Analyse geforderten Menge von 2.000 bis 10.000 Zellen pro Analyse war eine Anreicherung dieser Zellen zwingend notwendig. Darüber hinaus erforderte eine FACS-Analyse zur Charakterisierung der Zellen aufgrund der Autofluoreszenz von Erythrozyten deren vollständige Entfernung aus dem Reaktionsansatz.

Mithilfe der Ammoniumchloridlyse wurde eine Erythrozyten-freie Zellsuspension angestrebt. Nach einem einzelnen Lyse-Durchgang (II.4.1.1.) war noch ein prozentual großer Anteil an Erythrozyten in der Probe nachweisbar (siehe Abb. 18). Die große Population der Erythrozyten erschwerte in der FACS-Analyse die Abgrenzung der Endothelzellen zu anderen Zellpopulationen. Trotz einer großzügigen Schwellenwertsetzung (Threshold), die Verunreinigungen wie Zelldebris und Erythrozyten ausschließt, überlagerten die restlichen Erythrozyten die Populationen der PBMC und HUVEC (siehe Abb. 18, Erythrozyten orange umrandet). Eine eindeutige Zuordnung der einzelnen Zellpopulationen und eine korrekte Statistik war nicht möglich.

III. Ergebnisse

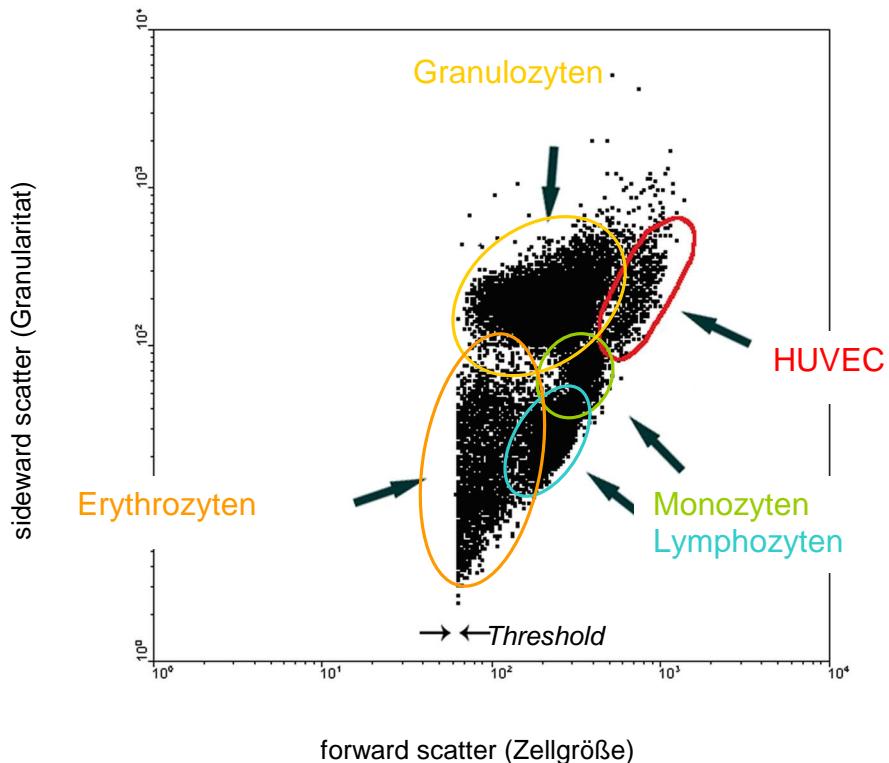


Abb. 18: Zweidimensionale Darstellung der Zellpopulationen einer FACS-Analyse (Zellgröße und Granularität) nach unzureichender Ammoniumchloridlyse: Eine mit HUVEC gespickte Vollblutprobe wurde einmal lysiert (III.1.1.1). Die Population der HUVEC (rot umrandet) ist nur schwer von den übrigen Populationen abzugrenzen (100.000 Zellen gemessen, 50.000 Zellen dargestellt).

III.1.1.1 Optimierung der Erythrozytenlyse

Für eine erfolgreiche Erythrozytenlyse wurde die Entfernung der Erythrozyten, sowie die Unversehrtheit der Endothelzellen gefordert. Eine ausreichende Lyse wurde bereits makroskopisch durch einen rötlich opaleszenten Überstand und fehlendes Erythrozytensediment nach Zentrifugation erkennbar. Die Optimierung des Verfahrens wurde durch eine zweimalige Lyse und Verkürzung der Lysezeit erreicht (siehe unten). Zur Verifizierung der Endothelzellpopulation wurde eine spezifische Endothelzell-Färbung (Anti-HumanCD146-PE, FL-2) eingeführt. Mittels 7-AAD-Färbung (Apoptose-Marker, FL-3) war eine Aussage über die Vitalität der Zellen möglich.

III. Ergebnisse

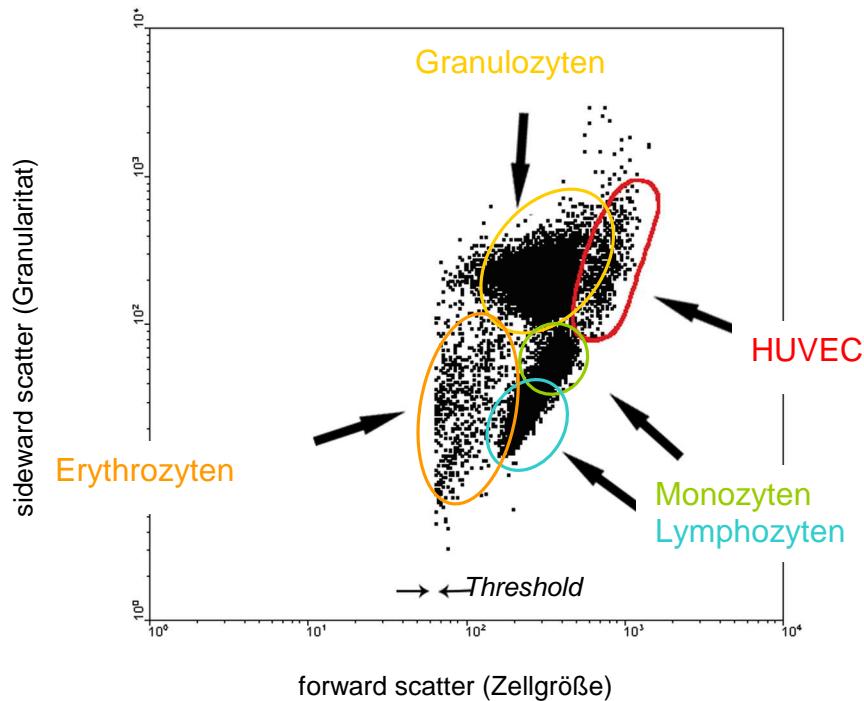


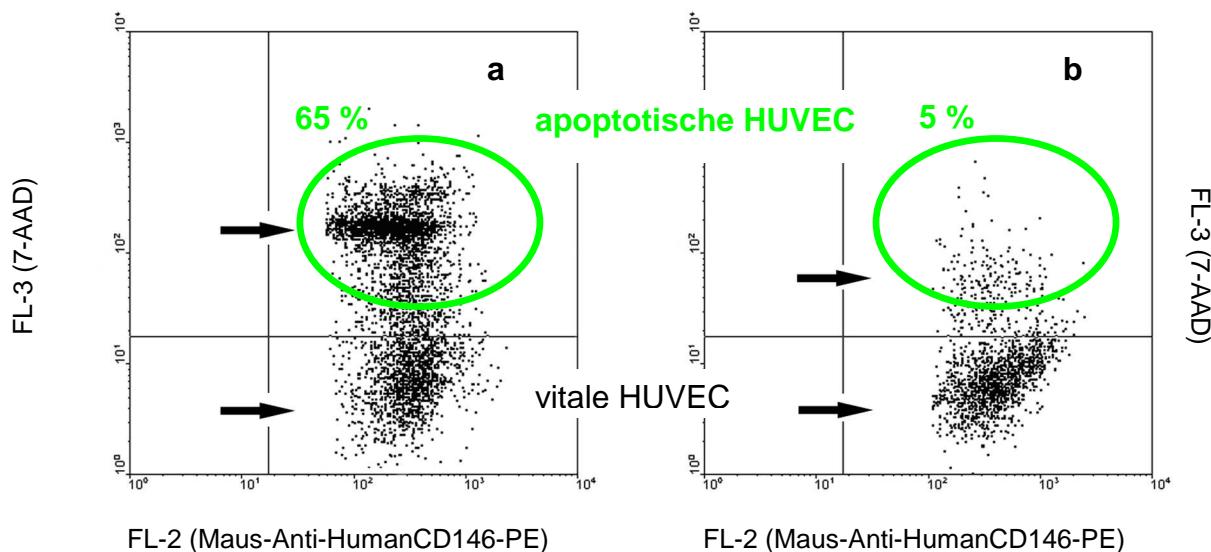
Abb. 19: *Zweidimensionale Darstellung der Zellpopulationen einer FACS-Analyse nach erfolgreicher Ammoniumchloridlyse: Die Population der HUVEC (rot umrandet) ist gut abgrenzbar (100.000 Zellen gemessen, 50.000 Zellen dargestellt).*

In den ersten Lyse-Versuchen erwies sich Ammoniumchlorid zwar als potentes Lysemittel für Erythrozyten (Abb. 19), jedoch als sehr aggressiv gegenüber Endothelzellen (Abb. 20, S. 56).

Aus Abb.20a geht hervor, dass nach einem Lyse-Durchgang mit 15 Minuten Lysezeit ein großer Teil der HUVEC-Population apoptotisch war: So waren mehr als 65 % der Endothelzellen (definiert über CD146-Positivität, FL-2) 7-AAD-positiv.

Eine Variation der Reaktionszeit des Lyse-Vorgangs bewirkte eine Zunahme der Anzahl vitaler Zellen: Zwei aufeinander folgende Lyse-Schritte (II.4.1.1) von je acht Minuten Dauer führten zu einer vollständigen Erythrozytenlyse bei gleichzeitiger Schonung der Endothelzellen. Mit diesem Protokoll (siehe II.4.1.1) waren mehr als 95 % der HUVEC vital (Abb. 20b).

III. Ergebnisse



Die optimierte Methode wurde mit der Isolierung von HUVEC aus Vollblutproben von drei unterschiedlichen Probanden überprüft (Abb. 21)

Eine zweimalige Lyse mit Ammoniumchlorid von je acht Minuten Lyse-Dauer erbrachte eine hohe Wiederfindung und Vitalität, jedoch eine ungenügende Reinheit an Endothelzellen.

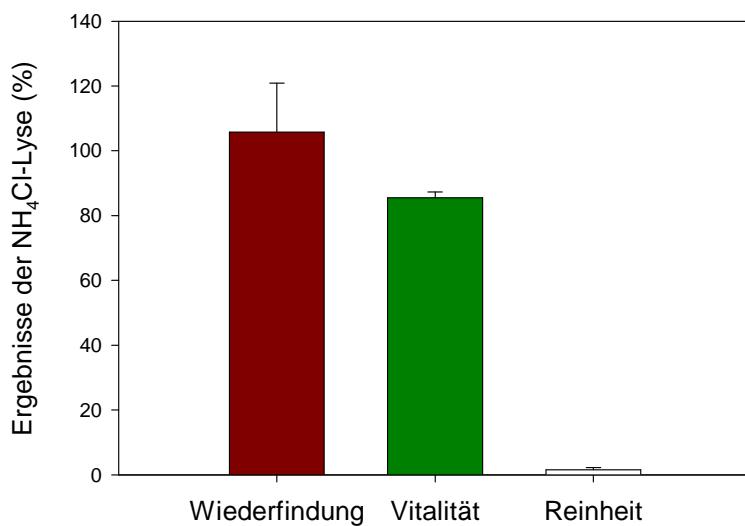


Abb. 21: Optimierung der Endothelzell-Anreicherung mittels Ammoniumchloridlyse. Spiken von jeweils 300 µl EDTA-Vollblut mit je 1 x 10⁵ HUVEC, Färbung mit Maus-Anti-HumanCD146-PE, zweimalige Lyse mit Ammoniumchlorid (II.4.1.1). Es wurden die Blutproben von drei Probanden als Doppelbestimmung untersucht.

III. Ergebnisse

III.1.1.2 Anreicherung von HUVEC mit Dichtegradientenzentrifugation

Die zweite Möglichkeit endotheliale Zellen anzureichern und Erythrozyten aus der Suspension zu beseitigen, besteht in der Zentrifugation mit einem Dichtegradienten (II.4.1.3). Auch aus dieser Methode sollten die Endothelzellen möglichst unbeschadet hervorgehen um anschließend im FACS analysiert zu werden, oder für weitere Isolierungsschritte zur Verfügung zu stehen.

Zur Isolierung von HUVEC aus Vollblut mittels Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll) wurde eine definierte Anzahl von HUVEC zu Probandenblut zugesetzt, über Ficoll angereichert und anschließend einer FACS-Analyse unterzogen. Die Wiederfindung, Vitalität und Reinheit der Ficoll-angereicherten HUVEC ist in Abb. 22 wiedergegeben.

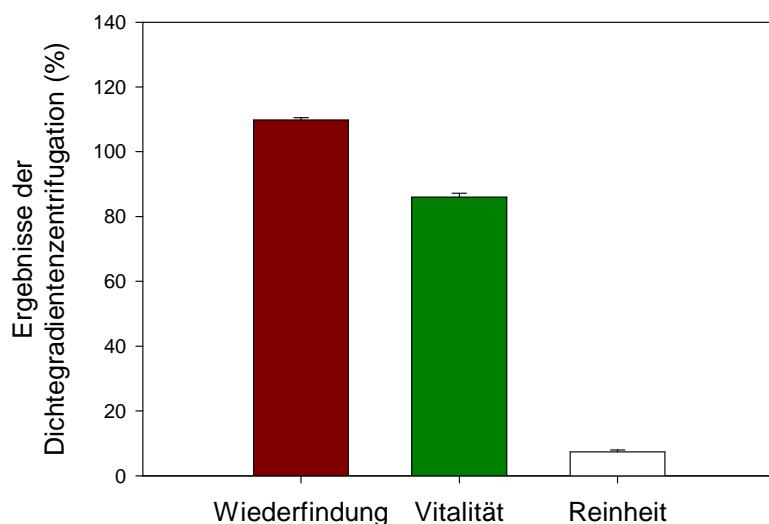


Abb. 22: **Ergebnisse der Dichtegradientenzentrifugation.** Färbung von HUVEC mit Maus-Anti-HumanCD146-PE, Spiken von 1 ml EDTA-Vollblut mit je 1×10^6 der gefärbten HUVEC und anschließende Dichtegradientenzentrifugation (II.4.1.3.1 und II.4.1.3.2). Dargestellt sind die Ergebnisse der Doppelbestimmung aus Blutproben von zwei Probanden.

Die angereicherte HUVEC zeichneten sich durch ihre hohe Wiederfindungsrate und Vitalität aus. Allerdings lag die Reinheit der Zellen unter 10 %.

III. Ergebnisse

III.1.2 Zellsortierung mit magnetischen Partikeln

Mit magnetischen Partikeln können Zellen auf eine spezifische Art und Weise nicht nur angereichert, sondern gezielt isoliert oder depletiert werden. Dadurch sollte es möglich sein, eine höhere Reinheit der Endothelzellen im Vergleich zur Anreicherung (siehe III.1.1) zu erzielen. Um dies zu überprüfen, wurden unterschiedliche Systeme getestet (siehe II.4, Tab. 7, S. 20).

III.1.2.1 Isolierung von HUVEC mit „DynaBeads Pan Mouse IgG“

Die Methode der Endothellzell-Isolierung aus Vollblut mit dem DynaBeads-System der Firma Dynal (unter II.4.2.1 beschrieben) wurde aus dem Labor der Hämatologie/Onkologie, Klinikum der Universität Regensburg (Prof. Dr. G. Eissner) übernommen. Um das optimale Verhältnis von DynaBeads zu Zellen zu eruieren, wurde eine definierte Menge an Anti-HumanCD146-gekoppelten Beads zu steigenden Mengen an HUVEC pro ml Vollblut gegeben. Die Proben wurden nach bekanntem Protokoll (II.4.2.1) behandelt.

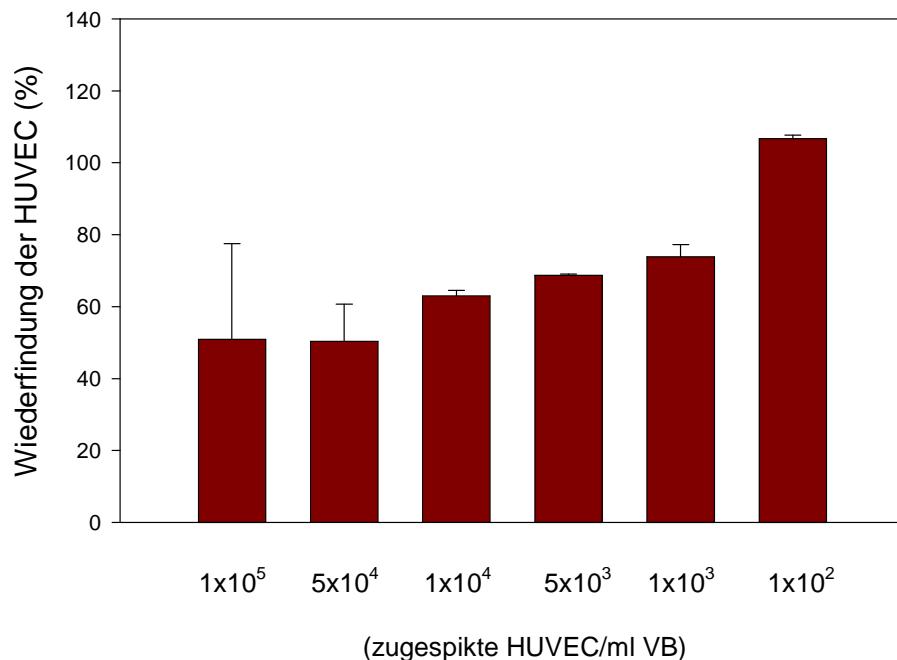


Abb 23: **Ergebnisse der HUVEC-Isolierung aus Vollblut mit dem „DynaBeads Pan Mouse IgG“-System.** Es wurden jeweils eine konstante Menge an DynaBeads (2×10^7 /ml EDTA-Vollblut, II.4.2.1b) und variierende Zahlen an HUVEC (1×10^5 , 5×10^4 , 1×10^4 , 5×10^3 , 1×10^3 , 1×10^2) eingesetzt.

III. Ergebnisse

Abb. 23 stellt die Spezifität des Systems dar. Optimale Ausbeuten zeigten sich besonders bei kleinen Endothelzell-Konzentrationen in der Vollblutprobe. Die Methode sollte sich also hervorragend für die Isolierung von kleinen Populationen wie den zirkulierenden Endothelzellen eignen.

III.1.2.2 Isolierung von HUVEC mit „Collection Pan Mouse IgG Kit“

Da das unter II.4.2.1 beschriebene System der DynaBeads eine anschließende FACS-Analyse der isolierten Endothelzellen aufgrund der Größe der noch anhaftenden DynaBeads verbietet, wurde das Ziel verfolgt DynaBeads-freie Endothelzellen zu isolieren. Eine Möglichkeit bot das „Collection Pan Mouse IgG“-Kit (Dynal).

Zur Überprüfung des Systems wurden erneut Vollblutproben von Probanden mit definierten Mengen an HUVEC gespikt und der Isolierung zugeführt. Das Protokoll sah laut Herstellerangaben einen 15-minütigen DNase-Verdau vor (II.4.2.2). Nach dieser Zeit lag die Wiederfindung der HUVEC bei lediglich 21 % (Abb. 24, S. 60). Die mikroskopische Kontrolle zeigte zwar eine vollständige Entfernung der DynaBeads_{DNAlinked} aus der Probe, allerdings waren auch große Zellaggregate und viele Zellfragmente erkennbar. Letztere erschwerten die Quantifizierung in der Nageotte-Zählkammer und erklärten die schlechte Wiederfindung.

Zur Verbesserung der Wiederfindung der HUVEC wurde die Reaktionszeit mit DNase reduziert: Der DNase-Verdau wurde auf 5 Minuten herabgesetzt. Die Abtrennung der DynaBeads_{DNAlinked} war bereits nach dieser Zeit erfolgreich. Allerdings erbrachte die Isolierung nur 27 % Wiederfindung der HUVEC (Abb. 24, S. 60). Die mikroskopische Kontrolle lieferte ein vergleichbares Bild: Zellaggregate und Zelldebris.

Je kürzer die Reaktionszeit der DNase gehalten wurde, desto größere Wiederfindungsraten der HUVEC konnten verzeichnet werden. Eine weitere Verkürzung der DNase-Reaktionszeit unter fünf Minuten war unter der Prämisse einer vollständigen DynaBeads-Ablösung jedoch nicht möglich. Die Ausbeuten lagen zwischen 20 und 30 %.

III. Ergebnisse

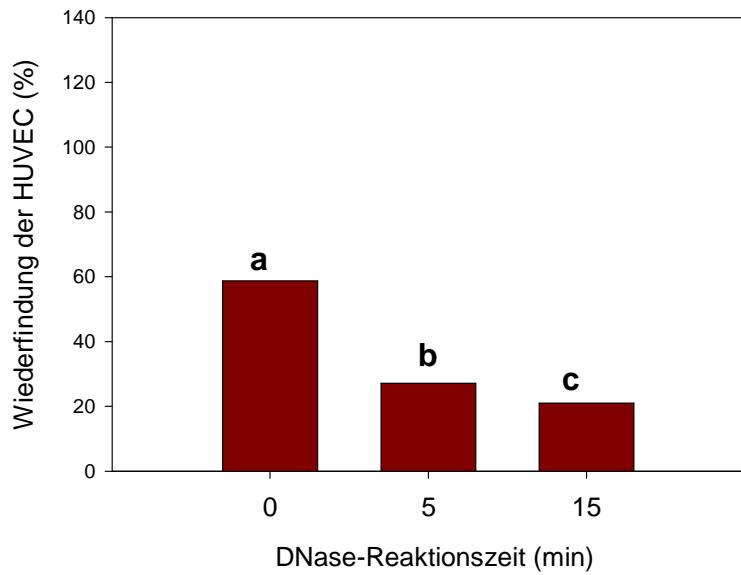


Abb. 24: **Ergebnisse der HUVEC-Isolierung mit dem „Collection Pan Mouse IgG“-Kit.** Spiken von je 1×10^4 HUVEC zu je $100 \mu\text{l}$ Vollblut; anschließende Isolierung mit den DynaBeadsDNA_{linked} und im Fall a) 0 Minuten, im Fall b) 5 Minuten und c) 15 Minuten DNase-Verdau (Vorgehensweise siehe II.4.2.2).

III.1.2.3 Isolierung von HUVEC mit „BD Imag Anti-MausIgG1 Particles-DM“

Eine weitere Variante der Zellisolierung bot die Firma BD mit dem System der „BD Imag Anti-MausIgG1 Particles-DM“. Der Vorteil dieses Systems war der Einsatz kleinster, bei der FACS-Analyse nicht störender Partikel (siehe auch Tab. 7, S. 20).

Zur Erprobung der Methode wurden erneut Vollblutproben mit HUVEC versetzt. Die zugespinkten HUVEC wurden sodann mit dem Imag Anti-MausIgG1 Particles-DM-System der Firma BD isoliert und die Wiederfindung, Vitalität und Reinheit ermittelt. Trotz verbesserter Ergebnisse hinsichtlich der Reinheit traten hohe Zellverluste auf (siehe Abb. 25, S. 61).

III. Ergebnisse

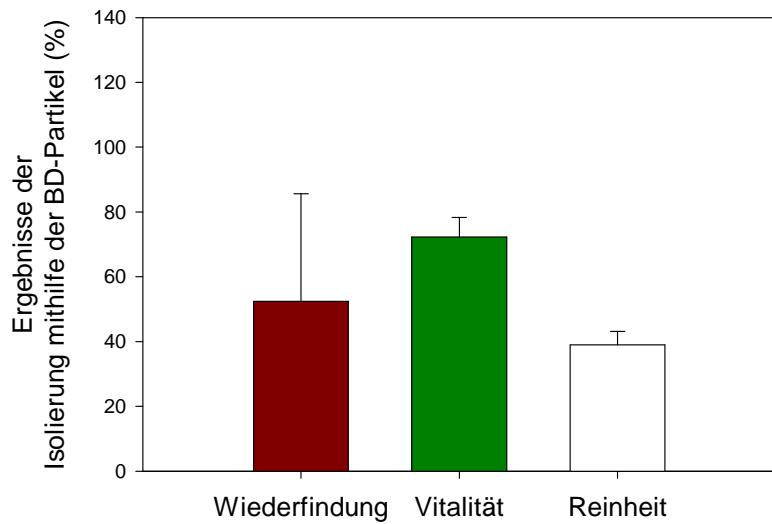


Abb. 25: *Ergebnisse der HUVEC-Isolierung mit den „BD Imag Anti-MausIgG1 Particles-DM“.* Es wurde jeweils eine Zellsuspension aus PBMC und HUVEC vorbereitet: 1×10^7 Gesamtzellen, davon 5 % HUVEC-CD146-PE (= mit Maus-Anti-HumanCD146-PE gefärbt). Vorgehen nach Protokoll (siehe II.4.2.3). Es wurden fünf Proben untersucht.

III.1.2.4 Zellsortierung mit dem „MACS-System“

Super-paramagnetische Partikel (MicroBeads) der Firma Miltenyi besitzen im Mittel einen Durchmesser von 50 nm und beeinträchtigen daher eine FACS-Analyse nicht. Außerdem zersetzen die MicroBeads sich in Kultur und weder Funktion noch Überlebensfähigkeit der Zellen werden beeinflusst (laut Herstellerangaben). Dies hielt die Möglichkeit einer anschließenden Kultivierung offen.

Für die Etablierung der Methode wurden Vollblutproben gesunder Spender mit HUVEC gespikt, oder PBMC-Suspensionen aus Probandenvollblut hergestellt und anschließend HUVEC zugesetzt. Es wurden sowohl Versuche zur Depletion von CD45-positiven PBMC (III.1.2.4.1) als auch zur Positiv-Selektion von HUVEC (III.1.2.4.2) aus der zusammengesetzten Zellsuspension durchgeführt.

III. Ergebnisse

III.1.2.4.1 Depletion von PBMC mit dem „MACS-System“

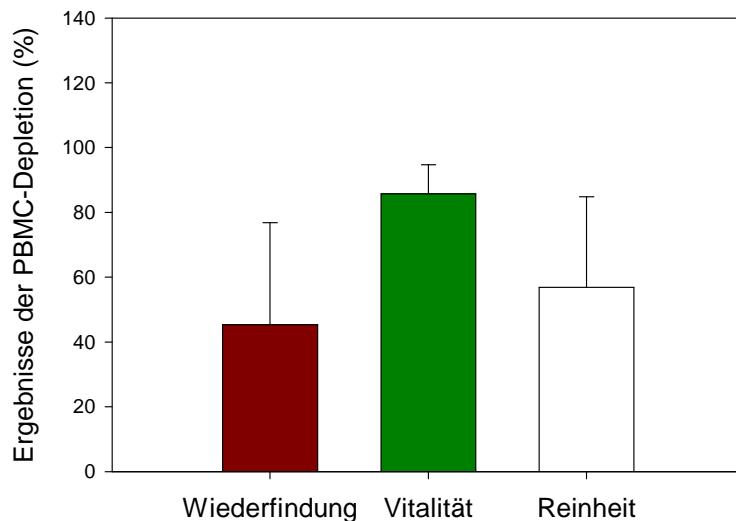


Abb. 26: **Ergebnisse der Depletion CD45-positiver PBMC mit dem „MACS-System“.** Spiken von Probanden-Vollblut mit 1×10^5 HUVEC/ml vor der Dichtegradientenzentrifugation, oder der PBMC-Suspension der Interphase mit 5 % HUVEC (1×10^7 PBMC + 1×10^5 HUVEC). Anschließende Depletion der PBMC mit dem MACS-System und FACS-Analyse der depletierten Probe. Es wurden sieben Proben untersucht.

Wie aus Abb. 26 ersichtlich, konnte mit dieser Methode die Reinheit der HUVEC erhöht werden. Die Wiederfindung der Zellen war allerdings sehr variabel: Bei sieben Versuchen lag sie zwischen zwölf und 100 %. Dies stellte die Reproduzierbarkeit der Versuche in Frage.

Um diese Methode zu optimieren, wurden in einer Versuchsreihe verschiedene verfügbare Trennsäulen für die Depletion verwendet und die Ausbeuten verglichen.

Vollblutproben von Probanden wurden mit HUVEC gespikt und diese Zellsuspension durch Dichtegradientenzentrifugation vorab angereichert. Schließlich wurden die PBMC/HUVEC unter Verwendung einer MS-, LS- oder LD-Säule depletiert (II.4.2.4.2).

Wiederfindung, Vitalität und Reinheit der HUVEC nach Depletion der CD45-positiven Zellen mittels verschiedener Säulen sind in Abb. 27 a-c dargestellt.

III. Ergebnisse

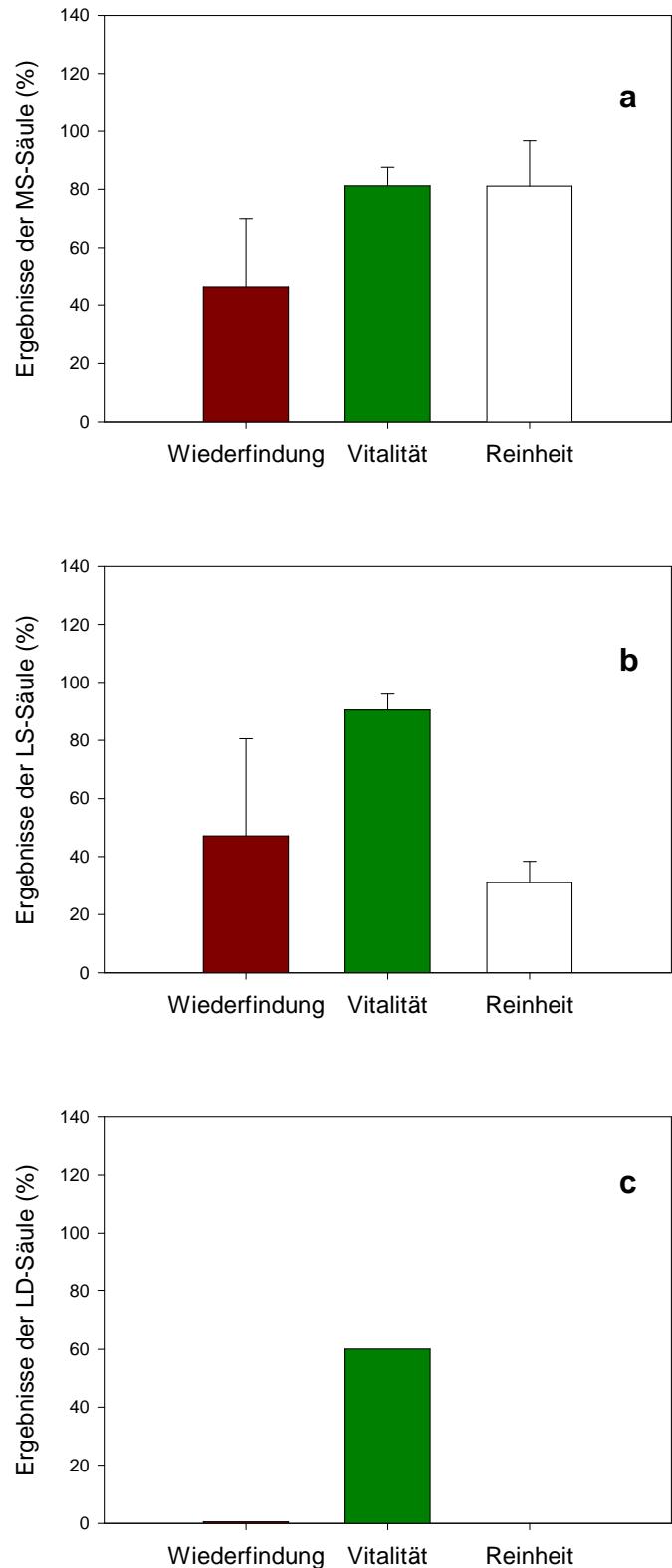


Abb. 27a-c: **Ergebnisse nach Depletion der CD45-positiven PBMC mit a) MS-Säule, b) LS-Säule, c) LD-Säule im MACS-System.** Dichtegradientenzentrifugation von Probanden-Vollblut und Spiken der PBMC-Suspension der Interphase mit 5 % HUVEC (1×10^7 PBMC + 1×10^5 HUVEC). Anschließende Depletion der PBMC mit dem MACS-System und den verschiedenen Säulen.

III. Ergebnisse

Mit den MS-Säulen wurde die größte Wiederfindung und Reinheit der HUVEC nach Depletion der PBMC erzielt (Abb. 27a). Die LS-Säulen lieferten hingegen eine Reinheit von weniger als 40 % (Abb. 27b). Bei der Verwendung von LD-Säulen gingen sämtliche eingesetzte HUVEC verloren. Diese Säulen waren für diese konkrete Fragestellung nicht geeignet (Abb. 27c). Da die Wiederfindung selbst bei den MS-Säulen im Schnitt nur bei 50 % lag, wurde dieses System nicht weiter benutzt.

III.1.2.4.2 Positiv-Selektion von HUVEC mit dem „MACS-System“

Nach einer Dichtegradientenzentrifugation wurden die angereicherten Zellen mit MicroBeads markiert und die Endothelzellen nach Vorschrift (II.4.2.4.3) isoliert.

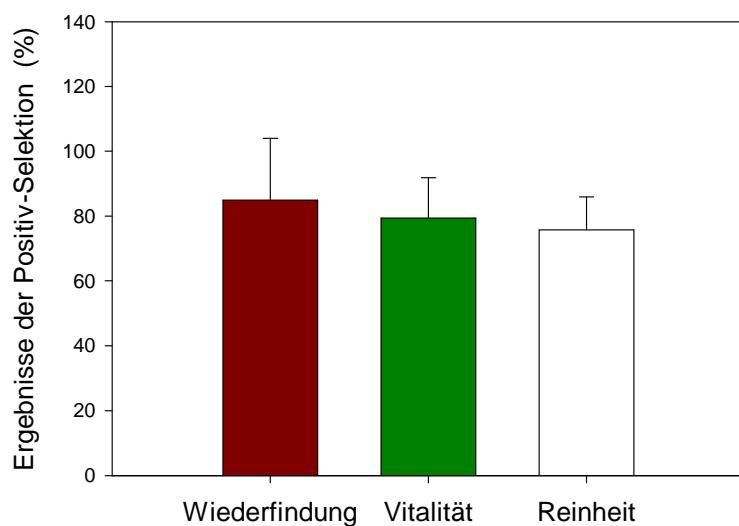


Abb. 28: **Ergebnisse der Positiv-Selektion von HUVEC mit dem „MACS-System“.** Spiken von Probanden-Vollblut mit 1×10^5 HUVEC/ml vor der Dichtegradientenzentrifugation, oder der PBMC-Suspension der Interphase mit 5 % HUVEC (1×10^7 PBMC + 1×10^5 HUVEC). Anschließende Positiv-Selektion der HUVEC mit dem MACS-System und FACS-Analyse.

Wiederfindung, Vitalität und Reinheit der HUVEC nach Positiv-Selektion mit den Anti-HumanCD146-markierten MicroBeads sind in Abb. 28 dargestellt. Mit einer durchschnittlichen Wiederfindung der HUVEC von über 80 %, einer Vitalität und Reinheit von über 75 % sollte dieses System optimal zur Isolierung von Endothelzellen aus Vollblut geeignet sein. Darüber hinaus erlaubt die Methode eine Charakterisierung der isolierten Zellen mittels FACS.

III. Ergebnisse

III.2 Isolierung von CEC aus peripherem Blut

Der nächste Abschnitt beschreibt die Verwendung der Positiv-Selektion von Endothelzellen zur Isolierung von CEC aus peripherem Patientenblut.

Peripheres Vollblut von herzchirurgischen Patienten (Patientenauswahl siehe II.4.2.4.3) wurde zunächst mit einem Ficoll-Dichthegradienten zentrifugiert, die Interphasezellen mit Maus-Anti-HumanCD146-PE gefärbt und einer Positiv-Selektion mit dem MACS-System unterzogen (Positiv-Marker: CD146). In der anschließenden FACS-Analyse wurde zudem 7-AAD zugesetzt, um den Anteil an vitalen CD146-markierten endothelialen Zellen zu bestimmen. (Vorgehensweisen der einzelnen Schritte siehe II.4.1.3, II.3.1 und II.4.2.4).

Als Referenzmethode diente eine Isolierung endothelialer Zellen aus denselben Proben mit dem DynaBeads Pan Mouse IgG der Firma Dynal (siehe II.4.2.1).

Patient	DynaBeads-System [CEC/ml Vollblut]	MACS-System, Positiv-Selektion [CEC/ml Vollblut]
Patient 1	720	35
Patient 2	704	7
Patient 3	2928	4
Patient 4	560	24
Patient 5	592	9
Patient 6	1024	4
Patient 7	1600	6

Tab. 13: **Isolierung von zirkulierenden Endothelzellen (CEC) aus Patienten-Vollblut mit dem DynaBeads-System der Firma Dynal bzw. mit dem MACS-System (Positiv-Selektion über CD146) der Firma Miltenyi.**

Wie aus Tab. 13 hervorgeht, erlaubte lediglich das DynaBead-System den Nachweis von CEC. Die Positiv-Selektion mit dem MACS-System war unabhängig von der Patientenprobe negativ. Weder bei Patienten mit gefäßschädigenden Erkrankungen wie Diabetes mellitus II, noch bei Patienten mit einer langen Bypass-Zeit, wie z.B. bei Patient 2 und 7, die sich einer Ross-Operation unterziehen mussten, konnten mit diesem System CEC isoliert und mittels FACS dargestellt werden. Diese Methode eignet sich offensichtlich nicht für die Isolierung von zirkulierenden endothelialen Zellen aus Vollblut von Patienten.

III. Ergebnisse

III.3 Weitere Optionen zum Nachweis von CEC im peripheren Vollblut

Da eine Isolierung von zirkulierenden Endothelzellen aus Patientenvollblut mit der optimierten Methode (Positiv-Selektion mit dem MACS-System) wie unter III.2 beschrieben nicht möglich war, wurden andere Strategien verfolgt:

III.3.1 Einzeitige Markierung von CEC durch Antikörper und Erythrozytenlyse

Kleine Zellpopulationen lassen sich auch direkt über spezifische Antikörperfärbungen im Vollblut nachweisen. Dazu wurde ein Aliquot der Vollblutprobe mit den entsprechenden fluoreszenzmarkierten Antikörpern zur Detektion der einzelnen Zelltypen gefärbt. Bei der anschließenden Erythrozytenlyse (BD-Lysereagenz, II.4.1.2) erfolgte gleichzeitig eine Fixierung der Zellen mit Formaldehyd.

Die gesuchten endothelialen Zellen sollten im Vollblut gleichzeitig mit vier verschiedenen fluoreszenzmarkierten Antikörpern identifiziert werden:

- Maus-Anti-HumanCD31-FITC (Endothelzell-Marker)
- Maus-Anti-HumanCD146-PE (Endothelzell-Marker)
- Maus-Anti-HumanCD45-PerCP (Blutzell-Marker)
- Maus-Anti-HumanCD34-APC (Stammzell-Marker)

Diese Vierfach-Kombination erlaubte eine Abgrenzung der Endothelzellen von den PBMC. Gesucht wurden per Definition (Fürstenberger et al. 2005) zirkulierende Endothelzellen, die als endotheliale Progenitorzellen aus dem Knochenmark beschrieben sind (siehe Einleitung). In der FACS-Analyse wurden somit Zellen erwartet, die CD146-positiv/CD31-positiv/CD34-positiv und CD45-negativ waren.

Im Folgenden sind die Ergebnisse dieser Methode anhand von zwei Patientenfällen dargestellt. Es wurden herzoperierte Patienten ausgewählt, bei denen lange Bypass-Zeiten an der HLM dokumentiert worden waren (Rekrutierung der Patienten siehe II.5.1).

III. Ergebnisse

1. Nachweis der CEC im Vollblut eines Patienten nach INCOR-Implantation (Patient 8):

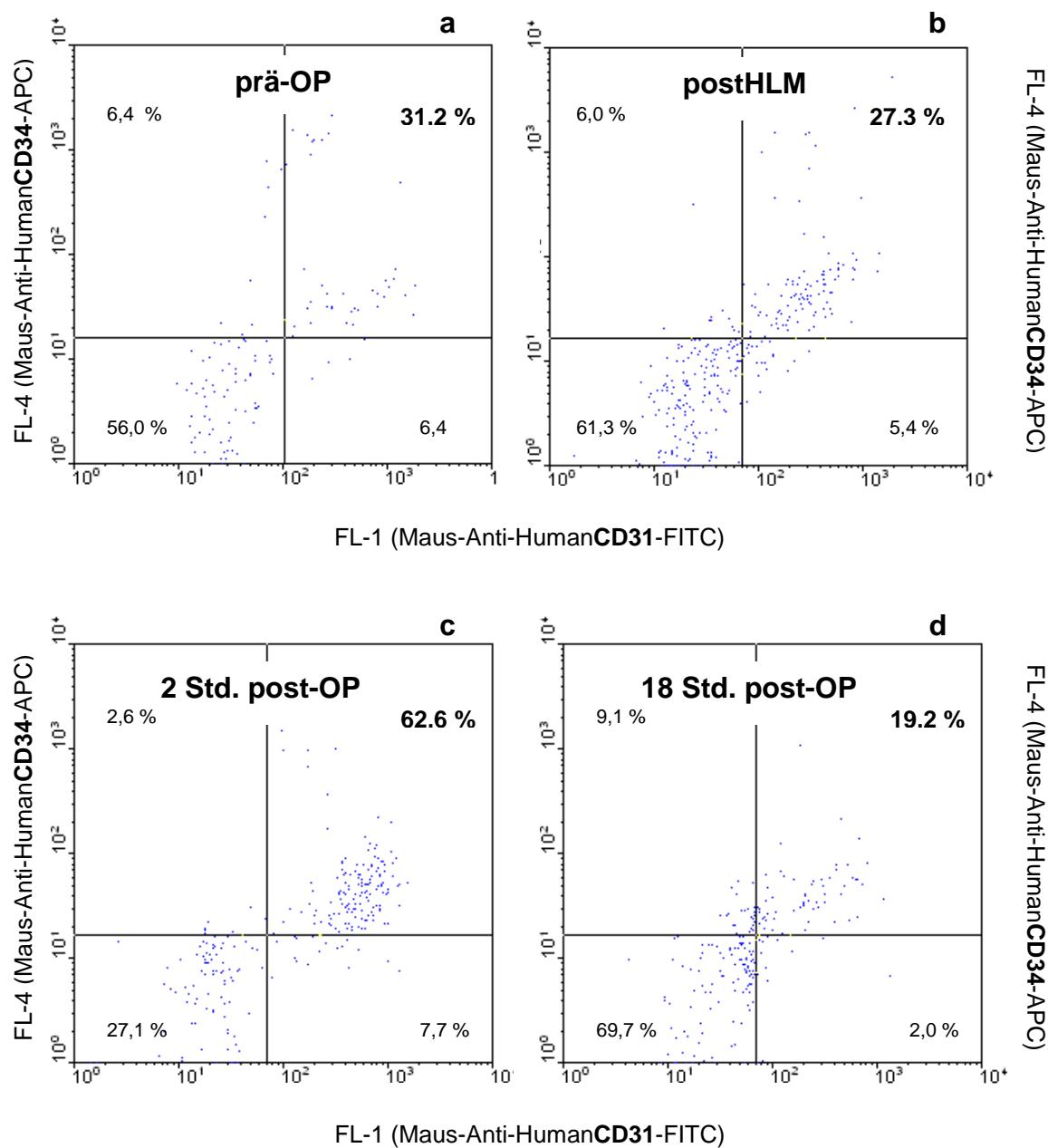


Abb. 29a-d: **CEC-Nachweis im Vollblut eines Patienten (Patient 8)** vor Implantation (a), direkt nach Abgang von der HLM (b) und zwei (c) bzw. 18 Stunden nach der Implantation (d). Darstellung von CD45-negativen, CD146-positiven mononukleären Zellen (Definition lt. II.5.1). Die Prozentzahlen geben den Anteil der über Antikörper-Markierung identifizierten Zellpopulationen an (bezogen auf die Anzahl aller CD45-negativen, CD146-positiven mononukleären Zellen).

In der Vollblutprobe des INCOR-implantierten Patienten konnte von Abgang von der HLM bis zwei Stunden postoperativ eine Zunahme der CEC-Population von 27,3 % auf 62,6 % nachgewiesen werden (Abb. 29b und c). 18 Stunden nach der Operation war die Anzahl der CEC mit 19,2 % bereits wieder auf das präoperative Niveau gefallen (Abb. 29d).

III. Ergebnisse

2. Nachweis der CEC im Vollblut eines Patienten nach Herzoperation nach Ross (Patient 9):

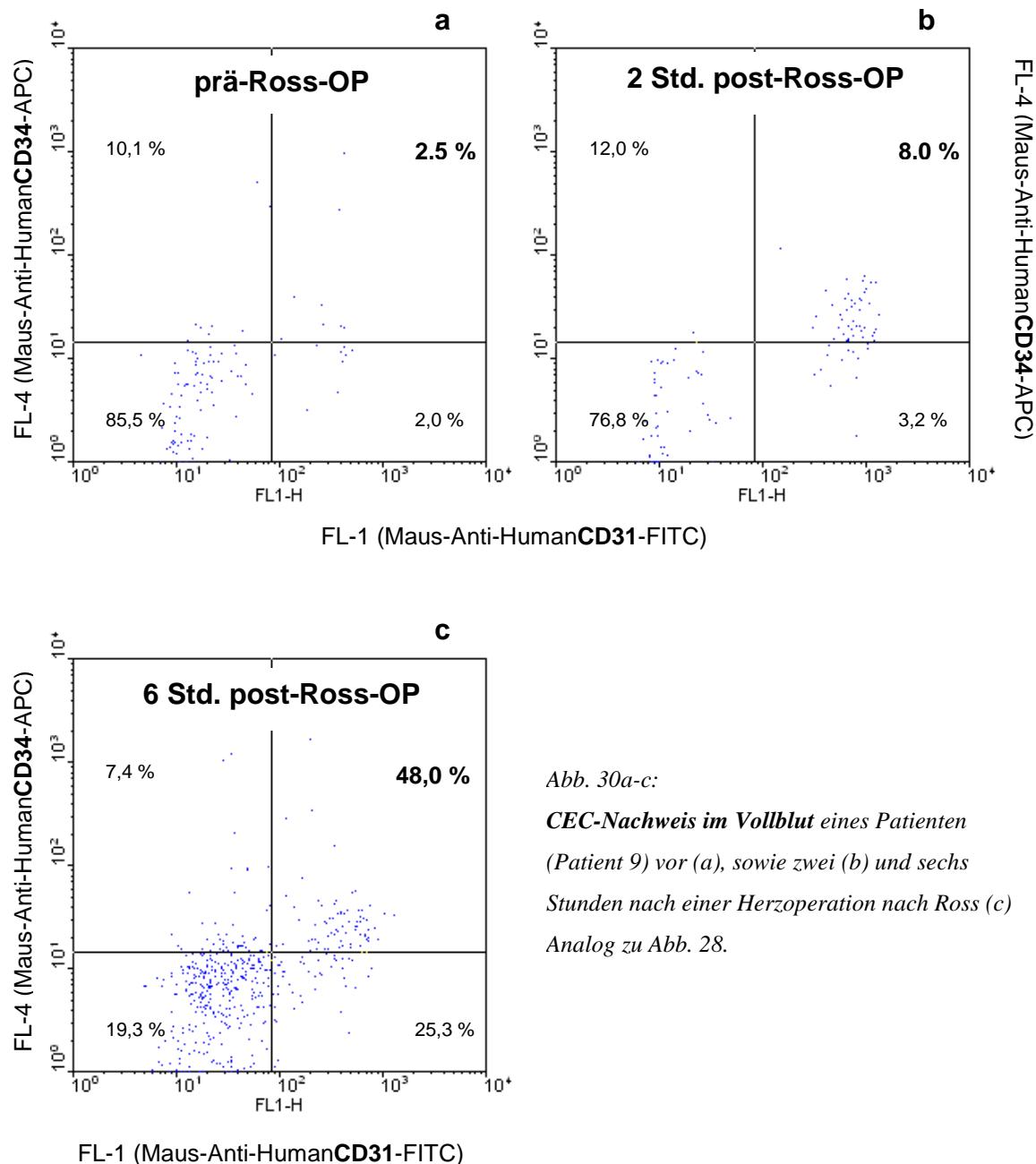


Abb. 30a-c:
CEC-Nachweis im Vollblut eines Patienten
 (Patient 9) vor (a), sowie zwei (b) und sechs
 Stunden nach einer Herzoperation nach Ross (c)
 Analog zu Abb. 28.

In der Vollblutprobe des herzoperierten Patienten konnte mit einem Anstieg von präoperativ 2,5 % auf 48,0 % sechs Stunden nach Beendigung der Operation ebenfalls eine Zunahme der CEC-Population nachgewiesen werden (Abb. 30a bis c).

III. Ergebnisse

III.3.2 Kultivierung von CEC nach Anreicherung aus Vollblut

In einer ersten Versuchsreihe wurde die Kultivierbarkeit von CEC, die entweder nach einer Ammoniumchloridlyse bzw. nach einer Dichtegradientenzentrifugation gewonnen wurden, überprüft. Trotz der optimierten Lyse-Bedingungen (III.1.1.1) war bei den Proben der Patienten 10 bis 18 auch nach einer Kultivierungszeit von drei Wochen in der Primärkultur noch keinerlei Zellwachstum zu verzeichnen. Aus diesem Grund wurde dieser Versuchsteil eingestellt und die weiteren Präparationen nur nach Dichtegradientenzentrifugation analysiert.

Das Wachstum der Zellen wurde wie folgt beschrieben:

Schwaches Wachstum: Einzeln wachsende Zellen, kein Konfluieren, kein epitheltypischer Kopfsteinpflaster-Aspekt, eher reiskorn- und y-ähnliche Morphologie.

Deutliches Wachstum: Ausbilden von Zellfortsätze und später konfluierendes Wachstum der Zellen mit epitheltypischem Kopfsteinpflaster-Aspekt.

Von den 27 Präparationen, die nach Dichtegradientenzentrifugation ausgesät worden waren, konnte in vier Fällen kein Wachstum, in fünf Fällen ein schwaches und in 18 Fällen ein deutliches Zellwachstum nach drei Wochen festgestellt werden.

Abb. 31 (S. 70) zeigt ein Beispiel einer ausgewachsenen CEC-Kultur nach Anreicherung mittels Dichtegradientenzentrifugation. Ein Problem stellte die lange Kultivierungsdauer dar. In einem Zeitraum von vier bis sechs Wochen waren von den 27 Objektträgerkulturen lediglich zwei weiterkultivierbar. Bei den restlichen Kulturen stagnierte das Wachstum bereits in der Primärkultur (p_0), oder die Kulturen mussten aufgrund einer Kontamination mit Pilzen verworfen werden.

III. Ergebnisse

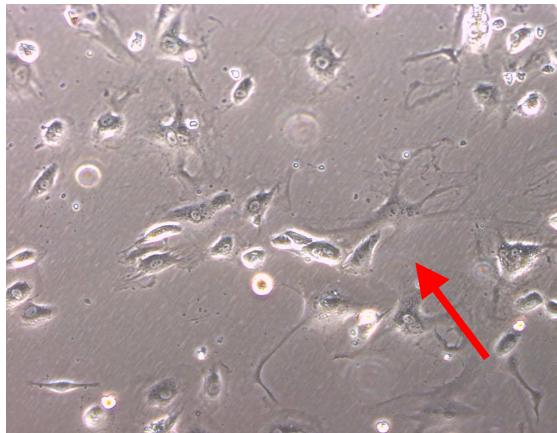


Abb. 31: **Kultivierte CEC nach Anreicherung aus peripherem Vollblut.** Auflichtmikroskopie, 40er-Objektiv. Deutliches Wachstum der CEC (Pfeil), noch nicht konfluierend. (Passage p2).

Die Objekträger-Kulturen mit deutlichem Wachstum konnten mit Dil-Ac-LDL und UEA-1-FITC positiv markiert und somit unter dem Fluoreszenzlicht als endotheliale Zellen charakterisiert werden.

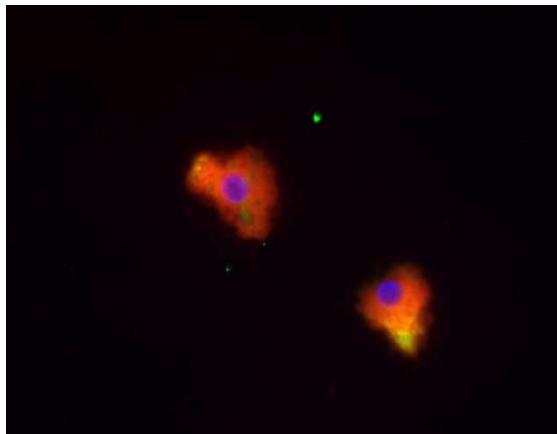


Abb. 32: **Darstellung von Endothelzellen im Fluoreszenzlicht,** 40er Objektiv, Färbung mit DAPI (→ blauer Zellkern), Dil-Ac-LDL (→ rotes Zytoplasma) und UEA-1-FITC (→ gelbgrüne Zellmembran).

Zwei Kulturen mit deutlichem Wachstum wurden weiter kultiviert. Zur weiteren FACS-Untersuchung erfolgte zunächst eine zweistündige Stimulierung der Zellen mit TNF. Anschließend wurden die Zellen mit Antikörpern gefärbt (Anti-E-Selektin-FITC, Anti-CD31-APC und Anti-CD146-PE und Anti-CD34-PerCP).

III. Ergebnisse

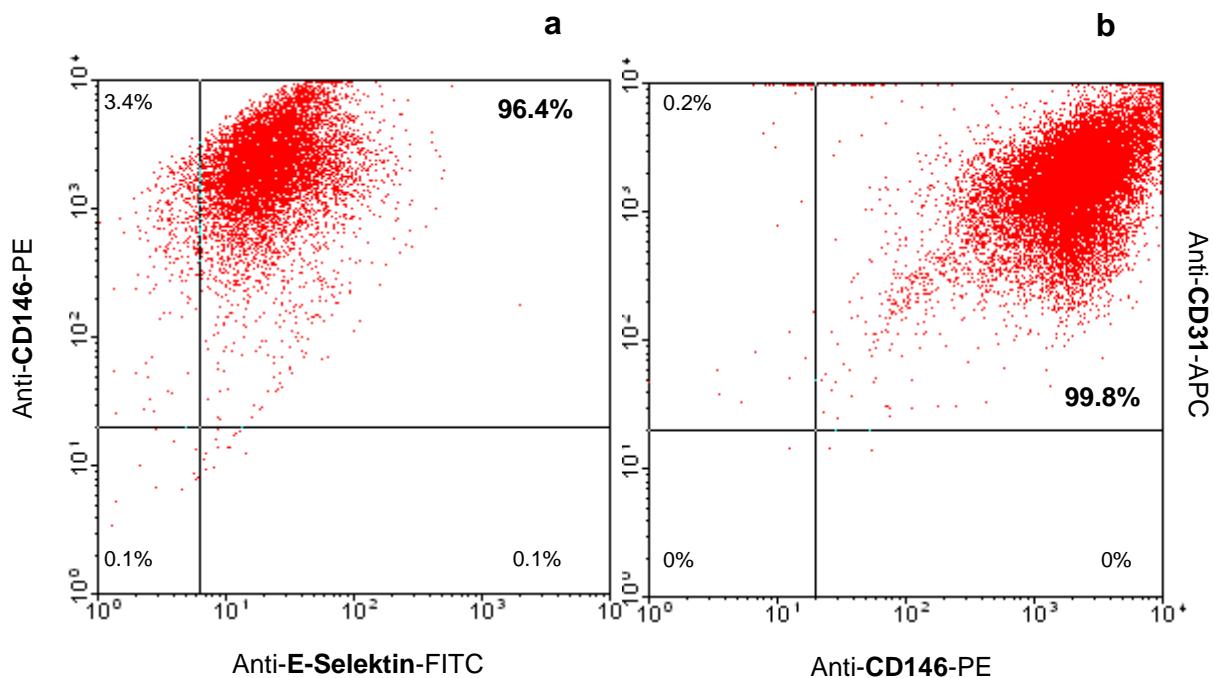


Abb. 33a und b: Darstellung einer FACS-Analyse von kultivierten CEC nach Anreicherung aus peripherem Vollblut eines Patienten nach Bypass-Operation (Patient 30).

Wie aus Abb. 33a hervorgeht, zeichneten sich die ausgewachsenen CEC durch eine positive Färbung mit Anti-CD146 und zugleich mit Anti-E-Selektin aus (über 95 %). Darüber hinaus zeigten die ausgewachsenen CD146-positiven Zellen auch eine positive Färbung für CD31 (Abb. 33 b). Diese Zellpopulation trug allerdings kein CD34 als Oberflächenmarker (*ausgewachsene = reife Zellen!*).

In der durchflusszytometrischen Analyse zeigten sich die ausgewachsenen CEC als **E-Selektin-/CD31-/CD146-positive** Zellen und wiesen sich somit als reife endotheliale Zellen aus.

III. Ergebnisse

III.4 Ergebnisse im Überblick:

- Ammoniumchloridlyse allein reichert mit Erfolg Endothelzellen (HUVEC) aus einer Vollblutprobe an, jedoch kann keine zufriedenstellende Reinheit erzielt werden.
- Durch eine Dichtegradientenzentrifugation allein können Endothelzellen (HUVEC) aus einer Vollblutprobe angereichert werden, aber auch hier ist die Reinheit nicht ausreichend.
- UEA-1-FITC und CD146 sind nicht als alleinige Marker zur EC-Definition geeignet.
- Immunomagnetische Zell-Isolierungen mit „Collection Pan Mouse IgG“ (Dynal), „BDImag Anti-MausIgG₁ Particles-DM“ (BD Pharmingen) und Depletion mit dem „MACS-System“ (Miltenyi) können Endothelzellen (HUVEC) nicht in gewünschter Weise aus Vollblut/einer gemischten Zellsuspension isolieren.
- Immunomagnetische Zell-Isolierung der Positiv-Selektion mit dem „MACS-System“ (Miltenyi) trennt erfolgreich Endothelzellen (HUVEC) und PBMC nach Dichtegradientenzentrifugation.
- CEC können über Positiv-Selektion mit dem „MACS-System“ (Miltenyi) nicht aus peripherem Vollblut von herzchirurgischen Patienten isoliert werden.
- Einzeitige Färbung der CEC im peripheren Vollblut von herzchirurgischen Patienten mit Anti-CD31, Anti-CD34, Anti-CD45 und Anti-CD146 und Erythrozytenlyse reichert die Zellen an und erlaubt eine durchflusszytometrische Analyse.
- Kultivierung der CEC aus peripherem Vollblut der herzchirurgischen Patienten gelingt nach Dichtegradientenzentrifugation mit „Ficoll Paque Plus“ und ermöglicht nach TNF-Aktivierung eine Identifizierung und Charakterisierung der Zellen mit Anti-E-Selektin, Anti-CD31, Anti-CD34 und Anti-CD146 zur durchflusszytometrischen Analyse.

IV. Diskussion

Die Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems rücken in den industrialisierten Ländern zunehmend in den Vordergrund. In Europa stehen sie auf der Liste der Todesursachen an erster Stelle. Neben den konservativen Behandlungsstrategien bietet das interventionell-operative Gebiet mehr und mehr Therapiemöglichkeiten. Anfang der 50er Jahre des letzten Jahrhunderts wurde mit der Entwicklung der Herz-Lungen-Maschine (HLM) eine wichtige Voraussetzung für längere Operationen am offenen Herzen geschaffen (Gibbon 1954). Knapp 100.000 Operationen werden in Deutschland jedes Jahr unter Einsatz einer HLM durchgeführt (Müller et al. 2006). Bei diesen herzchirurgischen Patienten tritt in ein bis zwei Prozent der Fälle ein sog. *post-pump-Syndrom* auf (Shah 1999). Die zugrundeliegenden Pathomechanismen sind noch nicht bis ins Detail verstanden. Der entscheidende Faktor in einem komplexen System aus Aktivierung von Granulozyten, Freisetzung von gewebszerstörenden Mediatoren und vielen weiteren ist die Schädigung des Endothels (Shah 1999, Ehrhardt 1999, Elhendy et Hamby 2007). Folglich kommt es zu einer Mannigfaltigkeit an Komplikationen durch gestörte Sauerstoffversorgung und Funktionsausfällen in den unterschiedlichen Geweben und Organen.

Bisher wurde der *Nachweis endothelialer Läsionen* über indirekte Marker wie Zytokine und andere Entzündungsparameter geführt: CRP (Wang et al. 2006), IL-6 (Lytvyn et al. 2004, Wang et al. 2005, Lee et al. 2005), von Willebrand-Faktor, lösliches E-Selektin (Chong et al. 2006). Der Nachweis von zirkulierenden Endothelzellen (CEC) im peripheren Blut schaffte die Voraussetzung, den Endothelschaden direkt darzustellen.

Aus Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe war bekannt, dass nach Verwendung einer HLM bei einer Bypass-Operation signifikant mehr CEC im Blut des Patienten nachzuweisen sind, als beim off-pump-Verfahren (Schmid et al. 2006). In der vorliegenden Studie sollte der Frage nachgegangen werden, ob es sich bei diesen Zellen um apoptotische reife Endothelzellen der Gefäßwand, oder aus dem Knochenmark mobilisierte Progenitorzellen handelt. Dazu war eine Charakterisierung der CEC mittels FACS-Analyse erforderlich.

Bis dato erfolgte die *Identifizierung und Quantifizierung* der CEC aus peripherem Blut der Patienten durch die paramagnetische Zell-Isolierung mit DynaBeads („DynaBeads Pan Mouse IgG“, Dynal) (Schmid et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit konnte zwar eine hohe Sensitivität dieser Methode nachgewiesen werden (mit hohen Ausbeuten bei kleinen

IV. Diskussion

Zellzahlen), allerdings beschränkte sich die Identifizierung der CEC auf zwei Marker: CD146 und Ulex-Lektin (UEA-1). Eine weitere Einschränkung stellt die unspezifische Bindung von UEA-1 an eine Subpopulation von PBMC dar, die bislang nicht beschrieben wurde. So wurde eine nähere Charakterisierung der CEC über eine Kombination von endothelialen Markern angestrebt.

Die Durchflusszytometrie stellt eine elegante Methode der *weiteren Charakterisierung* der CEC dar: Über eine Kombination mehrerer Oberflächenmarker und eine multiparametrische Analyse können Aussagen zur Herkunft der Zellen getroffen werden. Außerdem kann bereits mit geringen Probenmengen gearbeitet werden. Das ist sowohl bei perioperativen Untersuchungen von schwerkranken Patienten vorteilhaft, als auch bezüglich der erwarteten geringen CEC-Population (Schmid et al. 2006). Nicht zuletzt bietet die Durchflusszytometrie die Möglichkeit der Isolierung definierter Zellpopulationen aus einer Zellsuspension mittels Cell-Sorting. Die sortierten Zellen können dann kultiviert, vermehrt und weiter charakterisiert werden.

Neben der geforderten FACS-Analyse beeinflussten folgende Überlegungen die Auswahl der Isolierungsmethoden:

1. Um die Charakteristika der CEC möglichst unverfälscht untersuchen zu können, sollte eine Analyse der Zellen direkt aus dem Vollblut der Patienten erfolgen.
2. Aufgrund der zu erwartenden kleinen Zellpopulation von ungefähr 100 CEC pro ml Vollblut (Schmid et al. 2006a) wurde zunächst eine Anreicherung der Zellen angestrebt. Eine Erythrozytenlyse mit Ammoniumchlorid beeinträchtigte die Vitalität von Endothelzellen und reduzierte die Ausbeute deutlich. Eine Dichtegradientenzentrifugation reicherte mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) und CEC zusammen an (Woywodt et al. 2006) ohne die Vitalität der Zellen zu beeinträchtigen.
3. Das bisher verwendete DynaBead-Verfahren konnte aufgrund der Größe der verwendeten Beads für die Isolierung der CEC nicht eingesetzt werden. Systeme mit Beads kleineren Durchmessers stellten eine Alternative dar (MACS-System, Miltenyi oder BD Imag Anti-MausIgG₁ Particles-DM, BD).

IV. Diskussion

Zur Methoden-Validierung wurde ein *System mit Testzellen* verwendet, da es ethisch nicht vertretbar war, größere Mengen an Patientenblut zur Validierung einzusetzen.

Als Testzellen dienten HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) (Woywodt et al. 2004, Woollard et al. 2002). Diese Zellen sind humanen, endothelialen Ursprungs und exprimieren unter anderem den Oberflächenmarker CD146 (Strijbos et al. 2007), der vornehmlich zur Identifizierung von CEC verwendet wird (Mutin et al. 1999 und Blann et al. 2005). Außerdem sind HUVEC leicht zu präparieren und standen in unserer Arbeitsgruppe in ausreichender Menge zur Verfügung.

Das genannte Testsystem setzte sich aus Probandenblut von freiwilligen gesunden Spendern und einer definierten Anzahl an HUVEC-Testzellen zusammen. Damit war gewährleistet, dass nach erfolgter Isolierung und Analyse rechnerisch die Wiederfindung, Reinheit und Vitalität der eingesetzten HUVEC ermittelt werden konnte. Zudem war eine Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Testergebnisse möglich.

Zunächst wurden die Proben einer *Erythrozytenlyse* unterzogen, mit dem Ziel Erythrozytenfreie Zellpellets zur FACS-Analyse einzusetzen. Denn durch ihren hohen Gehalt an Hämoglobin störten die Erythrozyten die durchflusszytometrischen Messungen.

Bei Versuchen mit unserem Testsystem garantierte die Ammoniumchloridlyse zwar eine hohe Wiederfindung der Testzellen, jedoch störte ein starkes Hintergrundsignal (Debris und verbliebene Erythrozyten) die anschließende FACS-Messung. Eine Wiederholung der Lyse eliminierte diese Verunreinigungen, allerdings traten hohe Verluste durch Apoptose bzw. Zerstörung der Testzellen auf, was sich in einer verminderten Wiederfindung und Vitalität der HUVEC bemerkbar machte. Rustemeyer et al. (2007) machten eine vergleichbare Beobachtung: Der Prozentsatz überlebender endothelialer Progenitorzellen (EPC) nach Erythrozytenlyse war signifikant herabgesetzt. So ergab eine vergleichende EPC-Isolierung durch Erythrozytenlyse und magnetische Beads eine 20 % niedrigere Wiederfindung nach Lyse. Darüber hinaus werden formaldehyd-haltige Reagenzien zur Erythrozytenlyse eingesetzt. Diese Methode erlaubt allerdings keine Aussage über die Vitalität der Endothelzellen, da die Zellen durch Formaldehyd fixiert werden. Gleichzeitig wird damit die Option einer anschließenden Kultivierung der Zellen von vorneherein ausgeschlossen.

IV. Diskussion

Alternativ zur Erythrozytenlyse wird eine *Dichtegradientenzentrifugation* vorgeschlagen. Sie stellte mit einer Wiederfindung von 100 % und einer Vitalität der HUVEC von über 90 % in unserem Testsystem einen suffizienten Isolierungsschritt der Zellen aus Vollblut dar. Da keine spezifische Isolierung erfolgte, sondern lediglich Zellen derselben Dichte zusammen angereichert wurden (HUVEC finden sich in der Fraktion der mononukleären Zellen = PBMC wieder, Woywodt et al. 2006), war auch keine hohe Reinheit zu erwarten. Somit kann die Methode nicht allein zur Isolierung von CEC verwendet werden. Allerdings eignet sie sich hervorragend als erster Schritt der Zellanreicherung vor einer immunomagnetischen Isolierung oder in Kombination mit anderen Verfahren (siehe unten).

Um das Problem der geringen Reinheit zu beheben, musste die Dichtegradientenzentrifugation mit anderen Verfahren kombiniert werden. In diesem Sinne wurden einige Systeme ausgetestet, die zur Isolierung definierter Zellpopulationen mit paramagnetischen Partikeln arbeiten. Die *immunomagnetische Isolierung* allgemein ist laut Woywodt et Haubitz (2003) und Dignat-George et al. (2000) der Goldstandard zum Nachweis und der Quantifizierung von Endothelzellen. Cell-Sorting mithilfe von immunomagnetischen Partikeln wird in der Literatur vielfach als adäquate Methode zur Endothelzell-Isolierung beschrieben (Delorme 2005, Mutin 1999, Griwatz 1995). Der gemeinsame Nenner aller Isolierungstechniken war die Isolierung über CD146. Damit wurde zwar die Forderung einer Kombination von endothelialen Markern noch nicht erfüllt. Doch zunächst sollte erst einmal der Nachweis CD146-positiver Zellen aus peripherem Blut per se geführt werden.

Als Erstes wurde das sogenannte „*Collection Pan Mouse IgG*“ (Dynal) untersucht, eine Modifikation des bewährten Isolierungs-Systems („DynaBeads Pan Mouse IgG“, Dynal). Dieses System arbeitet mit den gleichen Beads, die indes mit einem DNA-linker zwischen Beads und Antikörpern versehen sind. Durch einen DNase-Verdau nach erfolgter Zelltrennung sollte es möglich sein, die Beads wieder von den Zellen zu lösen. Der DNase-Verdau war zu 100 % erfolgreich. Eine quantitative Auswertung der isolierten Zellen gestaltete sich aber schwierig, da ein Großteil der Zellen zerstört war (viele Zellfragmente). Außerdem waren große Zellaggregate in den Proben enthalten. Dies bedingte eine Wiederfindung von 55 bis 60 %.

Werther et al. (2000) verwendeten ein ähnliches DNA-gelinktes System zur Isolierung von Karzinomzellen aus PBMC-Suspensionen („RAM IgG1 Collection Kit“, Dynal). Sie bestätigten mit 60 % eine geringe Wiederfindung bei Isolierung mit Systemen dieser

IV. Diskussion

Funktionsweise. Die Gründe für die Schädigung der Zellen dürften bei den Reagenzien und Bedingungen während des enzymatischen Lyse-Schrittes zur Ablösung der Beads zu suchen sein, da bis zu diesem Zeitpunkt kein Zellverlust zu verzeichnen war. Am naheliegendsten war die Veränderung der Inkubationszeit mit DNase. Da eine Variation hinsichtlich der Reaktionszeit keinerlei Einfluss auf die Integrität der Zellen hatte, die gewollte Enzymwirkung aber nachließ, wurden weitere Versuche mit diesem System eingestellt.

Das System „*BD Imag Anti-MausIgG₁ Particles-DM*“ (*BD Pharmingen*) verwendet mikroskopisch kleine Beads, die den Vorteil bieten, mit durchflusszytometrischen Analyzern kompatibel zu sein.

Im Gegensatz zu den DynaBead-Systemen war hier laut Herstellerangaben eine Zell-Isolierung aus Vollblut nicht möglich. Deshalb wurde zuvor eine Dichtegradientenzentrifugation vollzogen und mit einer Suspension der Interphasezellen weitergearbeitet. Unsere Versuchsansätze mit Testzellen lieferten hohe Zellverluste von über 40 %. Einen Zellverlust durch die Dichtegradientenzentrifugation konnten wir ausschließen. Andere Ursachen könnten häufige Pipettierschritte und das geforderte Absaugen des Überstandes „bis das Pellet trocken ist“ sein. Der vorgeschriebene Einsatz eines 70 µm-Filters zur Entfernung von Zellaggregaten könnte ebenfalls ein Grund für den Zellverlust darstellen. Die Größe von HUVEC wird mit (10) 20 bis 50 µm angegeben (Woywodt et al. 2004, Mutin et al. 1999), jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Filter einen Teil der Zellen zurückhält. Weiterhin wäre eine unspezifische Bindung von Maus-Anti-HumanCD45 an die Anti-Maus-Antikörper, die die Grundbeschichtung der BD-Beads darstellen, denkbar. Letzteres würde die Auswertung im FACS beeinflussen. Aufgrund der hohen Zellverluste wurde diese Methode nicht weiter verfolgt.

Neben den oben beschriebenen Systemen zur immunomagnetischen Zellisolierung gibt es das „*MACS-System*“ der Firma Miltenyi, dessen extrem kleine paramagnetische Beads ebenfalls für die geforderte FACS-Analyse geeignet sind. Zwei Strategien boten sich im Anschluss an eine Dichtegradientenzentrifugation für die Isolierung von CEC an: Eine Positiv-Selektion der endothelialen Zellen (siehe unten) sowie eine Negativ-Selektion (= Depletion). Letztere entfernt unerwünschte Zellen aus der Suspension und lässt die Zielzellen unberührt (Prinzip der „untouched cells“). Je geringer die Belastung der Zellen ist, umso günstiger wirkt sich das unter Umständen auf eine eventuelle spätere Kultivierung oder weitere Untersuchung aus.

IV. Diskussion

In diesem Sinne verfolgten wir mit einer *Depletion* das Ziel, alle Blutzellen über den Oberflächenmarker CD45 aus den Proben zu entfernen (Blutzellen: CD45-positiv, HUVEC/CEC: CD45-negativ) und nur CD45-negative Zellen der FACS-Analyse zuzuführen. Trotz wiederholter Experimente konnten wir in unserem Testsystem unter vergleichbaren Bedingungen keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielen. Größtes Problem bei dieser Isolierungsmethode waren die starken Schwankungen bei der Wiederfindung der HUVEC, die zwischen zwölf und 100 % lagen. Ein Grund dafür könnten Zellverluste während der Prozedur der Depletion sein. So wurde diskutiert, ob die Beschaffenheit der Trennsäule (z.B. Größe, Trennmaterial, Trennfläche) die hohe Streuung bedingen könnten. Alle verfügbaren Säulen wurden getestet, allerdings konnte die Wiederfindung der HUVEC nicht verbessert werden. Darüber hinaus lag auch die Reinheit der isolierten Zellfraktion bei < 60 % Endothelzellen. Dies könnte auf eine ungenügende Antikörper-Bindung an die Blutzellen zurückzuführen sein. Unspezifische Bindungen der Antikörper wurden ausgeschlossen, da der Anti-CD45-Antikörper nachweislich nicht an HUVEC bindet.

Die schlechte Reproduzierbarkeit der Depletion und die unzureichende Reinheit der isolierten HUVEC waren Argumente, die gegen eine Anwendung dieser Methode zur Isolierung von CEC aus Patienten-Vollblut sprachen.

Wie oben erwähnt, erlaubt das MACS-System auch eine *Positiv-Selektion* von Endothelzellen. Zwar wurden die Endothelzellen hier mit Anti-HumanCD146-Antikörper markiert und somit nicht vollständig unberührt gelassen, die Isolierung erfolgte aber über die Fluoreszenzmarkierung (PE) des Antikörpers. Mit der Selektion über Anti-PE-MicroBeads erzielten wir Reinheiten von 75 bis 100 %. Die Wiederfindung der HUVEC war ebenfalls sehr hoch (> 80 %), die Vitalität der Zellen lag über 75 %.

Martin et al. (1998) validierten ein ähnliches Testsystem mit „MACS“ zur Isolierung von zirkulierenden epithelialen Tumorzellen aus Vollblut (über Anti-Zytokeratin8-Antikörper auf MicroBeads). Sie arbeiten nach eigenen Angaben bereits erfolgreich mit Patientenblut, obwohl sie bei Versuchen mit dem Testsystem nur eine Wiederfindung von 58 % angeben können.

Die Positiv-Selektion mit dem „MACS-System“ (Miltenyi) lieferte also vielversprechende Ergebnisse für die Isolierung von Testzellen (HUVEC) aus Vollblut. So wurde diese validierte Methode für die erste Versuchsreihe zur *Isolierung von CEC aus peripherem Vollblut von herzchirurgischen Patienten* eingesetzt. Als Referenz diente die Quantifizierung

IV. Diskussion

mit dem System „DynaBeads Pan Mouse IgG“ der Firma Dynal (Schmid et al. 2006, Skrabal et al. 2006).

Zur Isolierung von CEC oder EPC aus dem Vollblut von herzchirurgischen Patienten gibt es nur wenig Literatur. Es handelt sich um eine sehr kleine Fraktion von Zellen, die bei FACS-Analysen nur schwer nachweisbar ist. Erst eine multifaktorielle Untersuchung sollte Aufschluss über die Beschaffenheit und die geringe Populationsdichte dieser Zellen geben (Dignat-George, Sabatier, Blann et Woywodt et al. 2007). Ein wesentliches Problem stellt die geringe Zellzahl dar, die häufig unter der Nachweisgrenze des Meßsystems liegt (Dignat-George et al. 2007).

Während die Referenzmethode zwischen 500 und 4000 CEC pro ml Vollblut der Patienten dokumentierte, war eine Isolierung oder Quantifizierung dieser Zellen mittels Positiv-Selektion des MACS-Systems (Miltenyi) nicht möglich. Die Ausbeuten lagen bei 0 bis 30 CEC pro ml Vollblut in denselben Proben. Eine Isolierung von CEC aus Vollblut über die Markierung des CD146-Oberflächenmarkers war mit diesem System entgegen der Erwartung nicht möglich. Die Gründe dafür werden im Folgenden diskutiert:

1. Verlust der CEC bei der Dichtegradientenzentrifugation.

Eventuell ist die Vulnerabilität der CEC verglichen mit den HUVEC erhöht, sodass sie bei der physikalischen Belastung durch die Dichtegradientenzentrifugation (15 Minuten bei 650 x g, Raumtemperatur) zerstört werden. Ein Verlust von HUVEC bei der Ficoll-Auftrennung wurde ausgeschlossen (100 % Wiederfindung). Die angenommene Empfindlichkeit der CEC könnte die Hypothese der apoptotischen Endothelzellen, die sich von der Gefäßwand lösen und so in das periphere Blut gelangen (Bonello et al. 2006, Delorme et al. 2005, Petrishchev et al. 2001), stützen. Woywodt et al. (2006) sprechen beim Vergleich verschiedener Isolierungsmethoden von CEC aus Vollblut ebenfalls von schlechteren Ausbeuten nach Dichtegradientenzentrifugation. So lag die Ausbeute nach Anwendung der Referenzmethode bei 4,25 CEC pro ml Vollblut von Patienten mit akutem Koronarsyndrom bzw. bei 1,37 CEC pro ml Vollblut von gesunden Probanden. Nach Dichtegradientenzentrifugation wurden lediglich 3,37 CEC pro ml Vollblut von Patienten mit akutem Koronarsyndrom bzw. 1,00 CEC pro ml Vollblut von gesunden Probanden gefunden.

IV. Diskussion

2. Sukzessiver Verlust der CEC durch viele Einzelschritte.

Unser Protokoll beinhaltet eine Vielzahl von Einzelschritten (Dichtegradientenzentrifugation, Beschichtung mit Anti-CD146-Antikörpern und Anti-PE-MicroBeads, „MACS“-Separation, Gegenfärbung mit Anti-CD45-Antikörpern und 7-AAD für FACS-Analyse). Schon im Testsystem konnte gezeigt werden, dass durchschnittlich 10 % der eingesetzten HUVEC in der Trennsäule zurückbleiben können. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass bei der Isolierung ein gewisser Prozentsatz an Zellen verloren geht. Bei sehr kleinen Populationen machen sich schon geringe Verluste prozentual stark bemerkbar.

3. Probleme bei der Darstellung der CEC im FACS.

Wir vermuten, dass nach (vorausgesetzter) erfolgreicher Positiv-Selektion die CEC bei der FACS-Analyse eventuell nicht nachweisbar waren: Die CEC-Population könnte bei Patienten der HTC dafür zu gering sein (bis ~ 50 CEC/ml laut Skrabal et al. 2006, bis ~ 100 CEC/ml laut Schmid et al. 2006). Um eine FACS-Messung sinnvoll durchführen zu können, werden mindestens 5.000 bis 10.000 Zellen in Suspension benötigt. Ab 500 Zellen ist eine Population deutlich als solche definierbar, wie wir in unserem Testsystem zeigen konnten. Bei herzchirurgischen Patienten mit 100 CEC pro ml Vollblut wären mindestens 50 ml Blut pro Analyse zu entnehmen, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten. Das ist aus klinischen und ethischen Gründen nicht durchführbar, noch dazu, wenn mehrere Analysen prä- und postoperativ erfolgen sollen.

Die Arbeitsgruppe von Gill et al. (2001) hat hingegen bei einem ähnlichen Patientenkollektiv sehr viel höhere Zellzahlen ermittelt: Ihre Messungen ergaben bei Bypass-Patienten 6 Stunden postoperativ Zahlen von 18.000 bis 52.000 CEC pro ml Vollblut. Nach Dichtegradientenzentrifugation wurden die CEC über Anti-HumanVEGF-R2 (positiv) bzw. Anti-HumanVE-Cadherin (positiv) und Anti-HumanCD15 (negativ) identifiziert. Fraglich ist bei den angegebenen FACS-Daten, warum alle Populationen CD15-negativ dargestellt waren, obwohl auch Monozyten diesen Marker tragen. Monozyten sind nach Dichtegradientenzentrifugation noch in der Zellsuspension enthalten. Die Vermutung liegt nahe, dass der entsprechende Antikörper nicht gebunden hat. Folglich könnten die Endothelzellen zu hoch beziffert worden sein. Leider wurde keine weitere endotheliale Markierung durchgeführt. Die Zellzahlen erscheinen somit fragwürdig.

IV. Diskussion

4. Aggregatbildung der CEC.

Ein weiteres Problem für die durchflusszytometrische Messung stellte die Aggregatbildung der Endothelzellen dar, die eine korrekte Messung und Zellzahlbestimmung im FACS verhinderte. Woywodt et al. (2004) beschreiben diese Erscheinung. Selbst die mit der Referenzmethode isolierten Zellen zeigten häufig diese Aggregatbildung, die mikroskopisch nachgewiesen werden konnte.

Abschließend bleibt Folgendes kritisch zu bemerken: Arbeitsgruppen unterschiedlicher Fachrichtungen isolieren seit Jahrzehnten Endothelzellen (Bouvier et al. 1970, Hladovec et al. 1978). Seit den 90er Jahren erfolgt dies zunehmend über den Oberflächenmarker CD146, der sich infolgedessen als Endothelzellmarker etablierte (Sbarbati et al. 1991, George et al. 1992, Hristov et al. 2004, Blann et al. 2005, Khan et al. 2005). Allerdings haben inzwischen mehrere Forschungsgruppen festgestellt, dass verschiedene Populationen endothelialer Zellen im Blut vorkommen und nicht alle Zellen CD146 exprimieren (Hristov et al. 2004, Hunting et al. 2005, Duda et al. 2007, siehe auch Tab. 14). Zudem wurde klar, dass nicht ausschließlich Endothelzellen CD146 auf der Zelloberfläche tragen, sondern z.B. auch aktivierte T-Zellen (Elshal et al. 2005, Middleton et al. 2005, Duda et al. 2007, Strijbos et al. 2007, siehe auch Tab. 15, S. 82).

Hristov et al. 2004		
Oberflächenmarker	Unreife EPC	Reife EC
CD133	+	-
CD34	+	-
VEGF-R2	+	+
CD31	-	+
CD146	-	+
ENOS	-	+
VE-Cadherin	-	+
vWF	-	+

Hunting et al. 2005		
Oberflächenmarker	Unreife EPC	Reife EC
CD133	+	-
CD117	+	-
CD38	+	-
VE-Cadherin	+	+
CD34	+	+
VEGF-R2	+	+
CD146	-	+
vWF	-	+

Tab. 14: Zwei Beispiele für die inkonstante Zuordnung verschiedener Oberflächenmarker und der daraus resultierenden uneinheitlichen Definition von EPC bzw. CEC.

IV. Diskussion

Arbeitsgruppe	CD146-positive Zellen
Elshal et al. 2005	T-Lymphozyten-Subpopulation
Middleton et al. 2005	Perizyten, glatte Muskelzellen von Gefäßwänden
Duda et al. 2007	Lymphozyten-Population
Strijbos et al. 2007	T-Lymphozyten-Subset

Tab. 15: Auswahl nicht-endothelialer, CD146-positiver Zellen

Darüber hinaus kann CD146 auch in löslicher Form im Plasma auftreten, sich an beliebige Zellen anlagern und für falsch positive Ergebnisse bei der Isolierung von CEC sorgen (Bardin et al. 1998, Malyszko et al. 2004, Elshal et al. 2005).

CD146 ist also ein Marker für endotheliale Zellen, aber nicht mit der absoluten Spezifität wie lange Zeit angenommen. Er sollte demnach nicht allein zur Definition der Endothelzellen herangezogen werden. Zusammen mit anderen Endothelzellmarkern (CD31, VEGF-R2, VE-Cadherin u. a.) oder Progenitorzellmarkern (CD34, CD133 o. a.) wird er aber nach wie vor zum Einsatz kommen. Möglich ist auch eine Kombination der Antikörper-Färbung mit anderen Methoden zur Isolierung von CEC, wie bei der Diskussion zur Dichtegradientenzentrifugation bereits angemerkt.

Da es uns nicht gelungen ist, CEC aus Vollblut von herzchirurgischen Patienten mit der neu validierten Methode des MACS-Systems darzustellen, haben wir zwei weitere Strategien zur Isolierung/Charakterisierung von CEC verfolgt.

1. Einzeitige Markierung von CEC mit Antikörpern und Erythrozytenlyse:

Nach Fürstenberger et al. (2005) verfolgten wir zunächst eine direkte Färbung der CEC im Vollblut. Die Identifizierung der Zellen erfolgte über folgende Epitope: CD31-positiv, CD34-positiv, CD45-negativ und CD146- positiv. Fürstenberger et al. (2005) beschreiben eine Isolierung und Quantifizierung von EPC aus dem Vollblut von Brustkrebspatientinnen mit dieser Methode. Eine parallel durchgeführte real-time PCR der CD146-mRNA bestätigte durch signifikante Korrelation der Ergebnisse den zuverlässigen Nachweis der Zellen mittels der Durchflusszytometrie.

IV. Diskussion

In die vorliegende Untersuchung wurde ein Patient, der herztransplantiert und ein weiterer Patient, an dem eine Operation nach Ross durchgeführt wurde, eingeschlossen. Es wurde ein positiver Nachweis der CEC geführt. Der verzeichnete postoperative Anstieg der CEC (Patient 8 und Patient 9) mit einem Maximum bei 6 Stunden nach der Operation (Patient 9) ist aus früheren Untersuchungen bereits bekannt (Schmid et al. 2006, Gill et al. 2001) und bestätigte die Erwartungen des quantitativen Ergebnisses.

Die Mehrfach-Färbung mit Antikörpern und eine Erythrozytenlyse scheint die CEC aus peripherem Vollblut der HTC-Patienten verlässlich anzureichern und zu markieren, sodass sie durch die FACS-Analyse charakterisiert, quantifiziert und von Blutzellen sicher abgegrenzt werden können. Dieses positive Ergebnis bedarf der Bestätigung in weiteren Versuchsreihen.

2. Kultivierung von CEC nach Anreicherung aus Vollblut:

Die zweite Option verlangte eine Anreicherung der CEC durch Erythrozytenlyse oder Dichtegradientenzentrifugation, der Aussaat und Kultivierung folgen. Die kultivierten Zellen wurden mit Endothelzellmarkern gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Wir verwendeten „Ficoll Paque Plus“ zur Dichtegradientenzentrifugation und EBM-2 MV mit Wachstumsfaktoren zur Kultivierung. Fluoreszenzmarkierung erfolgte mit Dil-Ac-LDL, UEA-1-FITC und DAPI vor Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop, bzw. mit Anti-CD31-APC, Anti-CD34-PerCP, Anti-CD146-PE und Anti-E-Selektin-FITC für die FACS-Analyse.

Da unsere vorherigen Ergebnisse der Erythrozytenlyse und Markierung mit Antikörpern erfolgreich waren, wurden parallel zum Ansatz der Dichtegradientenzentrifugation Versuche mit Ammoniumchloridlyse und anschließender Aussaat der Zellen durchgeführt, restliches Protokoll wie oben.

Die ausgesäten Zellen nach Erythrozytenlyse zeigten keinerlei Wachstum. Wir vermuten, dass die Zellen durch das aggressive Lysereagenz soweit geschädigt wurden, dass kein Anwachsen in Kultur mehr möglich war. Rustemeyer et al. haben bereits ein herabgesetztes Überleben der EC nach Erythrozytenlyse beobachtet (20 % weniger Zellen nach Lyse im Vergleich zu anderen EC-Isolierungen, Rustemeyer et al. 2007).

Die nach Dichtegradientenzentrifugation kultivierten Zellen zeigten in 15 % der Fälle kein und in 19 % der Fälle nur ein schwaches Wachstum. In 66 % der Präparationen (18 aus 27) war ein deutliches Wachstum erkennbar. Allerdings verringerte sich die Ausbeute auf 2 von 27 Präparationen. Grund dafür war ein hoher Prozentsatz an Kontamination durch Pilze (lange Kultivierungszeit von bis zu sechs Wochen). Außerdem stellten 7 von 18 Kulturen

IV. Diskussion

(39 %) ihr Wachstum nach der ersten Passage ein. Die verbleibenden zwei Kulturen wurden anschließend positiv für Dil-Ac-LDL und UEA-1 dargestellt. Eine durchflusszytometrische Analyse beschrieb die ausgewachsenen Zellen als endotheliale Zellen – sie waren CD34-negativ, E-Selektin-positiv, CD31-positiv und CD146-positiv. Vergleichbare Untersuchungen an ausgewachsenen mononukleären Zellen wurden von Kalka et al. (2000) durchgeführt. Nach einer Kultivierungszeit von sieben Tagen in Endothelzell-Basalmedium (EBM-2) mit Supplement wurden die Zellen mit Dil-Ac-LDL und UEA-1-FITC gefärbt und die doppelt angefärbten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop als EPC identifiziert. Chen et al. führten die Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll durch und kultivieren die Zellen in M199 mit 20% FKS, VEGF, Streptomycin und Penicillin (Chen et al. 2004). Auch diese Gruppe identifizierte diese Zellen als endotheliale Progenitorzellen.

Für zukünftige klinische Fragestellungen muss berücksichtigt werden, dass die DynaBeads-Methode lediglich zur Quantifizierung der CEC, nicht zu deren Charakterisierung geeignet ist. Letzteres erreicht man nur durch eine direkte Antikörper-Markierung im Vollblut mit anschließender Erythrozytenlyse und FACS-Messung. Indirekt ist es auch möglich, die CEC über Dichtegradientenzentrifugation anzureichern und die mononukleären Zellen anschließend zu kultivieren. Allerdings handelt es sich dann nicht mehr um die ursprünglichen gesuchten und isolierten Zellen. Eine Differenzierung der Zellen während der Kultivierung muss in Kauf genommen werden.

V. Ausblick für den klinischen Einsatz von CEC

Mit der Isolierung der CEC aus Patientenvollblut eröffnen sich mehrere neue Möglichkeiten auf den Gebieten der Diagnostik, Prognostik und Therapie diverser Herz-/Gefäß- und Tumorerkrankungen.

Eine *quantitative Bestimmung* der CEC dient dem direkten Nachweis endothelialer Schäden (Boos et al. 2007, Delorme et al. 2005). Die Diskriminierung zwischen CEC als apoptotische, abgeschilferte Zellen und EPC als Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, die Teil der Reparaturvorgänge des Endothels sind, kann dabei eine Aussage über das Gleichgewicht zwischen Verletzung und Reparaturmechanismen des Endothels treffen (Bonello et al. 2006). Obwohl CEC bei Gesunden kaum auftreten (Bonello et al. 2006) und die Höhe der nachgewiesenen CEC mit der Schwere der Gefäßerkrankung/Läsion des Endothels korreliert (Boos et al. 2007), kann kein pathologischer cut-off angegeben werden, da weitere Faktoren wie Alter (Scheubel et al. 2003), Medikation (PGI2, Sinzinger et al. 1988) und Risikoverhalten (Rauchen, Blache et al. 1992, Sinzinger et al. 1988) die CEC beeinflussen. Die Bedeutung der CEC-Quantifizierung liegt vielmehr in Verlaufskontrollen, die die Entwicklung der aktuellen Situation zeigen. Im klinischen Alltag kann dies Anwendung zur Therapiekontrolle oder Kontrolle des Fortschreitens einer Krankheit finden. Fürstenberger et al. (2005) bezeichnen CEC beispielsweise als *surrogate marker* für Tumor-Angiogenese und somit Tumorwachstum und Metastasierung.

Mit der Korrelation der Anzahl der CEC und der Schwere einer Erkrankung lassen sich *prognostische Aussagen* treffen. Boos et al. 2007 fanden eine signifikante positive Korrelation zwischen steigenden CEC-Werten und steigendem kardiovaskulärem Risiko bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom (Boos et al. 2007). Auch Lee et al. untersuchten den prognostischen Wert der CEC bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom und entdeckten sie als einzigen unabhängigen Vorhersage-Parameter für den sogenannten „MACE“ (major cardiovascular endpoint) und den Todesfall (Lee et al. 2005).

Aufgrund der prognostischen Wertigkeit der CEC kann ihre Bestimmung zur Einschätzung einer Krankheit bei Diagnosestellung und Auswahl einer Therapie beitragen.

Erste Untersuchungen zum Einsatz von CEC bzw. EPC als *therapeutisches Mittel* zur Heilung diverser Erkrankungen wurden bereits vorgestellt.

V. Ausblick

Roberts et al. (2007) untersuchen Blutproben von Patienten bei elektiven und Notfall-Herzoperationen. Sie zeigten eine Mobilisation von EPC (über den Nachweis von EPC-CFU, colony forming units) nur bei elektiven Eingriffen und bezeichneten die EPC als ein „mögliches therapeutisches Ziel“.

Kalka et al. waren bereits im Jahr 2000 einen bedeutenden Schritt weiter gegangen, indem sie humane EPC in Mäuse mit Ischämie eines Hinterlaufs transplantierten. Sie verzeichneten eine deutliche Zunahme der Kapillardichte und Durchblutung und eine signifikant geringere Verlustrate der Extremitäten nach Transplantation. Um das Gleichgewicht zwischen Angebot und Nachfrage an EPC auch bei menschlichen Patienten zugunsten des Angebots zu verschieben, schlagen sie vor, mit Wachstumsfaktoren (zum Beispiel GM-CSF, granulocyte/monocyte- colony stimulating factor) die Mobilisation der EPC aus dem Knochenmark zu fördern und/oder in vitro vermehrte patienteneigene EPC zurück zu transfundieren (Kalka et al. 2000).

Nicht nur die schnelle Revaskularisierung bei ischämischen Arealen ist wünschenswert, sondern auch eine rasche Re-Endothelialisierung nach Verletzung des Endothels. Zum Beispiel verursachen therapeutische Maßnahmen (Ballon-Dilatation oder Stent-Implantation) bei atherosklerotischen Veränderungen der Herzkranzgefäße Endothelläsionen, die zu einer lokalen Thrombusbildung und Re-Stenosierung des Gefäßes führen können (Shirota et al. 2003). So entwickelten Shirota et al. mit Verfahren des *tissue-engineering* verschiedene Stents, die mit EPC besiedelt wurden. Diese Zellen stammen aus dem peripheren Vollblut von Kaninchen und wachsen auf dem Stent-Material und darüber hinaus in den Zwischenräumen als konfluente monozelluläre Schicht.

Neben verletztem Endothel stellen auch alle implantierten, nicht-beschichteten Grafts an sich eine potentiell thrombogene Gefahrenquelle dar. Sodian et al. beschäftigten sich mit der Entwicklung von künstlichen Herzklappen. Sie konstruierten eine Drei-Flügel-Klappe aus Polyhydroxyalkanoat, die ebenfalls mit vaskulären Zellen überzogen wurde. Hier wurden die Zellen aus den Halsschlagadern von Schafen gewonnen. Sie wuchsen als Monolayer auf und in die Poren des Klappenmaterials, zeigten gute Fähigkeit zur Proliferation und Kollagenbildung (Sodian et al. 2000).

Es wird künftig eventuell möglich sein, auch humane EPC der Patienten *ex vivo* zu expandieren und damit Stents oder andere Grafts zu beschichten, um diese den Patienten zu implantieren und dadurch die Thrombogenität der Implantate zu minimieren.

VI. Anhang**VI.1 Hilfs- und Analysengeräte**

Autoklav Varioclav Dampfsterilisator	H + P Labortechnik GmbH (Oberschleißheim, D)
Bunsenbrenner Fireboy mit automatischer Zündung	Tecnomara Deutschland GmbH (Fernwald, D)
CASY1 Cell Counter and Analyser System, Model TTC	Schärfe Systems GmbH (Reutlingen, D)
CO ₂ -Begasungs-Brutschrank CO ₂ -Auto-Zero	Heraeus Holdings GmbH (Hanau, D)
Dispensiersystem Multipette plus	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH (Hamburg, D)
Durchflusszytometer FACS Calibur 4CA-E1913	Becton/Dickinson GmbH (Heidelberg, D)
Fluoreszenzmikroskop Leica DMRE	Leica Mikroskopie und Systeme GmbH (Wetzlar, D)
Gilson Pipetten pipetman P 20/100/200/500/1000µl	Gilson Medical Electronics (Villiers-Le-Bel, F)
Glasesxikkator 1	Carl Roth GmbH + Co. KG (Wertheim, D)
Handstückzähler	Carl Roth GmbH + Co. KG (Wertheim, D)
Head-over-Head-Schüttler Intelli Mixer	Neo Lab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH (Heidelberg, D)
Knick Lab-pH-Meter Digital Typ 647	Escolab (Utrecht, NL)
Kryobox Nalgene Cryo 1 °C Freezing Container	Nalge Nunc International Corp. (Naperville, USA)
Magnet BD-IMagnet	Cat# 552311, Becton/Dickinson GmbH (Heidelberg, D)
Magnet MPC-S	Dynal/Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D)
Magnetrührer MR 2002 und MR 3002	Heidolph Elektro GmbH & Co. KG (Kelheim, D)
Mikroskop Fluovert FU	Leitz GmbH (Wetzlar, D)
N ₂ -Tank biorack 5400 statebourne	Statebourne cryogenics (Washington, GB)
Nageotte Zählkammer	Brand GmbH + Co. KG (Wertheim, D)
Neo Lab-Rotator mit Vortexer	Neo Lab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH (Heidelberg, D)
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences GmbH (Fernwald, D)
Präzisions-Analysenwaage von Sartorius	Sartorius AG (Göttingen, D)
Schüttelgerät Heidolph Reax 2000	Heidolph Elektro GmbH & Co. KG (Kelheim, D)
Sterilbank Hera safe Heraeus	Heraeus Holdings GmbH (Hanau, D)
Universal-Flaschendispenser Optifix	Walter Graf und Co. GmbH & Co. (Wertheim, D)
Vortex Mixer Genie 2 Model G-560E/ K-550GE	Scientific Industries, Inc. (Bohemia, NY, USA)
Zentrifuge Megafuge 1.0 R Heraeus Systems Sepatech	Heraeus Holdings GmbH (Hanau, D)

VI.2 Einwegmaterialien

BD Vacutainer CPT System mit Na-Citrat	Becton/Dickinson GmbH (Heidelberg, D)
Blue Max Jr.15 ml, Polypropylene Conical Tubes	Becton/Dickinson Labware (Franklin Lakes, USA)
Bottle Top Filter mit Cellulosenitrat-Membran 0,22 µm	Becton/Dickinson Labware (Le Pont de Claix, F)
CASY Cups-Cellcountergefäße mit Deckel	Schärfe System GmbH (Reutlingen, D)
Cellstar TC-Plate 6 Well/12 Well, steril, pyrogenfrei	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, D)
Cellstar Tissue Culture Flasks 25/75/175 cm ² , steril	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, D)
Cryovial 3 ml, roundbottom, self-standing, steril	Simport Plastics LTD. (Beloeil, Quebec, CDN)
Eppendorf Combitips plus 0,5/1,0/2,5/5,0/10/50 ml	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH (Hamburg, D)
Eppendorf Safe Lock Tubes 1,5/2,0 ml	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH (Hamburg, D)
Nunc Brand Products, Disposable Conical Tubes 15 ml	Nalge Nunc International Corp. (Naperville, USA)
Pipettenspitzen 200/1000 µl	Sarstedt Aktiengesellschaft & Co. (Nümbrecht, D)
Polypropylen-Rundbodenrörchen 12 x 75 mm	Becton/Dickinson Labware Europe (Meylan Cedex, F)
Polystyrol-Rundbodenrörchen 12 x 75 mm	Becton/Dickinson Labware Europe (Meylan Cedex, F)
Pre-Separations-Filter 30/70 µm	Becton/Dickinson Labware Europe (Meylan Cedex, F)
Separationsrörchen Leukosep 15/50 ml	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, D)
Venenverweilkanüle Medi-Cath	1,3 x 45 mm, 18 G, #118010218, KENDALL GmbH (Neustadt/Donau, D)
Zellseparationssäulen Typ MS/LS/LD	Miltenyi Biotec GmbH (Gladbach, D)

VI. Anhang

VI.3 Antikörper, antikörperbeschichtete Partikel (Beads)

VI.3.1 Antikörper

Human-Anti-HumanFc-Rezeptor	Miltenyi Biotec (Gladbach, D)
Human-Anti-HumanFc-Rezeptor "Octagam"	2,5 g in 50 ml, PZN-686429 1, gebrauchsfertig, Octapharma GmbH (Langenfeld, D)
Maus-Anti-HumanCD14-FITC	Miltenyi Biotec (Gladbach, D)
Maus-Anti-HumanCD15-FITC	Cat# 332 778, BD Biosciences Pharmingen (Erembodegem-Aalst, B)
Maus-Anti-HumanCD31(PECAM1)-FITC	Ancell Corporation (Bayport, USA)
Maus-Anti-HumanCD34-APC	Cat# 555824, 2 ml BD Biosciences Pharmingen (Erembodegem-Aalst, B)
Maus-Anti-HumanCD34-PE	BD Biosciences Pharmingen (Erembodegem-Aalst, B)
Maus-Anti-HumanCD34-PE	Miltenyi Biotec (Gladbach, D)
Maus-Anti-HumanCD45-FITC	Cat# 555 482, Was 31254X, BD Biosciences Pharmingen (Erembodegem-Aalst, B)
Maus-Anti-HumanCD45-FITC	Miltenyi Biotec (Gladbach, D)
Maus-Anti-HumanCD45-PerCP	Cat# 345809 BD Biosciences (San Jose, California, USA)
Maus-Anti-HumanCD45, unkonjugiert	BD Biosciences Pharmingen (Erembodegem-Aalst, B)
Maus-Anti-HumanCD62L-PE	Immunotech Coulter Company (Marseille, F)
Maus-Anti-HumanCD146, unkonjugiert	Biocytex American Diagnostica GmbH (Pfungstadt, D)
Maus-Anti-HumanCD146-PE	Cat# 5050-PE100T,Clone F4-35H7 (S-Endo1), Isotyp IgG1, Biocytex American Diagnostica GmbH (Pfungstadt, D)
Maus-Anti-HumanCD184-APC	BD Biosciences Pharmingen (Erembodegem-Aalst, B)
Maus-Anti-HumanVEGF-R2-PE	Cat# FAB357P, R&D Systems GmbH (Wiesbaden, D)

VI.3.2 Antikörperbeschichtete Partikel (Beads)

BD Imag Anti-MausIgG ₁ Particles-DM	Cat# 557983, 5 ml, Clone A85-1, BD Biosciences Pharmingen (Erembodegem-Aalst, B)
Collection Pan Mouse IgG Kit	Produkt-Nummer 115.31, Konzentration 4 x 10 ⁸ Beads/ml, Dynal Biotech ASA (Oslo, N)
DynaBeads Pan Mouse IgG	Produkt-Nummer 110.22, Konzentration 4 x 10 ⁸ Beads/ml, Dynal Biotech ASA (Oslo, N)
Maus-Anti-HumanCD45-MicroBeads	Cat# 458-01, 2 ml, Isotype mouse IgG2a, clone 5B1, Miltenyi Biotec (Gladbach, D)
Maus-Anti-PE-MicroBeads	Cat# 130-048-801, 2 ml, Isotype mouse IgG1, Miltenyi Biotec (Gladbach, D)

VI. Anhang

VI.3.3 Sonstiges

7-AAD (7-Amino-Actinomycin D)	BD Biosciences Pharmingen (Erembodegem-Aalst, B)
BD TruCOUNT Tubes	Cat# 340334, 25 Tubes/Pouch, BD Biosciences Pharmingen (Erembodegem-Aalst, B)
Dil-Ac-LDL	Cat# BT-902, Konzentration 200 µg/ml, Ex 514 nm/Em 550 nm Paesel + Lorei Diagnostica (Hanau, D)
Ulex europaeus (UEA1)-Lectin-FITC	Cat# L9006-2MG, Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, D)
Vectashield Mounting Medium mit DAPI	Cat# H-1200, Ex 360 nm, Em 460 nm, Linaris Biologische Produkte (Wertheim, D)

VI.4 Chemikalien, Puffer, Medien, weitere Reagenzien

VI.4.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Merck KGaA (Darmstadt, D), Carl Roth GmbH + Co. (Karlsruhe, D), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D) erworben.

VI.4.2 Puffer, Medien, Reagenzien

Amphotericin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D)
BD FACS Lysing Solution	Cat# 349202, Diethylenglycol <50%, Formaldehyd <15%, BD Immunocytometry Systems (Erembodegem-Aalst, B)
BD Pharm Lyse Lysing Reagent	10 x konz., Cat# 555899 BD Immunocytometry Systems (Erembodegem-Aalst, B)
CASYton-Verdünnungslösung für Zellkulturen 10 l	Schärfe System GmbH (Reutlingen, D)
EBM-2 Endothelzellmedium	Cat# CC-3156, Clonetics, Cambrex
Gentamycin	Roche Diagnostics (Indianapolis, IN, USA)
GIBCO Trypsin 2,5 %, 10 x, 100 ml mit 2,5 g Trypsin	Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D)
Hepes-Puffer	Stammlösung 1M, Biochrom AG (Berlin, D)
Humanserum Blutgruppe A/B/0	Uniklinikum Regensburg, Probanden der HTC
Separationsmedium Accuprep	Accurate Chemical&Scientific Corp. (Westbury, USA)
Separationsmedium Ficoll Paque Plus	Amersham Pharmacia biotech (Uppsala, S)
Simultest IMK-Lymphocyte Lysing Solution	Cat# 340182, Konzentration 10 x, Diethylenglycol <50%, Formaldehyd <15%, BD Immunocytometry Systems (Erembodegem-Aalst, B)

VI.4.3 Weitere Medien, Puffer, Gebrauchslösungen

Nach der Herstellung wurden folgende Medien, Puffer und sonstige Lösungen grundsätzlich mit einem 0,22 µm-Bottle Top Filter steril filtriert.

Humanserum wurde aus Vollblutspenden von Probanden der HTC Uniklinikum Regensburg gewonnen.

- Ammoniumchloridlyse-Reagenz:

NH ₄ CL	8,29 g
KHCO ₃	1 g
EDTA	0,037 g

mit aqua bidest. ad 1000 ml, pH = 7,47, steril filtrieren.

- BD IMag Buffer:

PBS-Puffer	500 ml
BSA	2,5 mg → 0,5 % BSA
EDTA	2 mM (= 0,5844 g/L): 0,5844 g
Na-Azid	0,05 mg → 0,01 % BSA

- Cell-Staining Buffer:

PBS-Puffer	500 ml
FKS	15 ml → 3 % FKS
Na-Azid	50 mg → 0,01 % Na-Azid

- Einfriermedium I:

M199	90 %
Hepes 0,05 M	10 %

- Einfriermedium II:

M199	70 %
Hepes 0,05 M	10 %
DMSO	20 %

VI. Anhang

- **EC-Medium:**

= Endothelial Cell Basal Medium (PromoCell GmbH (Heidelberg, D))

Das Basalmedium enthält keine Wachstumsfaktoren, Serum bzw. Antibiotika. Diese werden zusätzlich zugegeben (Supplement Pack Endothelial Cell Growth Medium, PromoCell GmbH (Heidelberg, D))

Endothelzellmedium	500 ml
FCS-10 (fetal calf serum)	10 ml
ECGS/H-2 (endothelial cell growth supplement/heparine)	2 ml
HEGF (human epidermal growth factor 0,05 µg)	0,5 ml
HbFGF (human basic fibroblast growth factor 0,5 µg)	0,5 ml
HC-500 (Hydrocortison 500 µg)	0,5 ml
Gentamycin	500 µl
Amphotericin B	100 µl

- **Gelatine:**

Vorratslösung:

Gelatinepulver (0,25 %)	2,5 g
PBS 1 x	1 l

Gebrauchslösung:

Gelatine	200 ml
Gentamycin	1 ml

Ansetzen der Vorratslösung: bei ca. 30 °C mit Magnetrührer lösen, autoklavieren. Gebrauchslösung lediglich mit Gentamycin versetzen (nicht autoklavieren!).

- **Hepes-Puffer:** (Stammlösung 1 M, Biochrom AG (Berlin, D):

Gebrauchslösung (0,05 M)

Hepes-Puffer 1 M	50 ml
aqua bidest.	ad 1000 ml

autoklavieren bzw. steril filtrieren.

- **M 199:**

= Bio Whittaker Medium 199 (Cambrex Bio Science Verviers (Verviers, B))

Earle`s balanced salt solution, L-Glutamin (Konz.) und Hepes-Puffer (Konz.) enthalten,

M 199	160 ml
FKS	40 ml → 20 % FKS
Gentamycin	500 µl
Amphotericin B	100 µl

VI. Anhang

- PBS-Puffer: (Stammlösung 10 x)

NaCl	80 g
Na ₂ HPO ₄	11,5 g
KCl	2 g
KH ₂ PO ₄	2 g

pH = 7,4 mit HCl/NaOH einstellen, mit H₂O ad 1000 ml,
autoklavieren bzw. steril filtrieren.

Gebrauchslösung (1 x): 1:10 mit aqua bidest. verdünnen, pH = 7,4 einstellen wie oben.

- PBS-Azid-Zitrat-Puffer (PBS-AZ-Puffer):

PBS (1 x)	50 ml
BSA	50 mg → 0,1 % BSA
Na-Azid	50 mg → 0,1 % Azid
Na-Zitrat	300 mg → 0,6 % Zitrat

- PBS-BSA-Puffer: (mit 0,5 bzw. 0,02 % BSA-Zusatz)

PBS (1 x)	1 L
BSA	5 g → 0,50 % BSA
	0,2 g → 0,02 % BSA

pH = 7,4 mit HCl/NaOH einstellen, steril filtrieren.

- PBS-BSA-Azid-Puffer:

PBS (1 x)	50 ml
BSA	50 mg → 0,1 % BSA
Na-Azid	50 mg → 0,1 % Azid

- PBS-EDTA-Puffer:

PBS (1 x)	1 l
EDTA (2 mM)	584 mg

pH = 7,4 mit HCl/NaOH einstellen, autoklavieren bzw. steril filtrieren.

- PBS-EDTA-BSA-Puffer:

PBS	1 l
EDTA (2 mM)	584 mg
BSA	5 g → 0,50 % BSA

pH = 7,4 mit HCl/NaOH einstellen, steril filtrieren.

VI.5 Daten und Einstellungen von Analysengeräten

VI.5.1 Automatischer Zellzähler CASY1

CASY1 Cell Counter and Analyser System, Modell TTC
Schärfe Systems GmbH (Reutlingen, D)

x-Achse	0 bis 30 µm
y-Achse	variabel
Kapillarendurchmesser	150 µm
CalibFile	K00_030.150
Angesaugtes Probenvolumen	3 x 400 µl
Verdünnung	variabel
Smoothing	0

VI.5.2 Durchflusszytometer

Durchflusszytometer FACS Calibur 4CA-E1913,
Becton/Dickinson GmbH (Heidelberg, D)

Aquisition and Storage:

Aquisition Gate	No Gate
Collection Criteria	Event Count
Aquisition Stop	100.000 of all Events
Storage Gate	All Events
Resolution	256 Parameters saved

Detectors/Amplifiers:

Parameters	Detectors	Voltage	AmpGain	Mode
P1	FSC	E-1	1.23	Log
P2	SSC	273	1.00	Log
P3	FL1	410	1.00	Log
P4	FL2	390	1.00	Log
P5	FL3	460	1.00	Log

Compensation:

FL1	1.1 % FL2
FL2	30.4 % FL1
FL2	5.0 % FL3
FL3	12.4 % FL2

Threshold:

FSC-H: Primary Parameter: Value 460
Secondary Parameter: None

VI.5.3 Fluoreszenzmikroskop

Fluoreszenzmikroskop Leica DMRE,
Leica Mikroskopie und Systeme GmbH (Wetzlar, Deutschland)

Lampenspannung	10,5
Vergrößerungswechsler	1 x
Kondensorfrontlinse	in den Strahlengang geklappt
Polarisator	aus dem Strahlengang geklappt
Analysator	aus dem Strahlengang gezogen
Kondensorrevolver	Position H
Interferenzrevolver	Position HF
Fluoreszenzrevolver	Position 1
Aperturblende	weit zugezogen
10er Objektiv, 40er Objektiv	
FITC-Filterblock	

VI.6 Software

Win MDI Version 2.8
Build # 13 01-19-2000
Windows Multiple Document Interface
Flow Cytometry Application
Copyright 1993-1998 Joseph Trotter.

Cell Quest Pro Version 5.2
1994-2001
The Premier Aquisition and Analysis Software
Apple Computers Inc.
Becton Dickinson Biosciences.

VII. Literaturverzeichnis

Aebert H, Kirchner S, Keyser A, Birnbaum DE, Holler E, Andreesen R, Eissner G. "Endothelial apoptosis is induced by serum of patients after cardiopulmonary bypass". Eur J Cardiothorac Surg. 2000; 18(5): 589-93.

Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, Inai Y, Silver M, Isner JM. "VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells". EMBO J. 1999; 18(14): 3964-72.

Asimakopoulos G, Smith PL, Ratnatunga CP, Taylor KM. "Lung injury and acute respiratory distress syndrome after cardiopulmonary bypass". Ann Thorac Surg. 1999; 68(3): 1107-15.

Badimon L, Martinez-Gonzalez J. "Endothelium and vascular protection: an update". Rev Esp Cardiol. 2002; 55(1): 17-26.

Bardin N, Francès V, Combes V, Sampol J, Dignat-George F. "CD146: biosynthesis and production of a soluble form in human cultured endothelial cells". FEBS Letters 1998; 421: 12-14.

Bartoc C, Frumento RJ, Jalbout M, Bennett-Guerrero E, Du E, Nishanian E. "A randomized, double-blind, placebo-controlled study assessing the anti-inflammatory effects of ketamine in cardiac surgical patients". J Cardiothorac Vasc Anesth. 2006; 20(2): 217-22.

Beerepoot LV, Mehra N, Vermaat JS, Zonnenberg BA, Gebbink MF, Voest EE. "Increased levels of viable circulating endothelial cells are an indicator of progressive disease in cancer patients". Ann Oncol 15: 139-145.

Blache D, Bouthillier D, Davignon J. "Acute influence of smoking on platelet behaviour, endothelium and plasma lipids and normalization by aspirin". Atherosclerosis. 1992; 93(3): 179-88.

Blann AD, Woywodt A, Bertolini F, Bull TM, Buyon JP, Clancy RM, Haubitz M, Hebbel RP, Lip GY, Mancuso P, Sampol J, Solovey A, Dignat-George F. "Circulating endothelial cells. Biomarker of vascular disease". Thromb Haemost. 2005; 93(2): 228-35.

Bonello L, Sabatier F, Basire A, Paganelli F, Dignat-George F. "The imbalance between circulating endothelial cells and progenitors in cardiovascular diseases: a mirror of disrupted endothelial integrity". Arch Mal Coeur Vaiss. 2006; 99(6): 607-13.

Bouvier CA, Gaynor E, Cintron JR, Bernhardt B, Spaet T. "Circulating endothelium as an indication of vascular injury". Thromb Diath Haemorrh 1970; 40: 163.

Boyle EM Jr, Pohlman TH, Johnson MC, Verrier ED. "Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: the systemic inflammatory response". Ann Thorac Surg. 1997; 63(1): 277-84.

Brtko M, Lonsky V, Kunes P, Dominik J, Kubicek J. "The post-perfusion syndrome after operations performed with extracorporeal circulation". Acta Medica (Hradec Kralove) 1999; 42(1): 13-6.

Bufretton C, Corbeau JJ, Pinaud F. "Inflammatory response and haematological disorders in cardiac surgery: toward a more physiological cardiopulmonary bypass". Ann Fr Anesth Reanim. 2006; 25(5): 510-20.

Burnhan EL, Tylor WR, Quyyumi AA, Rojas M, Bigham KL, Moss M. "Increased circulating endothelial progenitor cells are associated with survival in acute lung injury". AmJ Respir Crit Care Med 2005; 172(7): 854-60.

Butler J, Rocker GM, Westaby S. "Inflammatory response to cardiopulmonary bypass". Ann Thorac Surg. 1993; 55(2): 552-9.

Chen TG, Chen JZ, Wang XX. "Effects of rapamycin on number, activity and ENOS of endothelial progenitor cells from peripheral blood". Cell Proliferation 2006; 39(2): 117-25.

Chong AY, Lip GY, Freestone B, Blann AD. "Increased CEC in acute heart failure: comparison with vWF and soluble E-Selectin". Eur J Heart Failure 2006; 8(2): 167-72.

Defraigne JO. "Physiopathological disorders related to extracorporeal circulation. Pathogenesis and modes of prevention". Bull Mem Acad R Med Belg 1999; 154(10-12): 381-91.

Delorme B, Basire A, Gentile C, Sabatier F, Monsonis F, Desouches C, Blot-Chabaud M, Uzan G, Sampol J, Dignat-George F. "Presence of endothelial progenitor cells distinct from mature endothelial cells within human CD146+ blood cells". Thromb Haemost 2005; 94(6): 1270-79.

Del Papa N, Cortiana M, Comina DP, Maglione W, Silvestri I, Maronetti Mazzeo L, Fracchiolla N, Fantini F, Cortelezzi A. "Endothelial progenitor cells in systemic sclerosis: their possible role in angiogenesis". Reumatismo 2005; 57(3): 174-9.

Dignat-George F, Sampol J. "Circulating endothelial cells in vascular disorders: new insights into an old concept". Eur J Haematol 2000; 65: 215-220.

Duda DG, Cohen KS, di Tomaso E, An P, Klein RJ, Scadden DT, Willett CG, Jain RK. "Differential expression on circulating versus tissue endothelial cells in rectal cancer patients: implications for circulating endothelial and progenitor cells as biomarkers for antiangiogenic therapy". J Clin Oncol 2007; 25(5): 1-2.

Ehrhard S. "Bedeutung der Oberflächenbeschichtung mit Heparin für den Ablauf zellulärer Reaktionsmechanismen im extrakorporalen Rezirkulationsmodell". Inauguraldissertation, Gutenberg-Universität Mainz, 1999; S.13-15.

Elhendy A, Hamby R. <http://heart.health.ivillage.com/bypassurgery/postpump2.cfm>; Review Date: 04-24-2007.

Elshal MF, Khan SS, Takahashi Y, Solomon MA, McCoy JP Jr. „CD146 (Mel-CAM), an adhesion marker of endothelial cells, is a novel marker of lymphocyte subset activation in normal peripheral blood". Blood 2005; 106(8).

Erdbruegger U, Haubitz M, Woywodt A. "Circulating endothelial cells: a novel marker of endothelial damage". Clin Chim Acta 2006; 373(1-2): 17-26.

Fillinger MP, Rassias AJ, Guyre PM, Sanders JH, Beach M, Pahl J, Watson RB, Whalen PK, Yeo KT, Yeager MP. "Glucocorticoid effects on the inflammatory and clinical responses to cardiac surgery". J Cardiothorac Vasc Anesth 2002; 16(2): 163-9.

Fischetti F, Tedesco F. "Cross-talk between the complement system and endothelial cells in physiologic conditions and in vascular diseases". Autoimmunity 2006; 39(5): 417-28.

Franke A, Lante W, Fackeldey V, Becker HP, Kurig E, Zoller LG, Weinhold C, Markowitz A. "Pro-inflammatory cytokines after different kinds of cardio-thoracic surgical procedures: is what we see what we know?". Eur J Cardiothorac Surg 2005; 28(4): 569-75.

Fürstenberger G, von Moos R, Senn HJ, Boneberg EM. "Real-time PCR of CD146 mRNA in peripheral blood enables the relative quantification of circulating endothelial cells and is an indicator of angiogenesis". British Journal of Cancer 2005; 93: 793-798.

Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, Schuch G, Schafhausen P, Mende T, Kilic N, Kluge K, Schafer B, Hossfeld DK, Fiedler W. "In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells". Blood 2000; 95: 3106.

George F, Brisson C, Poncelet P. "Rapid isolation of human endothelial cells from whole blood using S-Endo1 monoclonal antibody coupled to immuno-magnetic beads: demonstration of endothelial injury after angioplasty". Thromb Haemost 1992; 67:147-53.

Gibbon JH Jr. "Artificial maintenance of circulation during experimental occlusion of pulmonary artery". Archives of Surgery; 34: 1105-1131.

Gibbon JH Jr. "Application of mechanical heart and lung apparatus to cardiac surgery". Minnesota Medicine; 37: 171-185.

Gill M, Dias S, Hattori K, Rivera ML, Hicklin D, Witte L, Girardi L, Yurt R, Himel H, Rafii S. "Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)AC133(+) endothelial precursor cells". Circ Res 2001; 88(2): 167-74.

Goette E. "Occurrence and significance of endothelial cells in the peripheral blood". Acta Haematol 1964; 32: 39-43.

Griese DP, Ehsan A, Melo LG, Kong D, Zhang L, Mann MJ, Pratt RE, Mulligan RC, Dzau VJ. "Isolation and transplantation of autologous circulating endothelial cells into denuded vessels and prosthetic grafts: implications for cell-based vascular therapy". Circulation 2003; 108(21): 2710-5.

Griwatz C, Brandt B, Assmann G, Zanker KS. „An immunological enrichment method for epithelial cells from peripheral blood“. J Immunol Methods 1995; 183(2): 251-65.

Haubitz M, Woywodt A. "Circulating endothelial cells and vasculitis". Intern Med 2004; 43(8): 660-7.

He XL, Liu Z, Xia SY. "Vascular endothelial injuries and changes of blood coagulation and fibrinolysis indexes in patients with acute respiratory distress syndrome". Chin Med Sci J 2004; 19(4): 252-6.

Hirai S, Sueda T, Orihashi K, Watari M, Okada K. "Serum cytokine levels response to cardiac surgery with cardiopulmonary bypass". Kyobu Geka 2001; 54(7): 550-4.

Hladovec J, Prerovsky I, Stanek V, Fabian J. "Circulating endothelial cells in acute myocardial infarction and angina pectoris". Klin Wochenschr 1978; 56:1033-6.

Ho JW, Pang RW, Lau C, Sun CK, Yu WC, Fan ST, Poon RT. "Significance of circulating endothelial progenitor cells in hepatocellular carcinoma". Hepatology 2006 Oct; 44(4): 836-43.

Hristov M, Weber C. "Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance". J Cell Mol Med 2004; 8(4): 498-508.

Hunting CB, Noort WA, Zwaginga JJ. "Circulating endothelial (progenitor) cells reflect the state of the endothelium: vascular injury, repair and neovascularization". Vox Sang 2005; 88(1): 1-9.

Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, Li T, Isner JM, Asahara T. "Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization". Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97(7): 3422-7.

Kawahito K, Kobayashi E, Ohmori M, Harada K, Kitoh Y, Fujimura A, Fuse K. "Enhanced responsiveness of circulatory neutrophils after cardiopulmonary bypass: increased aggregability and superoxide producing capacity". Artif Organs 2000; 24(1): 37-42.

Khan SS, Solomon MA, McCoy JP Jr. "Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry". Cytometry B Clin Cytom 2005.

Lee KW, Lip GY, Tayebjee M, Foster W, Blann AD. "CEC, vWF, IL-6 and prognosis in patients with acute coronary syndrome". Blood 2005; 105(2): 526-32.

Lee KW, Blann AD, Lip GY. "Inter-relationships of indices of endothelial damage/dysfunction (CEC, vWF and flow-mediated dilatation) to tissuefactor and IL-6 in acute coronary syndrome". Int J Cardiol 2006 Aug; 111(2): 302-8.

Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP. "Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood". J Clin Invest 2000; 105: 71-77.

Lindner H, Holler E, Ertl B, Multhoff G, Schreglmann M, Klauke I, Schultz-Hector S, Eissner G. "Peripheral blood mononuclear cells induce programmed cell death in human endothelial cells and may prevent repair: role of cytokines." Blood 1997; 89(6): 1931-8.

Löffler, Petrides "Biochemie und Pathobiochemie", Springer-Verlag, 6. Auflage; S. 64, S. 608, S. 895.

Lytvyn OI, Kopitsa MP, Petyunina OV. "Interaction between inflammation and thrombosis in acute coronary syndrome". Kardiol Pol 2004; 61(8): 110-6.

Makin AJ, Blann AD, Chung NA, Silverman SH, Lip GY. "Assessment of endothelial damage in atherosclerotic vascular disease by quantification of circulating endothelial cells. Relationship with von Willebrand factor and tissue factor". Eur Heart J 2004; 25(5): 371-6.

Malyszko J, Malyszko JS, Brzosko S, Wolczynski S, Mysliwiec M. "Adiponectin is related to CD146, a novel marker of endothelial cell activation/injury in chronic renal failure and peritoneally dialyzed patients". J Clin Endocrinol Metab 2004; 89(9): 4620-27.

Mancuso P, Burlini A, Pruner G, Goldhirsch A, Martinelli G, Bertolini F. "Resting and activated endothelial cells are increased in the peripheral blood of cancer patients". Blood 2001; 97: 3658-3661.

Martin VM, Siewert C, Scharl A, Harms T, Heinze R, Ohl S, Radbruch A, Miltenyi S, Schmitz J. "Immunomagnetic enrichment of disseminated epithelial tumor cells from peripheral blood by MACS". Exp Hematol 1998; 26(3): 252-64.

McClung JA, Naseer N, Saleem M, Rossi GP, Weiss MB, Abraham NG, Kappas A. "Circulating endothelial cells are elevated in patients with type 2 diabetes mellitus independently of HbA(1)c". Diabetologia 2005; 48(2): 345-50.

Middleton J, Americh L, Gayon R, Julien D, Mansat M, Mansat P, Anract P, Cantagrel A, Cattan P, Reimund JM, Aguilar L, Amalric F, Girard JP. "A comparative study of endothelial cell markers expressed in chronically inflamed human tissues: MECA-79, Duffy antigen receptor for chemokines, von Willebrand factor, CD31, CD34, CD105 and CD146". J Pathol 2005; 206(3):260-8.

Miller BE, Levy JH. "The inflammatory response to cardiopulmonary bypass". J Cardiothorac Vasc Anesth 1997; 11(3): 355-66.

Morariu AM, Gu YJ, Huet RC, Siemons WA, Rakhorst G, Oeveren WV. "Red blood cell aggregation during cardiopulmonary bypass: a pathogenic cofactor in endothelial cell activation?". Eur J Cardiothorac Surg 2004; 26(5): 939-46.

Müller M et al. „Chirurgie“. Medizinische Verlags- und Informationsdienste Breisach, 8. Auflage (2006/2007).

Mutin M, Canavy I, Blann A, Bory M, Sampol J, Dignat-George F. "Direct evidence of endothelial injury in acute myocardial infarction and unstable angina by demonstration of circulating endothelial cells". Blood 1999; 93: 2951-2958.

Oppiger Leibundgut E, Horn MP, Brunold C, Pfanner-Meyer B, Marti D, Hirsiger H, Tobler A, Zwicky C. "Hematopoietic and endothelial progenitor cell trafficking in patients with myeloproliferative diseases". Haematologica 2006; 91(11): 1465-72.

Palumbo B, Palumbo R, Sinzinger H. "Radioiodine therapy temporarily increases circulating endothelial cells and decreases endothelial progenitor cells". Nucl Med Rev Cent East Eur 2003; 6(2): 123-6.

Paparella D, Yau TM, Young E. "Cardiopulmonary bypass induced inflammation: pathophysiology and treatment. An update". Eur J Cardiothorac Surg 2002; 21(2): 232-44.

Paul J, Belleville J, Descotes J. "Circulating endothelial cells in arteriopathies of the lower limbs". Coeur Med Interne 1974; 13(2): 259-63.

Pavelkova M, Kubala L, Ciz M, Pavlik P, Wagner R, Slavik J, Ondrasek J, Cerny J, Lojek A. "Blood phagocyte activation during open heart surgery with cardiopulmonary bypass". Physiol Res 2006; 55(2): 165-73.

Petrishchev NN, Berkovich OA, Vlasov TD, Volkova EV, Zueva EE, Mozgovaia EV. "Diagnostic value of evaluation of desquamated endothelial cells in blood". Klin Lab Diagn 2001; 1: 50-2.

Pries AR, Kuebler WM. "Normal endothelium". Handb Exp Pharmacol 2006; 1: 1-40.

Raja SG, Dreyfus GD. "Modulation of systemic inflammatory response after cardiac surgery". Asian Cardiovasc Thorac Ann 2005; 13(4): 382-95.

Rinder C, Fitch J. "Amplification of the inflammatory response: adhesion molecules associated with platelet/white cell responses". J Cardiovasc Pharmacol 1996; 27(1): 6-12.

Roberts N, Xiao Q, Weir G, Xu Q, Jahangiri M. "Endothelial progenitor cells are mobilized after cardiac surgery". Ann Thorac Surg 2007; 83(2): 598-605.

Ruel M, Mesana TG. "Effects of off-pump versus on-pump coronary artery bypass grafting on function and viability of circulating endothelial progenitor cells". J Thorac Cardiovasc Surg 2005; 130(3): 633-9.

Rustemeyer P, Wittkowsky W, Greve B, Stehling M. "Flow-cytometric identification, enumeration, purification and expansion of CD133+ and VEGF-R2+ endothelial progenitor cells from peripheral blood". J Immunoassay Immunochem 2007; 28 (1): 13-23.

Sbarbati R, de Boer M, Marzilli M, Scarlattina M, Rossi G, von Mourik JA. "Immunologic detection of endothelial cells in human whole blood". Blood 1991; 77(4): 764-9.

Scheubel RJ, Zorn H, Silber RE, Kuss O, Morawietz H, Holtz J, Simm A. "Age-dependent depression in circulating endothelial progenitor cells in patients undergoing coronary artery bypass grafting". J Am Coll Cardiol 2003; 42(12): 2073-80.

Schmeisser A, Garlichs CD, Zhang H, Eskafi S, Graffy C, Ludwig J, Strasser RH, Daniel WG. "Monocytes coexpress endothelial and macrophagocytic lineage markers and form cord-like structures in Matrigel under angiogenic conditions". Cardiovasc Res 2001; 49(3): 671-80.

Schmid FX, Vudattu N, Floerchinger B, Hilker M, Eissner G, Hoenicka M, Holler E, Birnbaum DE. "Endothelial apoptosis and circulating endothelial cells after bypass grafting with and without cardiopulmonary bypass". Eur J Cardiothorac Surg 2006(a); 29(4): 496-500.

Schmid FX, Floerchinger B, Vudattu NK, Eissner G, Haubitz M, Holler E, Andreesen R, Birnbaum DE. "Direct evidence of endothelial injury during cardiopulmonary bypass by demonstration of circulating endothelial cells". Perfusion 2006(b); 21(3): 133-7.

Schmidt-Lucke C, Rossig L, Fichtlscherer S, Vasa M, Britten M, Kamper U, Dimmeler S, Zeiher AM. "Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair". Circulation 2005; 111(22): 2981-7.

Shaffer RG, Greene S, Arshi A, Supple G, Bantly A, Moore JS, Mohler ER 3rd. „Flow cytometric measurement of CEC: the effect of age and peripheral arterial disease on baseline levels of mature and progenitor populations“. Cytometry B Clin Cytom 2006; 70(2): 56-62.

Shah PK. „Targeting the proteolytic arsenal of neutrophils – a promising approach for postpump syndrome and ARDS“. Circulation 1999; 100: 333 – 334.

Sinzinger H, Rauscha F, Fitscha P, Kaliman J. "Beneficial effect of PGI2 on circulating endothelial cells". Basic Res Cardiol 1988; 83(6): 597-601.

Skrabal CA, Choi YH, Kaminski A, Steiner M, Kundt G, Steinhoff G, Liebold A. "Circulating endothelial cells demonstrate an attenuation of endothelial damage by minimizing the extracorporeal circulation". J Thorac Cardiovasc Surg 2006; 132(2): 291-6.

Strijbos MH, Kraan J, den Bakker MA, Lambrecht BN, Sleijfer S, Gratama JW. "Cells meeting our immunophenotypic criteria of endothelial cells are large platelets". Cytometry B Clin Cytom 2007; 72(2): 86-93.

Szmitko PE, Fedak PW, Weisel RD, Stewart DJ, Kutryk MJ, Verma S. "Endothelial progenitor cells: new hope for a broken heart". Circulation 2003; 107(24): 3093-100.

Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T. "Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization". Nat Med 1999; 5(4): 434-8.

Verma S, Kuliszewski MA, Li SH, Szmitsko PE, Zucco L, Wang CH, Badiwala MV, Mickle DA, Weisel RD, Fedak PW, Stewart DJ, Kutryk MJ. "C-reactive protein attenuates endothelial progenitor cell survival, differentiation, and function: further evidence of a mechanistic link between C-reactive protein and cardiovascular disease". Circulation 2004; 109(17): 2058-67.

Wang C, Li H, Fu P, Zhang S, Xiu R. "Serum C-reactive protein and circulating endothelial cells in patients with acute myocardial infarction". Clin Hemorheol Microcirc 2005; 32(4): 287-96.

Wang J, Qiao WH. "Vascular endothelial injuries and inflammation related cytokines in patients with multiple organ dysfunction syndrome". Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue 2006; 18(2): 82-4.

Werther K, Normark M, Hansen BF, Brünner N, Nielsen HJ. „The use of Celllection kit in the isolation of carcinoma cells from mononuclear cell suspensions“. J Immunol Methods 2000; 238 (1-2): 133-41.

Woollard KJ, Phillips DC, Griffiths HR. "Direct modulatory effect of CRP on primary human monocyte adhesion to human endothelial cells". Clin Exp Immunol 2002; 130(2): 256-62.

Woywodt A, Haubitz M. „Detection of circulating endothelial cells“. DYNALogue 2003(a).

Woywodt A, Schroeder M, Mengel M, Schwarz A, Gwinner W, Haller H, Haubitz M. "Circulating endothelial cells are a novel marker of cyclosporine-induced endothelial damage". Hypertension 2003(b); 41: 720-3.

Woywodt A, Streiber F, de Groot K, Regelsberger H, Haller H, Haubitz M. „Circulating endothelial cells as markers for ANCA-associated small-vessel vasculitis“. Lancet 2003(c); 361: 206–210.

Woywodt A, Goldberg C, Scheer J, Regelsberger H, Haller H, Haubitz M. „An improved assay for enumeration of circulating endothelial cells“. Annals of Hematology 2004(a); 83: 491-94.

Woywodt A, Scheer J, Hambach L, Buchholz S, Ganser A, Haller H, Hertenstein B, Haubitz M. "Circulating endothelial cells as a marker of endothelial damage in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation". Blood 2004(b); 103(9): 3603-5.

Woywodt A, Blann AD, Kirsch T, Erdbruegger U, Banzet N, Haubitz M, Dignat-George F. „Isolation and enumeration of circulating endothelial cells by immunomagnetic isolation: proposal of a definition and a consensus protocol“. J Thromb Haemost 2006; 4: 671-7.

Wright HP, Glacometti NJ. "Circulating endothelial cells and arterial endothelial mitosis in anaphylactic shock". Br J Exp Pathol 1972; 53(1): 1-4.

Yang Y, Wang Z, Liu H, Zhou Y. "Circulating endothelial cells in surgical patients". Cor Vasa 1992; 34(4): 359-64.

Zhu. "Changes in circulating endothelial cells in patients with essential hypertension". Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi 1991; 19(4): 217-8, 267.

VIII. Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. med. F.-X. Schmid, Klinik der Herz-, Thorax- und herznahen Gefäßchirurgie der Universitätsklinik Regensburg (Direktor: Prof. Dr. med. D. E. Birnbaum) für die Betreuung meiner Promotionsarbeit und seine Unterstützung während dieser Zeit.

Mein herzlicher Dank gilt auch Frau Dr. K. Lehle, die mir jederzeit mit Rat zur Seite stand und durch kritische Überlegungen und Hilfestellungen mich und meine Arbeit vorantrieb.

Außerdem danke ich Dr. M. Hönicka und dem gesamten Labor-Team der HTC Katrin Bielenberg, Sara Bergmann, Christina Leykauf und Karin Hollnberger, die ebenfalls geduldig alle meine Fragen beantworteten und sich immer Zeit für mich nahmen.

Vielen Dank an die Mitarbeiter des Forschungslabors der Anästhesie/Pharmakologie, allen voran „Gini“, die mir mehrfach bei Problemen mit dem Durchflusszytometer geholfen haben.

Danke auch an das Labor der Hämatologie/Onkologie (Dr. Eissner), von dem die validierte Methode der immunomagnetischen Isolierung „DynaBeads Pan Mouse IgG“ (Dynal) übernommen wurde. Weiterhin möchte ich ein Dankeschön an das Zentrallabor (Klinische Chemie/Hämatologie) und an Frau PD Dr. med. L. Kunz-Schughart (Histologie/Pathologie Uniklinikum Regensburg, jetzt OncoRay, Dresden) richten, die mir bei diversen Fragestellungen weitergeholfen haben.

Bei Frau Prof. Dr. med. M. Haubitz und Frau E.-M. Boneberg möchte ich mich für die Beratung zu Fragen der korrekten Antikörper-Färbung und FACS-Analyse bedanken. Herrn Steibl der Firma Miltenyi und Frau Pfeiffer der Firma BD danke ich für diverse Stunden telefonischer Besprechung und Betreuung vor Ort bei der technischen Durchführung der immunomagnetischen Zell-Isolierung.

Vielen Dank an Herrn Knüttel für die Tipps zu einer korrekten Medline-Analyse.

Und nicht zuletzt ein dickes Dankeschön an alle meine Freunde und Verwandte, die sich über Jahr und Tag meine Sorgen angehört und mich bestärkt haben, nicht aufzugeben!
Danke Mama, Papa, Christian und danke Alex, ohne Euch wäre ich wohl oft verzweifelt!

IX. Lebenslauf

Persönliche Daten

Eva Katharina Hagemeister
* 19.05.1978 in Freiburg im Breisgau

Schulausbildung

09/1989 – 06/1998

Von- Müller- Gymnasium Regensburg
Abschluss: Abitur; Note 2,3

Berufsausbildung

09/1998 – 07/2001

Ausbildung zur MTAL an der
Naturwissenschaftlich/Technischen Akademie in Isny
Abschluss: Staatliche Prüfung; Note „sehr gut“

Hochschulausbildung

10/2001 – 12/2007

Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg
Ärztliche Vorprüfung, Gesamtnote 2,66
Ärztliche Prüfung, Gesamtnote 1,5
Approbation

Krankenpflegedienst

07/1999 – 08/1999

Löwenstein Hospital & Rehabilitation Center
Ra`annana/Tel Aviv University, Israel

03/2002 – 04/2002

Prof. Dr. Rieger, Uniklinikum Regensburg
„Innere Medizin/Kardiologie“

Famulaturen

02/2004 – 03/2004

Prof. Dr. Wiedmann, KH der Barmherzigen Brüder Rbg.
„Innere Medizin/Gastroenterologie/Rheumatologie“

03/2004 – 04/2004

Prof. Dr. Gain, KH der Barmherzigen Brüder Rbg.
„Innere Medizin/Pulmonologie/Endokrinologie/Angiologie“

09/2004 – 09/2004

Prof. Dr. Segerer, Kinderklinik St. Hedwig Regensburg
„Allgemeine Pädiatrie“

08/2005 – 09/2005

Prof. Dr. Schmid, Uniklinikum Regensburg
„Allgemeine Chirurgie/Herz-Thorax-Gefäß-Chirurgie“

03/2006 – 03/2006	Gemeinschaftspraxis Dres. Eichelberg/Stoll „Dermatologie/Allergologie“
03/2006 – 04/2006	Praxis Dr. Schmid, Kinder-/Jugendarzt „Pädiatrie“
<i>Praktisches Jahr</i> 08/2006 – 12/2006	Prof. Dr. Wirsching, Caritas-KH St. Josef Regensburg “Viszeralchirurgie, Unfallchirurgie, Sportmedizin“
12/2006 – 04/2007	Dr. Fiedler, Klinikum St. Marien Amberg „Kinder-/Jugendmedizin, Neonatologie und Intensivmedizin“
04/2007 – 07/2007	Prof. Dr. Groß, Klinikum St. Marien Amberg „Innere Medizin, Gastroenterologie, Kardiologie, Pulmonologie, Rheumatologie“
Studienbegleitende Tätigkeiten 10/2000 – 02/2001	Mitarbeit stud. Hilfskraft bei der RESPECT-Studie (Bayer AG)
02/2006 – 04/2006	Mitarbeit stud. Hilfskraft bei der PROMPT-Studie (Roche GmbH)
Promotionsarbeit 12/2004 – 12/2008	Lehrstuhl für Herz-, Thorax- und herznaher Gefäßchirurgie der medizinischen Fakultät der Universität Regensburg, Prof. Dr. C. Schmid. Thema: „Isolierung und Charakterisierung von zirkulierenden Endothelzellen aus Patientenproben bei Operation mit extrakorporaler Zirkulation“.

Regensburg, 01.12.2008