

Einfluss von gefrorenem Frischplasma auf die endotheliale Barrierefunktion

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Marcel Scheck

aus Gelsenkirchen

2024

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Tobias Hilbert
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Jens Müller

Tag der Mündlichen Prüfung: 10.01.2024

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin
Direktor: Prof. Dr. med. Mark Coburn

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	4
1.	Deutsche Zusammenfassung	6
1.1	Einleitung	6
1.2	Material	8
1.3	Methode	9
1.4	Ergebnisse	14
1.5	Diskussion	24
1.6	Zusammenfassung	28
1.7	Abbildungsverzeichnis	29
1.8	Tabellenverzeichnis	29
1.9	Literaturverzeichnis	30
2.	Veröffentlichung	37
	Abstract	37
	Introduction	37
	Materials and Methods	38
	Results	39
	Discussion	43
	Conclusions	44
	References	44
3.	Danksagung	46

Abkürzungsverzeichnis

ANG-2	Angiopoeitin-2
BSA	bovine serum albumin
cAMP	3',5'-Zyklisches Adenosin-Monophosphat
cDNA	complementary DNA
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CREB	cAMP response element-binding protein
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EK	Erythrozytenkonzentrat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FCS	Fetal Calf Serum
FITC-Dextran	Fluorescein Isothiocyanate-Dextran
FFP	gefrorenes Frischplasma
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
G	g-Kraft
GSK	Glykogensynthase-Kinase
HPMEC	humane pulmonale mikrovaskuläre Endothelzellen
HSP27	Heat Shock Protein 27
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
IGF	Insulin-like growth factor
Intraop.	intraoperativ

IL-8	Interleukin-8
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharide
NFκB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B cells
p38 MAPK	p38-mitogenaktivierte Proteinkinase
PBS	Phosphate buffered saline
Postop.	postoperativ
RFU	relative fluorescent units
RNA	Ribonukleinsäure
RQ	relative quantification
rt-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
TBST	Tris-buffered saline with Tween20
TK	Thrombozythenkonzentrat
TLR-4	Toll-like receptor 4
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
VEGF	vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren

1. Deutsche Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit versteht sich als zusammenfassender Überblick über die bereits publizierte Veröffentlichung „*Differential modulation of endothelial cell function by fresh frozen plasma*“, welche dieser Arbeit angehängt ist. Beide Arbeiten sind federführend durch mich erstellt worden.

1.1 Einleitung

1.1.1 Endothelzellen und endotheliale Funktion

Das vaskuläre Endothel besteht aus einer einreihigen Schicht meist plattenförmiger Endothelzellen, die das Lumen der menschlichen Blutgefäße mit einer Dicke von bis zu 10 μm auskleiden (Wallez und Huber 2008). Den Großteil der Endothelzellpopulation bilden mikrovaskuläre Endothelzellen mit einer Dicke von weniger als 0,3 μm (Mallick und Duttaroy 2022; Wallez und Huber 2008). Das Endothel bildet die Grenzschicht zwischen dem intra- und extravaskulären Kompartiment (Bannerman und Goldblum 2003; Hellenthal et al. 2022). Das Endothel wirkt aber nicht nur als Trennwand zwischen diesen beiden Kompartimenten. Im physiologischen Zustand reguliert es an seiner direkten luminalen Oberfläche, der sogenannten Glykokalyx, und über transzelluläre Kanäle aktiv den Wasser- und Stoffaustausch zwischen Blut und Gewebe (Ait-Oufella et al. 2010; Hellenthal et al. 2022; Wiesinger et al. 2013). Auch ist es an der Regulation des Blutdrucks beteiligt, da es Stickstoffmonoxid, Prostacycline und Endothelin synthetisiert und freisetzt, welche die Aktivität der glatten Gefäßmuskulatur beeinflussen (Mallick und Duttaroy 2022). Weiterhin dient es der Aufrechterhaltung der Fließfähigkeit des Blutes und der Hemmung bzw. der Aktivierung der Blutgerinnung. Letztere wird durch eine antithrombotische Oberfläche und durch Gewebe-Plasmin-Aktivatoren inhibiert. Bei Verletzungen werden dagegen gerinnungsfördernde Prozesse aktiviert und Inhibitoren von Antikoagulantien freigesetzt (Ait-Oufella et al. 2010; Pablo-Moreno et al. 2022). Über die Expression von Rezeptoren für Wachstumsfaktoren wie IGF („insulin growth factor“), FGF („fibroblast growth factor“) und VEGF („vascular endothelial growth factor“) spielt das Endothel ferner eine entscheidende Rolle bei der Angiogenese (Claesson-Welsh et al. 2021; Paulus et al. 2011).

Zusätzlich sind Endothelzellen, auch wenn sie nicht zu den eigentlichen Immunzellen zählen, wichtige Mittler der Abwehr von Infektionen und können Pathogenitätsfaktoren erkennen und auf diese reagieren (Aird 2003; Hellenthal et al. 2022; Lee und Liles 2011; Pablo-Moreno et al. 2022). Dies geschieht über die Ausbildung von Rezeptoren der angeborenen (innaten) Immunität wie z.B. Toll-Like-Rezeptoren und über die Freisetzung von Chemokinen, die chemotaktisch auf Immunzellen wie Monozyten und neutrophile Granulozyten wirken sowie über die Vermittlung der Adhäsion dieser Immunzellen über spezifische Zelladhäsionsmoleküle wie P- und L-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 auf der Endothelzelloberfläche (Ait-Oufella et al. 2010; Paulus et al. 2011). Im Falle einer lokalen Infektion kommt es zu einer Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren und zu einer Aktivierung des Gerinnungssystems, um das Infektionsgeschehen einzugrenzen. Bei einem ausgeprägten inflammatorischen Geschehen kann es auch zu systemischen Veränderungen und somit zur Ausbildung eines sogenannten „capillary leakage syndroms“ kommen.

1.1.2 Funktionelle Veränderungen im Schock, Therapie mit gefrorenem Frischplasma

Im klinischen Alltag werden bei kritisch erkrankten Patientinnen und Patienten regelhaft Fremdblut-Produkte eingesetzt, um die Hämostase, aber auch die Hämodynamik zu stabilisieren (z.B. im Falle des hämorrhagischen Schocks). Neben der Störung der Hämostase kommt es bei letzterem auch zu einer Störung der Endothelbarriere mit einer daraus folgenden gesteigerten Permeabilität für Plasmaflüssigkeit (Barelli und Alberio 2018; Yu et al. 2020). In der leitliniengerechten Therapie des hämorrhagischen Schocks spielt die Transfusion von gefrorenem Frischplasma („fresh frozen plasma“, FFP) eine wichtige Rolle, denn sie führt nachgewiesenermaßen zu einer signifikanten Reduktion der Mortalität (Barelli und Alberio 2018; Peng et al. 2013; Shah et al. 2023). Hierbei gelangt das Endothel naturgemäß immer als erstes mit FFP in Kontakt. Tierexperimentelle Studien konnten zeigen, dass FFP dabei nicht nur einen korrigierenden Einfluss auf eine Koagulopathie (durch Substitution von Gerinnungsfaktoren), sondern auch einen stabilisierenden Effekt auf das Endothel selbst bzw. dessen Barrierefunktion hat (Barelli und Alberio 2018; Chang et al. 2018; Pati et al. 2016; Straat et al. 2015; van den Brink et al. 2021; Vigiola Cruz et al. 2019; Yu et al. 2020). Der dieser unter FFP-Substitution zu beobachtenden Barrierestabilisierung zugrundeliegende Funktionsmechanismus konnte

bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Klinisch zeigen sich jedoch ein geringerer Flüssigkeitsverlust nach extravasal und damit einhergehend eine Kreislaufstabilisierung (Pati et al. 2010). Beides kann zu einer Senkung der Mortalität beitragen (Chang et al. 2018; Lopez et al. 2020; Potter et al. 2015; Straat et al. 2015).

Ein möglicher mechanistischer Ansatz, die beobachteten Effekte zu erklären, wäre der Einfluss von FFP auf den 3',5'-Zyklisches Adenosin-Monophosphat (cAMP)-Metabolismus der beteiligten Endothelzellen. cAMP stellt einen wichtigen Second-Messenger dar, der an einer Vielzahl regulatorischer Schritte der endothelialen Funktion beteiligt ist. In diesem Zusammenhang konnten Schlegel et al. bereits beschreiben, dass erhöhte intrazelluläre cAMP-Spiegel zu einer verbesserten endothelialen Barrierefunktion führen (Hellenthal et al. 2022; Schlegel et al. 2009).

1.1.3 Fragestellung

Ziel unserer Studie, deren Ergebnisse in der vorliegenden Schrift sowie der entsprechenden Publikation dargelegt werden, war es, den Einfluss von gefrorenem Frischplasma auf die endotheliale Funktion *in vitro* näher zu betrachten. Hierbei wurde spezifisch auf den Einfluss auf die endotheliale Barrierefunktion und den interzellulären Zusammenhalt, auf proinflammatorische Effekte, auf die Adhäsionseigenschaften sowie auf die Phosphorylierung funktioneller Proteine eingegangen. Daneben wurden mögliche mechanistische Effekte auf den zellulären cAMP-Metabolismus näher betrachtet. Wir führten unsere Untersuchungen an primären humanen Endothelzellen pulmonalen Ursprungs unter Stimulation mit bakteriellem Endotoxin durch.

1.2 Material

Das für die Untersuchungen genutzte gefrorene Frischplasma (Blutgruppe AB) wurde vom Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Bonn (Deutschland) zur Verfügung gestellt. PBS sowie Trizol Reagent wurde von Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) bezogen. Das FCS stammte von Biochrom GmbH (Berlin, Deutschland). Die genutzten Zellkulturplatten wurden von Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland) bezogen. Verwendet wurden außerdem der TLR-4-Ligand Lipopolysaccharid (LPS; *Escherichia coli* O111:B4), Accutase-Lösung, Chloroform,

Isopropanol, Ethanol, BSA (Bovines Serum Albumin) und FITC-konjugiertes Dextran (70 kDa) (alles Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)).

1.3 Methode

1.3.1 Zellkultur

Primäre humane pulmonale mikrovaskuläre Endothelzellen (HPMECs) (PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland) der maximal sechsten Passage wurden in Endothelial Cell Growth Medium MV (MV) mit Endothelial Growth Factor Supplement von PromoCell (Heidelberg, Deutschland) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Bei einer Dichte von 80 – 90 % wurden die Zellen subkultiviert. Hierfür wurde das Wachstumsmedium abgesaugt und die Zellen einmalig mit 10 ml PBS gewaschen, mit 2 ml Accutase-Lösung bei 37 °C vom Boden der Kulturflasche gelöst und in MV-Medium resuspendiert.

Zur Inkubation wurden die HPMECs auf sterilen Zellkulturplatten ausgesät und in MV-Medium bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Nach 48 Stunden wurde das Nährmedium komplett erneuert bis zu einer 80- bis 90-prozentigen Konfluenz der Zellen.

Zur Stimulation wurde LPS in einer Konzentration von 1 µg/ml genutzt. Die Inkubation erfolgte für die Bestimmung der Monozyten-Adhäsion und der NFκB-Translokation über 2 Stunden. Für alle anderen Versuche erfolgte die Stimulation für 18 Stunden. Anschließend wurden 30 Vol% des Zellkulturmediums durch frisches MV-Medium oder frisch aufgetautes FFP (je nach Versuchsgruppe) ersetzt und damit für weitere 60 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die je nach Versuch zu untersuchenden Proben gewonnen. Als Kontrollgruppe wurden die Endothelzellen in MV-Medium kultiviert. Hierbei erfolgte ebenfalls nach 2 bzw. 18 Stunden ein Austausch von 30 Vol% Zellkulturmedium gegen frisches MV-Medium. So wurde verfahren, um eine unspezifische Aktivierung der Endothelzellen durch einen vollständigen Mediumwechsel zu verhindern.

THP-1-Zellen (Wesel, Deutschland) wurden in RPMI 1640 (Lonza, Basel, Schweiz) mit L-Glutamin mit 5 % FCS bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

1.3.2 Permeabilitäts-Assay

24 Well Inserts (Corning, Tewksbury, MA, USA) mit einer Porengröße von 0,4 µm und einer Membranfläche von 0,33 cm² wurden mit Gelatine beschichtet, und HPMECs (Passage 5) wurden darauf ausgesät (50.000 Zellen pro Well). Die Zellen wurden bei 37

°C und 5 % CO₂ in MV-Medium bis zur Bildung eines dichten und konfluenten Monolayers kultiviert. Es erfolgte ein regelmäßiger Wechsel des Kulturmediums. Um die Permeabilität zu induzieren, wurden die Zellen, wie oben beschrieben, für 18 Stunden mit 1 µg/ml LPS in MV-Medium inkubiert. Als Kontrolle erfolgte die entsprechende Inkubation mit MV-Medium. Nachfolgend erfolgte die Postinkubation mit FFP nach oben dargestellter Verfahrensweise.

Nach erfolgter Inkubation wurde das Medium vorsichtig aspiriert und in den unteren Wells 750 µl vorgewärmter Assaypuffer (HEPES-buffered Hank's buffered salt solution (HBSS), pH 7,4) vorgelegt. In die oberen Inserts wurden 50 µl FITC-Dextran (70 kDa, Konzentration 5 mg/ml) pipettiert. Die Platten wurden dann auf einem Schüttler in Dunkelheit (140 U/min, 37 °C) über eine Stunde inkubiert. Sodann wurden 50 µl des Puffers aus den unteren Wells entnommen und in eine schwarze 96-Well-Platte überführt. Die FITC-Dextran-Konzentration in den entnommenen Proben wurde mittels eines Fluoreszenz-Readers (Cytation 5; BioTek, Santa Clara, CA; USA) gemessen (Extinktion: 492 nm, Emission: 518 nm) und anhand einer Verdünnungsreihe ermittelt. Die Messung erfolgte in Doppelbestimmung.

1.3.2 Leukozytenadhäsions-Messung

24-Well-Platten wurden mit Gelatine beschichtet. Darauf wurden HPMECs gesät und bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit LPS (2 Stunden und/oder FFP (1 Stunde) wie oben beschrieben.

THP-1-Zellen wurden mit Calcein-AM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) gefärbt. Hierfür wurden die Zellen mit 1 µl Calcein-AM pro eine Million THP-1-Zellen in RPMI-Medium über 30 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden sie dreimal mit RPMI-Medium gewaschen und in einer Konzentration von einer Million Zellen pro ml in MV-Medium resuspendiert. Von den HPMECs wurde der Überstand abgesaugt und 400 µl Calcein-gefärbte THP-1-Zellen pro Well ($4 \cdot 10^5$ Zellen pro Well) hinzugegeben. Nach 30minütiger Inkubation wurden die Platten gewaschen. Zuletzt wurde 1 ml PBS pro Well ergänzt und die Zellen darin für fünf Minuten bei Raumtemperatur ruhen gelassen. Anschließend wurde die Fluoreszenz der

Platten in einem Fluoreszenz-Reader (Cytation 5) gemessen. Die Emission betrug dabei 520 nm und die Extinktion 485 nm.

1.3.3 Immunfluoreszenzmikroskopie

Immunfluoreszenzmikroskopisch wurde die zelluläre Verteilung des Zellkontakt-Proteins VE-Cadherin sowie des inflammatorischen Schlüsselproteins NFκB p65 visualisiert und quantifiziert. Die Färbung erfolgte jeweils nach dem gleichen Protokoll mit den in Tabelle 1 dargestellten Antikörpern.

Tab. 1: Primärer Antikörper Immunfluoreszenz

<u>Antigen</u>	<u>Konjugation</u>	<u>Spezies</u>	<u>Stock Konzentration</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Kat.- Nummer</u>	<u>Hersteller</u>
Human NFκB p65	unkonjugiert	rabbit	201.0 µg/ml	1:200	8242S	Cell Signalling Technology, Danvers, MA, USA
VE-Cadherin	unkonjugiert	rabbit	1 mg/ml	1:200	ab33168	Abcam, Cambridge, UK

Tab. 2: Sekundärer Antikörper Immunfluoreszenz

<u>Antigen</u>	<u>Konjugation</u>	<u>Spezies</u>	<u>Stock Konzentration</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Kat.- Nummer</u>	<u>Hersteller</u>
Anti-rabbit IgG	Alexa Fluor 488	goat	2 mg/ml	1:1000	A11008	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

HPMECs wurden auf autoklavierte Deckgläser in einer sterilen 24-Well-Platte verteilt und bis zur 80- bis 90prozentigen Konfluenz kultiviert. Anschließend wurde die Stimulation wie oben beschrieben durchgeführt. Für die Darstellung von NFκB erfolgte die Inkubation mit LPS über 2 Stunden, für die Darstellung von VE-Cadherin über 18 Stunden.

Nach Abschluss der Inkubation wurde das gesamte Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit 500 µl kaltem PBS gewaschen und anschließend mit eiskaltem Aceton/Methanol (1:1) für 3 Minuten bei -20 °C fixiert. Anschließend wurden die Zellen für 15 Minuten mit TBST (Tris-buffered salt solution mit Tween) mit 1 % BSA blockiert, um

unspezifische Bindungen zu unterbinden. Nun erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper gegen NFκB (NFκB p65, Verdünnung 1:200, Cell Signalling Technology, Danvers, MA, USA) bzw. VE-Cadherin (Verdünnung 1:200, Abcam, Cambridge, UK) für 90 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Nach dieser Inkubation wurden die Zellen dreimal für 5 Minuten mit PBS gewaschen, bevor der mit Alexa-Fluor™ 488 gelabelte Sekundärantikörper (Thermo Fisher Scientific) in einer Verdünnung von 1:1000 zugegeben wurde. Mit diesem wurde für 60 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, gefolgt von einem weiteren Waschschrift (3x). Nun wurden die Deckgläser auf Objektträgern mit Mounting-Medium (Dianova, Hamburg, Deutschland) eingedeckelt. Das Mounting-Medium enthielt DAPI, das bei einer Emission von 461 nm zu einer Anfärbung von DNA und somit der Zellkerne führt. Die Proben wurden bei Raumtemperatur im Dunkeln getrocknet und anschließend unter einem Zeiss AXIO Observer.Z1 Fluoreszenzmikroskop (Oberkochen, Deutschland) analysiert. Die Auswertung der NFκB-Translokation erfolgte durch Bestimmung des Verhältnisses der Fluoreszenz-Intensität zwischen Zytoplasma und Zellkern mittels Zeiss Zen Software.

1.3.4 Real-Time-PCR

HPMECs wurden wie beschrieben kultiviert und inkubiert. Im Anschluss wurde der Überstand abgenommen und die Zellen in 1 ml pro Well Trizol-Lösung lysiert. Anschließend erfolgte die RNA-Isolation mit Chloroform, Isopropanol und Ethanol gemäß Herstellerangaben. Das entstandene RNA-Pellet wurde zweimal gewaschen und für 30 Minuten getrocknet. Ab diesem Zeitpunkt wurde auf Eis gearbeitet. Das getrocknete Pellet wurde in ultra-reinem DEPC-Wasser gelöst und die enthaltene Menge an RNA spektralphotometrisch mittels Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Die anschließende cDNA-Synthese erfolgte mittels „High Capacity cDNA-Kit“ von Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland). Es wurden jeweils 2 µg RNA eingesetzt. Die entstandene cDNA wurde mit DEPC-Wasser 1:5 verdünnt und bei 4 °C gelagert. Die Analyse der Genexpression von ANG-2, IL-18, ICAM-1, VCAM-1 und VEGF erfolgte via RT-PCR mit Taqman-Gensonden im Vii7 System von Applied Biosystems nach Angaben des Herstellers. Die Genexpression wurde auf 18s ribosomale RNA normalisiert und die Auswertung nach der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode durchgeführt (RQ, relative quantification).

1.3.5 Bestimmung der cAMP-Konzentration

Die Bestimmung der cAMP-Konzentration erfolgte mit dem „direct cAMP ELISA Kit“ von Enzo Life Sciences (Loerrach, Deutschland). Die Proben wurden hierfür nach beschriebener Inkubation durch Zellyse in 0,1 %iger Salzsäure gewonnen. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Alle Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels der im Kit enthaltenen Standardreihe und mit Hilfe des Programms GraphPad Prism (La Jolla, CA, USA).

1.3.6 Phosphorylierungs-Assay

Der Phosphorylierungs-Assay wurde mittels „Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array Kit ARY003B“ von R&D-Systems (Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Proben wurden Zellysate von HPMECs untersucht, die nach beschriebener Stimulation mit dem im Kit enthaltenen Lyse-Puffer gewonnen wurden.

Es wurden mindestens 300 µg Protein auf den mit Capture-Antikörpern beschichteten Assay-Membran-Sets eingesetzt. Nach Inkubation über Nacht wurden die Membranen gewaschen und anschließend mit Detektions-Antikörper inkubiert. Das Auslesen des Arrays erfolgte mit einem Amersham™ Imager 600 von GE Life Sciences, (Freiburg, Deutschland). Die Auswertung erfolgte über die Messung der Pixeldichte mithilfe des Programms ImageQuant TL™ (GE, Boston, MA, USA). Jede Probe wurde als Doppelbestimmung gemessen. Nach Ermittlung der Mittelwerte wurden die Messwerte über die auf den Arraymembranen vorhandenen Referenzspots standardisiert und mittels MS Excel (Microsoft Corp., Redmond, CA, USA) die Ergebnisse für die jeweiligen Proteine nach unterschiedlicher Inkubation gegeneinander verglichen. Der Effekt von LPS bzw. FFP wurde dabei als prozentuale Veränderung dargestellt.

1.3.7 Bestimmung der Konzentration von löslichem Syndecan-1 im Serum

Die Bestimmung der Konzentration von löslichem Syndecan-1 erfolgte im Serum von Patientinnen, die sich einer abdominalen Operation zur Zytoreduktion bei fortgeschrittenem Ovarialkarzinom unterzogen. Alle studienbedingten Maßnahmen geschahen im Einklang mit der Deklaration von Helsinki und nach Einholen einer schriftlichen Einverständniserklärung. Ausschlusskriterien waren die fehlende

Einwilligung, Alter unter 18 Jahren oder eine bestehende Schwangerschaft. Anästhesie und Operation erfolgten nach häuslichem Standard, ebenso das intraoperative hämodynamische Management durch das zuständige Anästhesie-Personal, welches nicht Teil des Studienteams war. Jeweils 10 ml Blut wurden präoperativ und 24 Stunden postoperativ abgenommen und das Serum abgetrennt. Die Messung der Konzentration von löslichem Syndecan-1 in den Proben erfolgte mittels „custom-made“ Luminex™ Multiplex-Arrays von R&D-Systems nach beiliegendem Protokoll, und die Analyse der Arrays wurde auf einem MAGPIX™-Reader (Luminex Corp., Austin, Texas, USA) durchgeführt.

1.3.8 Statistische Analyse

Alle Experimente wurden mindestens in Triplikaten durchgeführt. Die Daten wurden anschließend in Microsoft Excel überführt. Die statistische Analyse und die graphische Darstellung erfolgte mittels GraphPad Prism 8. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung oder Standardfehler. Die statistische Signifikanz wurde mittels einseitiger ANOVA mit Tukey Post-hoc-Test oder ungepaartem, zweiseitigem Student T-Test geprüft. P-Werte kleiner 0.05 wurden als statistisch signifikant angesehen.

1.4 Ergebnisse

Sowohl bei kritischen Erkrankungen als auch im Rahmen größerer operativer Eingriffe spielt ein entstehender Endothelschaden mit einer daraus resultierenden Störung der Barrierefunktion eine entscheidende Rolle. Diese Funktionsstörung führt zu einer erheblich erhöhten Permeabilität des Endothels, was wiederum einen erhöhten Flüssigkeitsverlust nach extravasal nach sich zieht. Die Durchlässigkeit des Endothels nach Aktivierung konnten wir mittels Permeabilitäts-Assay mit FITC-konjugiertem Dextran untersuchen. Dabei kam es nach Inkubation mit LPS zu einer deutlich vermehrten Durchlässigkeit des Endothelzell-Monolayers gegenüber der Kontrolle (905 vs. 453 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$; $p < 0,05$). Durch Zugabe von FFP nach LPS-Inkubation zeigte sich eine signifikante Abnahme der endothelialen Permeabilität auf Ausgangsniveau (308 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$; $p < 0,05$). (Abb. 1A)

Den Einfluss auf die Permeabilität des mikrovaskulären Endothelzelllayers konnten wir auch mittels Immunfluoreszenzfärbung von endotheliale VE-Cadherin darstellen. VE-Cadherin stellt ein für den interzellulären Zusammenhalt essenzielles Protein dar (Piotti

et al. 2021). Durch die Inkubation der Endothelzellen mit LPS kam es zu einer Änderung der Zellmorphologie und einem Auseinanderrücken der Zellen mit einer sichtbaren Lückenbildung zwischen ihnen. Festzustellen war außerdem wie in Abbildung 1B zu sehen ein diffuseres Verteilungsmuster des gefärbten VE-Cadherins im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Bei der Postinkubation mit FFP nach vorheriger Stimulation mit LPS konnte man eine vermehrte Filamentbildung zwischen den Zellen und einen insgesamt dichter beieinanderliegenden Zellverband beobachten. Ebenfalls lag das gefärbte VE-Cadherin wie in der Kontrollgruppe wieder im Bereich der Zellgrenzen.

Das Endothel bildet jedoch nicht nur für Flüssigkeiten und Plasmaproteine eine Barriere, sondern auch für Immunzellen. Mit Hilfe von mit Calcein-AM markierten THP-1-Zellen konnten wir immunfluorometrisch die Adhäsion monozytärer Zellen an Endothelzellen messen. In der Kontrollgruppe führte die Adhäsion der markierten THP-1-Zellen zu einem Fluoreszenzsignal von 6980 RFU. Die Stimulation mit LPS führte im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einem hochsignifikanten Anstieg der Leukozytenadhäsion (24680 RFU vs. 6980 RFU; $p < 0,001$). Die anschließende Stimulation mit FFP führte zu einem weiteren Anstieg der Adhäsion der THP-1-Zellen im Vergleich zu den zuvor lediglich mit LPS stimulierten HPMECs (31615 RFU vs. 24680 RFU; $p < 0,005$). Die alleinige Inkubation mit FFP (ohne LPS) hatte demgegenüber wie in Abbildung 1C zu sehen keinen Effekt auf die Adhäsion.

(A) Dargestellt ist die Permeabilität für FITC-konjugiertes Dextran (70 kDa), bezogen auf die Oberfläche des Endothelzell-Monolayers. (n=4)

(B) Dargestellt sind repräsentative Bilder, die Veränderungen der Zellmorphologie sowie die Vergrößerung von interzellulären Lücken nach LPS-Inkubation zeigen. Nach anschließender FFP-Postinkubation sind diese Veränderungen zum Großteil rückläufig.

(C) Dargestellt ist der Effekt auf die Adhäsion von mit Calcein-AM gefärbten THP-1-Zellen. (n=4), RFU = relative fluorescent units

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Einseitige ANOVA mit Tukey Post-hoc-Test. Signifikanzen: * $p < 0.05$, *** $p < 0.005$.

NF κ B als Transkriptionsfaktor ist für eine Vielzahl regulatorischer Schritte humaner Zellen verantwortlich (Kempe et al. 2005). Durch diese regulatorischen Schritte ist NF κ B entscheidend an immunmodulatorischen Reaktionen beteiligt (Liu et al. 2017; Zhao et al 2021). Bei der Aktivierung von NF κ B kommt es zu dessen Internalisierung in den Zellkern (sog. Kerntranslokation). Dies lässt sich mittels Immunfluoreszenzfärbung darstellen.

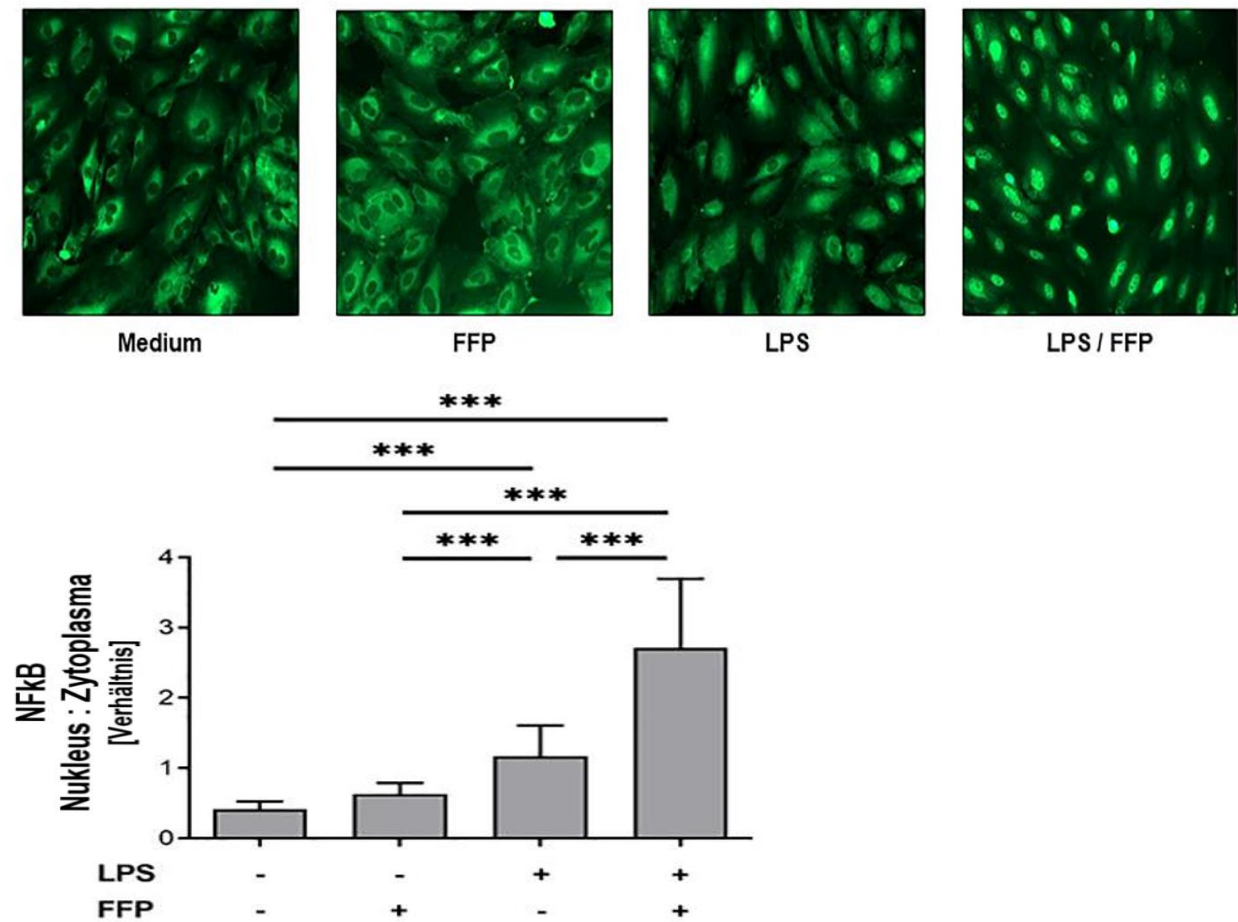
Eine moderate Aktivierung von NF κ B durch Internalisierung war nach der Inkubation der HPMECs mit LPS zu erkennen. Nach Zugabe von FFP wurde diese Aktivierung von NF κ B deutlich gesteigert, so dass es in der Folge fast vollständig im Zellkern vorlag. Das Verhältnis von NF κ B im Zellkern zu dem im Zytoplasma war um das 6,75-fache gegenüber der Kontrollgruppe erhöht ($p < 0,005$). Die alleinige Inkubation der Endothelzellen mit FFP führte wie in Abbildung 2A zu sehen zu keiner signifikanten Translokation von NF κ B.

Mit Hilfe der Real-Time-PCR konnten wir deutliche Veränderungen in der Expression verschiedener, u.a. proinflammatorischer Gene feststellen. So führte die Inkubation mit LPS wie in Abbildung 2B dargestellt zu einer deutlichen Steigerung der Genexpression von Interleukin-8 (RQ 34,2; $p < 0,005$), ICAM-1 (RQ 30,3; $p < 0,005$), VCAM-1 (RQ 91,2; $p < 0,005$), VEGF (RQ 3,1; $p < 0,005$) und Angiopoietin-2 (RQ 1,3; $p = 0,005$). Diese Proteine vermitteln Inflammation, Leukozytenadhäsion und beeinflussen die Integrität der Endothelbarriere.

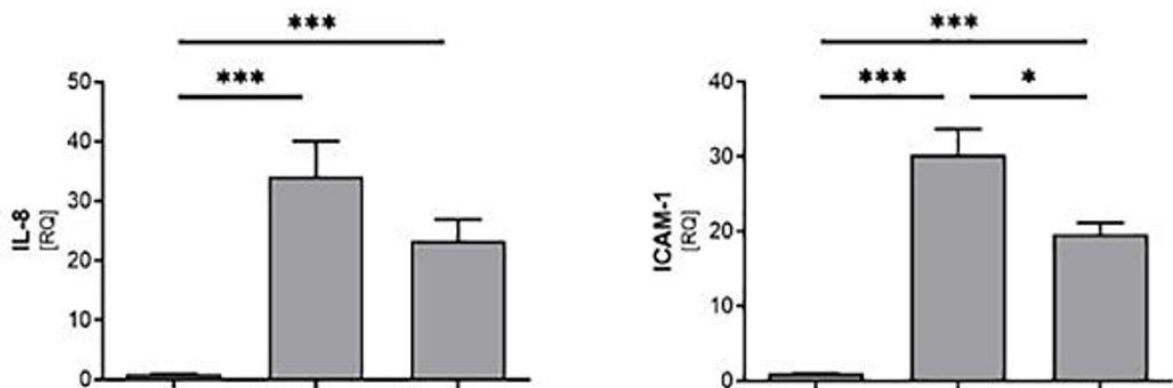
Vor dem Hintergrund der gesteigerten Kerntranslokation von NF κ B nach Zugabe von FFP in Kombination mit LPS wäre davon auszugehen, dass ebenfalls die Expression der oben genannten Gene deutlich gesteigert wird. Jedoch führte bereits eine kurzzeitige

Inkubation (1 Stunde) mit FFP vielmehr zu einer Reduktion dieser Genexpression (Interleukin-8 (RQ 23,4 vs. LPS; $p > 0,05$), ICAM-1 (RQ 19,6 vs. LPS; $p = 0,03$), VCAM-1 (RQ 50,3 vs. LPS; $p < 0,005$), VEGF (RQ 2,3 vs. LPS; $p > 0,05$) und Angiopoietin-2 (RQ 0,8 vs. LPS; $p < 0,005$).

A



B



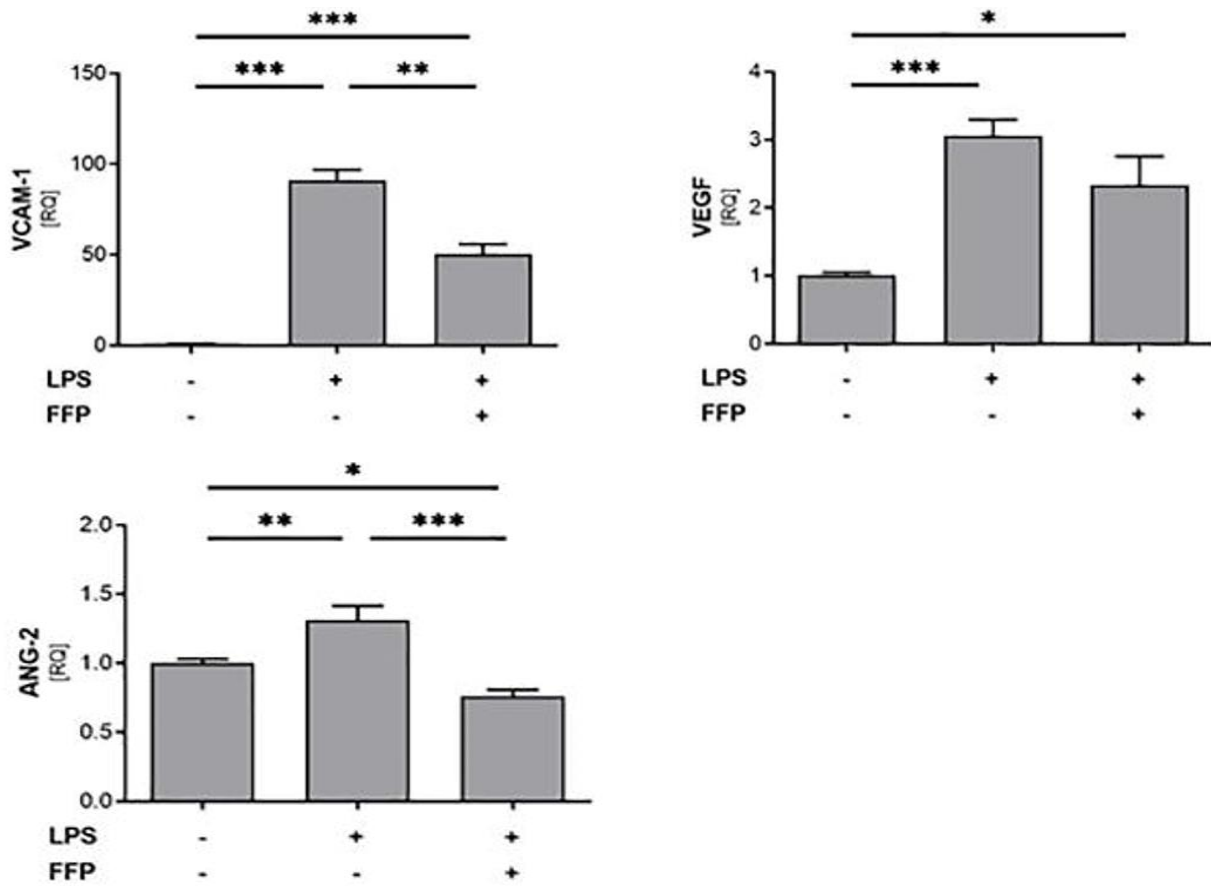


Abb. 2: FFP führt zu einer vermehrten Translokation von NFκB, jedoch ebenfalls zu einer verminderten Expression von Genen, die an der Regulation von Inflammation, Adhäsion und Regulation der Endothelbarriere beteiligt sind. Die Abbildung ist der Originalpublikation Scheck et al. (2020) entnommen.

(A) Dargestellt ist die durch Immunfluoreszenz sichtbar gemachte Translokation von NFκB. Der Graph zeigt die Quantifizierung dieser Translokation durch das Verhältnis von Fluoreszenzintensität im Zellkern zu der im Zytoplasma.

(B) Dargestellt ist die Genexpression von IL-8, ICAM-1, VCAM-1, VEGF und ANG-2. Die Expression wurde auf 18s ribosomale RNA normalisiert. (n=3-9)

Einseitige ANOVA mit Tukey Post-hoc-Test. Signifikanzen: * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.005.

3',5'-Zyklisches Adenosin-Monophosphat (cAMP) ist als wichtiger second messenger an einer Vielzahl regulatorischer Schritte der Endothelzellen beteiligt. Wir konnten wie in Abbildung 3A dargestellt zeigen, dass die Stimulation mit LPS zu einer leichten Abnahme der zellulären cAMP-Konzentration in Bezug auf die Kontrollgruppe führte (0,8; p > 0.05). Die Zugabe von gefrorenem Frischplasma nach vorangegangener Stimulation der Endothelzellen mit LPS führte zu einer signifikanten Steigerung der cAMP-Konzentration

sowohl in Bezug auf die LPS-Gruppe (0,8 vs. 1,6; $p < .05$) als auch in Bezug auf die Kontrollgruppe (1,6; $p < .05$). Die alleinige Inkubation mit FFP hatte keinen Einfluss auf die cAMP-Konzentration.

Die Funktion und Aktivität einer Vielzahl endothelialer Funktionsproteine wird reguliert und vermittelt über ihren Phosphorylierungszustand (Hung et al. 2017; Khakpour et al. 2015; Liang et al. 2014; Pober 2002). Für einige dieser Proteine, die an der Regulation der endothelialen Inflammation (IL-8, ICAM-1, VCAM-1) als auch der Permeabilität (VEGF, ANG-2) beteiligt sind, konnten wir einen Einfluss von LPS und FFP auf die Phosphorylierung feststellen. Wie Abb. 3 zeigt, reduzierte die Inkubation der Endothelzellen mit LPS die Phosphorylierung von cAMP Response Element-Binding Protein (CREB; 73 % der Kontrolle; $p < .005$), Glykogen Synthase Kinsase 3 (GSK3 α/β ; 60 %; $p = .02$), Heat Shock Protein 27 (HSP27; 71 %; $p < .005$), Proteinkinase Lyn (Lyn; 77 %; $p < .005$) sowie der p38-mitogenaktivierten Proteinkinase (p38 α ; 64 %; $p < .005$) im Vergleich zur Kontrolle signifikant. Die anschließende Zugabe von FFP führte zu einer Normalisierung der Phosphorylierung wieder auf das Kontrollniveau.

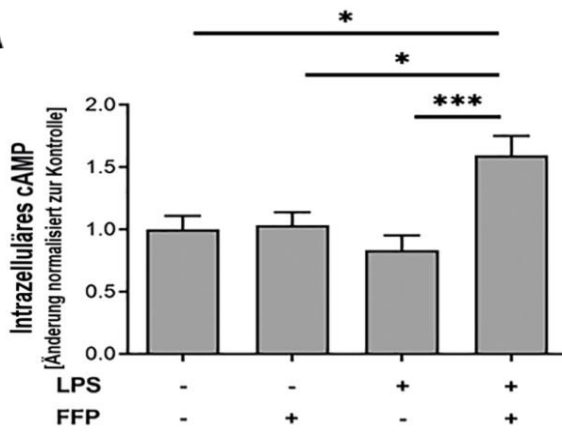
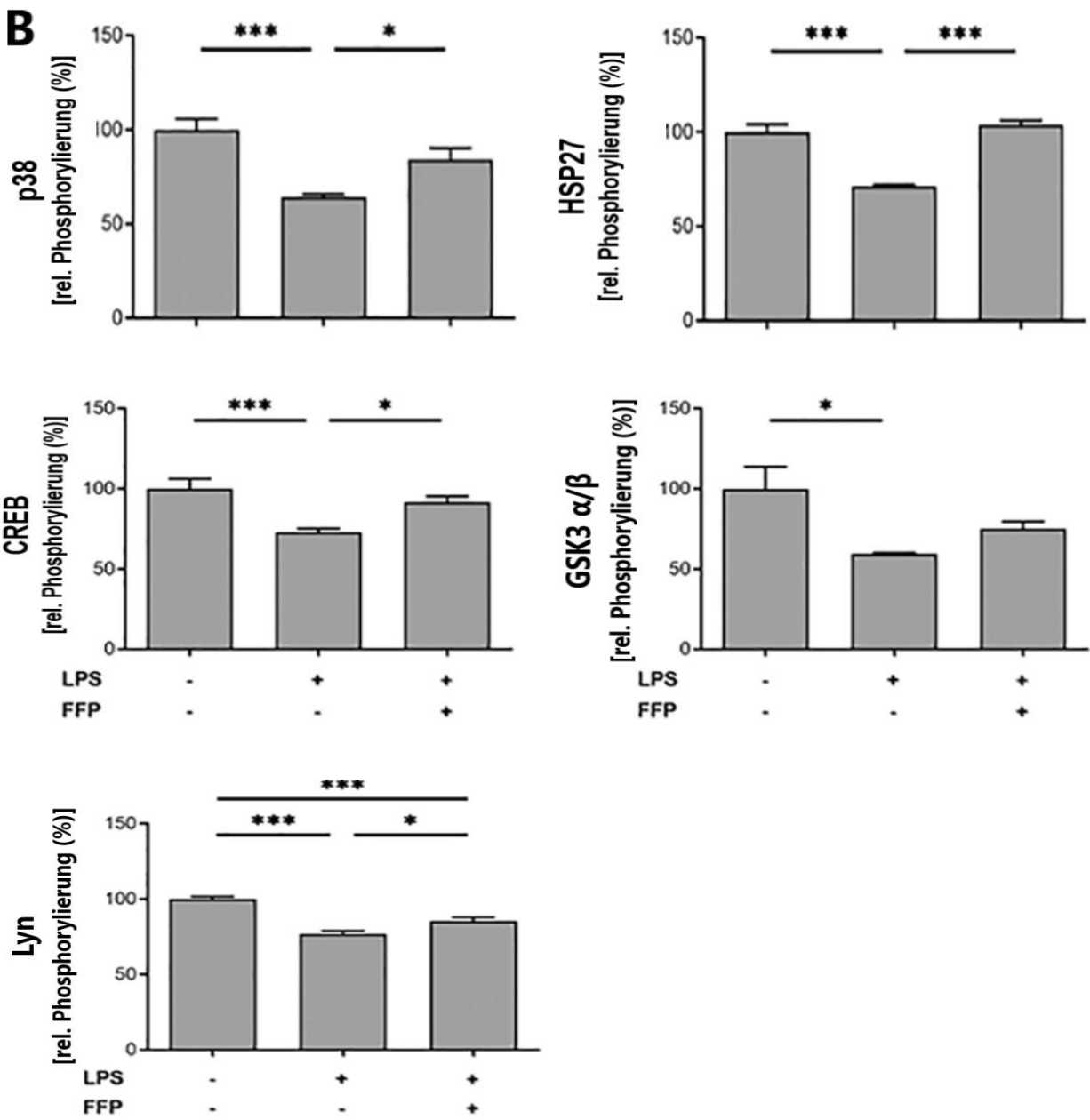
A**B**

Abb. 3: FFP steigert die zellulären cAMP-Spiegel und stabilisiert die Phosphorylierung von endothelialen Proteinen. Die Abbildung ist der Originalpublikation Scheck et al. (2020) entnommen.

(A) Dargestellt ist der Einfluss auf die intrazelluläre Konzentration des second messengers cAMP durch die Stimulation mit LPS und FFP. ($n=5-7$)

(B) Dargestellt ist das Phosphorylierungsprofil der endothelialen Funktionsproteine cAMP Response Element-Binding Protein (CREB), Glykogen Synthase Kinsase 3 (GSK3 α/β), Heat Shock Protein 27 (HSP27), Proteinkinase Lyn (Lyn), p38-mitogenaktivierten Proteinkinase (p38 α). ($n=2$)

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Einseitige ANOVA mit Tukey Post-hoc-Test. Signifikanzen: * $p<0.05$, *** $p<0.005$.

Syndecan-1 wird bei Schädigung der endothelialen Glykokalix in das Gefäßbett freigesetzt. Lösliches und daher im Serum messbares Syndecan-1 stellt daher bei kritischen Erkrankungen einen Marker für einen Endothelschaden dar (Dogné und Flamion 2020; Stepan et al. 2011; Straat et al. 2015; Tarbell und Cancel 2016; van den Brink et al. 2021). Wie in Tabelle 3 sichtbar konnten wir zeigen, dass bei Patientinnen, die während einer abdominalen zytoreduktiven Operation bei fortgeschrittenem Ovarialkarzinom FFP erhielten, sowohl absolute als auch relative Konzentrationen von löslichem Syndecan-1 im Blut 24 Stunden nach Operation deutlich niedriger lagen im Vergleich zu Patientinnen, die keine FFP-Transfusion erhalten hatten. Transfundierte Patientinnen zeigten darüber hinaus einen erhöhten intraoperativen Flüssigkeits- und Gesamttransfusionsbedarf im Vergleich zu denjenigen Patientinnen, die kein FFP erhielten, jedoch war die postoperative Flüssigkeitsbilanz nicht signifikant verändert.

Tab. 3: Serumkonzentrationen von Syndecan-1 bei Patientinnen, die sich einer abdominalen Operation zur Zytoreduktion bei Ovarialkarzinom unterzogen, in Abhängigkeit der Transfusion von FFP

Parameter	Mittelwert (SD)		P
	Keine erhalten	FFP FFP erhalten	
n	9	11	
Alter (Jahre)	64 (11)	72 (8)	0.09
Body Mass Index (kg/m ²)	29,3 (8.0)	26.0 (4.0)	0.25
OP-Dauer (min)	408 (157)	507 (110)	0.12
Intraop. Flüssigkeitsgabe (ml/kg * h)	15,1 (5.1)	20.6 (8.4)	0.11
Postop. Flüssigkeitsbilanz (ml)	5958 (2426)	8252 (2891)	0.07
Geschätzter intraop. Blutverlust (ml/h)	80.3 (52.7)	246.8 (249.3)	0.09
Transfundierte EK	0.2 (0.7)	3.7 (3.7)	0.01
Transfundierte FFP	0 (0)	5 (2)	<0.001
Transfundierte TK	0 (0)	0.1 (0.3)	0.38
Präop. Syndecan-1 Serumlevel (ng/ml)	2.80 (0.43)	2.88 (0.64)	0.75
Postop. Syndecan-1 Serumlevel (ng/ml)	5.58 (1.92)	3.99 (0.92)	0.03
Postop. Syndecan-1 Serumlevel (fold change)	1.97 (0.59)	1.42 (0.35)	0.02

Postop. = postoperativ, Präop. = präoperativ, EK = Erythrozytenkonzentrat, FFP = Frischplasma, TK = Thrombozytenkonzentrat; Ungepaarter, zweiseitiger Student T-Test. Die Tabelle ist der Originalpublikation Scheck et al. (2020) entnommen.

1.5 Diskussion

Der Effekt von FFP auf die Funktion von Endothelzellen ist aktuell weiterhin nicht vollständig beschrieben und ebenfalls nicht die dahinterstehenden Funktionsmechanismen. Mit unserer Studie untersuchten wir den Einfluss von FFP auf die endotheliale Barrierefunktion, Inflammation und Monozyten-Adhäsion nach Stimulation mit dem bakteriellen Endotoxin LPS.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Stimulation mit FFP zu einem signifikanten Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration führte, die zuvor durch die Stimulation mit dem TLR-4-Liganden LPS reduziert wurde. Der zelluläre cAMP-Spiegel hat sowohl einen Einfluss auf die Genexpression und auf den Phosphorylierungsgrad endothelialer Funktionsproteine als auch auf die Monozyten-Adhäsion und die NFκB-Translokation. In vivo zeigten sich erniedrigte Syndecan-1-Konzentrationen in Blutproben von Patientinnen, die während einer großen abdominalen Operation zur Zytoreduktion bei fortgeschrittenem Ovarialkarzinom FFP erhalten haben.

Die Stimulation mit LPS führte zu einer Abnahme der cAMP-Konzentration. Auch wenn wir hier lediglich eine diskrete Abnahme aufzeigen konnten, steht dies im Einklang mit den Ergebnissen von Schlegel et al., die eine deutliche Reduktion der cAMP-Konzentration durch LPS-Stimulation zeigen konnten und eine daraus resultierende erhöhte endotheliale Permeabilität mit Auseinanderrücken der Endothelzellen und Fragmentation von VE-Cadherin (Schlegel et al. 2009; Xiong et al. 2023). Diese Effekte von LPS auf die Endothelbarriere konnten durch eine Erhöhung des cAMP-Spiegels geblockt werden (Hellenthal et al. 2022; Schlegel et al. 2009; Xiong et al. 2023). So scheint cAMP ein Schlüsselfaktor der Regulation der endothelialen Permeabilität zu sein.

Die Stimulation mit LPS hatte auch einen Einfluss auf die endotheliale Inflammation. So konnten wir eine deutliche Aktivierung von NFκB durch Translokation in den Zellkern darstellen. Auch kam es zu einer deutlich gesteigerten Expression von Genen, die proinflammatorisch (IL-8) bzw. proadhäsiv (ICAM-1, VCAM-1) wirken oder die zu einer erhöhten Permeabilität führen (VEGF, ANG-2). Zusätzlich konnten wir eine Steigerung der Monozyten-Adhäsion nach Stimulation mit LPS darstellen, was ebenfalls, wie bereits von anderen gezeigt wurde, Folge der Aktivierung von NFκB ist (Kempe et al. 2005; Kim et al. 2000; Schlegel et al. 2012; Zhang und Frei 2001).

Wenn die mit LPS stimulierten Endothelzellen nachfolgend mit FFP inkubiert wurden, kam es nicht nur zu einer Normalisierung des reduzierten intrazellulären cAMP-Spiegels, sondern sogar zu einer Steigerung über das Normalniveau der Kontrollgruppe hinaus. Wir konnten zeigen, dass die durch LPS induzierte Permeabilität der Endothelzellen durch die Inkubation mit FFP signifikant reduziert werden konnte. Dies wurde ebenfalls in der immunfluoreszenzmikroskopischen Darstellung des interzellulären Zusammenhalts sichtbar. Nachdem LPS zu einem Auseinanderrücken der Zellen mit einem Verlust von Zell-Zell-Kontakten führte, kam es nach Inkubation mit FFP zu einem erneuten Zusammenrücken der Zellen mit vermehrten interzellulären Kontakten. Dies ist, wie bereits beschrieben, ein Effekt des erhöhten cAMP-Spiegels und scheint in unseren Versuchen durch die Inkubation mit FFP bedingt (Schlegel et al. 2009; Fukuhara et al. 2005).

Interessanterweise führte die Kombination von LPS mit FFP zu einer weitergehenden, stark erhöhten Translokation von NFκB in den Zellkern als Ausdruck einer proinflammatorischen Aktivierung. Dieser Effekt auf NFκB scheint ebenfalls cAMP-vermittelt zu sein und wurde ebenfalls durch Schlegel et al. beschrieben. In dieser Arbeit konnte nach Erhöhung der intrazellulären cAMP-Spiegel durch Forskolin neben der gesteigerten NFκB-Translokation ebenfalls ein stabilisierender Effekt auf die endotheliale Barrierefunktion beschrieben werden (Schlegel et al. 2012).

In unserer Arbeit zeigte sich, passend zu der verstärkten Aktivierung von NFκB, eine vermehrte Monozyten-Adhäsion nach Inkubation mit LPS und FFP. Auch dieses ist, wie bereits von Sung et al. beschrieben, als Effekt eines erhöhten intrazellulären cAMP-Spiegels zu interpretieren (Sung et al. 1991).

Bemerkenswert ist, dass es trotz einer verstärkten Translokation von NFκB zu einer verminderten Expression von Genen kam, die die Inflammation (IL-8), die Leukozytenadhäsion (VCAM, ICAM) und die Permeabilität (VEGF, ANG-2) regulieren. Diesen Effekt der reduzierten Genexpression bei gleichzeitig verstärkter NFκB-Translokation in den Zellkern zeigten jedoch auch bereits Ollivier et al. und stellten dabei ebenfalls einen Zusammenhang zum zellulären cAMP-Stoffwechsel her. Sie konnten demonstrieren, dass erhöhte cAMP-Spiegel zu einer verminderten Expression von proinflammatorischen wie auch proadhäsiven Genen führte, wobei jedoch die Aktivierung von NFκB durch LPS selbst unbeeinflusst blieb (Ollivier et al. 1996). Dies legt erneut nahe,

dass cAMP Endothelzellen auf verschiedenen Ebenen funktionell beeinflusst. Weitere Arbeiten zum septischen oder hämorrhagischen Schock zeigten ebenfalls einen Einfluss von FFP auf die Expression von proinflammatorischen Genen oder von ICAM-1 und VCAM-1 (Chang et al. 2018; Dekker et al. 2014; Sillesen et al. 2014). Dabei ist zu bemerken, dass eine Reduktion der zelloberflächlichen Adhäsionsmoleküle nicht zwangsläufig auch zu einer reduzierten Monozyten-Adhäsion führen muss. So haben andere Arbeiten gezeigt, dass es sehr wohl zu einer gesteigerten Monozyten-Adhäsion unabhängig von der Expression von ICAM-1 oder VCAM-1 kommen kann (Wataha et al. 2013).

Unsere Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Effekte von FFP auf die endotheliale Funktion differentiell zu sein scheinen. So gibt es in Bezug auf die Barrierefunktion sowohl einen direkten Einfluss, indem es zu einem verstärkten Zell-Zell-Kontakt kommt, als auch einen eher indirekten Einfluss über die Regulation von barriereregulierenden Proteinen wie zum Beispiel VEGF (Page und Liles 2013) oder ANG-2 (Hellenthal et al. 2022). Auch führte FFP zu einer deutlichen Regulation der Phosphorylierung entscheidender Funktionsproteine der endothelialen Barriere (HSP27, CREB, Lyn) und der Inflammation (GSK). Die Phosphorylierung von HSP27, die durch Hypoxie oder Inflammation reduziert wird, führt nachweislich zu einer Stabilisierung der Endothelbarriere (Nahomi et al. 2014; Liu et al. 2009; Sun et al. 2015). HSP27 ist dabei ein Effektor-Molekül der p38 MAPK. Ähnlich verhält es sich mit CREB, dessen Phosphorylierung zum Erhalt der endothelialen Barrierefunktion beiträgt und eine LPS-vermittelte Erhöhung der Permeabilität reduzieren kann (Chava et al. 2012; Xiong et al. 2023). Unsere These, dass ein erhöhter cAMP-Spiegel einen protektiven Effekt auf die endotheliale Funktion vermittelt, unterstützt, dass CREB wiederum durch erhöhte cAMP-Spiegel via Phosphorylierung von p38 MAPK aktiviert werden kann (Delghandi et al. 2005). Analog zu HSP27 und CREB wird auch GSK-3 durch p38 MAPK aktiviert und führt dann zu einer Reduktion TLR-4 bedingter Inflammation, Apoptose und oxidativem Stress von Endothelzellen (Di Qi et al. 2017; Thornton et al. 2008). Auch für die LYN-Kinase, die in unseren Versuchen durch FFP in ihrer Phosphorylierung stabilisiert wurde, wurde eine Stabilisierung der endothelialen Barrierefunktion nachgewiesen (Han et al. 2013).

Mit der vorliegenden Arbeit konnten wir konkludente Daten liefern, die die endothelstabilisierenden Effekte von FFP in vitro nach Stimulation mit LPS zeigen und zusätzlich einen mechanistischen Erklärungsansatz über die Regulation von zellulärem cAMP liefern. Weiterhin unklar bleibt, welche spezifischen Komponenten von FFP an der Regulation von cAMP beteiligt sind. Einen vielversprechenden Ansatzpunkt für weitergehende Untersuchungen sehen wir dabei im Adiponectin, das nachweislich vasoprotektive Eigenschaften besitzt (Cohen et al. 2022; Shen et al. 2016; van den Brink et al. 2021). Für Adiponectin wurde bereits gezeigt, dass es erhöhte cAMP-Spiegel vermitteln kann (Ouchi et al. 2000) und zu der Stabilisierung der Endothelbarriere durch FFP-Gabe im Schockgeschehen beiträgt (Deng et al. 2016; van den Brink et al. 2021). Ein Indikator für die Schädigung der endothelialen Glykokalyx und somit auch für eine eingeschränkte endotheliale Barrierefunktion stellt die erhöhte Konzentration des zirkulierenden Glykokalyxproteins Syndecan-1 dar (Chipman et al. 2020; Dogné und Flamion 2020; Steppan et al. 2011; Tarbell und Cancel 2016; van den Brink et al. 2021). Wir analysierten die Spiegel von löslichem Syndecan-1 im Serum von Patientinnen, die sich einer ausgedehnten abdominalen Operation zur Zytoreduktion bei fortgeschrittenem Ovarialkarzinom unterzogen. Solche Eingriffe sind oft mit einer deutlich gesteigerten endothelialen Permeabilität verbunden, die zu einem ausgeprägten Volumenverlust nach extravasal führt (Hellenthal et al. 2022; Klaschik et al. 2019). Passend zu unseren in vitro-Ergebnissen waren die Syndecan-1-Konzentrationen derjenigen Patientinnen im Blut messbar niedriger, denen perioperativ FFP verabreicht wurde, im Vergleich zu denjenigen, die perioperativ kein FFP erhielten. Diese Ergebnisse spiegeln sich auch in Studien wieder, die zeigen konnten, dass im Tiermodell die Gabe von FFP die Konzentration von löslichem Syndecan-1 bei Sepsis und Ischämie-Reperfusionssyndrom reduziert und so die endotheliale Glykokalyx und Barrierefunktion stabilisiert, vergleichbar den Ergebnissen bei septischen Patienten (Ban et al. 2015; Chang et al. 2018; Chipman et al. 2020; Peng et al. 2013; Straat et al. 2015) Dies könnte ferner auch die Resultate von Saxena et al. erklären, die bei Patienten nach abdominalen zytoreduktiver Operation eine verbesserte hämodynamische Stabilität und einen verminderten Volumenverlust beschreiben konnten, wenn FFP anstelle von kristalloider Infusion transfundiert wurde (Saxena et al. 2013). Analog dazu wurde auch bei

Verbrennungspatienten eine verminderte Ödembildung beobachtet, wenn diese anstelle von kristalloider Lösung FFP erhalten hatten (Du et al. 1991).

1.6 Zusammenfassung

Kritische Erkrankungen oder große Operationen führen in vielen Fällen zu einer erhöhten Permeabilität des Endothels mit einer Volumenverschiebung nach extravasal. Im klinischen Alltag werden bei diesen Patienten häufig Fremdblut-Transfusionen durchgeführt. Durch diese Transfusionen kommt es nicht nur zu einer Stabilisierung der Hämostase, sondern auch zu einer Stabilisierung der Hämodynamik. Studien konnten zeigen, dass es durch die Transfusion von gefrorenem Frischplasma (FFP) zusätzlich zu einer Stabilisierung der endothelialen Barrierefunktion kommt. Der zugrundeliegende Funktionsmechanismus ist bisher jedoch noch nicht vollständig bekannt. In unserer Arbeit konnten wir den barriestabilisierenden Effekt von FFP auf das Endothel in vitro bestätigen. Passend zu unseren Ergebnissen in vitro konnten wir im Blut von Patientinnen, die während einer großen Operation zur Zytoreduktion bei Ovarialkarzinom FFP erhalten haben, eine geringere Syndecan-1-Konzentration feststellen im Vergleich zu Patientinnen, die keine FFP erhalten haben. Bei Syndecan-1 handelt es sich um ein Glykokalyxprotein, das einen Indikator für die endotheliale Barrierefunktion darstellt.

Zusätzlich konnten wir einen Einfluss auf die endotheliale Inflammation und die Leukozytenadhäsion feststellen. So kam es durch die Gabe von FFP einerseits zu einer Reduktion der Genexpression von IL-8, ICAM-1 und VCAM-1, andererseits zu einer erhöhten Translokation von NFκB. Auch kam es zu einer Reduktion der Leukozytenadhäsion. Als möglichen Schlüsselfaktor für diese differentiellen Effekte von FFP auf die Endothelzellen konnten wir das cAMP herausarbeiten. So lassen sich die beschriebenen Effekte durch einen erhöhten cAMP-Spiegel erklären. In unserer Arbeit kam es durch die Gabe von FFP zu einem signifikanten Anstieg der cAMP-Konzentration, die zuvor durch die Gabe von LPS gesenkt wurde. Weiterhin unklar bleibt, welcher Bestandteil des FFP zu diesem Anstieg der cAMP-Konzentration führt. Einen passenden Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen sehen wir im Adiponectin, für das bereits vasoprotektive Eigenschaften beschrieben sind.

1.7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: FFP führt zu einer Stabilisierung der endothelialen Barrierefunktion, jedoch auch zu einer gesteigerten Monozyten-Adhäsion

Abb. 2: FFP führt zu einer vermehrten Translokation von NFkB, jedoch ebenfalls zu einer verminderten Expression von Genen, die in der Regulation von Inflammation, Adhäsion und Regulation der Endothelbarriere beteiligt sind.

Abb. 3: FFP steigert die zellulären cAMP-Spiegel und stabilisiert die Phosphorylierung von endothelialen Proteinen

1.8 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Primärer Antikörper Immunfluoreszenz

Tab. 2: Sekundärer Antikörper Immunfluoreszenz

Tab. 3: Serumkonzentrationen von Syndecan-1 bei Patientinnen, die eine abdominelle Operation zur Zytoreduktion bei Ovarialkarzinom erhalten haben im Verhältnis zur Transfusion von FFP

1.9 Literaturverzeichnis

Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood* 2003; 101: 3765–3777

Ait-Oufella H, Maury E, Lehoux S, Guidet B, Offenstadt G. The endothelium: physiological functions and role in microcirculatory failure during severe sepsis. In: *Intensive Care Med* 2010; 36: 1286–1298

Ban K, Peng Z, Pati S, Witkov RB, Park PW, Kozar RA. Plasma-Mediated Gut Protection After Hemorrhagic Shock is Lessened in Syndecan-1^{-/-} Mice. *Shock* 2015; 44: 452–457

Bannerman DD, Goldblum SE. Mechanisms of bacterial lipopolysaccharide-induced endothelial apoptosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 284: 899-914

Barelli S, Alberio L. The Role of Plasma Transfusion in Massive Bleeding: Protecting the Endothelial Glycocalyx? *Front Med (Lausanne)* 2018; 5: 91

Chang R, Holcomb JB, Johansson PI, Pati S, Schreiber MA, Wade CE. Plasma Resuscitation Improved Survival in a Cecal Ligation and Puncture Rat Model of Sepsis. *Shock* 2018; 49: 53–61

Chava KR, Tauseef M, Sharma T, Mehta D. Cyclic AMP response element-binding protein prevents endothelial permeability increase through transcriptional controlling p190RhoGAP expression. *Blood* 2012; 119: 308–319

Chipman AM, Wu F, Pati S, Burdette AJ, Glaser JJ, Kozar RA. Fresh frozen plasma attenuates lung injury in a novel model of prolonged hypotensive resuscitation. *J Trauma Acute Care Surg* 2020; 89: 118-125

Claesson-Welsh L, Dejana E, McDonald DM. Permeability of the Endothelial Barrier: Identifying and Reconciling Controversies. *Trends Mol Med* 2021; 27: 314-331

Cohen KE, Katunaric B, SenthilKumar G, McIntosh JJ, Freed JK. Vascular endothelial adiponectin signaling across the life span. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2022; 322: 57-65

Dekker SE, Sillesen M, Bambakidis T, Jin G, Liu B, Boer C, Johansson PI, Halaweish I, Maxwell J, Alam HB. Normal saline influences coagulation and endothelial function after traumatic brain injury and hemorrhagic shock in pigs. *Surgery* 2014; 156: 556–563

- Delghandi MP, Johannessen M, Moens U. The cAMP signalling pathway activates CREB through PKA, p38 and MSK1 in NIH 3T3 cells. *Cell Signal* 2005; 17: 1343–1351
- Deng X, Cao Y, Huby MP, Duan C, Baer L, Peng Z, Kozar RA, Doursout MF, Holcomb JB, Wade CE, Ko TC. Adiponectin in Fresh Frozen Plasma Contributes to Restoration of Vascular Barrier Function After Hemorrhagic Shock. *Shock* 2016; 45: 50–54
- Dogné S, Flamion B. Endothelial Glycocalyx Impairment in Disease: Focus on Hyaluronan Shedding. *Am J Pathol* 2020; 190: 768-780
- Du GB, Slater H, Goldfarb IW. Influences of different resuscitation regimens on acute early weight gain in extensively burned patients. *Burns* 1991; 17: 147-150
- Fukuhara S, Sakurai A, Sano H, Yamagishi A, Somekawa S, Takakura N, Saito Y, Kangawa K, Mochizuki N. Cyclic AMP potentiates vascular endothelial cadherin-mediated cell-cell contact to enhance endothelial barrier function through an Epac-Rap1 signaling pathway. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 136-146
- Han J, Zhang G, Welch EJ, Liang Y, Fu J, Vogel SM, Lowell CA, Du X, Cheresch DA, Malik AB, Li Z. A critical role for Lyn kinase in strengthening endothelial integrity and barrier function. *Blood* 2013; 122: 4140-4149
- Hellenthal KEM, Brabenec L, Wagner NM. Regulation and Dysregulation of Endothelial Permeability during Systemic Inflammation. *Cells* 2022; 11: 1935
- Hung YL, Fang SH, Wang SC, Cheng WC, Liu PL, Su CC, Chen CS, Huang MY, Hua KF, Shen KH, Wang YT, Suzuki K, Li CY. Corylin protects LPS-induced sepsis and attenuates LPS-induced inflammatory response. *Sci Rep* 2017; 11: 46299
- Kempe S, Kestler H, Lasar A, Wirth T. NF-kappaB controls the global pro-inflammatory response in endothelial cells: evidence for the regulation of a pro-atherogenic program. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: 5308-5319
- Khakpour S, Wilhelmsen K, Hellman J. Vascular endothelial cell Toll-like receptor pathways in sepsis. *Innate Immun* 2015; 21: 827-846
- Kim I, Kim JH, Ryu YS, Liu M, Koh GY. Tumor necrosis factor-alpha upregulates angiopoietin-2 in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 269: 361-365

Klaschik S, Gehlen J, Neumann C, Keyver-Paik MD, Soehle M, Frede S, Velten M, Hoefft A, Hilbert T. Network of Mediators for Vascular Inflammation and Leakage Is Dysbalanced during Cytoreductive Surgery for Late-Stage Ovarian Cancer. *Mediators Inflamm* 2019; 2019: 5263717

Lee WL, Liles WC. Endothelial activation, dysfunction and permeability during severe infections. *Curr Opin Hematol* 2011; 18: 191-196

Liang Y, Li X, Zhang X, Li Z, Wang L, Sun Y, Liu Z, Ma X. Elevated levels of plasma TNF- α are associated with microvascular endothelial dysfunction in patients with sepsis through activating the NF- κ B and p38 mitogen-activated protein kinase in endothelial cells. *Shock* 2014; 41: 275-281

Liu T, Guevara OE, Warburton RR, Hill NS, Gaestel M, Kayyali US. Modulation of HSP27 alters hypoxia-induced endothelial permeability and related signaling pathways. *J Cell Physiol* 2009; 220: 600-610

Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther* 2017; 2: 17023

Lopez E, Peng Z, Kozar RA, Cao Y, Ko TC, Wade CE, Cardenas JC. Antithrombin III Contributes to the Protective Effects of Fresh Frozen Plasma Following Hemorrhagic Shock by Preventing Syndecan-1 Shedding and Endothelial Barrier Disruption. *Shock* 2020; 53: 156-163

Mallick R, Duttaroy AK. Modulation of endothelium function by fatty acids. *Mol Cell Biochem* 2022; 477: 15-38

Nahomi RB, Palmer A, Green KM, Fort PE, Nagaraj RH. Pro-inflammatory cytokines downregulate Hsp27 and cause apoptosis of human retinal capillary endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1842: 164-174

Nohé B, Kiefer RT, Ploppa A, Haeberle HA, Schroeder TH, Dieterich HJ. The effects of fresh frozen plasma on neutrophil-endothelial interactions. *Anesth Analg* 2003; 97: 216-221

Ollivier V, Parry GC, Cobb RR, de Prost D, Mackman N. Elevated cyclic AMP inhibits NF-kappaB-mediated transcription in human monocytic cells and endothelial cells. *J Biol Chem* 1996; 271: 20828-20835

Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Okamoto Y, Maeda K, Kuriyama H, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y. Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation* 2000; 102: 1296-1301

Pablo-Moreno JA, Serrano LJ, Revuelta L, Sánchez MJ, Liras A. The Vascular Endothelium and Coagulation: Homeostasis, Disease, and Treatment, with a Focus on the Von Willebrand Factor and Factors VIII and V. *Int J Mol Sci* 2022; 23: 8283

Page AV, Liles WC. Biomarkers of endothelial activation/dysfunction in infectious diseases. *Virulence* 2013; 4: 507-516

Pati S, Matijevic N, Doursout MF, Ko T, Cao Y, Deng X, Kozar RA, Hartwell E, Conyers J, Holcomb JB. Protective effects of fresh frozen plasma on vascular endothelial permeability, coagulation, and resuscitation after hemorrhagic shock are time dependent and diminish between days 0 and 5 after thaw. *J Trauma* 2010; 69: 55-63

Pati S, Potter DR, Baimukanova G, Farrel DH, Holcomb JB, Schreiber MA. Modulating the endotheliopathy of trauma: Factor concentrate versus fresh frozen plasma. *J Trauma Acute Care Surg* 2016; 80: 576-584

Paulus P, Jennewein C, Zacharowski K. Biomarkers of endothelial dysfunction: can they help us deciphering systemic inflammation and sepsis? *Biomarkers* 2011; 16: 11-21

Peng Z, Pati S, Potter D, Brown R, Holcomb JB, Grill R, Wataha K, Park PW, Xue H, Kozar RA. Fresh frozen plasma lessens pulmonary endothelial inflammation and hyperpermeability after hemorrhagic shock and is associated with loss of syndecan 1. *Shock* 2013; 40: 195-202

Piotti A, Novelli D, Meessen JMTA, Ferlicca D, Coppolecchia S, Marino A, Salati G, Savioli M, Grasselli G, Bellani G, Pesenti A, Masson S, Caironi P, Gattinoni L, Gobbi M, Fracasso C, Latini R; ALBIOS Investigators. Endothelial damage in septic shock patients as evidenced by circulating syndecan-1, sphingosine-1-phosphate and soluble VE-cadherin: a substudy of ALBIOS. *Crit Care* 2021; 25: 113

Pober JS. Endothelial activation: intracellular signaling pathways. *Arthritis Res* 2002; 4: 109-116

Potter DR, Baimukanova G, Keating SM, Deng X, Chu JA, Gibb SL, Peng Z, Muench MO, Fomin ME, Spinella PC, Kozar R, Pati S. Fresh frozen plasma and spray-dried plasma mitigate pulmonary vascular permeability and inflammation in hemorrhagic shock. *J Trauma Acute Care Surg* 2015; 78: 7-17

Qi D, Wang D, Zhang C, Tang X, He J, Zhao Y, Deng W, Deng X. Vaspin protects against LPS-induced ARDS by inhibiting inflammation, apoptosis and reactive oxygen species generation in pulmonary endothelial cells via the Akt/GSK-3 β pathway. *Int J Mol Med*. 2017; 40: 1803-1817

Saxena A, Chua TC, Fransi S, Liauw W, Morris DL. Effectiveness of early and aggressive administration of fresh frozen plasma to reduce massive blood transfusion during cytoreductive surgery. *J Gastrointest Oncol* 2013; 4: 30-39

Schlegel N, Baumer Y, Drenckhahn D, Waschke J. Lipopolysaccharide-induced endothelial barrier breakdown is cyclic adenosine monophosphate dependent in vivo and in vitro. *Crit Care Med* 2009; 37: 1735-1743

Schlegel N, Leweke R, Meir M, Germer CT, Waschke J. Role of NF- κ B activation in LPS-induced endothelial barrier breakdown. *Histochem Cell Biol* 2012; 138: 627-641

Shah A, Kerner V, Stanworth SJ, Agarwal S. Major haemorrhage: past, present and future. *Anaesthesia*. 2023; 78: 93-104

Shen L, Evans IM, Souza D, Dreifaldt M, Dashwood MR, Vidya MA. Adiponectin: An Endothelium-Derived Vasoprotective Factor? *Curr Vasc Pharmacol* 2016; 14: 168-174

Sillesen M, Johansson PI, Rasmussen LS, Jin G, Jepsen CH, Imam A, Hwabejire JO, Deperalta D, Duggan M, DeMoya M, Velmahos GC, Alam HB. Fresh frozen plasma resuscitation attenuates platelet dysfunction compared with normal saline in a large animal model of multisystem trauma. *J Trauma Acute Care Surg* 2014; 76: 998-1007

Steppan J, Hofer S, Funke B, Brenner T, Henrich M, Martin E, Weitz J, Hofmann U, Weigand MA. Sepsis and major abdominal surgery lead to flaking of the endothelial glycocalyx. *J Surg Res* 2011; 165: 136-141

- Straat M, Müller MC, Meijers JC, Arbous MS, Spoelstra-de Man AM, Beurskens CJ, Vroom MB, Juffermans NP. Effect of transfusion of fresh frozen plasma on parameters of endothelial condition and inflammatory status in non-bleeding critically ill patients: a prospective substudy of a randomized trial. *Crit Care* 2015; 19: 163
- Sun HB, Ren X, Liu J, Guo XW, Jiang XP, Zhang DX, Huang YS, Zhang JP. HSP27 phosphorylation protects against endothelial barrier dysfunction under burn serum challenge. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 463: 377-383
- Sung CP, Arleth AJ, Storer B, Feuerstein GZ. Modulation of U937 cell adhesion to vascular endothelial cells by cyclic AMP. *Life Sci* 1991; 49: 375-382
- Tarbell JM, Cancel LM. The glycocalyx and its significance in human medicine. *J Intern Med* 2016; 280: 97-113
- Thornton TM, Pedraza-Alva G, Deng B, Wood CD, Aronshtam A, Clements JL, Sabio G, Davis RJ, Matthews DE, Doble B, Rincon M. Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3 β inactivation. *Science* 2008; 320: 667-670
- van den Brink DP, Kleinveld DJB, Sloos PH, Thomas KA, Stensballe J, Johansson PI, Pati S, Sperry J, Spinella PC, Juffermans NP. Plasma as a resuscitation fluid for volume-depleted shock: Potential benefits and risks. *Transfusion* 2021; 61: 301-312
- Vigiola Cruz M, Carney BC, Luker JN, Monger KW, Vazquez JS, Moffatt LT, Johnson LS, Shupp JW. Plasma Ameliorates Endothelial Dysfunction in Burn Injury. *J Surg Res* 2019; 233: 459-466
- Wallez Y, Huber P. Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1778: 794-809
- Wataha K, Menge T, Deng X, Shah A, Bode A, Holcomb JB, Potter D, Kozar R, Spinella PC, Pati S. Spray-dried plasma and fresh frozen plasma modulate permeability and inflammation in vitro in vascular endothelial cells. *Transfusion* 2013; 53: 80S-90S
- Wiesinger A, Peters W, Chappell D, Kentrup D, Reuter S, Pavenstädt H, Oberleithner H, Kümpers P. Nanomechanics of the endothelial glycocalyx in experimental sepsis. *PLoS One* 2013; 8: e80905

Xiong S, Hong Z, Huang LS, Tsukasaki Y, Nepal S, Di A, Zhong M, Wu W, Ye Z, Gao X, Rao GN, Mehta D, Rehman J, Malik AB. IL-1 β suppression of VE-cadherin transcription underlies sepsis-induced inflammatory lung injury. *J Clin Invest* 2023; 133: e169500. Erratum for: *J Clin Invest* 2020; 130: 3684-3698

Yu Q, Yang B, Davis JM, Ghosn J, Deng X, Doursout MF, Dong JF, Wang R, Holcomb JB, Wade CE, Ko TC, Cao Y. Identification of Fibrinogen as a Key Anti-Apoptotic Factor in Human Fresh Frozen Plasma for Protecting Endothelial Cells In Vitro. *Shock* 2020; 53: 646-652

Zhang WJ, Frei B. Alpha-lipoic acid inhibits TNF-alpha-induced NF-kappaB activation and adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells. *FASEB J* 2001; 15: 2423-2432

Zhao H, Wu L, Yan G, Chen Y, Zhou M, Wu Y, Li Y. Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention. *Signal Transduct Target Ther* 2021; 6: 263

2. Veröffentlichung

Life Sciences 254 (2020) 117780



Contents lists available at ScienceDirect

Life Sciences

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lifescie



Differential modulation of endothelial cell function by fresh frozen plasma

Marcel Scheck^{a,1}, Markus Velten^{a,1}, Sven Klaschik^a, Martin Soehle^a, Stilla Frede^a, Jennifer Gehlen^a, Jochen Hoch^b, Alexander Mustea^c, Andreas Hoefl^a, Tobias Hilbert^{a,*}

^a Department of Anesthesiology and Intensive Care Medicine, University Hospital Bonn, Venusberg-Campus 1, 53127 Bonn, Germany

^b Institute for Experimental Hematology and Transfusion Medicine, University Hospital Bonn, Venusberg-Campus 1, 53127 Bonn, Germany

^c Department of Gynecology and Obstetrics, University Hospital Bonn, Venusberg-Campus 1, 53127 Bonn, Germany



ARTICLE INFO

Keywords:

Fresh frozen plasma
Endothelial cells
Barrier function
cAMP
Angiopoietin-2

ABSTRACT

Aims: In vivo studies suggest a positive influence of fresh frozen plasma (FFP) on endothelial properties and vascular barrier function, leading to improved outcomes in animal sepsis models as well as in major abdominal surgery. However, those effects are incompletely described. It was our aim to evaluate in vitro effects of FFP on endothelial key functions and to identify underlying mechanisms.

Materials and methods: Human pulmonary microvascular endothelial cells (HPMECs) were prestimulated with LPS, followed by incubation with FFP. Permeability for FITC-dextran was assessed, and intercellular gap formation was visualized. NF- κ B nuclear translocation and expression of pro-inflammatory, pro-adhesion, and leakage-related genes were evaluated, and monocyte adhesion to ECs was assessed. Intracellular cAMP levels as well as phosphorylation of functional proteins were analyzed. In patients undergoing major abdominal surgery, Syndecan-1 serum levels were assessed prior to and following FFP transfusion.

Key findings: Post-incubation of HPMECs with FFP increased intracellular cAMP levels that had been decreased by preceding LPS stimulation. On one hand, this reduced endotoxin-mediated upregulation of IL-8, ICAM-1, VCAM-1, VEGF, and ANG-2. Impaired phosphorylation of functional proteins was restored, and intercellular cohesion and barrier function were rescued. On the other hand, NF- κ B nuclear translocation as well as monocyte adhesion was markedly increased by the combination of LPS and FFP. Syndecan-1 serum levels were lower in surgery patients that were transfused with FFP compared to those that were not.

Significance: Our data provide evidence for a differential modulation of crucial endothelial properties by FFP, potentially mediated by elevation of intracellular cAMP levels.

1. Introduction

In critically ill patients as well as during major surgery, blood products are administered to prevent or correct clinically relevant acute anemia, thrombocytopenia, and coagulopathy and to stabilize hemodynamics. The vascular endothelium, representing the most significant interface between the vasculature and the interstitial tissue and therefore playing a cardinal role in the development of critical perfusion mismatches and organ failure, is meanwhile recognized as being a target structure for allogenic blood products. For example, in recent years, the impact of red blood cell (RBC) transfusion on endothelial function has gained growing attention [1]. Fluid resuscitation using fresh frozen plasma (FFP) has been shown to be beneficial in animal models of abdominal sepsis and in human major abdominal surgery, independent of its influence on hemostasis [2,3]. Positive effects on

glycocalyx integrity, on endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and on vascular leakage and edema suggest a specific protective influence of FFP on endothelial function [2,4–9].

However, effects of FFP on vascular endothelial cells (ECs) are incompletely described and at least in part contradictory, as study results reveal aggravating as well as attenuating influence on e.g. endothelial inflammation, depending on further conditions [10,11]. The underlying mechanisms explaining this differential regulation are still elusive. Metabolism of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) has been shown to be heavily involved in the regulation of key functions of the vasculature. While on one hand, cAMP affects smooth muscle cell proliferation and vasodilatation, thereby controlling capillary perfusion, on the other hand, it particularly influences core features of endothelial cells [12,13]. Integrity of the endothelial cell layer lining the inner vascular wall and tightly controlling fluid and solutes exchange

* Corresponding author at: Department of Anesthesiology and Intensive Care Medicine, University Hospital Bonn, Venusberg-Campus 1, 53127 Bonn, Germany.
E-mail address: thilbert@uni-bonn.de (T. Hilbert).

¹ MS and MV contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117780>

Received 30 March 2020; Received in revised form 7 May 2020; Accepted 9 May 2020

Available online 12 May 2020

0024-3205/ © 2020 The Author(s). Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

between the intra- and extravascular space directly depends on adequate cAMP signaling [14]. Administration of blood products is known to exert influence on the recipient's cellular cAMP metabolism [15]. Whether cAMP may also be involved in effects of FFP on endothelial cells has not yet been investigated. Therefore, with this study, we aimed for a more detailed evaluation of the *in vitro* effects of FFP on the function of ECs. Pro-inflammatory response, adhesion properties, permeability and intercellular barrier breakdown as well as phosphorylation of functional proteins were assessed in primary human ECs of pulmonary origin prestimulated with bacterial endotoxin. In addition, we sought to identify and understand potential underlying mechanisms at the EC level.

2. Materials and methods

Single-donor fresh frozen plasma units (blood group AB) were provided by the Institute for Experimental Hematology and Transfusion Medicine of the University Hospital Bonn (Germany). PBS (pH 7.4) was purchased from Life Technologies (Carlsbad, CA, USA), and fetal calf serum (FCS) was purchased from Biochrom GmbH (Berlin, Germany). Cell culture plastics were obtained from Greiner Bio-One (Frickenhausen, Germany). The TLR4 ligand lipopolysaccharide (LPS; *Escherichia coli* O111:B4) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). TRIzol™ reagent was purchased from Life Technologies. Accutase™ solution, chloroform, isopropanol, ethanol, bovine serum albumin (BSA), and FITC-conjugated dextran (70 kDa) were obtained from Sigma-Aldrich.

2.1. Culture and incubation of endothelial cells with FFP

Cryopreserved pooled human pulmonary microvascular endothelial cells (HPMECs) and the recommended ECGM-MV (endothelial cell basal medium (EBM-MV) with cell-specific supplement containing 5% FCS) were purchased from PromoCell (Heidelberg, Germany). Cells of < 6 passages were cultured in medium until 80–90% confluence. For subcultivation, cells were washed, harvested using Accutase™ solution, and seeded in ECGM-MV. Cells were cultured at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. Basic culture medium in all experimental groups was ECGM-MV, which contains cell-specific supplement and 5% FCS. For the assays, ECs were stimulated with LPS (1 µg/ml) in fresh culture medium (ECGM-MV), while control cells received ECGM-MV without LPS. For the assessment of monocyte adhesion to EC surface as well as for detection of nuclear NF-κB translocation, incubation with LPS was carried out for 2 h. For all other assays, cells were stimulated with LPS for 18 h. Following this initial incubation step, in all experimental groups, 30 vol% of the cell culture supernatant were removed by aspiration and discarded. Subsequently, the wells of the control and the LPS experimental group, respectively, received the equivalent volume of full cell culture medium (ECGM-MV). For the FFP and the LPS/FFP experimental group, respectively, the equivalent volume of undiluted FFP was directly added to the wells. Afterwards, cells were incubated for another 60 min in all experiments. This particular incubation pattern was performed in order to avoid possible non-specific activation of ECs by a complete medium exchange and to maintain LPS stimulation during this second incubation step in the respective experimental groups.

THP-1 cells were purchased from LGC Standards (Wesel, Germany) and cultured in RPMI 1640 (Lonza, Basel, Switzerland) containing 5% FCS.

2.2. Assessment of endothelial barrier function

Transwell™ permeable supports (0.33 cm², 0.4 µm pore size, polycarbonate membrane; Corning, Tewksbury, MA) were equilibrated with medium. Subsequently, HPMECs in ECGM-MV were seeded into the upper compartment in high density and cultured to form a confluent

monolayer. Culture medium was changed every other day. Cells were then stimulated with LPS and FFP as described above (18 h with full medium or LPS, respectively, followed by exchange of 30 vol% of supernatant for the equivalent volume of full medium or FFP, respectively, and further incubation for 1 h). FITC-conjugated dextran (70 kDa, final concentration 5 mg/ml) was added to the upper compartment and the inserts were transferred into pre-warmed assay buffer (HEPES-buffered Hank's buffered salt solution (HBSS), pH 7.4). A 50 µl sample was taken from the lower compartment after 1 h, and the fluorescent signal was determined using a fluorescent plate reader (excitation 492 nm, emission 518 nm). Concentration of dextran was calculated using an experimentally derived standard curve, and the flux over the membrane was calculated.

2.3. Assessment of monocyte adhesion to endothelial cells

HPMECs in ECGM-MV were seeded into 24-well plates. Cells were cultured until 90–100% confluence and then stimulated with LPS and FFP as described above (2 h with full medium or LPS, respectively, followed by exchange of 30 vol% of supernatant for the equivalent volume of full medium or FFP, respectively, and further incubation for 1 h). THP-1 cells were cultured in RPMI 1640 (+5% FCS) supplemented with Calcein-AM (1 µl per 10⁶ cells; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for 30 min in darkness at 37 °C. Cells were then washed extensively and resuspended in ECGM-MV. Supernatant was removed from HPMECs after the second incubation step, and Calcein-stained THP-1 cells were added (4 × 10⁵ cells per well) and cultured on the EC monolayer for 30 min. Subsequently, supernatant was removed, and wells were washed with prewarmed PBS three times. After the final wash step, wells were filled with one milliliter PBS and were left to rest at room temperature for 5 min. The fluorescent signal was then determined using a fluorescent plate reader (excitation 485 nm, emission 520 nm).

2.4. Immunofluorescence microscopy

HPMECs were grown to confluence on sterilized coverslips. Cells were then stimulated with LPS and FFP as described above (2 h (NF-κB visualization) or 18 h (VE-Cadherin visualization) with full medium or LPS, respectively, followed by exchange of 30 vol% of supernatant for the equivalent volume of full medium or FFP, respectively, and further incubation for 1 h). Subsequently, ECs were washed, fixed and permeabilized with ice-cold acetone-methanol and blocked with TBST (TRIS-buffered salt solution with Tween) containing 1% BSA. Subsequently, slips were incubated with primary antibodies to human NF-κB (p65 subunit, dilution 1:200; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) or human VE-Cadherin (dilution 1:200; Abcam, Cambridge, UK), respectively, for 90 min, extensively washed with PBS and then incubated again with corresponding secondary antibodies (dilution 1:1000; Thermo Fisher Scientific) for 60 min. After another wash period, slips were counterstained with DAPI and covered with mounting medium (Dianova, Hamburg, Germany). Samples were analyzed on a Zeiss AXIO Observer.Z1 fluorescence microscope (Oberkochen, Germany). NF-κB nuclear translocation was quantified by calculating the ratio between the cytoplasmatic and nuclear fluorescence intensity using the Zeiss ZEN software package.

2.5. Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)

For the assessment of changes in gene expression, after stimulation with LPS and FFP as described above (18 h with full medium or LPS, respectively, followed by exchange of 30 vol% of supernatant for the equivalent volume of full medium or FFP, respectively, and further incubation for 1 h), cells were harvested and completely lysed in TRIzol™ reagent. Further isolation of total RNA was performed by the TRIzol™ reagent method according to the manufacturer's instructions

using chloroform, isopropanol, and ethanol. The resulting air-dried RNA pellet was resuspended in RNase-free water, and the concentration was determined spectrophotometrically (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific). 2 µg of total RNA were reverse transcribed into cDNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany). Following synthesis, cDNA was diluted in RNase-free water (1:5) and stored at +4 °C. Gene expression analysis of IL-8, ICAM-1, VCAM-1, VEGF, and ANG-2 was performed by quantitative RT-PCR with Taqman™ Expression Assays for the respective genes and Taqman™ Gene Expression Master Mix on a ViiA7 device (all Applied Biosystems). Expression was normalized to 18 s ribosomal RNA as house-keeping gene and calculated as fold change expression of the respective control using the delta-delta CT method (RQ, relative quantification).

2.6. Assessment of endothelial intracellular cAMP levels

Following incubation of ECs as described above (18 h with full medium or LPS, respectively, followed by exchange of 30 vol% of supernatant for the equivalent volume of full medium or FFP, respectively, and further incubation for 1 h), cells were lysed in 0.1 M hydrochloric acid. Subsequently, intracellular cAMP levels were determined using the Direct cAMP ELISA kit from Enzo Life Sciences (Loerrach, Germany) according to the manufacturer's instructions. Results from repeated experiments were normalized to the control, and the effect of LPS or FFP incubation was expressed as fold changes.

2.7. Assessment of phosphorylation levels of endothelial functional proteins

HPMECs were incubated as described above (18 h with full medium or LPS, respectively, followed by exchange of 30 vol% of supernatant for the equivalent volume of full medium or FFP, respectively, and further incubation for 1 h). Phosphorylation state of functional proteins was then determined using the Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array Kit from RnD Systems (Wiesbaden-Nordenstadt, Germany) according to the manufacturer's instructions. Briefly, nitrocellulose membranes spotted with capture antibodies were incubated with cell lysates overnight. The membranes were washed to remove unbound proteins, followed by incubation with biotinylated detection antibodies. The specific signal at each capture spot corresponding to the amount of phosphorylated protein bound was then visualized by chemiluminescence. The results were normalized to the control, and the effect of LPS or FFP incubation was expressed as percentage change.

2.8. Assessment of serum Syndecan-1 levels in patients following major abdominal surgery

All clinical data were generated in accordance with the Declaration of Helsinki, after approval by the institutional review board of the University of Bonn (protocol number 360/16, date of approval March 21, 2018) and after written informed consent has been obtained. Patients being scheduled for laparotomy for advanced-stage ovarian cancer were prospectively screened. Exclusion criteria were as follows: inability or refusal to provide written informed consent, patient age < 18 years, and pregnancy. Anesthesia and surgery were performed according to local standard procedures. Intraoperative hemodynamic therapy including administration of blood products followed recent transfusion guidelines and was performed on the responsibility of the attending anesthetist that was not part of the study team. Ten mls of blood were drawn before the beginning of surgery (at baseline) and 24 h later on the next morning. Coagulated samples were centrifuged (3.000 rpm, 4 °C, 10 min), and serum aliquots were stored at -80 °C for subsequent analysis. Serum Syndecan-1 levels were detected using custom-made, bead-based Luminex™ multiplex arrays purchased from RnD Systems according to the manufacturer's protocol. Arrays were analyzed on a MAGPIX™ reader (Luminex Corp., Austin, TX, USA). All

analyses were performed in duplicates. Out of these results, the mean value was calculated and used for further statistical analyses. All personnel performing the serum analyses were blinded for the intra- and postoperative patient data.

2.9. Statistical analysis

All experiments were repeated at least three times with similar results. Data were transferred into MS Excel (Microsoft Corp., Redmond, CA, USA). Statistical analysis and visualization were performed using GraphPad PRISM 8 (La Jolla, CA, USA). All data are presented as mean values with standard error of the mean (SEM) or standard deviation (SD), respectively. Statistical significance was tested using one-way ANOVA with Tukey post hoc test or unpaired, two-sided Student's *t*-test, as indicated. *P* values < .05 were considered statistically significant.

The datasets generated and analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

3. Results

3.1. FFP restores endothelial barrier function but increases monocyte adhesion to ECs

Endothelial barrier breakdown with subsequent increased permeability for fluids and plasma proteins is a hallmark in the development of critical conditions. To determine the effect of FFP on EC barrier function, cells were incubated with LPS followed by FFP, and EC monolayer macromolecular permeability was assessed using FITC-conjugated dextran. As shown in Fig. 1A, endothelial permeability was doubled upon LPS incubation, compared to control conditions (905 vs. 453 µmol/cm², *p* = .04). Adding 30% FFP for 1 h restored EC barrier properties to basal conditions (308 µmol/cm²). Immunofluorescence of VE-Cadherin revealed shrinking of cells together with intercellular gap formation and loss of cell-cell contacts following incubation with endotoxin (Fig. 1B). This was markedly reduced when LPS stimulation was followed by FFP incubation.

As the endothelium forms the vascular barrier not only for fluids and plasma proteins but also for immune cells, activation of ECs results in increased leukocyte adhesion. Fig. 1C shows that stimulation of ECs with endotoxin greatly increased adhesion of the human monocyte cell line THP-1, compared to resting conditions (24,680 vs. 6980 RFU, *p* < .005). When stimulation was followed by incubation with FFP, this even amplified THP-1 adhesion significantly (31,615 RFU, *p* < .005 vs. LPS). Of note, FFP alone had no effect on monocyte adhesion to the ECs.

3.2. FFP increases NF-κB nuclear translocation but attenuates endotoxin-mediated upregulation of pro-inflammatory, pro-adhesion, and leakage-related genes

Binding of pathogen- (PAMPs) and danger-associated molecular patterns (DAMPs) to endothelial toll-like receptors (TLRs) results in the activation of NF-κB [16]. ECs were challenged with LPS, and localization of NF-κB in the cytoplasm and the nucleus was determined by immunofluorescence. As illustrated in Fig. 2A, stimulation of TLR4 with LPS resulted in a moderate perinuclear and nuclear accumulation of NF-κB. However, when endotoxin stimulation was followed by incubation with FFP, this induced marked and almost complete translocation of NF-κB to the cellular nucleus, with an increase of ratio between nuclear and cytoplasmatic fraction of factor 6.75 compared to the unstimulated control (*p* < .005). Of note, incubation with FFP alone had no influence on nuclear translocation of NF-κB.

As expected, incubation of ECs with LPS resulted in a strong, significant upregulation of the gene expression of IL-8 (RQ 34.2, *p* < .005), ICAM-1 (RQ 30.3, *p* < .005), VCAM-1 (RQ 91.2, *p* < .005), VEGF (RQ 3.1, *p* < .005), and ANG-2 (RQ 1.3, *p* = .005),

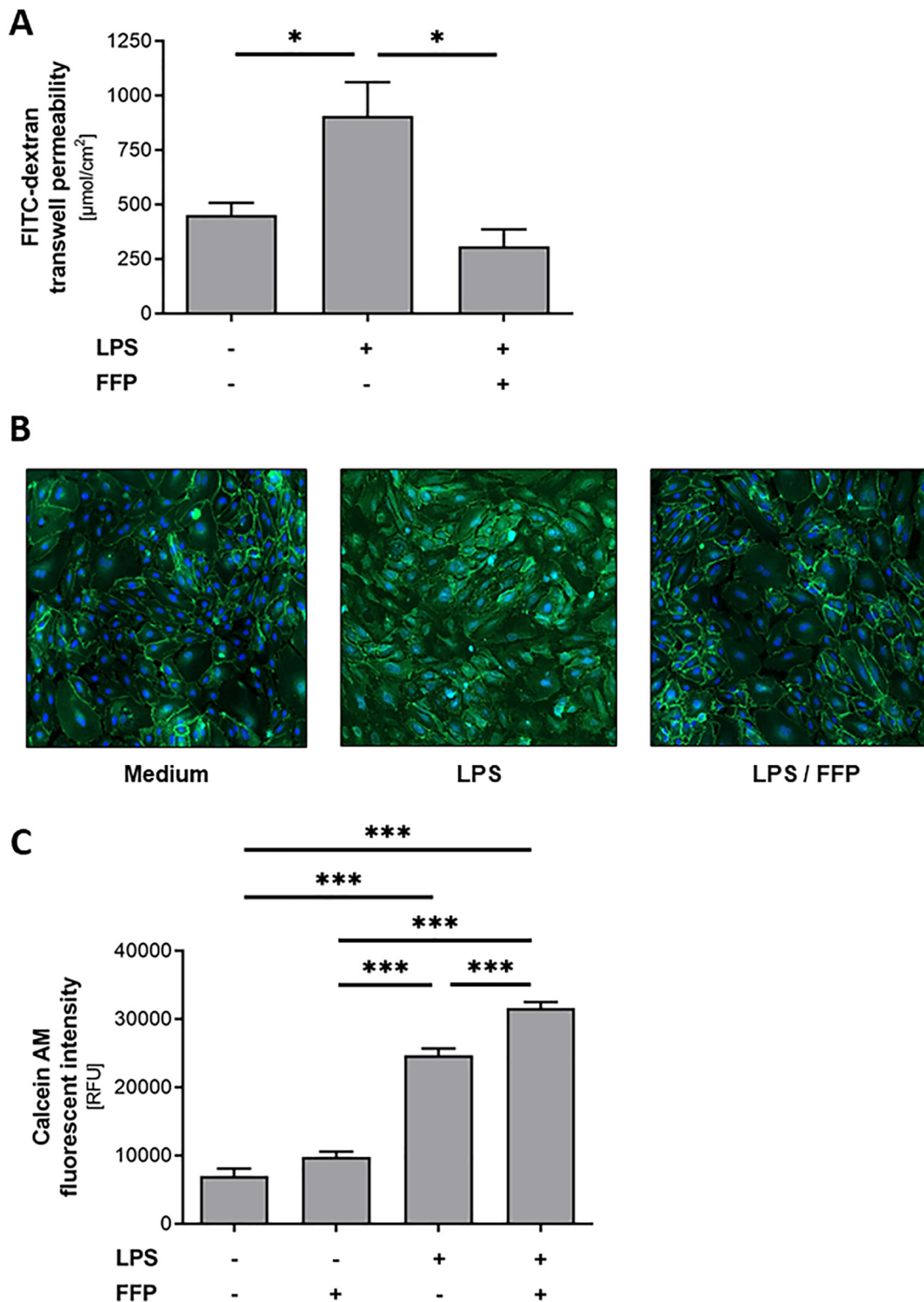


Fig. 1. FFP restores endothelial barrier function but increases monocyte adhesion to ECs.

HPMECs were incubated with LPS (1 µg/ml) for 2 h (adhesion assay) or 18 h, respectively. Then, 30 vol% of supernatant were replaced by the equivalent volume of FFP, and incubation was continued for another 60 min.

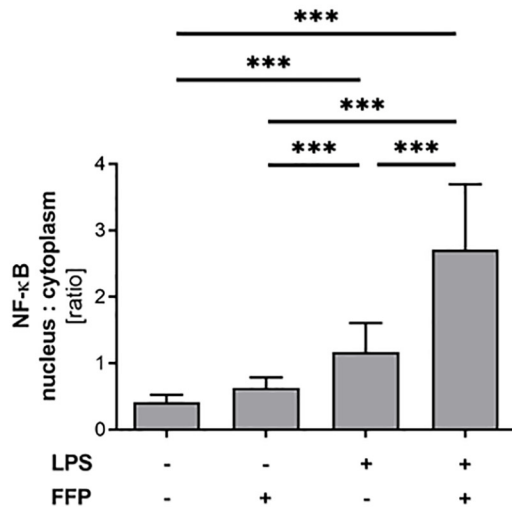
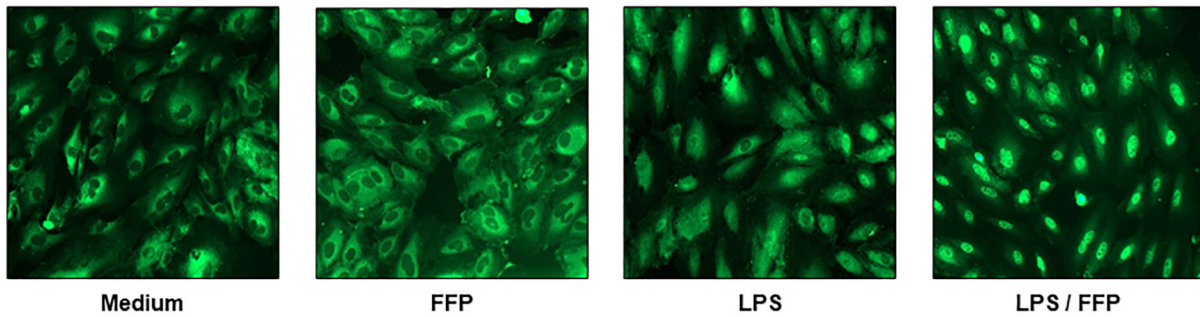
(A) Effect of incubation with LPS and FFP on EC monolayer permeability for FITC-conjugated dextran (70 kDa) in a Transwell assay, expressed as molar permeation per surface area. $n = 4$.

(B) Changes on cell morphology, as revealed by immunofluorescent staining of VE-Cadherin. The representative images show shrinking of cells together with intercellular gap formation and loss of cell-cell contacts following LPS stimulation (middle panel). These changes are mitigated when LPS was followed by incubation with FFP (right panel).

(C) Effect of incubation on adhesion of Calcein-stained THP-1 cells to EC monolayers. $n = 4$. RFU = relative fluorescent units.

Mean with SEM. One-way ANOVA with Tukey post hoc test. Significant intergroup differences are indicated by asterisks: * $p < .05$, *** $p < .005$.

A



B

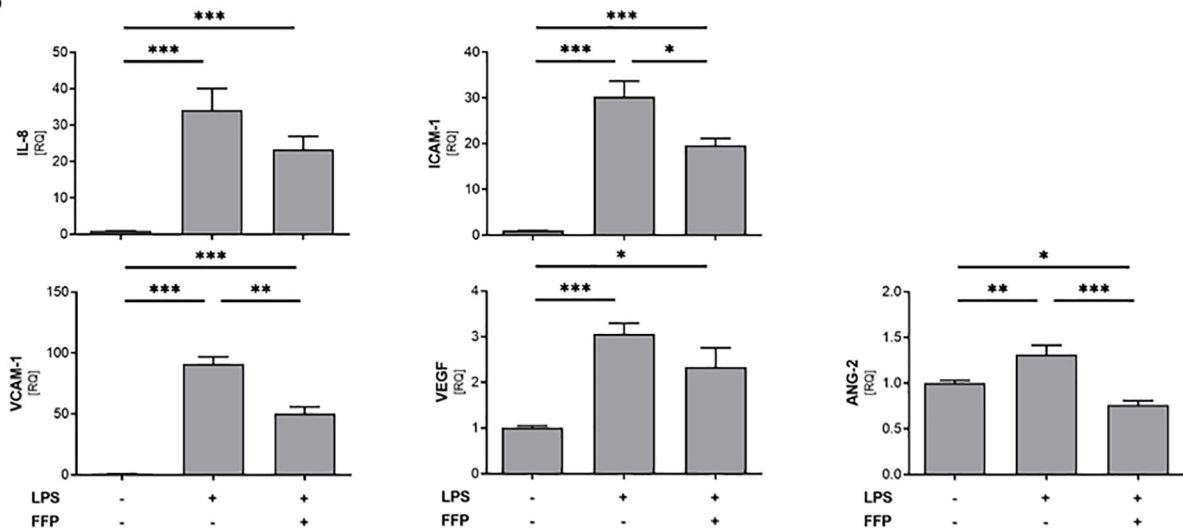


Fig. 2. FFP increases NF- κ B nuclear translocation but attenuates endotoxin-mediated upregulation of pro-inflammatory, pro-adhesion, and leakage-related genes. HPMECs were incubated with LPS (1 μ g/ml) for 2 h (NF- κ B translocation) or 18 h, respectively. Then, 30 vol% of supernatant were replaced by the equivalent volume of FFP, and incubation was continued for another 60 min.

(A) Changes on NF- κ B translocation, as revealed by immunofluorescent staining. Stimulation with LPS resulted in a moderate perinuclear and nuclear accumulation of NF- κ B (third panel). When endotoxin was followed by incubation with FFP, this induced marked and almost complete translocation of NF- κ B to the cellular nucleus (right panel). Of note, incubation with FFP alone had no effect on NF- κ B nuclear translocation. The graph shows the quantification of NF- κ B translocation by calculating the ratio between fluorescence intensity in nucleus and cytoplasm (n = number of cells per field of view, mean with SD).

(B) Effect of incubation with LPS and FFP on regulation of EC gene expression of IL-8, ICAM-1, VCAM-1, VEGF, and ANG-2. Expression was normalized to 18 s ribosomal RNA and calculated as fold change expression of the respective control (RQ, relative quantification). n = 3–9, mean with SEM.

One-way ANOVA with Tukey post hoc test. Significant intergroup differences are indicated by asterisks: * p < .05, ** p < .01, *** p < .005.

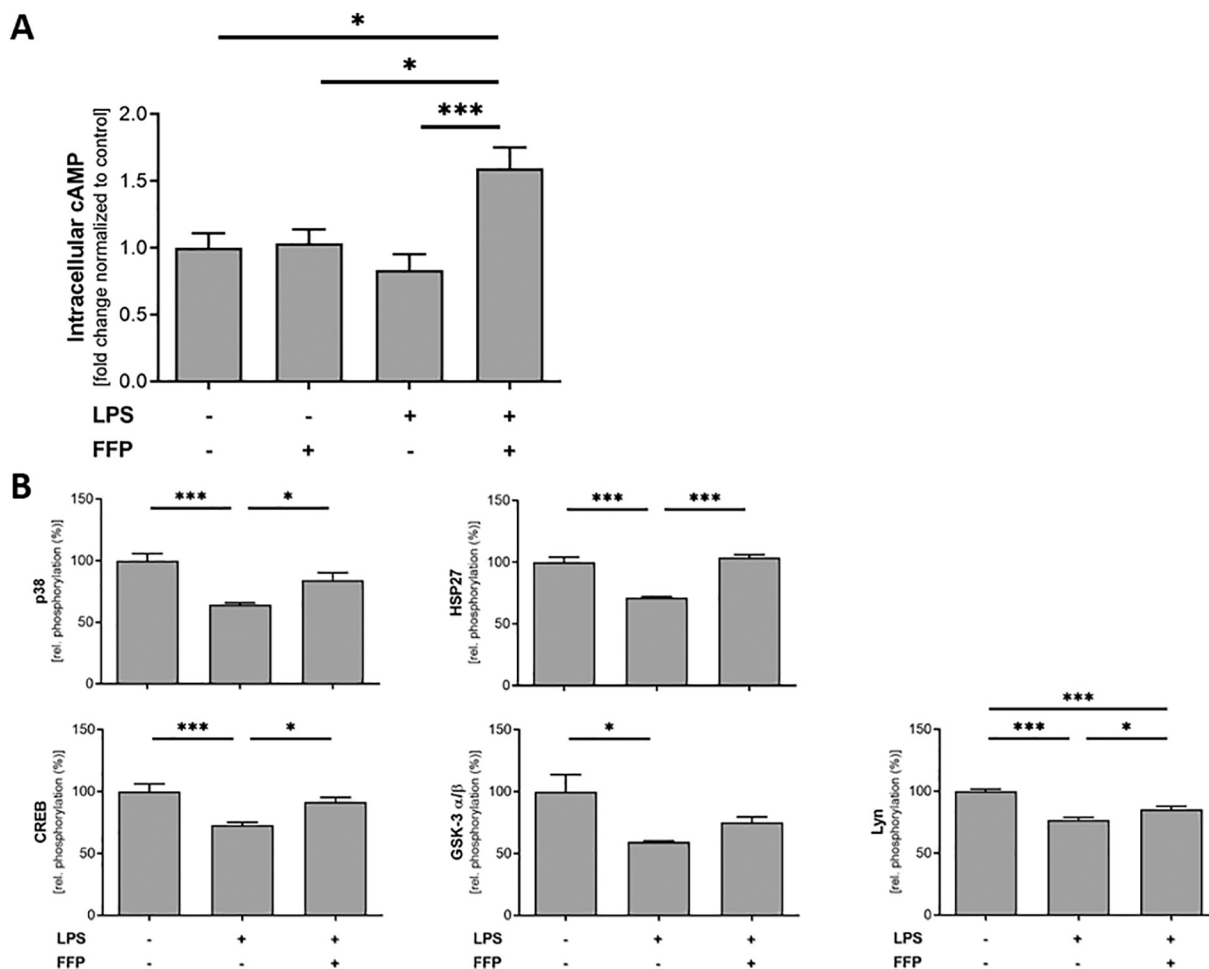


Fig. 3. FFP increases cellular cAMP levels and restores endothelial protein phosphorylation.

HPMECs were incubated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 18 h. Then, 30 vol% of supernatant were replaced by the equivalent volume of FFP, and incubation was continued for another 60 min.

(A) Effect of incubation with LPS and FFP on intracellular cAMP levels, assessed by ELISA from cell lysates. cAMP levels are normalized to unstimulated control. $n = 5-7$.

(B) Effect of incubation on phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase, of heat shock protein 27 (HSP27), of the cAMP response element binding protein (CREB), of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) α/β as well as of Lyn kinase. Phosphorylation state was normalized to unstimulated control, and effects following incubation were expressed as percentage change. $n = 2$.

Mean with SEM. One-way ANOVA with Tukey post hoc test. Significant intergroup differences are indicated by asterisks: * $p < .05$, *** $p < .005$.

compared to the unstimulated control (Fig. 2B). Given the marked nuclear translocation of NF- κB following sequential stimulation with endotoxin and FFP, we expected a likewise further upregulation of expression. Surprisingly, all these genes were downregulated again when LPS incubation was followed by FFP, resulting in a suppression of expression from at least 25% compared to the LPS stimulation (IL-8: RQ 23.4, $p > .05$ vs. LPS; ICAM-1: RQ 19.6, $p = .03$; VCAM-1: RQ 50.3, $p < .005$; VEGF: RQ 2.3, $p > .05$) up to a reduction below the basal expression level in case of ANG-2 (RQ 0.8, $p < .005$).

3.3. FFP increases cellular cAMP levels and restores endothelial protein phosphorylation

Transitions in cAMP signaling are crucial for endothelial function [17]. Therefore, we assessed how stimulation of TLR4 and incubation with FFP alter cellular cAMP levels. Fig. 3A shows that these tended to be decreased compared to control conditions when ECs were challenged with LPS (fold change 0.8, $p > .05$). However, when TLR4 ligation was followed by FFP, cAMP levels were not only restored but rather increased to suprabasal levels (fold change 1.6, $p < .05$ vs. control or LPS, respectively). Of note, incubation with FFP alone had no influence

on intracellular cAMP levels.

Function of cellular proteins usually depends on their phosphorylation state. As the results in Fig. 3B reveal, incubation of ECs with LPS over 18 h significantly reduced phosphorylation of the p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK; 64% of control, $p < .005$), of heat shock protein 27 (HSP27; 71%, $p < .005$), of the cAMP response element binding protein (CREB; 73%, $p < .005$), of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) α/β (60%, $p = .02$) as well as of Lyn kinase (77%, $p < .005$), compared to the control. Again, when TLR4 stimulation was followed by subsequent FFP incubation, phosphorylation was restored to almost control levels in all those proteins.

3.4. Syndecan-1 levels are reduced in FFP-transfused patients following major abdominal surgery

Syndecan-1 is released from the endothelium by shedding upon glycocalyx degradation, and increased levels of soluble Syndecan-1 in the circulation are an established marker of endothelial damage in critically ill patients [5,18]. We assessed serum levels of Syndecan-1 in 20 patients undergoing major abdominal surgery for cytoreduction due to advanced-stage ovarian cancer. Patients were divided into two

Table 1
Serum Syndecan-1 levels in patients undergoing major abdominal surgery in relation to FFP administration.

Parameter	Mean (SD)		p
	No FFP admin.	FFP admin.	
n	9	11	
Age (years)	64 (11)	72 (8)	0.09
Body mass index (kg/m ²)	29.3 (8.0)	26.0 (4.0)	0.25
Duration of surgery (min)	408 (157)	507 (110)	0.12
Intraop. fluid intake (ml/kg * hr)	15.1 (5.1)	20.6 (8.4)	0.11
Postop. fluid balance (ml)	5958 (2426)	8252 (2891)	0.07
Estimated intraop. blood loss (ml/h)	80.3 (52.7)	246.8 (249.3)	0.09
PRBC units transfused	0.2 (0.7)	3.7 (3.7)	0.01
FFP units transfused	0 (0)	5 (2)	< 0.001
Platelet concentrate units transfused	0 (0)	0.1 (0.3)	0.38
Preop. Syndecan-1 serum level (ng/ml)	2.80 (0.43)	2.88 (0.64)	0.75
Postop. Syndecan-1 serum level (ng/ml)	5.58 (1.92)	3.99 (0.92)	0.03
Postop. Syndecan-1 serum level (fold change)	1.97 (0.59)	1.42 (0.35)	0.02

PRBC = packed red blood cell concentrate, FFP = fresh frozen plasma.
Unpaired, two-sided Student's t-test.

cohorts according to whether they were administered FFP during surgery or not. As shown in Table 1, Syndecan-1 levels were equally distributed prior to surgery. Patients that were required to be transfused with FFP also received more RBC units and more fluid in trend, but difference in postoperative total fluid balance was not significant. To eliminate a possible influence of intraoperative fluid resuscitation on Syndecan-1 levels due to dilution, these were assessed not directly following but 24 h after beginning of surgery. Surgical trauma induced increase of Syndecan-1 in all patients by a mean of 1.7-fold, however, total Syndecan-1 serum levels as well as fold changes compared to preoperative values were significantly lower in patients that were transfused with FFP during surgery than in those that were not.

4. Discussion

Effects of FFP on function of endothelial cells are still inconsistently described, and underlying mechanisms are not well understood. Therefore, we assessed the influence of FFP on primary human microvascular ECs challenged with bacterial endotoxin, covering aspects of inflammation, adhesion, and barrier function. Furthermore, determining underlying mechanisms should reveal an explanation for apparently contradictory effects described in the present literature. Our results demonstrate that FFP increases cellular cAMP levels that had been decreased by preceding stimulation of TLR4. On one hand, this controls endotoxin-mediated upregulation of pro-inflammatory, pro-adhesion, and leakage-related genes, restores impaired phosphorylation of significant functional proteins, and rescues endothelial intercellular cohesion and barrier function. On the other hand, this increases nuclear translocation of NF- κ B as well as monocyte adhesion to the EC monolayer surface. In vivo, serum levels of Syndecan-1 following major abdominal surgery were lower in patients that were transfused with FFP compared to those that were not.

Stimulation of the endothelial TLR4 with bacterial endotoxin decreases intracellular levels of cAMP. The influence on this key second messenger of signal transduction is crucial and has a direct impact on endothelial cellular function [17]. Although our experiments only reveal a trend towards decreasing cAMP levels following TLR4 stimulation, they are in line with data from Schlegel et al. who demonstrated that incubation of human microvascular ECs with LPS lowered intracellular cAMP levels by more than half [19]. This resulted in the formation of intercellular gaps and fragmentation of VE-Cadherin

immunostaining, together with significantly increased EC monolayer permeability for FITC-dextran, which is confirmed by our experiments. Interestingly, all observed LPS-mediated effects on EC barrier can be blocked by increasing cAMP levels [19]. Therefore, altering intracellular cAMP levels seems to be a key event in TLR4-induced EC barrier breakdown.

Stimulation of TLR4 engages an intracellular signaling pathway ultimately resulting in the activation of NF- κ B in ECs by its nuclear translocation [16]. Thereby, genes that mediate pro-inflammatory (IL-8 [20]), pro-adhesion (ICAM-1, VCAM-1 [20]) as well as vascular leakage-related effects (VEGF, ANG-2 [21]) are strongly upregulated. Consistently, we demonstrate NF- κ B translocation together with significant upregulation of those genes upon stimulation of ECs with endotoxin. Moreover, adhesion of monocytes to ECs was markedly increased following LPS, which is likewise NF- κ B-dependent, as demonstrated by others [22].

When TLR4 stimulation of ECs was followed by subsequent incubation with FFP, this not only restored but rather increased intracellular cAMP to levels above the unstimulated control. Given the significant role of cAMP signaling for endothelial function, this alters LPS-mediated effects in a substantial way. TLR4-induced shrinking of cells with loss of intercellular contacts and gap formation was attenuated, and endothelial barrier breakdown was completely rescued. As previously shown, this is a specific effect of increased cAMP levels [19,23] and in our case mediated by FFP. In line with that, other authors likewise observed reconstitution of intercellular junctions and alleviation of endothelial permeability when incubating ECs with FFP [24]. However, it is of significance that this FFP-induced cAMP increase modulates endothelial function and the consequences of TLR4 activation in a differential way. While barrier disruption is attenuated or even abolished, nuclear translocation of NF- κ B is greatly increased compared to stimulation with LPS alone, suggesting that EC barrier breakdown and NF- κ B activation are influenced independently of each other. Indeed, when Schlegel et al. raised intracellular cAMP levels by forskolin, this prevented TLR4-induced loss of endothelial barrier properties, while nuclear translocation of NF- κ B was actually further increased [16]. Consistently, blocking LPS-mediated NF- κ B activation with an NBD (NEMO-binding domain) peptide had no effect on intercellular gap formation and EC barrier breakdown. Our results are completely in line with these findings.

Together with further activation of NF- κ B, FFP likewise increases the subsequent TLR4-mediated adhesion of monocytes to ECs. This also is obviously a result of increased intracellular cAMP levels, as previously shown by Sung et al. [25] Interestingly, some authors described rather attenuation than further increase of stimulated adhesion of neutrophil granulocytes to ECs upon FFP incubation [10]. However, this is likewise to be explained by the effect of FFP on the second messenger cAMP, as elevation of cAMP in ECs was demonstrated to decrease LPS-induced neutrophil binding while increasing that of monocytes [26].

Our data show that the upregulation of pro-inflammatory, pro-adhesion as well as leakage-related genes elicited by TLR4 stimulation is markedly reduced when LPS incubation is followed by FFP. This might be unexpected given that FFP increased NF- κ B translocation to the nucleus. However, as previously demonstrated by Ollivier et al., elevating intracellular cAMP levels effectively blocks stimulated upregulation of pro-inflammatory and pro-adhesion genes, while LPS-mediated activation of NF- κ B is unaffected at the same time, again suggesting a differential modulation of NF- κ B and gene expression regulation by cAMP [27]. Moreover, results from other authors likewise describing downregulation of adhesion molecules on ECs following FFP confirm our findings [10]. In addition, studies on resuscitation in septic or hemorrhagic shock suggest the same positive influence of FFP on gene expression of pro-inflammatory cytokines or ICAM-1 and VCAM-1 [2,28,29]. Of note, downregulation of adhesion molecule expression by FFP must not necessarily reduce leukocyte binding to ECs, since other

authors demonstrated altered monocyte adhesion in response to FFP independent of gene expression regulation of ICAM-1 and VCAM-1 [24].

It must be stressed that our results obviously suggest a positive influence of FFP on EC barrier properties in several independent ways: a direct influence of increased intracellular cAMP levels on intercellular cohesion, and a rather indirect effect mediated by the control of leakage-related factors such as VEGF and ANG-2. In addition to that, FFP incubation restored the phosphorylation state of proteins impaired by LPS stimulation that are vital for endothelial barrier function. Phosphorylation of HSP27, which is lost during hypoxia and inflammation, has been shown to preserve EC barrier properties [30–32]. HSP27 is a downstream effector molecule of the p38 MAPK, just like CREB. Phosphorylation of CREB has been shown to maintain basal endothelial barrier function and to suppress the permeability increased by stimulation with LPS [33]. Interestingly, CREB is activated in response to elevated cAMP levels by phosphorylation of p38 MAPK, providing further mechanistic evidence for a protective effect of cAMP increase by FFP [34]. Similar to HSP27 and CREB, GSK-3 is likewise phosphorylated by p38 and mitigates TLR4-induced inflammation, apoptosis, and oxidative stress in ECs [35,36]. Finally, Lyn kinase, of which the phosphorylation state was restored by FFP in our experiments, was shown to stabilize endothelial integrity and thereby barrier function [37].

Given the influence of FFP we observed on intracellular cAMP levels and on endothelial key properties, it is a critical limitation of our study that we were not able to identify the components of FFP that mediate these effects. However, there is some evidence that Adiponectin, a protein hormone with significance for glucose regulation and fatty acid oxidation, is one promising candidate. Adiponectin is known for its vasoprotective properties [38]. It has been shown to increase endothelial cAMP levels [39]. In particular, Adiponectin contained in FFP was demonstrated to contribute to the restoration of vascular barrier function in human shock [40].

Elevated levels of the glycocalyx protein Syndecan-1 are indicative of degradation of the glycocalyx and subsequent breakdown of vascular barrier function [18,41]. Cyto-reductive surgery (CRS) for advanced-stage ovarian cancer is highly associated with the emergence of a vascular-leakage phenotype, leading to extensive intra- and postoperative fluid shifts [42]. When we analyzed circulating levels of Syndecan-1 in patients after major abdominal CRS, this revealed a more pronounced increase in patients that were not administered FFP during surgery compared to those that actually were. In line with our results in patients receiving elective abdominal surgery, resuscitation with FFP has been demonstrated to reduce levels of circulating Syndecan-1 in animal models of abdominal sepsis and ischemia/reperfusion injury as well as in non-bleeding septic humans and to restore endothelial glycocalyx integrity and barrier function by increasing Syndecan-1 expression [2,5,7,43]. This might explain the findings from Saxena et al. who described a superior hemodynamic stability and less total fluid intake when volume resuscitation was performed with FFP instead of crystalloid infusion solution in patients undergoing major abdominal CRS [3]. Attenuated edema formation has likewise been demonstrated in burned patients with disrupted vascular barrier when FFP and not crystalloids were used for fluid replacement [9].

5. Conclusions

Taken together, our data provide evidence for a differential modulation of crucial endothelial properties by FFP. This seems to be mediated by elevation of intracellular cAMP levels. Further studies should evaluate the observed positive effects of FFP in non-critically ill surgery patients.

CRedit authorship contribution statement

Marcel Scheck: Writing - original draft, Investigation, Data curation. **Markus Velten:** Writing - review & editing, Methodology, Investigation, Data curation. **Sven Klaschik:** Writing - review & editing, Methodology, Investigation. **Martin Soehle:** Validation, Methodology, Conceptualization. **Stilla Frede:** Supervision, Methodology, Investigation, Formal analysis. **Jennifer Gehlen:** Writing - review & editing, Investigation, Data curation. **Jochen Hoch:** Resources, Methodology. **Alexander Muresta:** Writing - review & editing, Resources. **Andreas Hoefl:** Writing - review & editing, Validation, Resources, Project administration. **Tobias Hilbert:** Writing - original draft, Visualization, Validation, Supervision, Software, Project administration, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Formal analysis, Conceptualization.

Acknowledgements

The authors thank Frank Spletstoesser for providing technical support.

Funding

This work was in part supported by the B.Braun foundation, Germany (grant ID: H-017.0251).

Declaration of competing interest

The authors state that they have no conflicts of interest to declare.

References

- [1] R. Neuman, S. Hayek, A. Rahman, et al., Effects of storage-aged red blood cell transfusions on endothelial function in hospitalized patients, *Transfusion (Paris)* 55 (2015) 782–790.
- [2] R. Chang, J.B. Holcomb, P.I. Johansson, et al., Plasma resuscitation improved survival in a cecal ligation and puncture rat model of sepsis, *Shock Augusta Ga* 49 (2018) 53–61.
- [3] A. Saxena, T.C. Chua, S. Fransi, et al., Effectiveness of early and aggressive administration of fresh frozen plasma to reduce massive blood transfusion during cytoreductive surgery, *J Gastrointest Oncol* 4 (2013) 30–39.
- [4] M. Vigiola Cruz, B.C. Carney, J.N. Luker, et al., Plasma ameliorates endothelial dysfunction in burn injury, *J. Surg. Res.* 233 (2019) 459–466.
- [5] M. Straat, M.C. Müller, J.C. Meijers, et al., Effect of transfusion of fresh frozen plasma on parameters of endothelial condition and inflammatory status in non-bleeding critically ill patients: a prospective substudy of a randomized trial, *Crit. Care* 19 (2015) 163.
- [6] A. Imam, G. Jin, M. Sillesen, et al., Fresh frozen plasma resuscitation provides neuroprotection compared to normal saline in a large animal model of traumatic brain injury and polytrauma, *J. Neurotrauma* 32 (2015) 307–313.
- [7] K. Ban, Z. Peng, S. Pati, et al., Plasma-mediated gut protection after hemorrhagic shock is lessened in Syndecan-1 $-/-$ mice, *Shock Augusta Ga* 44 (2015) 452–457.
- [8] C.L. Kendrick, J.W. Edens, R.J. Christy, et al., Fresh frozen plasma reduces edema in skeletal muscle following combined limb ischemia-reperfusion injury and hemorrhagic shock in rats, *J. Trauma Acute Care Surg.* 79 (2015) S110–S115.
- [9] G.B. Du, H. Slater, I.W. Goldfarb, Influences of different resuscitation regimens on acute early weight gain in extensively burned patients, *Burns J Int Soc Burn Inj* 17 (1991) 147–150.
- [10] B. Nohé, R.T. Kiefer, A. Ploppa, et al., The effects of fresh frozen plasma on neutrophil-endothelial interactions, *Anesth. Analg.* 97 (2003) 216–221 (table of contents).
- [11] P.A. Letourneau, S. Pati, M.H. Gerber, et al., Fresh frozen plasma increases adhesion molecule expression on human pulmonary endothelial cells, *J. Surg. Res.* 163 (2010) 317–322.
- [12] M. Morgado, E. Cairrão, A.J. Santos-Silva, et al., Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle, *Cell Mol Life Sci CMLS* 69 (2012) 247–266.
- [13] C. Indolfi, E.V. Avvedimento, E. Di Lorenzo, et al., Activation of cAMP-PKA signaling in vivo inhibits smooth muscle cell proliferation induced by vascular injury, *Nat. Med.* 3 (1997) 775–779.
- [14] Radeva MY, Waschke J. Mind the gap: mechanisms regulating the endothelial barrier. *Acta Physiol Oxf Engl*; 222. Epub ahead of print January 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/apha.12860>.
- [15] T. Kurokawa, Y.-W. Zheng, N. Ohkohchi, Novel functions of platelets in the liver, *J.*

- Gastroenterol. Hepatol. 31 (2016) 745–751.
- [16] N. Schlegel, R. Leweke, M. Meir, et al., Role of NF- κ B activation in LPS-induced endothelial barrier breakdown, *Histochem. Cell Biol.* 138 (2012) 627–641.
- [17] S.L. Sayner, Emerging themes of cAMP regulation of the pulmonary endothelial barrier, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 300 (2011) L667–L678.
- [18] J. Steppan, S. Hofer, B. Funke, et al., Sepsis and major abdominal surgery lead to flaking of the endothelial glycocalyx, *J. Surg. Res.* 165 (2011) 136–141.
- [19] N. Schlegel, Y. Baumer, D. Drenckhahn, et al., Lipopolysaccharide-induced endothelial barrier breakdown is cyclic adenosine monophosphate dependent in vivo and in vitro, *Crit. Care Med.* 37 (2009) 1735–1743.
- [20] S. Kempe, H. Kestler, A. Lasar, et al., NF- κ B controls the global pro-inflammatory response in endothelial cells: evidence for the regulation of a pro-atherogenic program, *Nucleic Acids Res.* 33 (2005) 5308–5319.
- [21] I. Kim, J.H. Kim, Y.S. Ryu, et al., Tumor necrosis factor- α upregulates angiotensin-2 in human umbilical vein endothelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269 (2000) 361–365.
- [22] W.J. Zhang, B. Frei, Alpha-lipoic acid inhibits TNF- α -induced NF- κ B activation and adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells, *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 15 (2001) 2423–2432.
- [23] S. Fukuhara, A. Sakurai, H. Sano, et al., Cyclic AMP potentiates vascular endothelial cadherin-mediated cell-cell contact to enhance endothelial barrier function through an Epac-Rap1 signaling pathway, *Mol. Cell. Biol.* 25 (2005) 136–146.
- [24] K. Wataha, T. Menge, X. Deng, et al., Spray-dried plasma and fresh frozen plasma modulate permeability and inflammation in vitro in vascular endothelial cells, *Transfusion (Paris)* 53 (Suppl. 1) (2013) 80S–90S.
- [25] C.P. Sung, A.J. Arleth, B. Storer, et al., Modulation of U937 cell adhesion to vascular endothelial cells by cyclic AMP, *Life Sci.* 49 (1991) 375–382.
- [26] F. Parhami, Z.T. Fang, A.M. Fogelman, et al., Minimally modified low density lipoprotein-induced inflammatory responses in endothelial cells are mediated by cyclic adenosine monophosphate, *J. Clin. Invest.* 92 (1993) 471–478.
- [27] V. Ollivier, G.C. Parry, R.R. Cobb, et al., Elevated cyclic AMP inhibits NF- κ B-mediated transcription in human monocytic cells and endothelial cells, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 20828–20835.
- [28] S.E. Dekker, M. Sillesen, T. Bambakidis, et al., Normal saline influences coagulation and endothelial function after traumatic brain injury and hemorrhagic shock in pigs, *Surgery* 156 (2014) 556–563.
- [29] M. Sillesen, P.I. Johansson, L.S. Rasmussen, et al., Fresh frozen plasma resuscitation attenuates platelet dysfunction compared with normal saline in a large animal model of multisystem trauma, *J. Trauma Acute Care Surg.* 76 (2014) 998–1007.
- [30] T. Liu, O.E. Guevara, R.R. Warburton, et al., Modulation of HSP27 alters hypoxia-induced endothelial permeability and related signaling pathways, *J. Cell. Physiol.* 220 (2009) 600–610.
- [31] H. Sun, X. Ren, J. Liu, et al., HSP27 phosphorylation protects against endothelial barrier dysfunction under burn serum challenge, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 463 (2015) 377–383.
- [32] R.B. Nahomi, A. Palmer, K.E. Roth, et al., Pro-inflammatory cytokines downregulate Hsp27 and cause apoptosis of human retinal capillary endothelial cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1842 (2014) 164–174.
- [33] K.R. Chava, M. Tauseef, T. Sharma, et al., Cyclic AMP response element-binding protein prevents endothelial permeability increase through transcriptional controlling p190RhoGAP expression, *Blood* 119 (2012) 308–319.
- [34] M.P. Delghandi, M. Johannessen, U. Moens, The cAMP signalling pathway activates CREB through PKA, p38 and MSK1 in NIH 3T3 cells, *Cell. Signal.* 17 (2005) 1343–1351.
- [35] T.M. Thornton, G. Pedraza-Alva, B. Deng, et al., Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3 β inactivation, *Science* 320 (2008) 667–670.
- [36] D. Qi, D. Wang, C. Zhang, et al., Vaspin protects against LPS-induced ARDS by inhibiting inflammation, apoptosis and reactive oxygen species generation in pulmonary endothelial cells via the Akt/GSK-3 β pathway, *Int. J. Mol. Med.* 40 (2017) 1803–1817.
- [37] J. Han, G. Zhang, E.J. Welch, et al., A critical role for Lyn kinase in strengthening endothelial integrity and barrier function, *Blood* 122 (2013) 4140–4149.
- [38] L. Shen, I.M. Evans, D. Souza, et al., Adiponectin: an endothelium-derived vasoprotective factor? *Curr. Vasc. Pharmacol.* 14 (2016) 168–174.
- [39] N. Ouchi, S. Kihara, Y. Arita, et al., Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF- κ B signaling through a cAMP-dependent pathway, *Circulation* 102 (2000) 1296–1301.
- [40] X. Deng, Y. Cao, M.P. Huby, et al., Adiponectin in fresh frozen plasma contributes to restoration of vascular barrier function after hemorrhagic shock, *Shock Augusta Ga* 45 (2016) 50–54.
- [41] J.M. Tarbell, L.M. CANCEL, The glycocalyx and its significance in human medicine, *J. Intern. Med.* 280 (2016) 97–113.
- [42] S. Klaschik, J. Gehlen, C. Neumann, et al., Network of mediators for vascular inflammation and leakage is Dysbalanced during Cyto-reductive surgery for late-stage ovarian Cancer, *Mediat. Inflamm.* 2019 (2019) 5263717.
- [43] Z. Peng, S. Pati, D. Potter, et al., Fresh frozen plasma lessens pulmonary endothelial inflammation and hyperpermeability after hemorrhagic shock and is associated with loss of syndecan 1, *Shock Augusta Ga* 40 (2013) 195–202.

3. Danksagung

Zu Beginn möchte ich ganz herzlich Prof. Tobias Hilbert für die Ermöglichung meines Projektes, für die optimale Betreuung meiner Dissertation und auch für die darüberhinausgehende Förderung danken. Als nächstes möchte ich mich bei PD Stilla Frede und dem gesamten Team des experimentellen Labors der Anästhesie bedanken, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Ein weiterer herzlicher Dank geht an Prof. Markus Velten, Prof. Sven Klaschik, Prof. Martin Söhle, Jennifer Gehlen, Prof. Jochen Hoch, Prof. Alexander Mustea und in Gedenken an Prof. Andreas Hoeft.

Zuletzt danke ich meiner Familie, die immer hinter mir steht und mich unterstützt.