

Aus dem Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Jens W. Fischer

**Extrazelluläre Matrix nach akuter kardialer
Ischämie -
Untersuchungen zur Bedeutung der
zirkulierenden Hyaluronsäure**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Friederike Schmitz
2022

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. med. Maria Grandoch

Zweitgutachter: PD Dr. med. Amin Polzin

Meiner Familie

Zusammenfassung

Hyaluronsäure (HA) kommt u.a. in der extrazellulären Matrix (EZM) und in der endothelialen Glykokalyx (eGC) vor. Auch im Rahmen der Atherosklerose scheint sie Bedeutung zu haben, da die HA-Synthese-Hemmung nachweislich Atherogenität fördert. Ihre Funktionen konnten kontextspezifisch charakterisiert werden: Innerhalb des Myokards und in der eGC scheint die HA eine protektive Funktion innezuhaben, wohingegen es durch oxidativen Stress zur HA-Degradation in niedermolekulare Fragmente kommt, die *pro*-inflammatorisch und somit gewebeschädlich agieren. HA kann sowohl bei physiologischen als auch pathologischen Zuständen erhöht im Blutstrom nachgewiesen werden.

Ziel unserer Untersuchung war es die Bedeutung der zirkulierenden HA bei der koronaren Herzkrankheit (KHK) bzw. der kardialen Ischämie zu charakterisieren.

Bis zur Durchführung unserer Untersuchung in 2015/16 gab es keine veröffentlichte Studie hinsichtlich zirkulierender HA bei kardialer Ischämie mit koronarangiographisch gesicherter Koronarsklerose. Wir untersuchten daher in einer prospektiven unizentrischen Studie am Universitätsklinikum Düsseldorf die Plasma-HA-Konzentrationen von Patienten (n=140), die anhand ihres koronarangiographischen Befundes und ihres klinischen Status in drei Gruppen eingeteilt wurden.

So unterschieden wir Patienten mit nachgewiesener stenosierender KHK, die entweder eine stabile *Angina pectoris* oder ein akutes Koronarsyndrom (*(non)-ST-segment elevation myocardial infarction*; NSTEMI bzw. STEMI) aufwiesen. Die Referenzgruppe hatte einen angiographisch unauffälligen Koronarstatus. Plasma-HA-Spiegel wurden zudem in Hinblick auf KHK-prädisponierende Risikofaktoren analysiert.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom erniedrigte HA-Werte im Vergleich zu solchen mit stabiler KHK vorliegen. Ebenso wurden reduzierte Plasma-HA-Werte bei Patienten sowohl mit aktivem Nikotinabusus, als auch LDL-Hyperlipoproteinämie nachgewiesen. Basierend auf unseren Ergebnissen könnte Plasma-HA als Marker bei kardialer Ischämie dienen. Ferner lassen unsere Ergebnisse vermuten, dass einem eGC/EZM-schädigenden Einfluss und einer HA-Degradation durch Nikotinverzicht und medikamentöse Lipidsenkung entgegengewirkt werden kann. Die Mechanismen für die Plasma-HA-Reduktion unter den genannten Bedingungen sind bis jetzt noch unklar. Weitere Studien, die speziell die HA-Fragmente in der Zirkulation und mögliche Zell-/Rezeptor-Interaktionen untersuchen, sind erforderlich.

Summary

Hyaluronic acid (HA) occurs mainly in the extracellular matrix (ECM) and in the eGC. It also seems to be relevant in the context of atherosclerosis as inhibition of its synthesis has been shown to promote atherogenicity. Its functions could be characterized in a context-specific manner: Within the myocardium and in the eGC, HA seems to have a protective function, whereas oxidative stress leads to HA degradation into low-molecular fragments, which act *pro-inflammatory* and thus tissue-damaging. HA can be detected at increased levels in the bloodstream in both physiological and pathological conditions.

The aim of our study was to characterize the importance of circulating HA in coronary artery disease (CAD) and cardiac ischemia.

Until our research was carried out in 2015/16, there was no published data regarding circulating HA in cardiac ischemia with angiographically confirmed CAD.

In a prospective, unicentric study at the University Hospital Düsseldorf, we therefore examined the plasma HA concentrations in patients (n= 140) who were divided into three groups based on their coronary angiographic findings and clinical presentation.

We differentiated between patients with proven obstructive CAD who either had stable angina or an acute coronary syndrome (*(non)-ST-segment elevation myocardial infarction*; NSTEMI and STEMI).

The reference group showed angiographically unremarkable coronary status.

The plasma HA values were additionally analysed regarding various CAD-promoting risk factors.

In summary, our results show that patients with acute coronary syndrome have lower HA levels than those with stable CAD. Reduced plasma Ha levels were also found in patients with ongoing nicotine consumption as well as LDL hyperlipoproteinemia.

Based on our results, plasma HA could thus serve as a marker in cardiac ischemia. Furthermore, our results suggest that an eGC / ECM-damaging and HA degradation can be measurably counteracted by nicotine withdrawal and application of lipid-lowering agents. The underlying mechanisms for HA reduction in plasma are still unclear. Further studies, specifically examining HA fragments in circulation and potential cell/ receptor interactions are required.

Abkürzungsverzeichnis

ACS	<i>acute coronary syndrome</i> ; akutes Koronarsyndrom
AHTN	Arterielle Hypertonie
AMI	Akuter Myokardinfarkt
Ang-2	Angiopoetin-2
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
AP	<i>Angina pectoris</i>
AST	Aspartattransaminase
AT III	Antithrombin III
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	<i>body mass index</i>
CAD	<i>coronary artery disease</i> ; koronare Herzkrankheit
CD44	<i>cluster of differentiation 44</i>
CK	Creatinkinase
CKD	<i>chronic kidney disease</i>
CK-MB	Creatinkinase vom <i>muscle-brain-type</i>
COPD	<i>chronic-obstructive pulmonary disease</i>
CRP	C-reaktives Protein
cTnT, I bzw. C	Kardiales Troponin vom Typ T, I bzw. C
EC	Endothelzellschicht
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm
eGC	Endotheliale Glykokalyx
ESL	<i>endothelial surface layer</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
GAG	Glykosaminoglykan
GDF-15	<i>growth differentiation factor 15</i> ;
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GlcA	<i>glucuronic acid</i>
GlcNAc	N-Acetyl-D-Glukosamin
HA	<i>hyaluronic acid</i> ; Hyaluronsäure
HABP	Hyaluronsäure-bindendes Protein
HARE	<i>hyaluronan receptor for endocytosis</i>

HAS 1/2/3	Hyaluron-Synthase 1/2/3
HELLP	<i>hemolysis, elevated liver enzymes, low platelets</i>
H-FABP	<i>heart-type fatty acid binding protein</i>
HMW	<i>high-molecular weight</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
hs-	<i>high sensitive</i>
HYAL	Hyaluronidase
IL	Interleukin
I/R	Ischämie/Reperfusion
kDA	Kilodalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
KO	<i>knock-out</i>
LDH	Laktatdehydrogenase
LDL	<i>low-density lipoprotein</i>
LJ	Lebensjahr
LMW	<i>low-molecular weight</i>
LYVE-1	<i>lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1</i>
MMP	Matrix-Metalloprotease
MW	Mittelwert
NO	Stickstoffmonoxid
NSTEMI	<i>non-ST-segment elevation myocardial infarction</i>
NT-pro-BNP	<i>N-terminal pro brain natriuretic peptide</i>
OAD	Orale Antidiabetika
OCT	Optische Kohärenztomographie
oxLDL	Oxidiertes Lipoprotein geringer Dichte
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCI	Perkutane Koronarintervention
RA	Rheumatoide Arthritis
RHAMM	<i>receptor for hyaluronan mediated motility</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SLRP	<i>small leucine-rich repeat proteoglycan</i>
SO	Superoxid
SOD	Superoxid-Dismutase
SSc	Systemische Sklerose

STEMI	<i>ST-segment elevation myocardial infarction</i>
sVCAM-1	<i>soluble vascular cell adhesion molecule-1</i>
sVEGFR-1	<i>soluble vascular endothelial growth factor receptor-1</i>
TAG	Triacylglyceride
TF	<i>tissue factor</i>
TGF β	<i>transforming growth factor β</i>
TH	T-Helferzelle
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNFα	Tumornekrosefaktor α
T1DM bzw. T2DM	Typ-1 respektive Typ-2 Diabetes mellitus
UDP	Uridindiphosphat
UGT	Glukuronosyltransferase
UGDH	UDP-Glukose-Dehydrogenase
UGPP	UDP-Glukose-Pyrophosphorylase
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
VSMC	<i>vascular smooth muscle cell</i>
vWF	von Willebrand-Faktor
WHO	<i>World Health Organization</i>
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung
4-MU	4- Methylumbelliferon

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der endothelialen Glykokalyx.	6
Abb. 2: Schematischer Aufbau eines Hyaluronsäure-Moleküls.	8
Abb. 3: Übersicht der ein-/ ausgeschlossenen Patienten.	23
Abb. 4: Spiegel zirkulierender Plasma-Hyaluronsäure (HA) bei gesunden Probanden abhängig von der Zentrifugationsstufe ($g \cdot x$).	27
Abb. 5: Spiegel zirkulierender Plasma-Hyaluronsäure (HA) abhängig vom Geschlecht (a) und Lebensalter (b/c).	30
Abb. 6: Spiegel zirkulierender Plasma-Hyaluronsäure (HA) abhängig vom Vorliegen einer diagnostizierten arteriellen Hypertonie (AHTN).	31
Abb. 7: Spiegel zirkulierender Plasma-Hyaluronsäure (HA) in Abhängigkeit vom Vorliegen eines Nikotinabusus.	32
Abb. 8: Spiegel zirkulierender Plasma-Hyaluronsäure (HA) abhängig vom Body-Mass-Index (BMI; a), dem Vorliegen einer Dyslipoproteinämie (b/c/d/f) und unter Einnahme einer Lipid-senkenden Medikation (e).	33
Abb. 9: Spiegel zirkulierender Plasma-Hyaluronsäure (HA) in Abhängigkeit vom HbA1c (a), bei Patienten mit Typ-2 Diabetes mellitus (T2DM) (b) und der antidiabetischen Therapie (c/d).	34
Abb. 10: Spiegel zirkulierender Plasma-Hyaluronsäure (HA) in Abhängigkeit von der Schwere einer diagnostizierten chronischen Niereninsuffizienz (CKD).	35
Abb. 11: Spiegel zirkulierender Plasma-Hyaluronsäure (HA) bei koronarer Herzkrankheit (KHK) und akutem Koronarsyndrom (ACS = N/STEMI = (Nicht)-ST-Strecken-Hebungs-Infarkt) gegenüber einer gesunden Vergleichsgruppe (keine KHK).	36
Abb. 12: Plasma-Hyaluronsäure (HA)-Level bei Patienten mit KHK/ACS abhängig von der Gefäßbeteiligung der KHK (a) und von vorausgegangenem ischämischem Ereignis (ACS/Apoplex; b).	37
Abb. 13: Verlaufsmessungen bis 96 Stunden nach akutem Koronarsyndrom (ACS) (a) Creatinkinase (CK), (b) high-sensitive Troponin-T und (c) Plasma-Hyaluronsäure (HA).	38
Abb. 14: Auswahl relevanter Funktionen der Hyaluronsäure (HA) in Bezug auf Inflammation und Atherogenese in Abhängigkeit vom Zell-Kompartiment.	40
Abb. 15: Schematische Darstellung des eGC-sheddings und der Atherogenese.	41

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Patientencharakteristika	28
---	----

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Summary	II
Abkürzungsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen.....	1
1.1.1 Koronare Herzkrankheit	1
1.1.2 Akutes Koronarsyndrom und myokardiale Nekrose	2
1.2 Atherosklerose.....	3
1.2.1 Endotheliale Glykokalyx	4
1.2.1.1 Aufbau, Funktion und Shedding	4
1.3 Extrazelluläre Matrix.....	6
1.3.1 Myokardiale Extrazelluläre Matrix und Ischämie.....	7
1.4 Hyaluronsäure.....	8
1.4.1 Rolle der HA innerhalb der eGC	11
1.4.2 Bedeutung der HA für die myokardiale extrazelluläre Matrix	13
1.4.3 Im Blutstrom zirkulierende HA.....	15
1.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.....	19
2 Patienten und Methoden.....	20
2.1 Studiendesign	20
2.2 Patienten und Gruppen	20
2.3 Ein-/Ausschlusskriterien.....	22
2.4 Ermittlung des Koronarstatus	24
2.5 Probenverarbeitung.....	24
2.5.1 Vorversuch	24
2.5.2 Hauptuntersuchung.....	25
2.5.3 Messung der HA im EDTA-Plasma.....	25

2.6 Statistik.....	26
3 Ergebnisse	27
3.1 Vorversuch	27
3.2 Epidemiologische Daten	28
3.2.1 HA-Spiegel in Abhängigkeit vom Geschlecht und Alter	30
3.2.2 HA-Spiegel in Abhängigkeit von Atherogenese-begünstigenden Erkrankungen.....	31
3.2.2.1 Arterielle Hypertonie	31
3.2.2.2 Tabakkonsum	32
3.2.2.3 <i>Body-Mass-Index</i> (BMI) und Dyslipidämien	33
3.2.2.4 Diabetes mellitus	34
3.2.2.5 Chronische Niereninsuffizienz	35
3.2.3 Zirkulierende HA bei stabiler KHK und ACS	36
3.2.4 Verlaufsmessungen von CK, TnT und Plasma-HA nach ACS.....	38
4 Diskussion	40
4.1 Bedeutung zirkulierender Plasma-HA-Spiegel bei KHK begünstigenden Risikofaktoren und Komorbiditäten	42
4.2. Zeigen sich Unterschiede zirkulierender Plasma-HA-Level zwischen Patienten mit stabiler KHK und ACS?	45
4.3 Kann zirkulierende Plasma-HA als Biomarker bei nekrotischem Myokarduntergang dienen?.....	47
4.4 Limitationen	51
4.5 Schlussfolgerungen und Ausblick.....	52
5 Literatur- und Quellenverzeichnis	53
6 Anhang	71
Danksagung.....	72

1 Einleitung

1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen

Kardiovaskuläre Erkrankungen haben unverändert große Bedeutung für die Gesundheit, vor allem der westlichen Bevölkerung. Die koronare Herzerkrankung gehört mit einer Lebenszeitprävalenz von 9,3% bei 40-79-Jährigen zu den wichtigsten Volkskrankheiten. Neben höherem Lebensalter und männlichem Geschlecht ist auch ein niedriger sozialer Status mit einer höheren Lebenszeitprävalenz einer KHK und einem Herzinfarkt verbunden [1].

1.1.1 Koronare Herzkrankheit

Die koronare Herzerkrankung (KHK) beschreibt die klinisch relevante Manifestation der Atherosklerose in den Herzkranzarterien [2].

Folgende kardiovaskuläre Risikofaktoren werden unter anderem für eine vorzeitige Atherosklerose-Bildung verantwortlich gemacht [3], [4]:

- Männliches Geschlecht
- Lebensalter (Männer ≥ 55 Jahre; Frauen ≥ 65 Jahre)
- Arterielle Hypertonie (AHTN)
- Tabakkonsum bzw. chronisch hohe Feinstaubbelastung
- *Low-density lipoprotein* (LDL)-Cholesterin-Erhöhung bzw. *high-density lipoprotein* (HDL)-Cholesterin-Erniedrigung bzw. andere Lipidstoffwechselstörungen (Hypertriglyzeridämie, Lipoprotein a Erhöhung)
- Adipositas (v.a. abdominell betonte Fettspeicherung; Taillenumfang >94 cm bei Männern; > 80 cm bei Frauen)
- Körperliche Inaktivität
- Atherogene Diät
- Diabetes mellitus (HbA1c $\geq 7\%$), bzw. Glukosetoleranzstörung mit einem Nüchternblutzucker ≥ 100 mg/dl
- Chronische Niereninsuffizienz (CKD)
- KHK/Herzinfarkte bei erstgradigen Familienangehörigen vor dem 55. Lebensjahr (LJ; bei Männern) bzw. 65. LJ (bei Frauen)
- Niedriger sozioökonomischer Status
- Chronische Entzündungszustände

1.1.2 Akutes Koronarsyndrom und myokardiale Nekrose

Beim akuten Koronarsyndrom (ACS) liegt ätiologisch meist eine Koronarsklerose zugrunde. Häufigste Ursache für die überwiegend akut eintretende Myokardischämie ist ein kompletter thrombotischer Verschluss eines Koronararterienastes nach Plaqueruptur mit konsekutiver absoluter Koronarinsuffizienz [5], [6]. Unter anderem durch Scherkräfte getriggert, können die stabilen Plaqueablagerungen innerhalb der Intima durch Degradation der endothelialen Glykokalyx destabilisiert und somit vulnerabel werden. Durch Ruptur der Intimaschicht und Aktivierung *pro*-koagulatorischer Faktoren [7] bildet sich ein Thrombus, der das Lumen des Herzkranzgefäßes einengen bzw. komplett verschließen kann.

Neben diesem, als am häufigsten auftretend beschriebenen pathophysiologischen Mechanismus der Plaqueruptur (60-80%), konnte bei Patienten mit ACS weitere Morphologien der sogenannten *culprit lesion* ausgemacht werden [8]. So wird als zweithäufigste Entität die Plaqueerosion beschrieben [9], bei der es zur Thrombusbildung in einem Bereich mit Diskontinuität der Endothellzellschicht ohne Unterbrechung der schützend über einem lipidreichen Kern liegenden fibrösen Kappe kommt [10]. Die Plaqueerosion, die ca. in 20-40% der Fälle auftritt, wird gehäuft bei Frauen und jüngeren Patienten mit plötzlichem Herztod beobachtet [8].

Zwar ist das Mortalitätsrisiko bei akutem Myokardinfarkt (AMI) über die letzten Dekaden dank effektiverer Präventionsmaßnahmen - u.a. durch Behandlung prädisponierender Faktoren und Begleiterkrankungen - und verbesserter und gezielterer akuter Interventionsstrategien zunehmend gesunken, jedoch treten dadurch *post*-ischämische Komplikationen wie z.B. Herzinsuffizienz, Klappeninsuffizienz, Herzrhythmusstörungen oder plötzlicher Herztod häufiger auf [11], [12].

Die Entwicklung innovativer Therapieoptionen, um das Langzeitüberleben für Patienten nach AMI oder myokardialer Ischämie/Reperfusion (I/R), insbesondere in Bezug auf Prohibition *post*-ischämischer Komplikationen zu verbessern, ist daher von besonders großem klinischem Interesse [13], [14].

1.2 Atherosklerose

Der Pathomechanismus, der der Entwicklung einer KHK bzw. eines Myokardinfarkts zugrunde liegt, ist die Atherosklerose. Sie beschreibt einen pathologischen, degenerativen Prozess arterieller Blutgefäße. Im Laufe der letzten Jahrzehnte hat das Verständnis der Atherosklerose viel Wandel durchlaufen, sodass heutzutage nicht mehr ausschließlich von einem chronisch- degenerativen, durch Lipid-Retention hervorgerufenen, sondern vielmehr auch von einem chronisch-inflammatorischen Prozess ausgegangen wird [15].

Durch Endothelschädigung kommt es bei der Atherogenese durch Einwanderung von Entzündungszellen (Neutrophilen, Monozyten und T-Lymphozyten) zur Auslösung einer lokalen Inflammation. T-Lymphozyten werden durch Zytokin-Stimulation getriggert, sodass vaskuläre glatte Muskelzellen von der Media in die Intima migrieren und dort proliferieren. Durch die Permeabilitätsveränderungen der Arterienwand lockert sich der Zellverbund und Flüssigkeit sowie Lipide können eindringen. Lipoproteine wie z.B. LDL werden in der Intima durch Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies oxidiert (oxLDL) und fördern die Infiltration von Entzündungszellen in die Gefäßwand. Makrophagen nehmen das oxLDL auf und werden im Verlauf als Schaumzellen bezeichnet. Im Weiteren unterlaufen die Schaumzellen der Apoptose, das Lipid akkumuliert neben den proliferierenden *vascular smooth muscle cells* (VSMC) in der Intima und es formiert sich eine sogenannte Plaque. In Reaktion auf den Inflammationsstimulus werden Enzyme, sogenannte Matrix- Metalloproteasen (MMPs) exprimiert, die die extrazelluläre Matrix (EZM) abbauen und dadurch penetrieren können. Nach proteolytischem Abbau der MMPs und dadurch generierter Peptide, die sogenannten Matrikine, kommt es zur Akkumulation dieser in der EZM mit Entfaltung eines *pro*-inflammatorischen Milieus [16]. Weiterhin wird durch die Kommunikation zwischen T-Lymphozyten und Makrophagen die Expression *pro*-koagulatorischer Gewebefaktoren (TF, *tissue factor*) erhöht, die bei der Plaqueruptur für die Thrombusbildung und die nachfolgenden Akutkomplikationen der Atherosklerose verantwortlich sind [16], [17]. Die fibröse Kappe der Plaque trennt das Gefäßlumen vom thrombogenen Kern der Plaque und ist als solche die letzte Barriere für die Thrombusbildung. Anders als zuvor angenommen, bestimmt nicht der Kollagengehalt der fibrösen Kappe die Plaque-Stabilität, sondern der inflammatorisch-getriggerte Abbau der Kollagenmatrix und die dadurch fortschreitende Verdünnung der Faserkappe mit konsekutivem Intima-Einriss, Freilegung des nekrotischen Plaquekerns und Freisetzung *pro*-koagulatorischer Faktoren [15], was wiederum ischämische Akutkomplikationen hervorrufen kann.

Der inflammatorische Prozess erstreckt sich über alle Phasen der Atherosklerose-Entstehung; von der frühen vaskulären Atherogenese, der Progression der Läsion bis hin zu thrombotischen Komplikationen. Im Jahr 2016 machten gemäß der *World Health Organization* (WHO) ischämische Herzerkrankungen die häufigste Todesursache global aus [18].

1.2.1 Endotheliale Glykokalyx

Die Endothelauskleidung von Blutgefäßen bietet eine große Oberfläche für die Interaktion zwischen Blut und Gewebe und ist maßgeblich an vielen Prozessen wie der Regulierung des Blutflusses und des Gefäßtonus, des Austauschs von Flüssigkeiten und gelösten Stoffen, der Sensorik von Wandscherkräften, der Hämostase und Blutgerinnung sowie Entzündungsreaktionen beteiligt [19], [20].

In den letzten zwanzig Jahren hat die Glykokalyx in der Gefäßphysiologie und -pathologie zunehmend an Bedeutung gewonnen. Insbesondere bei Erkrankungen mit akuter oder chronischer Inflammation, Atherosklerose, Diabetes mellitus oder bei I/R - Zuständen zeigen sich relevante Veränderungen in der Glykokalyxstruktur, sodass sie eine mögliche Zielstruktur für therapeutische Zwecke darstellen kann [21].

1.2.1.1 Aufbau, Funktion und Shedding

Das unmittelbar luminal dem Endothel anliegende kohlenhydratreiche Netzwerk membrangebundener Proteoglykane, Glykoproteine und Glykosaminoglykane (GAG) ist als endotheliale Glykokalyx (eGC) benannt.

Neben der eGC gibt es auch den übergeordneten Begriff des *endothelial surface layer* (ESL), der zusätzlich den Anteil an Molekülen (Glykoproteinen und Proteoglykanen), die unmittelbar der Glykokalyx aufsitzen, mit einbezieht. Da der Begriff der ESL nicht einheitlich in der Literatur benutzt, sondern hauptsächlich eGC synonym verwendet wird, wird sich im Folgenden der besseren Vergleichbarkeit und Verständlichkeit halber auf den Begriff der eGC beschränkt.

Proteoglykane dienen als Rückgrat der Glykokalyx. Sie bestehen aus einem Kernprotein, an das eine oder mehrere GAG-Ketten gebunden sind und über eine Transmembrandomäne mit den Endothelzellen (Syndecan), oder mit einem Glykosylphosphatidylinositol-Anker fest mit der Zellmembran verbunden ist (Glypikan). Die anderen Proteoglykane (Mimecan, Perlecan und Biglycan) werden nach Bildung sezerniert und fügen sich in das Glykokalyx-Netzwerk ein oder diffundieren in den Blutkreislauf. Es werden fünf Arten von GAG-Ketten unterschieden: Heparansulfat, Dermatansulfat, Keratansulfat, Chondroitinsulfat und Hyaluronsäure.

Neben den Proteoglykanen mit ihren langen linearen Seitenketten werden bestimmte Glykoproteine ebenfalls als "Rückgrat"- Moleküle angesehen, die die Glykokalyx mit der Endothelzellmembran verbinden. Diese Zelladhäsionsmolekülen gehören zu der Gruppe der Selectine, Integrine und Immunglobuline.

Die Dicke der eGC wird auf ca. 0,5 – 5 µm geschätzt. Diese Spannbreite ist zum einen der herausfordernden Messmethodik, der Fixierung bzw. Färbung der Glykokalyxstrukturen geschuldet [21]. Zum anderen gibt es Anhalt dafür, dass die Dicke der eGC ebenso vom Kaliber des Gefäßes abhängig ist. So konnten beispielsweise mittels *in vivo* Messungen in den versorgenden Kapillaren des *Musculus cremaster* des Hamsters eine eGC Dicke von 0,4 – 0,5 µm bestimmt werden [22]. Spätere Messungen bei der Maus stellten in der Arteria carotis communis Dicken von 4,3 - 4,5 µm fest [23]. Zwischen der Schicht löslicher Bestandteile und dem Blutstrom besteht ein dynamisches Gleichgewicht, welches die Konstitution der eGC kontinuierlich beeinflusst. Die eGC hält eine vaskuloprotektive Rolle in gesunden Gefäßen inne, indem sie die Gefäßpermeabilität reguliert, die Interaktionen zwischen Blutzellen und Endothel abschwächt, Scherspannungen detektiert und Signalübertragung ermöglicht. Den Startpunkt für die Atherosklerose-Entstehung bietet die endotheliale Dysfunktion, die an Stellen turbulenter Scherbelastung in Arterien auftritt und durch die bereits zuvor genannten Risikofaktoren der Atherosklerose (u.a. Hypercholesterinämie, Hypertonus, Hyperglykämie, oxidativer Stress (z.B. durch Nikotinkonsum) und systemische Inflammation) begünstigt wird.

Die endotheliale Dysfunktion ist durch eine verminderte Fähigkeit der Endothelzellen, Stickstoffmonoxid (NO) zu bilden und dadurch eine Vasodilatation zu induzieren, charakterisiert. Wenn das Gleichgewicht der eGC gestört bzw. modifiziert wird, gehen die vaskuloprotektiven Eigenschaften verloren. eGC-Bestandteile werden degradiert, und die Dicke der eGC nimmt ab. Diesen Prozess fasst man unter dem Begriff *shedding* zusammen [24], [25]. Eine Reduktion der vaskuloprotektiven Fähigkeiten der eGC kann somit an der Initiierung und Evolution der Atherosklerose beteiligt [26] und die Wiederherstellung der eGC-Integrität ein therapeutisches Ziel sein [27]. Klinische Situationen, in denen eine Schädigung des Glykokalyx mit messbarem Nachweis von zirkulierenden eGC-Bestandteilen berichtet wurde, umfassen u.a. I/R [24], [28]–[30], Hypoxie [31], Sepsis [32], [33], kardiales Pumpversagen [34], Hyperglykämie [35] und Atherosklerose [36]. Eine Übersicht hinsichtlich des eGC-Aufbaus bietet **Abb. 1**.

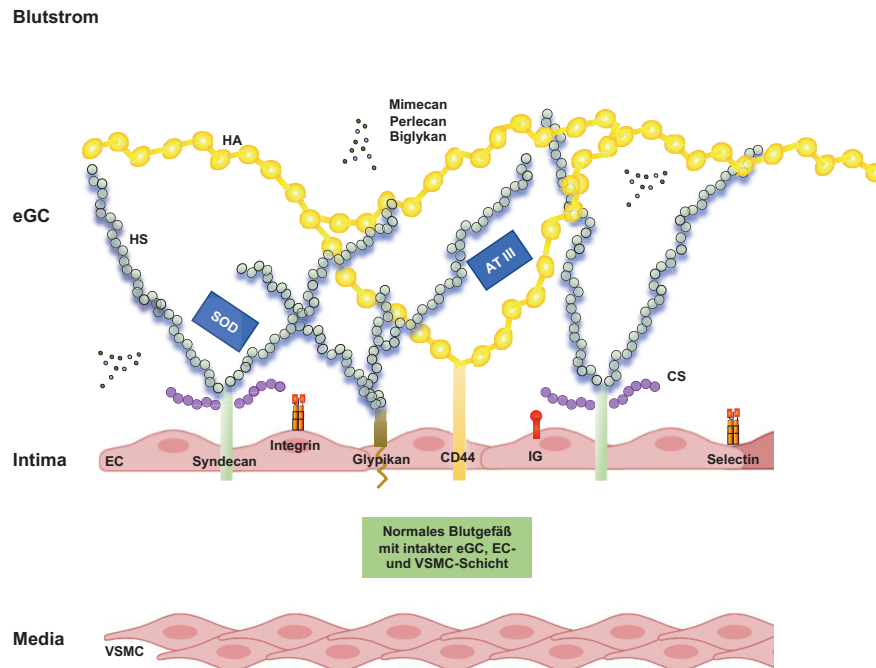


Abb. 1: Schematische Darstellung der endothelialen Glykokalyx.

Intakte endotheliale Glykokalyx (eGC), Endothelzellschicht (EC) in der Intima und *vascular smooth muscle cells* (VSMC) in der Media. Protektive Funktion innerhalb der eGC u.a. von zirkulierender Superoxid-Dismutase (SOD) und Antithrombin III (ATIII). HA: Hyaluronsäure, HS: Heparansulfat, IG: Immunglobulin, CS: Chondroitinsulfat.

1.3 Extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix (EZM) ist ein dynamisches, nichtzelluläres, quervernetztes Konstrukt, welches in allen Geweben vorhanden ist und sowohl bei physiologischen als auch pathologischen Prozessen eine fundamentale Rolle spielt [37].

Die EZM fungiert nicht nur als mechanisches und stabilisierendes Netzwerk für den Zellverband, sondern auch als Knotenpunkt für zelluläre Signalkaskaden. Die Organhomöostase hängt entscheidend von der EZM ab, indem EZM-Komponenten kontinuierlich mit zellulären Elementen interagieren und bei Stressbedingungen die Zellen vor schädlichem Einfluss schützen und gleichzeitig auch Komponenten zur Gewebereparatur bereitstellen können. Jedoch kann unter pathologischen Bedingungen auch das EZM-Netzwerk Änderungen in der biochemischen Zusammensetzung von Matrixproteinen unterliegen, was wiederum direkt die Zell-/Organfunktion beeinträchtigt bzw. die einwandfreie Signaltransduktion hemmt [38]. Trotz zunehmender Anerkennung ihrer Rolle bei der Vermittlung zellbiologischer Reaktionen, wird der Beitrag der EZM in pathophysiologischen Zuständen unterschätzt.

Bestrebungen in der Entwicklung von Agenzien, die EZM-Proteine gezielt modifizieren können, sind ein vielversprechender Ansatz, um somit pathologische Zustände, wie u.a. Atherogenese oder Tumorprogression behandeln bzw. diesen vorbeugen zu können [39], [40].

1.3.1 Myokardiale extrazelluläre Matrix und Ischämie

Die myokardiale EZM kann in eine interstitielle, alle Myokardzellen-umgebende, strukturgebende und in eine perizelluläre Komponente eingeteilt werden [38], [41]. Der perizelluläre Bestandteil umfasst die Basalmembran, die aus Lamininen, Kollagenen und Proteoglykanen besteht und die Kardiomyozyten von der interstitiellen Matrix abtrennt [42]. Die gesunde myokardiale EZM besteht neben Kollagenen auch aus GAG, wie z.B. Hyaluronsäure, sowie Glykoproteinen und Proteoglykanen. Sie dient als Reservoir für Wachstumsfaktoren und Proteasen, die im Interstitium gespeichert sind und nach einer Gewebsverletzung freigesetzt oder aktiviert werden können. Bei pathologischen Prozessen unterliegt die EZM drastischen und dynamischen Veränderungen in ihrer Zusammensetzung und ist zumeist mit einer Ausdehnung der kardialen interstitiellen Matrix verknüpft [43], [44]. Erkrankungen, die als Risikofaktoren einer KHK gelten, wie z.B. Diabetes mellitus, Adipositas und metabolische Dysfunktion [45], [46] sind mit der Aktivierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten verbunden und gehen mit der Ablagerung von Matrix-Makromolekülen und fortschreitender Akkumulation von fibrillären Kollagenen im Herzinterstitium einher [47]–[49]. Diese dynamischen Änderungen in der Komposition der EZM beeinflussen wiederum negativ die Funktion des Herzmuskels.

Die durch die EZM ausgelösten Reparaturvorgänge nach myokardialer Nekrose können in drei voneinander abgrenzbare, jedoch sich überlappende Phasen eingeteilt werden [38]: 1. Inflammationsphase, 2. Proliferationsphase und 3. Reifungsphase.

Während der Inflammationsphase kommt es durch EZM-Abbau zur Bildung von Matrikinen, die zur Aktivierung eines entzündlichen Milieus und Einleitung der Reparaturprozesse beitragen. Ein provisorisches Matrixnetzwerk auf Fibrinbasis wird gebildet. Makrophagen befreien die Infarktzone von abgestorbenen Zellen, und über die Induktion *anti*-inflammatorischer Mediatoren wird die weitere Entzündungsreaktion unterdrückt. In der sich anschließenden proliferativen Phase kommt es zur phänotypischen Modulation von Fibroblasten zu aktivierten Myofibroblasten, die wiederum extrazelluläre Matrixproteine sezernieren und somit zur Stabilisierung der Ventrikelanatomie beitragen. Gleichzeitig wird die Angiogenese induziert mit konsekutiver Ausbildung eines Gefäßnetzwerkes. In der Reifungsphase wird die EZM

durch Kollagen quervernetzt, wodurch eine Narbe gebildet wird, und es folglich zur Bereinigung der zellulären Bestandteile durch Apoptose kommt [38].

Eine reibungslos funktionierende Wundheilung im Bereich des Herzens ist essenziell für die Erhaltung der Geometrie, Signaltransduktion und Pumpfunktion. Ein Ungleichgewicht zwischen Abbau des Herzmatrixnetzwerks und Bildung von neu synthetisierten Matrixproteinen kann sich auf die mechanischen Eigenschaften des Herzmuskels so ungünstig auswirken, dass durch ventrikuläre Dilatation eine Verschlechterung der Pumpfunktion, das Auftreten potenziell vital bedrohlicher Herzrhythmusstörungen und schließlich die Entwicklung einer chronischen Herzinsuffizienz begünstigt wird [50], [51]. Diese Veränderungen des Herzmuskels hinsichtlich Form, Volumen und Masse werden unter dem Begriff des *remodelings* zusammengefasst und sind prognosebestimmend nach akuter myokardialer Ischämie [52].

Einen elementaren Bestandteil der eGC und EZM stellt die Hyaluronsäure dar, deren Funktionen und Interaktionen im folgenden Kapitel kontextspezifisch charakterisiert werden.

1.4 Hyaluronsäure

Die Hyaluronsäure (*hyaluronic acid*; HA) ist ein nicht-sulfatiertes GAG, das sich aus sich wiederholenden Disaccharidgruppen, β -(1,3)-D-Glucuronsäure und β -(1,4)-N-Acetyl-D-Glucosamin zusammensetzt (**Abb. 2**).

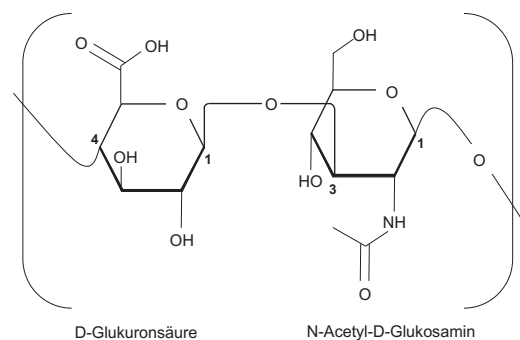


Abb. 2: Schematischer Aufbau eines Hyaluronsäure-Moleküls.

Im Gegensatz zu den anderen GAGs (Heparansulfat, Dermatansulfat, Keratansulfat, Chondroitinsulfat) wird die HA nicht im endoplasmatischen Retikulum bzw. Golgi-Apparat produziert, sondern an der Plasmamembran durch dort aktivierte HA-Synthasen (HAS 1-3). Aus Uridindiphosphat (UDP)-Zuckervorstufen wird sie zu einer

makromolekularen Kette mit bis zu 25.000 alternierenden Disacchariden formiert und dann in das extrazelluläre Kompartiment *via* Exozytose freigesetzt [53], [54]. Sie ist daher, anders als die anderen GAGs, nicht an ein Kernprotein gebunden und nicht-sulfatiert [55], [56]. Die Expression der drei HAS wird während der Morphogenese und abhängig von pathologischen Zuständen reguliert [57], [58]. Die HAS reagieren sensibel auf den intrazellulären Glukosemetabolismus, so ist ihre Syntheseleistung von einer ausreichenden Bereitstellung der zytosolischen Substrate Uridindiphosphat- (UDP)-Glukuronsäure (*glucuronic acid*; GlcA) und UDP-N-Acetyl-D-Glukosamin (*N-acetyl-D-glucosamine*; GlcNAc) abhängig [59]. Die HAS können HA mit variablem Molekulargewicht erzeugen [60], [61]. HAS 1 und 2 sind in der Lage große HA-Moleküle zu generieren, wohingegen HAS3 Moleküle mit niedrigerem Molekulargewicht generiert [60], [62]. Sobald HA in den extrazellulären Raum extrudiert wird, unterliegt sie komplexen Wechselwirkungen mit den sie bindenden Proteinen - sogenannten Hyaladherinen, wie z.B. Aggrecan und Versican – und ihren HA-Rezeptoren [63], [64]. Der CD44-Rezeptor [65] ist hauptsächlich an der HA-Signaltransduktion beteiligt, jedoch sind auch Signalwege über den *receptor for hyaluronan mediated motility* (RHAMM), *lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1* (LYVE-1), *hyaluronan receptor for endocytosis* (HARE) und die *toll-like* Rezeptoren 2 und 4 (TLR2/4) beschrieben [62]. Die HA besitzt aufgrund ihrer Negativladung und ihrer hohen molekularen Masse hygroskopische Eigenschaften, wodurch ihr Vorkommen in der extrazellulären Matrix von Geweben, wie zum Beispiel der Gelenkflüssigkeit, der Haut und dem Glaskörper des Menschen zur Bindung von Gewebwasser, Aufrechterhaltung des osmotischen Gleichgewichts und Prozessregulation wie Migration, Adhäsion und Proliferation beiträgt [62], [66]. Die HA ist nicht nur wichtiger Bestandteil der EZM, sondern auch der eGC im Gefäßsystem. Die HA wurde früher lediglich als Strukturmolekül betrachtet, jedoch ist sie abhängig von ihrer molekularen Masse an zahlreichen zellulären Prozessen beteiligt und fungiert so als wichtiges Signalmolekül. Durch Balance zwischen Synthese und Degradation wird die Verfügbarkeit und die Länge der HA-Ketten im Gewebe reguliert. Die Degradation der HA außerhalb der Zelle erfolgt durch Hyaluronidasen (HYAL), innerhalb der Zelle durch Lysosome [61]. Die HYALs sind in der Lage, die β -1,4-glykosidischen Verbindungen zwischen GlcNAc und GlcA zu hydrolysieren und HA-Fragmente zu generieren. Beim Menschen sind insgesamt bisher sechs verschiedene HYALs identifiziert: HYAL1 - 4, PH-20 und HYALP1 [67].

Als Hauptisoformen gelten HYAL1 und 2, bei denen gezeigt werden konnte, dass HYAL2 hauptsächlich hochmolekulare HA (*high molecular weight HA*; HMW-HA) in Fragmente von 20 kDa (ca. 100 Saccharide) spaltet und diese anschließend bis hin zu

Oligosacchariden durch die PH- 20 [68] verarbeitet werden. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), Superoxid (SO) oder NO, die typischerweise in entzündeten, verletzten oder ischämischen Geweben entstehen, können ebenfalls an einer Degradation der HA und anderer Matrix-Moleküle beteiligt sein [69]–[71]. Durch diese Fragmentierung entsteht niedermolekulare HA (*low molecular weight HA*; LMW- HA), deren Funktion sich von HMW-HA unterscheidet. Bei Inflammation zeigt sich sowohl die HA-Synthese durch Hochregulation der HAS-Isoenzyme als auch der HA-Katabolismus gesteigert, was wiederum Degradation und *de novo* Synthese mit Generierung von LMW-HA induziert. In der Literatur finden sich für HMW und LMW je nach Referenz unterschiedlich weite kDa- und Saccharid-Spektren. Abhängig von der Molekülmasse werden eine Vielfalt von Signalwegen und Zellen induziert (siehe [67]). HMW-HA liegt im gesunden Gewebe bis zu einer Größe von 10^5 Sacchariden (entsprechend 2×10^4 kDa) vor [67]. Davon lässt sich die LMW-HA mit einer Masse von etwa 100-500 kDa abgrenzen, die vor allem bei Gewebsverletzung, der Tumorgenese [72] oder anderen inflammatorischen Prozessen entsteht [62]. HMW-HA vermittelt eine *anti*-inflammatorische Wirkung und trägt zur Erhaltung der Homöostase und Gewebeintegrität bei [67]. Interessanterweise wurde eine Besonderheit bei intrazellulär ausgelöster Inflammation hinsichtlich HMW-HA beobachtet. Bei mehreren inflammatorischen Erkrankungen [73]–[76] wurde die Ausbildung großer, bis zu mehrere Millimeter messender, strangförmiger HMW-HA-Komplexe beschrieben, an die Leukozyten binden. Es wird davon ausgegangen, dass durch Bindung von Entzündungszellen an die sogenannten HA-*cables* Inflammation begünstigt wird. HA-Moleküle mit niedriger Masse (vor allem 4-25, aber auch bis ~1000 Saccharide) wirken durch Makrophagen-Induktion mit konsekutiver Chemo- und Zytokinsekretion ebenfalls entzündungsfördernd und können die Angiogenese und den Gewebeumbau im Wundheilungsprozess auslösen [67], [77]. Während der Homöostase weisen die meisten Immunzellen eine geringe HA-Bindungskapazität auf. Jedoch im Inflammationsstatus – stimuliert durch die Freisetzung kleiner HA-Fragmente – werden CD44 oder alternative HA-Rezeptoren wie z.B. TLR auf Immunzellen (Lymphozyten und dendritischen Zellen [78]) hochreguliert. HA-Komplexe können Einfluss auf die Zell-Polarisation, Differenzierung und Funktion nehmen. LMW-HA kann daher als elementares Signalmolekül für Gewebsschädigung und Inflammation betrachtet werden. In einem murinen Lungenmodell konnte gezeigt werden, dass die extrazelluläre Superoxiddismutase (SOD) als intrinsischer Schutzmechanismus durch direkte HA-Bindung die oxidative Degradation der HMW-HA inhibieren und somit die Immunantwort hemmen kann; SOD-KO-Mäuse wiesen hingegen verstärkte pulmonale Inflammation auf [79]. Um weitere wissenschaftliche Erkenntnisse über die HA zu generieren, kann

man im Tiermodell, außer durch genetisches KO beteiligter Moleküle, auch pharmakologisch Einfluss auf die HA-Synthese nehmen. So kommt es durch extrinsische, systemische Gabe von 4-Methylumbelliferon (4-MU) zur Störung des intrazellulären Pools aktivierter UDP-Zucker-Vorstufen und damit zur multifaktoriellen Beeinträchtigung der HA-Synthese und Signaltransduktion [80], [81]. So interferiert 4-MU als kompetitives Substrat und wird anstelle eines UDPs durch die UDP-Glukuronosyltransferase (UGT) mit GlcA verknüpft. Konsekutiv kommt es – dosisabhängig – zur Substratverarmung des UDP-GlcA-Pools und somit zur Hemmung der HA-Synthese. Übergeordnet gibt es Anhalt dafür, dass 4-MU *anti*-angiogen, *anti*-inflammatorisch, *anti*-proliferativ sowie *pro*-apoptotisch wirkt und die Migration und Invasion von Tumorzellen stört [82]. Unklar bleibt jedoch, ob beobachtete Effekte alleine durch Hemmung der HA-Synthese zu erklären sind [82]. Wie im Verlauf dieses Kapitel aufgeführt, sind die biologischen Funktionen der HA hoch komplex und stark kontextspezifisch. Neben den oben aufgeführten Vorkommen in Geweben spielen die HA, ihre Synthesen und interagierenden Rezeptoren als Bestandteile der EZM und der eGC eine elementare Rolle, die vor allem auch bei Untersuchungen zur Atherogenese, hierfür relevanter Komorbiditäten (v.a. Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie und Hypertonie) sowie der myokardialen Ischämie in den Fokus getreten ist. Vielfältige physiologische Regulationsmechanismen und bisher eine pharmakologische Interventionsmöglichkeit stehen zur Verfügung, die HA- Synthese bzw. -Degradation zu modifizieren und geben Hoffnung, zukünftig positiven Einfluss auf pathologische Zustände nehmen zu können. In den weiteren Kapiteln wird detailliert die Relevanz der HA und ihre Regulation in Bezug auf die Atherogenese und myokardiale Ischämie in Gewebe und Vaskulatur beleuchtet, sowie ihre Freisetzung in den Blutstrom erläutert.

1.4.1 Rolle der HA innerhalb der eGC

Die HA ist integraler Bestandteil der eGC gesunder Gefäße und wirkt atheroprotektiv. Die Funktion von HA als Teil der vaskulären Glykokalyx wirkt sowohl entzündungshemmend als auch *anti*-thrombotisch [83]. Endotheliale Stressoren erhöhen die Abscherung der HA [84], was wiederum Thrombozytenaktivität und deren Gefäßwandankopplung sowie die Makrophagen-induzierte Inflammation fördert und dadurch die Atherogenese begünstigt. Speziell auch durch Zytokinausschüttung, wie z.B. des Tumornekrose Faktors alpha (TNF α) wird *shedding* der eGC hervorgerufen; eine Blockade der TNF α -Produktion hingegen schützt die eGC-Integrität, wie Nieuwdorp *et al.* demonstrieren konnten [85].

Sobald es durch eGC-Abscherung und zunehmende Endothelschädigung dazu kommt, dass Entzündungszellen wie Monozyten und T-Lymphozyten die VSMC-Migration begünstigen, wird HA von aktivierten VSMC in der Neointima produziert. Die EZM-Umgestaltung durch (V)SMC-Einwanderung wirkt sich nachteilig aus und spielt eine wesentliche Rolle im Rahmen der Plaquebildung und -expansion. Es konnte gezeigt werden, dass die interstitielle HA-Matrix neointimale Hyperplasie und Atherosklerose durch Erleichterung der VSMC-Proliferation und Migration *in vivo* maßgeblich beeinflusst [86].

Unter der Annahme, dass HA neointimale Hyperplasie und Atherosklerose begünstigt, untersuchten Nagy *et al.* [87] den Effekt der HA-Synthese-Hemmung mittels 4-MU in einem murinen Atherosklerose-Modell. Überraschenderweise löste die Hemmung der HA-Synthese durch 4-MU einen adversen Effekt aus und verstärkte die Rekrutierung von Entzündungszellen und thrombotischen Reaktionen mit langfristiger Begünstigung der Atherosklerose-Progression. Diese nachteilige Wirkung wurde unter anderem einer partiellen Schädigung der eGC zugeschrieben [87].

Wie unter anderem schon bei chronisch-inflammatorischen Darmerkrankungen [73], [75] beschrieben, konnte auch bei VSMCs die Konfiguration von HMW-HA zu Strängen, sogenannten HA-*cables*, mit verstärkter Monozyten-Adhäsion nachgewiesen und ein mutmaßlicher Beitrag zur Atherosklerose zugesprochen werden [88], [89]. Speziell die HAS-Isoenzym-Expression und HA-Synthese wird durch eine Vielzahl von *pro*-atherogenen Wachstumsfaktoren induziert [90]. So konnte beispielweise für HAS-2 und HAS-3 eine Involvierung in den Atherosklerose-Prozess nachgewiesen werden. Eine Has-2 Überexpression in VSMCs im Mausmodell induzierte Atherosklerose [91], [92], wohingegen bei Has3-*knockout* (KO) Mäusen die neointimale Hyperplasie und Atherosklerose gehemmt war [93], [94]. Vor allen Dingen konnte für die HAS3-vermittelte HA-Synthese auch gezeigt werden, dass eine durch T-Zell/Makrophagen-Interaktion vermittelte Inflammation hinsichtlich der Atherogenese von besonderer Bedeutung ist. So verringerte sich durch Has3-Deletion die Polarisierung von T-Zellen in T-Helferzellen des Typs 1 (TH-1) und somit auch die neointimale Inflammation und Atherosklerosebildung [93]. Während der Entzündungsreaktion präsentieren viele Immunzellen den HA-Rezeptor CD44 an ihrer Oberfläche. Es konnte im Mausmodell anhand eines CD44-KO gezeigt werden, dass weniger Inflammation und Atherosklerose ausgelöst wurde, was wiederum auf einen Zusammenhang der CD44/HA-Signalachse bei der Atherogenese hindeutet [95]. Auch andere für die EZM bedeutende und teils mit HA interagierende Proteoglykane konnten in Zusammenhang mit Atherogenität gebracht werden. In Untersuchungen von Plaques an *culprit lesions* konnte interessanterweise

eine unterschiedliche Verteilung von HA und Biglykan - einem sogenannten *small leucine-rich repeat* Proteoglykan (SLRP) mit zwei N-terminalen Dermatansulfat-Ketten – nachgewiesen werden. So wurde in erodierten Plaques eine HA-reiche Matrix mit vermindertem Biglykan-Vorkommen und in sogenannten stabilen Plaques - die durch eine dicke fibröse Kappe charakterisiert und somit weniger rupturanfällig sind – ein umgekehrtes Verhältnis beschrieben [96]. Es wird davon ausgegangen, dass die Dermatansulfatketten des Biglykans *anti-thrombogen* agieren [97], [98]. Das mit HA Bindung eingehende Chondroitinsulfat-Proteoglykan namens Versican konnte vermehrt in primären wie auch sekundären, *post-interventionellen* Gefäßläsionen nachgewiesen werden [99], [100] und heizte Spekulationen an, ob Versican zur *pro-thrombogenen* Oberfläche erodierter Plaques beiträgt. Weitere Erkenntnisse hinsichtlich seiner Beteiligung sind noch ausstehend. Versican unterhält jedoch eine weitere für die Atherogenese bedeutende Interaktion mit LDL, worüber HA einen indirekten Einfluss auf LDL-Retention /-Modifikation und Inflammation haben könnte [101].

Von großem Interesse ist die Frage, ob durch Applikation von Medikamenten die Synthese von Glykokalyx-Komponenten spezifisch gesteigert, modifiziert, bzw. selektiv der enzymatische Abbau verhindert und somit Inflammation und Krankheitsentwicklung entgegengewirkt werden kann. Eine protektive Wirkung auf die eGC konnte u.a. für Hydrokortison und Antithrombin gezeigt werden [102], was eine verminderte Leukozytenadhäsion mit reduzierter Gefäßleckage, Gewebsödem und Inflammation nach I/R zur Folge hatte [103].

1.4.2 Bedeutung der HA für die myokardiale extrazelluläre Matrix

In mehreren *in vitro* als auch *in vivo* Studien konnte gezeigt werden, dass Zellen in Reaktion auf schnelle Umbauprozesse – wie etwa im Rahmen von Inflammation [104] und Wundheilung [105] – erhöhte HA-Produktion und Bildung abnormaler HA-Matrices induzieren können. Das Konstrukt kann folgend CD44-vermittelt von Immunzellen (Monozyten, Makrophagen) erkannt, phagozytiert und durch gesundes Gewebe wieder ersetzt werden [106]. Die Expression von HA ist in experimentellen Modellen bei kardialer Ischämie [107], Myokarditis [108] und Hypertrophie [109], [110] hochreguliert. Nach Myokardischämie akkumuliert HA stark in der perivaskulären, jedoch nur zu einem sehr geringen Maße in der interstitiellen Matrix [111].

In einem *in vitro* I/R- Versuch mit Peroxid-behandelten Kardiomyozyten konnte erstmalig ein zellprotektiver Einfluss von HA nachgewiesen werden [112]. In morphologischen Untersuchungen an Maus- und Hunde-Herzen zeigte sich die HA *post-ischämisch* bei der Maus nach 3-7 bzw. 14 Tagen beim Hund in der Infarktzone hochreguliert [113].

Müller *et al.* konnten nachweisen, dass sich im Mausmodell bereits innerhalb der ersten 12 Stunden nach AMI Interleukin (IL) -6-vermittelt eine HA-reiche Matrix formiert, die die Myofibroblasten-Differenzierung begünstigt, die lokale Inflammation moduliert und somit kardioprotektiv wirkt [114]. IL-6 zeigt sich dabei als wichtiges Zytokin, welches maßgeblich an der Regulation von Entzündungsreaktionen im Organismus beteiligt ist und konnte neben chronisch-entzündlichen Erkrankungszuständen oder Malignomen [115] auch in erhöhtem Maße im Rahmen eines AMIs in humanen Serumproben nachgewiesen werden. Die Spiegel korrelierten zudem mit dem Ausmaß der Myokardnekrose [116]. HA nimmt über Interaktion mit dem *transforming growth factor* (TGF)- β - Einfluss auf die Differenzierung von Myofibroblasten [117]–[120]. Auch für CD44 – als bedeutender HA-Rezeptor – wurde eine modulatorische Einflussnahme auf die Herzreparatur angenommen, da der HA / CD44-Achse bereits bei der Wundheilung eine bedeutende Rolle zukommt [121]. Die CD44-Expression ist nachweislich in der Infarktzone deutlich erhöht und vorwiegend auf Leukozyten, Myofibroblasten und Gefäßzellen hochreguliert, was wiederum eine längere und stärkere Entzündungsreaktion nach AMI induziert [122]. CD44-Deletion zeigte zudem eine gestörte Interaktion auf TGF- β , was eine deutlich reduzierte Myofibroblasten-Rekrutierung und Kollagenbildung mit beeinträchtigter Wundheilung und nachteiligem *remodeling* in der Infarktzone hervorrief [122]. Da CD44 sich vor allem auch essenziell für die Auflösung von Entzündungen gezeigt hat [106], wurde postuliert, dass die Heilungsstörungen womöglich durch eine verminderte Befreiung von *pro*-inflammatorisch agierenden HA-Fragmenten im Bereich des infarzierten Gebietes hervorgerufen sein könnten [123].

Darüber hinaus wurde später von Petz *et al.* [111] anhand einer murinen Has-2-KO-Studie demonstriert, dass eine HAS-2-Deletion mit einer gestörten Infarktheilung und hämodynamischer Dysfunktion des Herzmuskels zusammenhängt. Die Bedeutung der HAS2-vermittelten HA-Synthese wird auch basal bei Has2-Defizienz im Mausmodell deutlich, die aufgrund einer fehlerhaften kardiovaskulären Morphogenese für den Embryo zum Tode führt [124]. Basierend auf den bisherigen Erkenntnissen kann der HA in der myokardialen EZM nach Ischämie eine Wundheilungs-fördernde und insgesamt kardioprotektive Rolle zugesprochen werden. Ob die Wundheilungsstörungen bei CD44-KO durch das Verbleiben möglicher residueller HA-Fragmente im Infarktbereich ausgelöst sind, bleibt bis jetzt unbeantwortet und bedarf weiterer Investigation.

1.4.3 Im Blutstrom zirkulierende HA

HA wird physiologisch durch steten Umbau und Erneuerung von Gewebematrices in den Blut- und Lymphstrom freigesetzt. Im Jahr 1985 wurde erstmalig von Engström-Laurent *et al.* die Serum-Konzentration von HA bei einem gesunden Erwachsenen mit einem Wert in Höhe von 10 bis 100 ng/ml (Mittelwert (MW) 30 - 40 ng/ml) ermittelt [125].

Bei Neugeborenen lassen sich Werte von bis zu 700µg/l nachweisen [126]. Nach Erreichen des 1. LJ fallen die Serum-HA-Werte stark ab und finden ihren Nadir zwischen dem 1.-16. LJ. Mit zunehmendem Alter steigen die Werte wieder an, sodass bei älteren Probanden (> 60. LJ) HA-Konzentrationen von 117 ± 80 µg/l festgestellt werden konnten [125]. Ein nennenswerter geschlechtsspezifischer Unterschied zeigte sich nicht [125]. Auch bei Nahrungsaufnahme [127] und körperlichem Training [128] kommt es zur Beeinflussung zirkulierender HA, a.e. durch Freisetzung aus dem Gewebe und durch erhöhten Lymphfluss [129]. In der Untersuchung zwischen HA-Leveln in Serum bzw. Plasma, konnten im Plasma durchschnittlich um 5% höhere Werte festgestellt werden [125]. Fraser *et al.* ermittelten nach Injektion von HA eine Eliminationszeit von 2,5 bis 5,5 min aus dem Plasma. Die Elimination erfolgt hauptsächlich extrarenal [130]. Eine wichtige Rolle bei der Elimination der HA aus dem Blutstrom spielt die Leber, insbesondere über die Endothelzellen in den Lebersinusoiden, die über einen Rezeptor >90% der zirkulierenden HA aufnehmen und dann in den Lysosomen abbauen [130], [131]. Bei hohen HA- Werten im Blutstrom wird angenommen, dass sich auch die Kupffer-Zellen der Leber an der *clearance* der HA beteiligen [130]. Ein deutlich kleinerer Anteil wird von der Milz und den Nieren aufgenommen und über den Urin ausgeschieden [130], [132]. An diesem Abbauweg sind vor allem die HA-Rezeptoren wie HARE [133], auch Stabilin-2 genannt [134], und LYVE-1 [135] beteiligt.

Im Rahmen pathophysiologischer - insbesondere bei inflammatorischen und malignen Zuständen – kann es durch Gewebsschaden und Freisetzung von HA-Fragmenten in den Blutstrom, eGC-*shedding* bzw. durch verminderte Eliminierung von HA über Leber und Nieren zu einem signifikant erhöhten Nachweis zirkulierender HA kommen.

Da die Produktion von HA mit der Zellproliferation korreliert, und die HA-Synthese während der Mitose ihr Maximum erreicht [136], wurde die Bedeutung der HA ab Ende der 1980er Jahre vor allem auch bei sich schnell teilenden Zellen im Rahmen von Malignität untersucht. In zahlreichen Studien konnten gezeigt werden, dass HA neben ihrer verstärkten Expression im Tumorgewebe, auch im Blut bei diversen Tumorerkrankungen, wie z.B. dem Kopf-Hals-Karzinom [137], dem Pankreaskarzinom [138], (metastasiertem) Brustkrebs [139], dem Pleuramesotheliom [140] als auch bei diversen hämatologischen Neoplasien [141]–[143] signifikant erhöht ist und sowohl

positiv mit dem klinischen Tumorstadium [137], [139], [144] korreliert, gleichwohl auch als prognostischer Marker für das Überleben dienen kann [143], [145]. Auch bei gesunden Probanden kann LMW-HA zwischen 100-300 kDA im Blut detektiert werden [146]. Bei Brustkrebs korrelierte der erhöhte Nachweis zirkulierender LMW-HA (< 50 kDA) mit dem Vorkommen von Metastasen [139]. Der Nachweis von LMW-HA konnte bei kolorektalem Karzinom sowohl im befallenen Gewebe (< 30 kDA) als auch im Serum (~ 6 kDa) erbracht werden [144].

Erhöhte LMW-Serum-HA korrelierte mit einer gesteigerten Früh-Rezidiv-Rate, fortgeschrittenem lokalem Tumorstadium, Lymphknotenbefall sowie dem Vorhandensein von Fernmetastasen. Da der LMW-HA-Nachweis nach Tumorresektion signifikant reduziert war, proklamierten Zhang *et al.* [144], dass LMW-HA mit einer Molekülmasse von 6 kDA als Serum-Detektor für Tumorprogression, Vorhersage von Lymphknotenmetastasen und Tumorrezidiv dienen könnte.

Zirkulierende HA gilt bisher als etabliertester Serum-Marker für die Leberfibrose bzw. -zirrhose [147]–[149]. Erhöhte Serum-HA konnten bei Patienten mit Leberfunktionsstörungen, wie z.B. Hepatitis, Leberzirrhose oder toxischem Leberschaden [150]–[153] nachgewiesen werden, sodass dies eine Involvierung der Leber in den HA-Abbauprozess vermuten ließ [154], [155]. Die orale Administration von Ketanserin, einem Serotoninderivat, oder Alkohol beeinflusst die hepatische sinusoidale Durchblutung negativ mit konsekutiver Reduktion der HA-clearance aus dem Blutstrom, was die Bedeutung der Endothelzellen in diesem Rahmen hervorhebt [156], [157]. Serum-HA korrelierte mit der Schwere der hepatischen Inflammation, dem Ausmaß der Leberfibrose und der Schwere der hepatischen Fibrogenese bei Patienten mit alkoholischer Lebererkrankung [148]. Gleichwohl eignete sich Serum-HA als prognostischer Marker für Leberzirrhose mit Entwicklung späterer Komplikationen [147]. Dies konnte auch von Li *et al.* hinsichtlich des Schweregrades einer Myokardfibrose bei chronischer Herzinsuffizienz gezeigt werden [158]. Sie konnten einen signifikanten Anstieg der Serum-HA-Konzentration mit Zunahme des Schweregrades eines chronischen Herzversagens nachweisen und postulierten, dass HA als empfindlicher Marker zur Detektion einer Herzfibrose und Einteilung deren Schweregrads eingesetzt werden könne [158].

Neben der Leber spielt auch die Niere eine wichtige, wenn auch gegenüber der Erstgenannten, untergeordnete Rolle bei der Eliminierung der HA aus dem Blutstrom. Bei Patienten mit Nierenversagen (unabhängig von der Entität) und unter Hämodialysetherapie konnten in mehreren Studien aus den 1980/90er Jahren erhöhte Serum-HA nachgewiesen werden [159], [160], die auch mit dem klinischen Zustand und

der Mortalität korrelierten [161]. Patienten mit vorbestehender dialysepflichtiger Urämie konnten nach Nierentransplantation normale Serum-HA-Spiegel erreichen [159]. Wie schon bei rheumatoider Arthritis gezeigt [162], könnte die Kortikosteroid-Gabe zur Vermeidung einer Abstoßungsreaktion nach Nieren-Transplantation eine mögliche Erklärung für die Reduktion zirkulierender HA geben. Insgesamt wurde für das vermehrte Vorkommen von HA im Blutstrom bei Niereninsuffizienz, neben einer verminderten Exkretion von HA über die Nieren, auch postuliert, dass ein erhöhter HA-Umsatz im Gewebe zu einer erhöhten Akkumulation im Blut führen könne und eine Elimination auch abhängig vom Molekulargewicht der HA erfolge. Abschließende Erklärungen für die erhöhten HA-Werte bzw. eine vermehrte Ausscheidung von LMW-HA über die Glomerula konnten jedoch nicht getroffen werden. Padberg *et al.* [163] fanden im Jahr 2014 einen weiteren Faktor für erhöhte zirkulierende HA, nämlich die Schädigung der eGC bei chronischer Nierenerkrankung. Abhängig vom Grad der Niereninsuffizienz wurden steigende Spiegel von HA und Syndecan-1 im Blut beobachtet, die auch positiv mit etablierten Markern für endotheliale Aktivierung und Dysfunktion, wie z.B. dem von Willebrand-Faktor (vWF), *soluble vascular cell adhesion molecule-1* (sVCAM-1), *soluble vascular endothelial growth factor receptor-1* (sVEGFR-1) und Angiopoetin-2 (Ang-2) korrelierten [163]. Patienten hingegen mit der höchsten glomerulären Filtrationsrate (GFR) und der niedrigsten Proteinurie wiesen die niedrigsten zirkulierenden Syndecan- und HA-Werte im Blut auf. In Bezug auf kardiovaskuläre Komorbiditäten (AHTN, Diabetes, Nikotinabusus, Übergewicht, Dyslipidämien) ergab sich bis auf Diabetes – ein bedeutender Treiber einer Niereninsuffizienz – kein Unterschied in Abhängigkeit vom Schweregrad der Niereninsuffizienz. Um die Ergebnisse zu der endothelialen Schädigung bei Niereninsuffizienz zu untermauern, führten Padberg *et al.* im Rattenmodell eine 5/6 Nephrektomie durch. 14 Tage postoperativ konnte eine deutliche Reduktion der eGC-Dicke und Zunahme der Steifigkeit in der Aorta nachgewiesen werden. In der Kontrollgruppe konnte der gleiche Effekt durch Verabreichung von Heparinase, Chondroitinase und Hyaluronidase induziert werden [163]. Mehrere *in vivo* Studien konnten bei akuter Inflammation wie bei der Sepsis [164], als auch bei Patienten nach Blutverlust, massivem Trauma, im *post-operativen* Setting [165], oder mit schweren Verbrennungen [166] erhöhte Spiegel zirkulierender HA nachweisen, die mit dem Schweregrad und der Prognose der Erkrankung korrelierten [167]. Sallisalmi *et al.* fanden bei Patienten im septischen Schock an Tag 1 bis zu 10fach erhöhte HA-Werte mit einer Masse von 50 – 2500 kDa. Mit Verbesserung der Organfunktion unter Sepsis-Therapie sanken die HA-Werte kontinuierlich ab [168]. Als mögliche Gründe für die

erhöhten Spiegel wurde zum einen eine verminderte hepatische Aufnahme und renale Ausscheidung, als auch eine erhöhte periphere Synthese unter septischen Bedingungen angegeben [169], [170]. Ebenso wurden Auswirkungen auf den HA-Umsatz im Gewebe bedingt durch den gestörten Gewebswasserhaushalt mit erhöhter Kapillarextravasation, Gewebsödem und erhöhten Lymphfluss angenommen. Die Ausschüttung von HA in den Blutstrom wurde auch als regulatorischer Mechanismus im Sinne eines natürlichen Blutexpanders verstanden [67]. Festzuhalten ist, dass durch Gewebsverletzung bei Sepsis (u.a. Endothelzellfunktion und Organdysfunktion durch Mikrozirkulationsstörung, mitochondriale Dysfunktion bei oxidativem Stress und Immunparalyse) bzw. durch direktes Trauma des Gewebes z.B. durch Verbrennung erhöhte HA-Werte im Blutstrom nachgewiesen werden können. Diesen Zuständen gemein ist, dass zur Behandlung überwiegend eine hohe Infusionsmenge zum Volumenausgleich mit dem Ziel der Aufrechterhaltung des intravasalen Drucks notwendig wird; verstärktes eGC-*shedding* durch Gabe großer Mengen intravasaler Flüssigkeit wurden durch Berg *et al.* [171] bereits nachgewiesen. Auch bei anderen Pathologien, wie z.B. bei hypertensiven Schwangeren mit Gefahr der Entwicklung einer Präeklampsie bzw. des HELLP-Syndroms – das mit einer obstruktiv-thrombotischen Mikroangiopathie mit Hämolyse, Thrombozytopenie und konsekutiver Leberschädigung einhergeht – zeigten sich in Beobachtungsstudien stark erhöhte Blutspiegel von HA und Syndecan als Bestandteile der eGC [172]–[175], sodass vermehrtes *shedding* als möglicher Ursprung der erhöht auftretenden Glykokalyxkomponenten benannt wurde. HA wurde auch bei chronisch-inflammatorischen Zuständen verstärkt im Blut nachgewiesen. So konnte bei chronischen Atemwegserkrankungen wie dem Asthma bronchiale [176] bzw. der chronisch-obstruktiven Lungenerkrankung (*chronic obstructive pulmonary disease*, COPD) [177], HA in erhöhtem Maße im Sputum bzw. gewonnener bronchoalveolärer Lavage nachgewiesen werden. Vor allem im Stadium der Exazerbation – die häufig durch Infekte der oberen Atemwege getriggert wird – konnten Papakonstantinou *et al.* erhöhte Spiegel zirkulierender HA auch im Blut feststellen; der Schweregrad der COPD sowie das *overall survival* (OS) korrelierten positiv [178]. Nach experimenteller Auslösung eines Asthmaanfalls hielten die erhöhten HA-Werte im Blut für mindestens fünf Tage an, was auch bei direkter pulmonaler Schädigung, wie z.B. der Pneumonie gezeigt werden konnte [176], [179], [180]. Es ist final nicht geklärt, ob die in den Blutstrom gelangende HA lediglich aus dem submukösen Bindegewebe gespült wird, oder ob sie aktiv durch Einfluss von Entzündungszellen degradiert und als HA-Fragmente in den Blutstrom abgegeben wird [176]. Studien hierzu stehen aus.

Ebenso konnten bei autoimmun-reaktiven Erkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis (RA) [162], [181]–[183], der systemische Sklerose (SSc) [184], [185], der Psoriasis [186] und der Vaskulitis [187] erhöhte zirkulierende HA-Spiegel im Blut gemessen werden. Überwiegend wird bei diesen Autoimmunerkrankungen von einer durch die Inflammation getriggerten Akkumulation und dem konsekutiven Ausstrom von HA aus der Matrix beteiligter Gewebe ausgegangen – z.B. im/vom Synovialraum beteiligten Gelenken bei der RA bzw. bei der SSc, einer Erkrankung mit pathologisch gesteigerter Kollagensynthese.

Zirkulierende HA kann bei verschiedensten physiologischen als auch pathologischen Zuständen im Blutstrom nachgewiesen werden. Der erhöhte Nachweis von HA im Blutstrom scheint multifaktoriell bedingt zu sein: Hochregulation der HA-Synthese in verletztem bzw. entzündetem Gewebe und Freisetzung in den Blutstrom, Freisetzung aus der Gefäßwand bzw. *HA-shedding* aus der eGC. Zudem scheint auch die molekulare Masse der HA eine relevante Rolle hinsichtlich ihrer Funktion auf Entzündungsmechanismen im Gewebe zu haben.

Bis zur Durchführung unserer Untersuchung gab es keine veröffentlichte Studie hinsichtlich der Bedeutung zirkulierender HA im Rahmen der kardialen Ischämie mit einer koronarangiographisch gesicherten Koronarsklerose.

1.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

In dieser Dissertation werden folgende zentrale Fragen untersucht:

- Welche Bedeutung haben zirkulierende Plasma-HA-Spiegel bei Patienten mit KHK-begünstigenden Risikofaktoren und Komorbiditäten?
- Zeigen sich Unterschiede zirkulierender Plasma-HA-Level zwischen Patienten mit stabiler KHK und ACS?
- Kann zirkulierende Plasma-HA als Biomarker bei nekrotischem Myokarduntergang dienen?

2 Patienten und Methoden

2.1 Studiendesign

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine prospektive Observationsstudie. Der Studienantrag wurde durch die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Studien-Nr.: 4739R, Registrierungs-ID:2014072639) genehmigt.

2.2 Patienten und Gruppen

Für die Studie wurden die Teilnehmer in der kardiologischen Klinik der Universitätsklinik Düsseldorf zwischen März 2015 und September 2016 rekrutiert.

Drei Patientengruppen wurden für diese Studie definiert:

1. **Patienten mit stabiler koronarer Herzerkrankung (KHK)**; d.h. mit angiographisch gesicherter koronarer Herzerkrankung und ohne akutes Koronarsyndrom in den letzten 3 Monaten; n= 49
2. **Patienten mit akutem Koronarsyndrom (ACS)** und positiven Nekrosemarkern; n= 42
 - a. **STEMI**; d.h. Troponin positiv, ST-Hebungen im EKG, Angabe von typischen körperlichen Beschwerden des Patienten und leitliniengerechter akuter PCI; siehe [188].
 - b. **NSTEMI**; d.h. Troponin positiv, keine ST-Hebungen im EKG, Angabe von typischen körperlichen Beschwerden und leitliniengerechter akuter perkutaner Koronarintervention (PCI); siehe [189]
3. **Altersgematchte gesunde Kontrollgruppe** ohne koronarangiographisch-apparente Koronarsklerose; n = 49

Bei den im Rahmen des Klinikaufenthaltes durchgeführten Blutentnahmen wurden zusätzlich für dieses Projekt ca. 4 Ethylendiamintetraacetat (EDTA) - Röhren à 5 ml (insgesamt 20ml) Blut entnommen. Für die koronargesunde Kontrollgruppe und die Gruppe mit stabiler KHK wurde jeweils nur am Aufnahmetag Blut abgenommen,

wohingegen bei den Patienten der ACS-Gruppe (STEMI/NSTEMI) max. 5 Blutproben (zu Stunde 0- 24 - 48- 72- 96) nach stationärer Aufnahme bei Infarkt ereignis abgenommen wurden.

Diese Zeitpunkte sind so gewählt, dass die Blutentnahmen im Rahmen der üblichen Blutkontrollen, im Speziellen der Infarkt-Nachsorge entnommen wurden. Bei zudem relativ kleiner zusätzlicher Blutentnahmemenge konnte angenommen werden, dass den Patienten kein weiteres Komplikationsrisiko entstand.

Die Aufklärung erfolgte ausführlich mündlich sowie schriftlich mittels eines Aufklärungsbogens und einer Einverständniserklärung, die in Kopie an die Patienten ausgehändigt wurden.

Die Patienten wurden über das Projekt, mögliche Risiken bei der Blutabnahme und die pseudonymisierte Verarbeitung ihrer Daten unter Berücksichtigung des Bundesdatenschutzgesetzes informiert. Alle Patientendaten (Basis-Patientendaten, Diagnose, Begleittherapie, Komorbiditäten, Ergebnisse der Funktionsdiagnostik etc.) wurden pseudonymisiert gespeichert und entsprechend den gesetzlichen Bestimmungen des Datenschutzes vertraulich behandelt sowie nicht an Dritte weitergegeben.

Die durchgeführte Untersuchung berücksichtigte die aktuelle Fassung der Deklaration von Helsinki und alle weiteren ethischen und rechtlichen Vorgaben für klinische Studien, die nicht dem Arzneimittelgesetz unterliegen, sowie die Berufsordnung für Ärzte.

Alle verwendeten Geräte waren für die medizinische Anwendung zugelassen und unterlagen einer gesetzlich geregelten regelmäßigen Kontrolle.

Das klinische Vorgehen beruhte auf den 2015 gültigen Leitlinien der *European Society of Cardiology* [188], [189].

2.3 Ein-/Ausschlusskriterien

Es galten folgende Ein- und Ausschlusskriterien bei der Rekrutierung:

Einschlusskriterien:

- Alter > 18 Jahre
- Patienten männlichen und weiblichen Geschlechtes mit mündlicher und schriftlicher Einwilligung zur Studienteilnahme nach ausführlicher Aufklärung
- **Stabile KHK**; hier: angiographisch gesicherte koronare Herzerkrankung und kein akutes Koronarsyndrom in den letzten drei Monaten
- **ACS**; hier: NSTEMI bzw. STEMI bzw. eine
- **Gesunde Kontrollgruppe** ohne Hinweis auf eine koronarangiographisch manifeste kardiovaskuläre Atherosklerose

Ausschlusskriterien:

- Maligne Grunderkrankung
- Schwangerschaft
- Akute Entzündungen/Infekte oder abgelaufene Infektionen < 10 Tage
- Vorbekannte Leberzirrhose oder rheumatoide Arthritis
- Alle weiteren Behandlungen oder Erkrankungen, die nach Einschätzung der Studienleiter eine Teilnahme verbieten.

Abbruchkriterien:

Abbruchkriterien waren mit Auftreten der aufgeführten Ausschlusskriterien, einer *non-Compliance* der Patienten oder dem Entzug der Einverständniserklärung erfüllt.

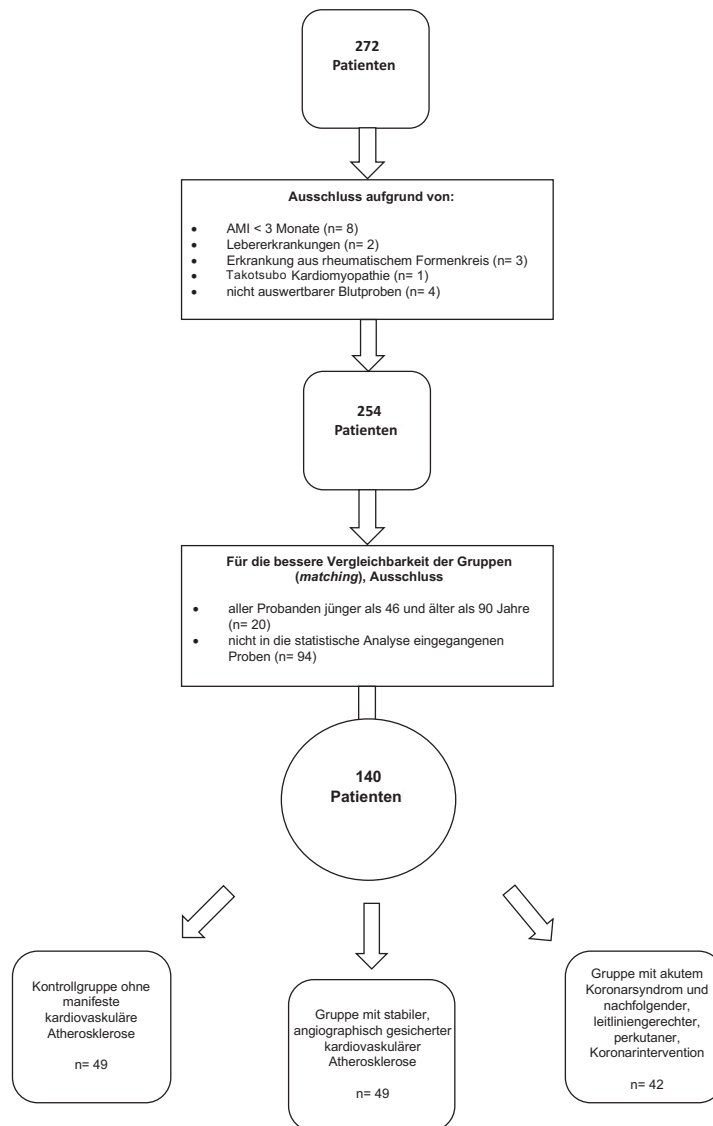


Abb. 3: Übersicht der ein-/ ausgeschlossenen Patienten.

Insgesamt wurden für die Studie 272 Patienten rekrutiert (s. **Abb. 3**). Aufgrund strikter Kriterien wurden nachfolgend 140 Patienten (86 Männer und 54 Frauen) eingeschlossen. Besonderes Augenmerk wurde auf die Erfüllung aller vordefinierten Kriterien bei der ACS-Gruppe gelegt (s.o.) sowie auf den angiographischen Nachweis einer > 50%igen Diameter-Stenose mindestens eines Koronargefäßes in der stabilen KHK-Gruppe. Zur besseren Vergleichbarkeit der Gruppen wurden nur Patienten zwischen 46 und 90 Jahren in die statistische Analyse eingeschlossen. Das Durchschnittsalter unseres Studienkollektivs liegt bei $69,6 \pm 1,0$ (MW \pm SEM).

2.4 Ermittlung des Koronarstatus

Bei allen Patienten war ein Koronarstatus durch invasive angiographische Untersuchung dokumentiert worden.

Bei den Patienten mit ACS im Akutstadium, bei den stabilen KHK-Patienten und der Vergleichsgruppe ohne KHK innerhalb der letzten 6 Monate.

Als Kriterium für das Vorliegen einer koronaren Herzkrankheit wurde eine mindestens 50%ige Stenose in einem oder mehreren Koronargefäßen zugrunde gelegt. Der Grad der Stenose wurde visuell vom Untersucher beurteilt.

2.5 Probenverarbeitung

2.5.1 Vorversuch

Das Ziel dieses Vorversuchs war die Festlegung eines Standards bei der Zentrifugation von EDTA-Proben zur Bestimmung von Plasma-HA, da es dazu bisher keine Untersuchungen bzw. Standardverfahren gibt.

Hierfür wurde das Plasma von sieben männlichen, gesunden Probanden im Alter von 21 – 30 Jahren (MW \pm SEM 25,86 \pm 1,1) untersucht. Die Blutabnahme erfolgte unter sterilen Bedingungen an einer Ellenbogen- oder Handvene mittels einer 21G Butterfly Nadel (BD Vacutainer® Safety-Lok™, Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) in vier 3ml EDTA-Röhrchen (BD Vacutainer® Safety-Lok™, Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA). Nach Probengewinnung erfolgte die Zentrifugation pro Röhrchen bei jeweils unterschiedlicher Zentrifugationsstufe (800, 1700, 2800 und 3150 g*x) bei 4°C für 10 Minuten mittels Eppendorf Centrifuge 5810 R (Seriennummer: 5811AH962972). Danach wurde das Plasma vorsichtig abpipettiert und in handelsübliche Aliquots überführt. Die Lagerung der Proben erfolgte konsequent bei -80°C bis zur Durchführung des HA-assays.

2.5.2 Hauptuntersuchung

Die Probenentnahme bei den kardiologischen Patienten erfolgte in der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie des Uniklinikums Düsseldorf.

Bei Patienten der „stabilen KHK“-Gruppe sowie der gesunden Vergleichsgruppe erfolgte nur eine Blutabnahme. Innerhalb der ACS-Gruppe (STEMI/NSTEMI) erfolgten nach initialer Blutabnahme repetitive Laborbestimmungen im Rahmen der regulären täglichen Blutkontrollen zu Stunde 24, 48, 72 und 96 nach stationärer Aufnahme bei Akutereignis zur Evaluation einer möglichen Dynamik. Die abgenommenen EDTA-Blutproben wurden auf Trockeneis gekühlt von der kardiologischen Klinik in das Institut für Pharmakologie und klinische Pharmakologie der Universität Düsseldorf transportiert. Daraufhin erfolgte die Zentrifugation (Eppendorf Centrifuge 5810 R, Seriennummer: 5811AH962972) bei 4°C für 10 Minuten bei 1750 g * x. Danach wurde das Plasma vorsichtig abpipetiert und in handelsübliche Aliquots überführt. Die Lagerung der Proben erfolgte konsequent bei -80°C bis zur Durchführung der Analyse.

2.5.3 Messung der HA im EDTA-Plasma

Die Messung der HA im Plasma wurde mit Hilfe des *Hyaluronic Acid Test Kit* der *Corgenix Incorporation* (Broomfield, Colorado 80020, USA; *European Patent Number* (EP) 283779) durchgeführt. Basierend auf der enzymatischen Verknüpfung zwischen der HA und dem Hyaluronsäure-bindenden Protein (HABP), das als spezifischer Rezeptor für HA dient, erfolgte die quantitative Bestimmung der HA im Probanden-Plasma. Die verwendeten Mikrotiterplatten wurden bereits vom Hersteller mit aus Nasenknorpel von Rindern extrahierten, enzym-konjugierten, immobilisierten HABP benetzt. Nach Aufwärmen der Patientenproben und Kitreagenzien auf Raumtemperatur (20 - 26°C), wurden die Mikrovertiefungen mit Patientenplasma und den jeweiligen Standards beimpft und für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen erfolgte die spezifische Bindung zwischen HABP und HA. Nach vorsichtigem Umdrehen der Mikrotiterplatte und Entleerung des Überstandes wurde die vierfache Waschung der *microwells* mit phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung (PBS; *phosphate-buffered saline*) durchgeführt, sodass ungebundene Moleküle des Plasma-Überstandes entfernt wurden. Nach anschließendem Hinzufügen von 100 µl an Meerrettich-Peroxidase (HRP, *horseradish peroxidase*) konjugiertes HABP, welches Komplexe mit der bereits gebundenen HA bildet, erfolgte eine 30minütige Inkubation. Ungebundenes konjugiertes HABP wurde anschließend durch erneutes vierfaches Waschen mit PBS entfernt.

Die Anfärbung wurde mittels Zugabe einer vom Hersteller bereitgestellten Substratlösung – bestehend aus Tetramethylbenzidin und stabilisiertem Wasserstoffperoxid – induziert und die Enzymreaktion nach 30-minütiger Inkubation durch Hinzufügen von 100 µl Stopplösung (Schwefelsäure) pro Vertiefung beendet. Die optische Dichte der einzelnen Vertiefungen wurde im Photometer bei 450nm gemessen.

2.6 Statistik

Die statistische Analyse der Ergebnisse sowie die Erstellung der Graphiken erfolgte mithilfe der GraphPad-Software Version 8.0.2 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) bzw. mit Microsoft PowerPoint (Version 16.57).

Der Grubb's Test wurde zur Identifizierung von Ausreißern (*outlier*) verwendet, welche folglich von der statistischen Analyse ausgeschlossen wurden. Das Signifikanzniveau wurde für * $p < 0,05$ festgelegt.

Die Daten wurden auf Normalverteilung überprüft und bei Abweichung für die statistische Auswertung logarithmiert.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind prinzipiell angegeben als arithmetischer MW \pm Standardfehler des MW (SEM).

Zum Vergleich zweier Datensätze wurde der *students t*-Test bzw. zum Vergleich mehrerer Datensätze eine *one-way analysis of variance* (ANOVA) mit anschließendem *Bonferroni multiple comparisons test* bzw. Tukey-Test durchgeführt.

3 Ergebnisse

In diesem Kapitel werden zunächst die Ergebnisse unseres Vorversuches zur Etablierung eines Zentrifugationsstandards von Plasma-HA vorgestellt. Danach werden die epidemiologischen Daten der drei Kohorten (koronarangiographisch keine KHK, stabile KHK und ACS) präsentiert, gefolgt von den einzelnen Subgruppenanalysen hinsichtlich des Geschlechtes, Alters sowie für die Entwicklung einer Atherosklerose relevanten Komorbiditäten. Als finaler Punkt wird der zeitliche Verlauf zirkulierender HA bis zu 96 Stunden nach akuter kardialer Ischämie im Vergleich zu klinisch-etablierten Nekrosemarkern (Troponin/Creatinkinase) aufgezeigt.

3.1 Vorversuch

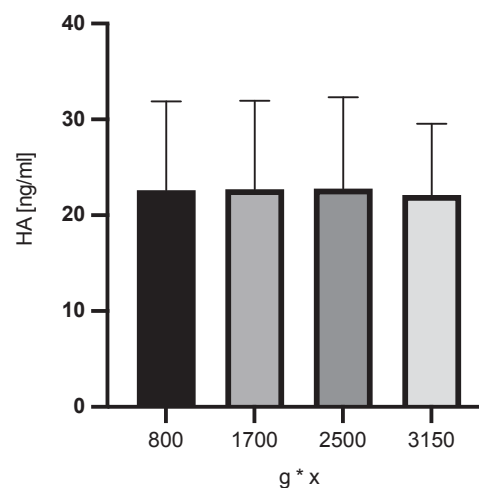


Abb. 4: Spiegel zirkulierender Plasma-Hyaluronsäure (HA) bei gesunden Probanden abhängig von der Zentrifugationsstufe (g*x).

n = 7. Angegeben: MW ± SEM.

Ziel dieses Vorversuches war herauszufinden, ob es einen Unterschied hinsichtlich gemessener HA-Plasma-Level gibt, wenn die Blutproben unterschiedlich stark zentrifugiert werden. Von je sieben gesunden Probanden wurde EDTA-Blut jeweils auf 800, 1700, 2500 bzw. 3150 g*x bei 4°C zentrifugiert. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p = 0,87$), sodass die HA-Plasmaproben der Folgeuntersuchungen bei 1750 g*x – unserem Laborstandard für EDTA-Proben entsprechend – zentrifugiert wurden.

3.2 Epidemiologische Daten

	Keine KHK	KHK	ACS
Geschlecht (m/w)	19/30	34/15	33/9
Lebensalter	69,1 ± 1,7	72,9 ± 1,6	66,4 ± 1,8
Leukozyten [G/l]	7,1 ± 0,3	6,8 ± 0,3	11,0 ± 0,6
Hämoglobin [g/dl]	13,2 ± 0,3	12,8 ± 0,8	13,5 ± 1,0
Thrombozyten [G/l]	229,5 ± 9,2	223,2 ± 12,9	247,1 ± 15,7
CRP [mg/dl]	1,1 ± 0,3	0,8 ± 0,2	1,4 ± 0,4
Niereninsuffizienz	26 (53,1%)	29 (59,1%)	12 (28,6%)
Kreatinin [mg/dl]	1,1 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,0 ± 0,1
BMI [kg KG/m²]	27,0 ± 0,6	28,2 ± 0,7	25,2 ± 0,5
Adipositas	10 (20,4%)	19 (38,8%)	3 (7,1%)
Raucher	7 (16,7%)	11 (22,4%)	13 (31%)
Ex-Raucher	9 (21,4%)	15 (39,5%)	8 (27,6%)
AHTN	31 (63,3%)	39 (79,6%)	29 (69,1%)
T2DM	8 (16,3%)	13 (26,5%)	9 (21,4%)
HbA1c [%]	5,9 ± 0,2	5,9 ± 0,2	5,8 ± 0,2
Cholesterin [mg/dl]	182,3 ± 8,4	174 ± 12,1	182,8 ± 10,0
LDL [mg/dl]	113,3 ± 5,9	106,5 ± 10,3	117,7 ± 8,6
STEMI			28 (66,7%)
NSTEMI			14 (33,3%)
hs-TnT initial [ng/l]			827,9 ± 241,8
maximal			2578 ± 488,3
CK initial [U/l]			621,4 ± 137,4
maximal			1134 ± 199,3
Prior MI	0	16 (32,7%)	6 (14,3%)
Plasma-HA [ng/ml]	84,6 ± 11,4	179,4 ± 44,3	72,5 ± 10,7

Tabelle 1: Patientencharakteristika. Angegeben: MW ± SEM. KHK: koronare Herzkrankheit, ACS: akutes Koronarsyndrom, m: männlich, w: weiblich, CRP: C-reaktives Protein, BMI: *body-mass* Index, KG: Körpergewicht; Ex-Raucher: Rauchverzicht > 4 Wochen, AHTN: arterielle Hypertonie, T2DM: Typ-2 Diabetes mellitus, LDL: Lipoprotein geringerer Dichte, N-/STEMI: nicht-/ ST-Strecken-Hebungsinfarkt, hs-TnT: *high-sensitive* Troponin, CK: Creatinkinase, Prior MI: Myokardinfarkt in der Anamnese > 3 Monate, HA: Hyaluronsäure.

Die Patientencharakteristika unserer Studienkohorte (n=140) wurden kategorisiert nach Entität (keine KHK, stabile KHK und ACS). Insgesamt betrachtet, waren 61,4% der Probanden männlichen Geschlechts und das mittlere Alter betrug $69,1 \pm 1,0$ Jahre.

In die Auswertung unserer Studie wurden nur Patienten zwischen 46 und 90 Jahren eingeschlossen. Das mittlere Alter zeigte sich in der Gruppe „stabile KHK“ am höchsten und in der ACS-Gruppe am niedrigsten. Die meisten Frauen waren in der Gruppe „keine KHK“ vertreten, prozentual am wenigsten in der ACS-Gruppe.

Die Inzidenz von nahezu allen traditionellen Risikofaktoren dominierte in der KHK-Gruppe deutlich im Vergleich zu den Gruppen „keine KHK“ und „ACS“.

In der ACS-Gruppe fallen tendenziell höhere Werte für Leukozyten, Thrombozyten und CRP auf (**Tabelle 1**).

Wir führten zunächst eine Querschnittsanalyse der gesamten Kohorte hinsichtlich Plasma-HA in Abhängigkeit von Geschlecht bzw. Alter durch, gefolgt von Atherogenesebegünstigenden Erkrankungen.

Im Weiteren untersuchten wir Plasma-HA bei akuter kardialer Ischämie (ACS-Gruppe) im Vergleich zu Patienten mit stabiler KHK, sowie im Verlauf von 96 Stunden nach kardialem ischämischem Akutereignis im Vergleich zu etablierten kardialen Nekrosemarkern.

3.2.1 HA-Spiegel in Abhängigkeit vom Geschlecht und Alter

Wie bereits in vorherigen Studien gezeigt, konnte in unserer Studienpopulation bestätigt werden, dass kein Unterschied der Plasma-HA in Abhängigkeit vom Geschlecht vorliegt. Mit steigendem Alter jedoch kam es zu einem signifikanten Anstieg zirkulierender Plasma-HA mit einem Maximum in der Alterskohorte 76-90 Jahre (**Abb.5**)

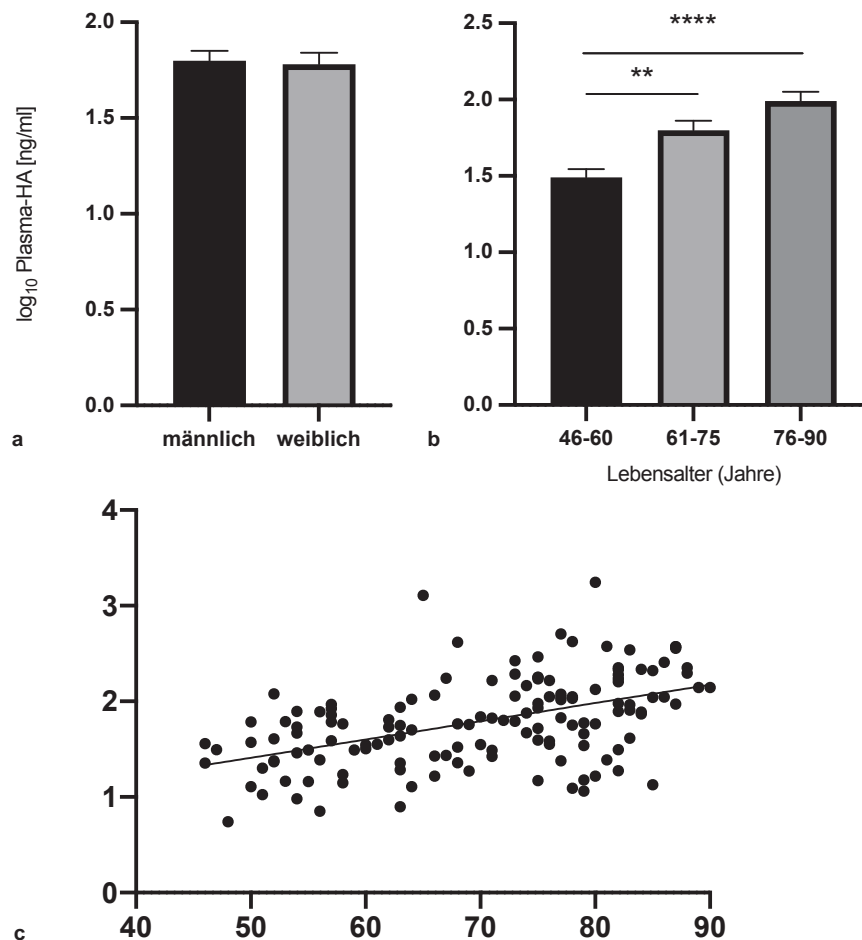


Abb. 5: Spiegel zirkulierender Plasma-Hyaluronsäure (HA) abhängig vom Geschlecht (a) und Lebensalter (b/c).

a) n= 85, 54

b) n= 36, 50, 53; ** p < 0,01, **** p < 0,0001. *One-way ANOVA multiple comparisons.*

c) Positive Pearson-Korrelation: n= 140; **** p = <0,0001. $r = 0,49$; $r^2 = 0,24$; 95%iges Konfidenzintervall [0,35 – 0,60].

Angegeben: MW \pm SEM; ein *outlier* exkludiert.

3.2.2 HA-Spiegel in Abhängigkeit von Atherogenese-begünstigenden Erkrankungen

Entsprechend der Auflistung der in den ESC-Guidelines [189] gelisteten prädisponierenden Erkrankungen für eine KHK bzw. einer myokardialen Ischämie untersuchten wir zirkulierende HA-Spiegel bei Patienten mit AHTN, Nikotinabusus, Dyslipidämien, Typ-2-Diabetes-mellitus (T2DM) und chronischer Niereninsuffizienz.

3.2.2.1 Arterielle Hypertonie

Zwischen Hypertonikern und Blutdruckgesunden Patienten konnte interessanterweise kein Unterschied hinsichtlich zirkulierender HA festgestellt werden.

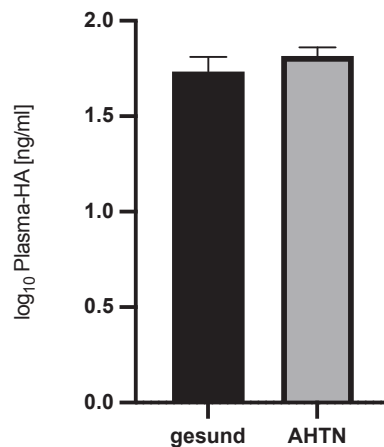


Abb. 6: Spiegel zirkulierender Plasma-Hyaluronsäure (HA) abhängig vom Vorliegen einer diagnostizierten arteriellen Hypertonie (AHTN).

n= 40, 99; p= 0,34; Angegeben MW ± SEM; ein *outlier* exkludiert.

3.2.2.2 Tabakkonsum

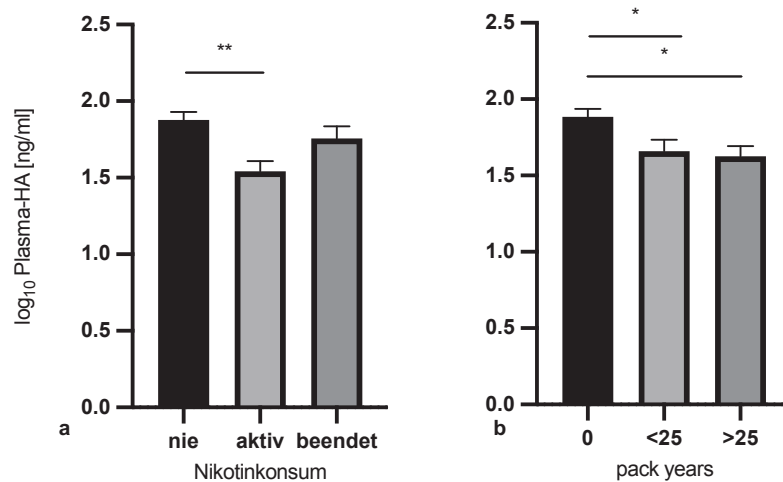


Abb. 7: Spiegel zirkulierender Plasma-Hyaluronsäure (HA) in Abhängigkeit vom Vorliegen eines Nikotinabusus.

a) n= 78, 28, 32; **p= 0,005. Beendeter Nikotinkonsum > 4 Wochen.

b) n= 79, 35, 24; * p = 0,035.

Angegeben: MW ± SEM; zwei *outlier* exkludiert.

Es zeigen sich erniedrigte Werte zirkulierender Plasma-HA bei Patienten mit aktivem Nikotinkonsum, die sich signifikant von denen unterscheiden, die noch nie geraucht haben. Nach andauerndem Rauchstopp > 4 Wochen scheinen die Werte der ehemaligen Raucher sich denen der Nichtraucher wieder anzugleichen (**Abb. 7a**)

Eingeteilt wurde der anamnestisch erhobene Nikotinkonsum in „noch nie geraucht“ (n= 78), aktiver Nikotinkonsum (n= 28) und beendeter Nikotinkonsum (> 4 Wochen; n= 32). *Pack years* dienen im klinischen Alltag der Erhebung und Quantifizierung des Nikotinabusus, berechnet anhand der Anzahl konsumierter Zigarettenschachteln (*packs*) multipliziert mit der Anzahl der Jahre des durchgeführten Nikotinkonsums. Zirkulierende Plasma-HA-Spiegel zeigten sich abhängig von der Dauer des Tabakkonsums bzw. Menge an konsumierten Zigaretten signifikant niedriger als die bei Nichtrauchern (**Abb. 7b**).

3.2.2.3 Body-Mass-Index (BMI) und Dyslipidämien

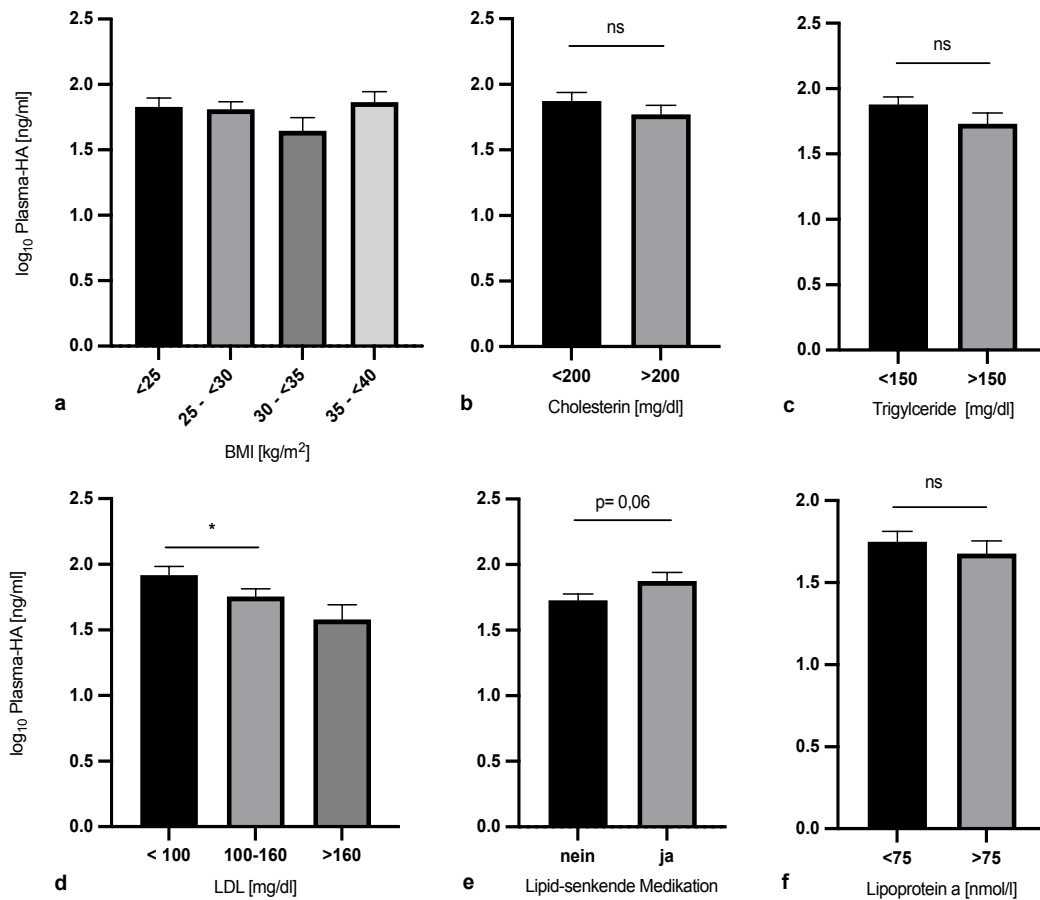


Abb. 8: Spiegel zirkulierender Plasma-Hyaluronsäure (HA) abhängig vom Body-Mass-Index (BMI; a), dem Vorliegen einer Dyslipoproteinämie (b/c/d/f) und unter Einnahme einer Lipid-senkenden Medikation (e).

a) n= 55, 54, 24, 6

b) n= 54, 32

c) n= 64, 23

d) n= 28, 41, 9; *p= 0,05; LDL = *low-density protein*

e) n= 71, 65; p= 0,06; Lipid-senkende Med.: Statine, Cholesterinresorptionshemmer, Fibrate.

f) n= 33, 13

Angegeben: MW ± SEM; ein *outlier* exkludiert.

Fettleibigkeit und erhöhte Blutfettwerte zählen zu wichtigen Katalysatoren einer KHK. Zirkulierende HA-Spiegel zeigen sich mit zunehmendem BMI (**Abb.8a**), erhöhtem Gesamt-Cholesterin, Triacylglyceriden (TAG) und Lipoprotein a nicht signifikant verändert. Jedoch konnte mit steigendem LDL abnehmende HA-Spiegel festgestellt werden. Invers hierzu verhalten sich die HA-Spiegel unter lipidsenkender Therapie. Unter Therapie mit Statinen, Cholesterinresorptionshemmern oder Fibraten zeigen sich höhere zirkulierende HA-Spiegel.

3.2.2.4 Diabetes mellitus

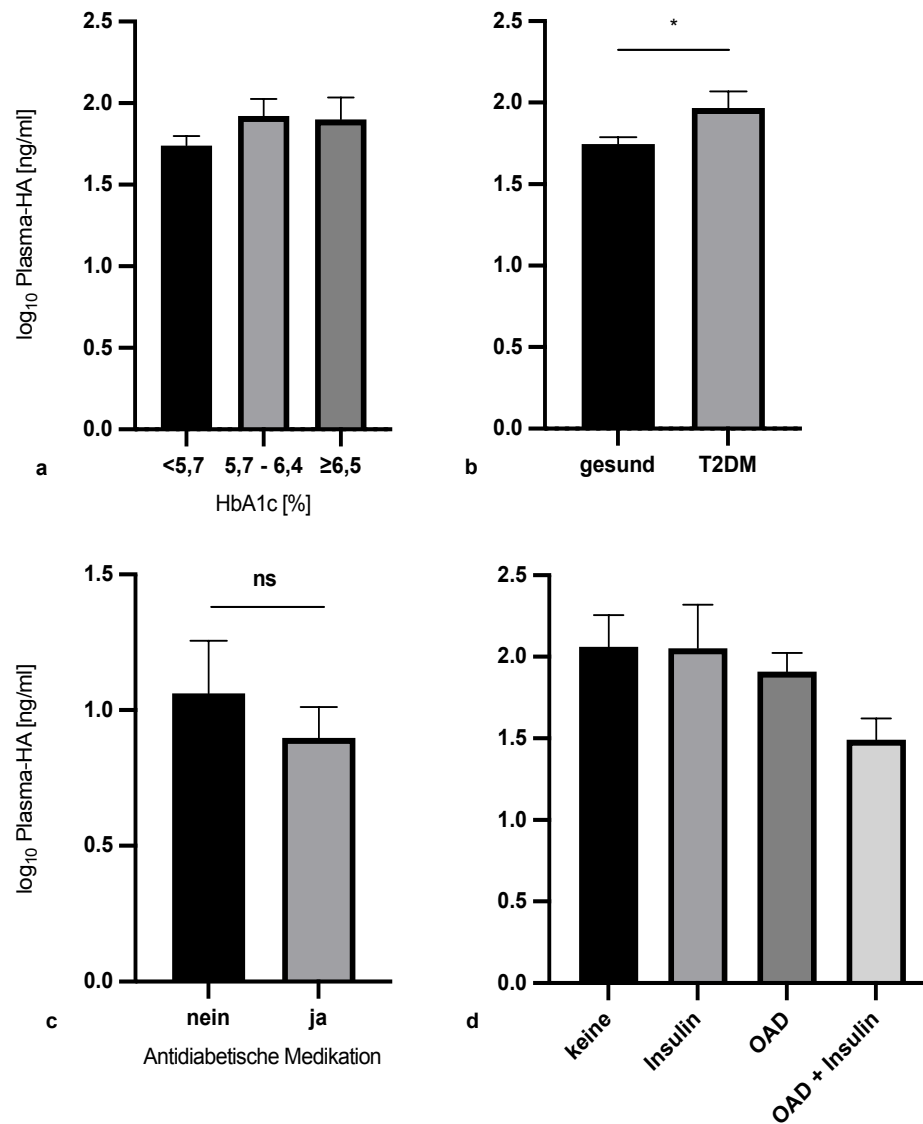


Abb. 9: Spiegel zirkulierender Plasma-Hyaluronsäure (HA) in Abhängigkeit vom HbA1c (a), bei Patienten mit Typ-2 Diabetes mellitus (T2DM) (b) und der antidiabetischen Therapie (c/d).

a) n= 44, 25, 14; p= 0,2; zwei *outlier* exkludiert
 b) n= 108, 30; *p= 0,002; zwei *outlier* exkludiert
 c) n= 11, 20; p= 0,4; ein *outlier* exkludiert
 d) n= 11, 7, 10, 3; p= 0,4; ein *outlier* exkludiert
 Angegeben: MW ± SEM.

Mit steigendem HbA1c als Indikator für die durchschnittlichen Blutzuckerwerte der vergangenen zwei bis drei Monate, ist auch tendenziell, jedoch nicht signifikant mehr zirkulierende HA im Plasma nachweisbar (**Abb. 9a**). Bei Patienten mit einem bekannten

T2DM (n= 30) zeigen sich im Vergleich zu gesunden, normoglykämien Patienten (n= 108) signifikant höhere Plasma-HA-Spiegel (**Abb. 9b**).

Es lassen sich bei T2DM-Patienten, die orale Antidiabetika (OAD) einnehmen (n= 10), vor allem in Kombinationstherapie, tendenziell niedrigere Werte im Vergleich zu den Diabetikern, die keine medikamentöse Therapie (n = 11) oder nur Insulin (n= 7) erhalten, nachweisen. Diese Unterschiede stellen sich jedoch als nicht signifikant dar (**Abb. 9c/d**).

3.2.2.5 Chronische Niereninsuffizienz

Das Vorliegen einer chronischen Niereninsuffizienz (CKD) ist mit zunehmendem Schweregrad ein relevanter Risikofaktor für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse. Wie bereits in vorherigen Studien gezeigt, können wir signifikant erhöhte zirkulierende HA-Werte in Abhängigkeit von der Schwere der CKD bestätigen (**Abb.10**).

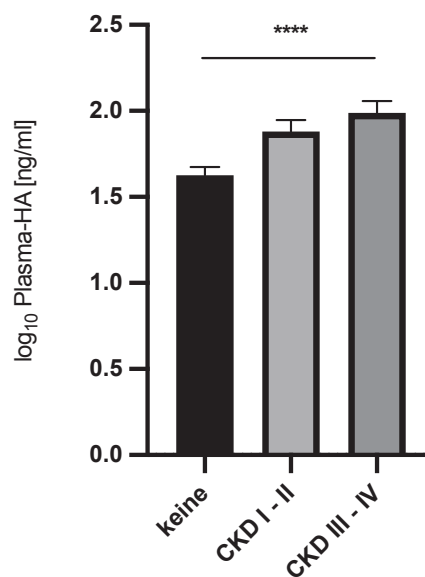


Abb. 10: Spiegel zirkulierender Plasma-Hyaluronsäure (HA) in Abhängigkeit von der Schwere einer diagnostizierten chronischen Niereninsuffizienz (CKD).

n= 71, 15, 53; ****p < 0,0001. Angegeben: MW ± SEM.

3.2.3 Zirkulierende HA bei stabiler KHK und ACS

Unter der Annahme, dass Patienten mit angiographisch gesicherter KHK und akuter myokardialer Ischämie mehr Endothelschädigung und eGC-*shedding* aufweisen und somit mehr HA im Blutstrom zirkuliert, untersuchten wir die beiden Kohorten im Vergleich zu Patienten ohne KHK.

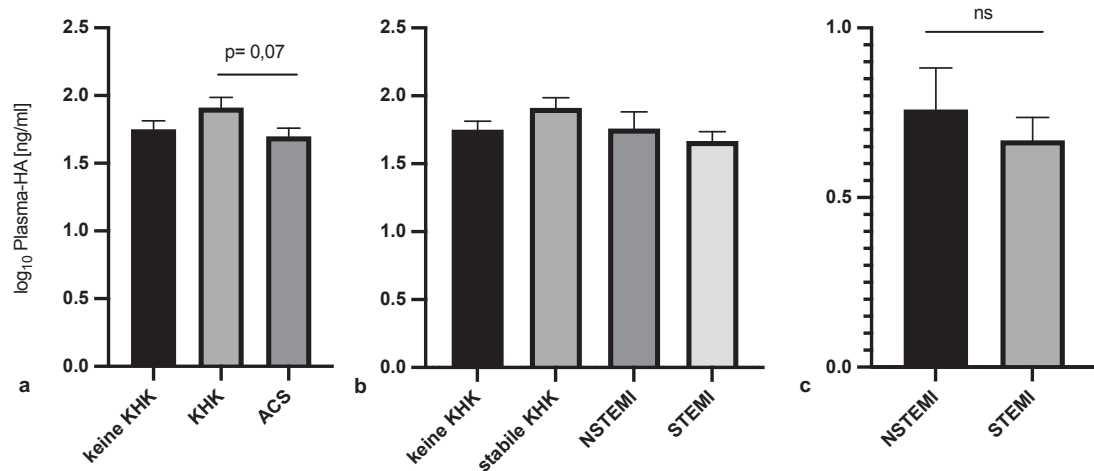


Abb. 11: Spiegel zirkulierender Plasma-Hyaluronsäure (HA) bei koronarer Herzkrankheit (KHK) und akutem Koronarsyndrom (ACS = N/STEMI = (Nicht)-ST-Strecken-Hebungs-Infarkt) gegenüber einer gesunden Vergleichsgruppe (keine KHK).

a) n= 48, 49, 42; p= 0,07

b) n= 48, 49, 14, 28

c) n= 14, 28; p= 0,5

Angegeben: MW ± SEM; ein *outlier* exkludiert.

Bei Patienten mit stabiler KHK zeigten sich im Vergleich zur Gruppe ohne KHK höhere Werte zirkulierender HA (**Abb.11a**). Beim ACS stellten sich erstaunlicherweise tendenziell eher niedrigere Werte als bei der KHK oder der Vergleichsgruppe ohne KHK dar. Der Unterschied zwischen KHK und ACS erreicht das Signifikanzniveau nur knapp nicht (p= 0,07). Innerhalb der ACS-Gruppe lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit NSTEMI bzw. STEMI darstellen (**Abb.11c**)

Die naheliegende Annahme, dass die vergleichsweise höheren HA-Spiegel bei nachgewiesener Koronarsklerosierung positiv mit der Gefäßbeteiligung (1, 2 bzw. 3 Gefäße) korrelieren, konnte in unserer Analyse nicht bestätigt werden. Jedoch zeigt sich bei Patienten mit Koronarsklerose (Kohorte KHK + ACS, n= 91), abhängig von bereits in der Vorgeschichte aufgetretenen ischämischen Komplikationen (ACS/Apoplex) signifikant höhere Spiegel zirkulierender HA (**Abb. 12b**).

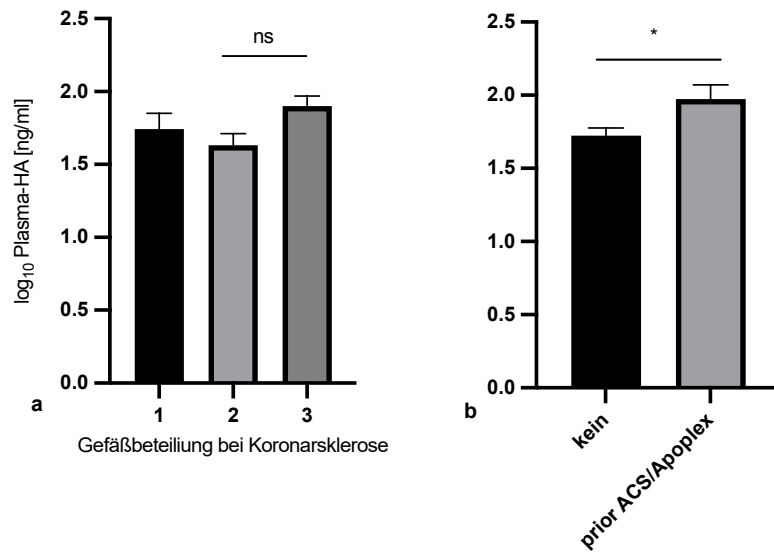


Abb. 12: Plasma-Hyaluronsäure (HA)-Level bei Patienten mit KHK/ACS abhängig von der Gefäßbeteiligung der KHK (a) und von vorausgegangenem ischämischem Ereignis (ACS/Apoplex; b).

a) n= 20, 18, 53; p= 0,09

b) n= 63, 28; *p= 0,015; ein *outlier* exkludiert.

Angegeben: MW ± SEM.

3.2.4 Verlaufsmessungen von CK, TnT und Plasma-HA nach ACS

Wir untersuchten, ob zirkulierende HA mit anderen, in der klinischen Praxis gängigen Nekrosemarkern korreliert. Dafür beobachteten wir den Verlauf 96 Stunden nach Krankenhausaufnahme bei gesicherter Diagnose eines ACS.

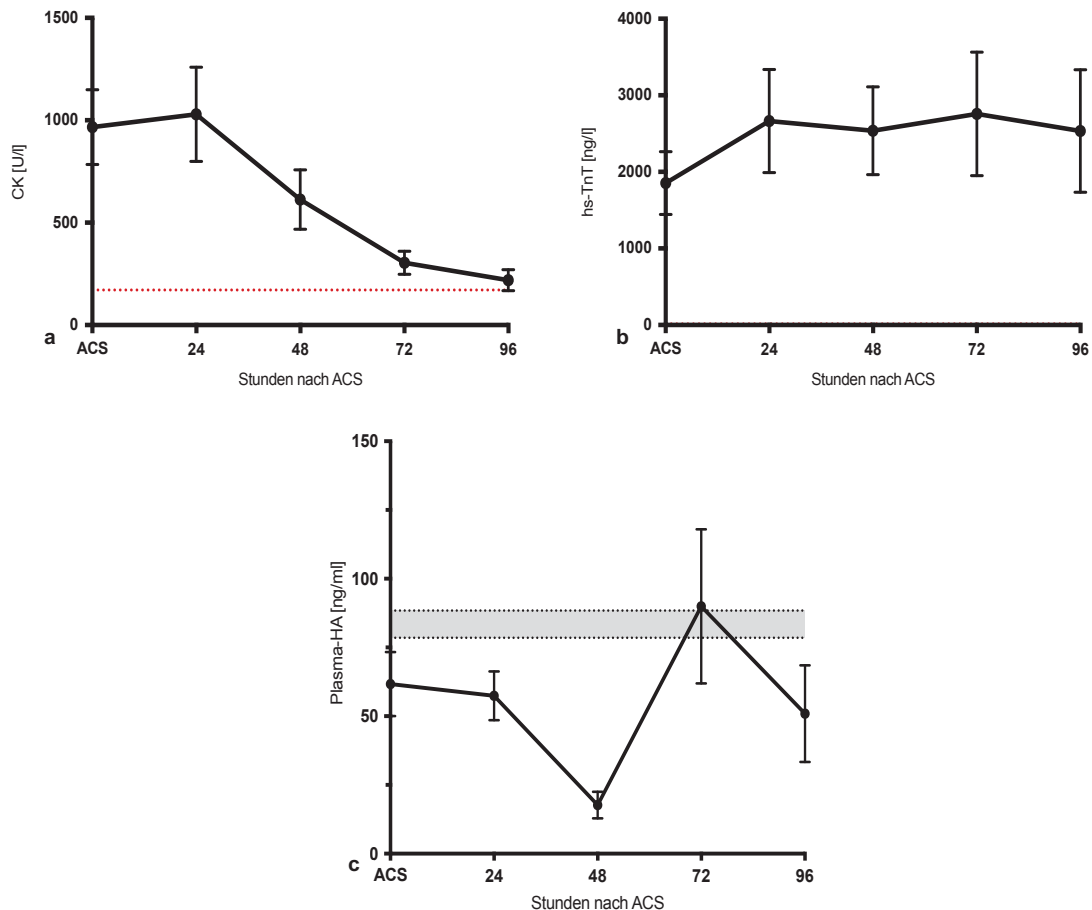


Abb. 13: Verlaufsmessungen bis 96 Stunden nach akutem Koronarsyndrom (ACS) (a) Creatinkinase (CK), (b) *high-sensitive* Troponin-T und (c) Plasma-Hyaluronsäure (HA).

Angegeben: MW \pm SEM

Oberer Norm-Grenzwert/-bereich angegeben durch rotgestrichelte Linie für (a) CK < 171 U/l, (b) hs-Troponin-T < 14 ng/l und (c) Plasma-HA; dargestellt im grau-schattierten Bereich der MW der Kohorte ohne KHK $78,5 \pm 9,9$ ng/ml (= MW \pm SEM der Kohorte ohne KHK)

CK (**Abb.13a**) zeigte sich im Mittel bei Aufnahme mehr als fünffach erhöht in Bezug auf das Ausgangsniveau. In Stunde 24 kam es zu einer weiteren leichten Erhöhung, bevor der Blutspiegel konsequent bis Stunde 96h – bis auf oberes Normniveau – abfiel.

Hs-TnT (**Abb. 13b**) zeigte sich bei stationärer Aufnahme bei den Patienten ca. 135fach höher als das Normalniveau. Nach Koronarintervention stieg hs-TnT weiter an (Stunde 24) und blieb im Verlauf bis zu Stunde 96 auf etwa stabilem Niveau.

Der Verlauf von zirkulierender Plasma-HA (**Abb. 13c**) nach kardialer Ischämie stellte sich anders da.

Da es keinen definierten Normwertbereich für zirkulierende Plasma-HA gibt, errechneten wir diesen anhand der MW koronargesunder Patienten (Gruppe „keine KHK“: $78,5 \pm 9,9$ ng/ml).

Die Ausgangswerte (Werte bei Vorstellung bei ACS im Notfallzentrum; $61,7 \pm 11,6$ ng/ml) waren im Vergleich zu dem errechneten Normbereich koronargesunder Patienten niedriger und flachten auf ein Minimalniveau von ca. 20 ng/ml zu Stunde 48h ab.

In Stunde 72 kam es zu einem erneuten Anstieg, nun oberhalb des kalkulierten Normbereichs ($89,9 \pm 28,1$ ng/ml). Zu Stunde 96 zeigte sich dieser Trend wieder rückläufig auf etwa das Wertniveau zu Stunde 48. Diese zeitlichen Schwankungen zeigten sich jedoch nicht statistisch signifikant.

4 Diskussion

Durch die zunehmende Erforschung der HA, ihrer Synthesen und interagierenden Rezeptoren als elementare Bestandteile der EZM und der eGC, ist ihre bedeutende Rolle bei Inflammation und in der Entwicklung und Progression von Atherosklerose belegt [190]. Vielfältige physiologische Regulationsmechanismen und bisher eine (unspezifische) pharmakologische Interventionsmöglichkeit stehen zur Verfügung, die HA- Synthese bzw. -Degradation zu modifizieren und geben Hoffnung, zukünftig positiven Einfluss auf pathologische Zustände nehmen zu können. Für die HA konnte kontextspezifisch – abhängig von ihrem Vorkommen in eGC, EZM bzw. im Interstitium – unterschiedliche Funktionen nachgewiesen werden. Dies macht das Verständnis ihrer Funktionen abhängig von molekularen Interaktionspartnern komplex. **Abb. 14** fasst die wichtigsten, bisher entschlüsselten Funktionen der HA in den verschiedenen Kompartimenten in Hinblick auf Atherogenese und Inflammation zusammen. Die atheroprotektive Funktion der HA konnten schon durch HA-Beschichtung in Koronarstents therapeutisch genutzt werden [191].

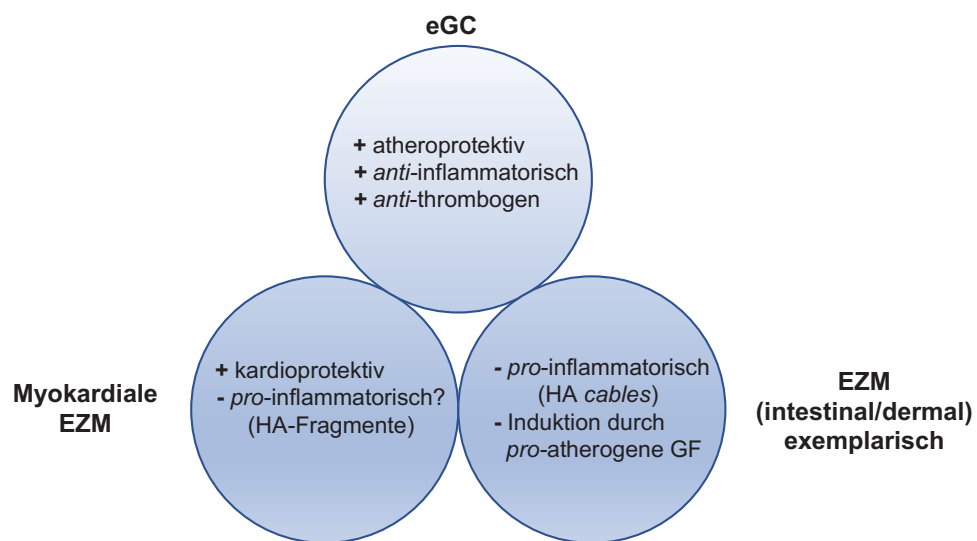


Abb. 14: Auswahl relevanter Funktionen der Hyaluronsäure (HA) in Bezug auf Inflammation und Atherogenese in Abhängigkeit vom Zell-Kompartiment.

+ : schützender Effekt auf das Gewebe / - : schädigender Effekt auf das Gewebe;
eGC: endotheliale Glykokalyx, EZM: extrazelluläre Matrix, GF: *growth factors*

Zirkulierende HA kann bei verschiedensten physiologischen als auch pathologischen Zuständen im Blutstrom nachgewiesen werden. Der erhöhte Nachweis von HA im Blutstrom scheint multifaktoriell bedingt zu sein: Hochregulation der HA-Synthese in verletztem bzw. entzündetem Gewebe und Freisetzung in den Blutstrom, Freisetzung aus der Gefäßwand bzw. HA-*shedding* aus der eGC.

Da die eGC eine bedeutende Determinante der vaskulären Permeabilität für Makromoleküle, so z. B. Lipoproteine ist, kann der Glykokalyxverlust die Atherogenese begünstigen [192].

Risikofaktoren, die die Entwicklung einer Atherosklerose über schädigenden Einfluss auf das Endothel mit konsekutiver Leukozytenadhäsion provozieren, sind u.a. physikalischer Stress durch Scherkräfte und Zirkulation von ROS. Dies ist bei Erkrankungen wie z.B. der arteriellen Hypertonie, beim Rauchen, Hyperlipoproteinämie, Diabetes mellitus und chronischer Entzündung gegeben – siehe **Abb. 15**.

Neben dem Abscheren von eGC-Bestandteilen kommt es zur endothelialen Dysfunktion.

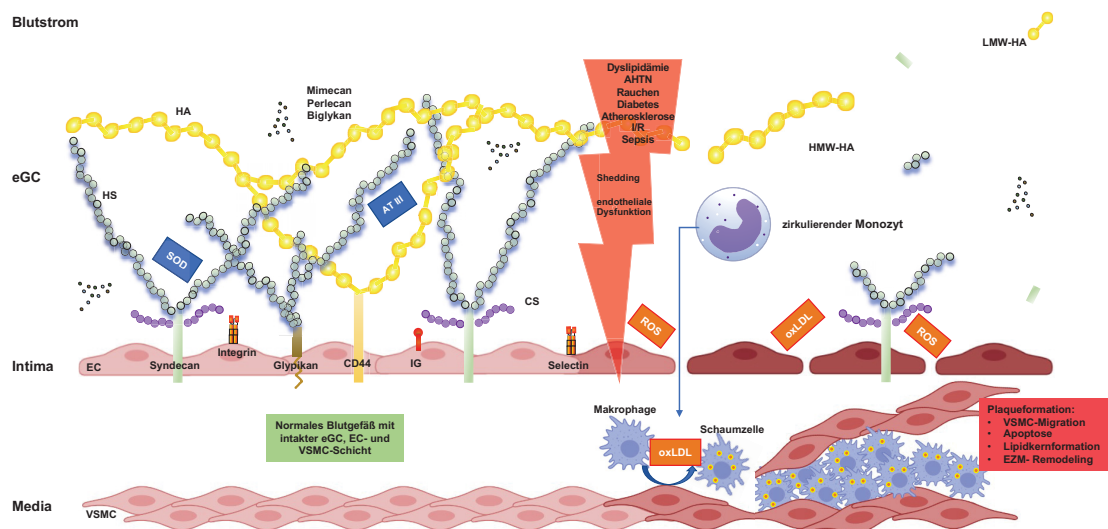


Abb. 15: Schematische Darstellung des eGC-sheddings und der Atherogenese.

Links: intakte endotheliale Glykokalyx (eGC), Endothelzellschicht (EC) in der Intima und *vascular smooth cells* (VSMC) in der Media. Protektive Funktion innerhalb der eGC u.a. von zirkulierender Superoxid-Dismutase (SOD) und Antithrombin III (ATIII).

Rechts: Durch Störfaktoren (roter Pfeil) ausgelöstes eGC-*Shedding* mit Generierung von in die Zirkulation freigesetzten eGC-Fragmenten wie z.B. *high-* bzw. *low- molecular weight* Hyaluronsäure (HMW/LMW-HA). Zunehmende Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) mit negativem Einfluss auf die Endothelintegrität. Endotheliale Dysfunktion mit Einwanderung von Entzündungszellen (beispielhaft hier Monozyt) in die Media. Aktivierung zum Makrophagen und zunehmende intrazelluläre Akkumulation von oxidiertem LDL (oxLDL), dann als Schaumzelle benannt. Konsekutive Plaqueformation mit negativer EZM-Umgestaltung (*remodeling*), siehe roter Kasten.

HA: Hyaluronsäure, HS: Heparansulfat, IG: Immunglobulin, CS: Chondroitinsulfat, ATHN: arterielle Hypertonie, I/R: Ischämie/Reperfusion

4.1 Bedeutung zirkulierender Plasma-HA-Spiegel bei KHK begünstigenden Risikofaktoren und Komorbiditäten

Unter den in Kapitel 1.1.1 aufgeführten kardiovaskulären Risikofaktoren, die eine frühzeitige Atherosklerose-Bildung begünstigen, gehören auch männliches Geschlecht und das Lebensalter (> 55 Jahre). Wie bereits in vorherigen Studien gezeigt wurde, konnten wir bestätigen, dass es keine signifikanten geschlechterspezifischen Unterschiede hinsichtlich zirkulierender Plasma-HA gibt - hier auch nicht zwischen Patienten mit nachgewiesener KHK oder ACS. Bezogen auf Zunahme des Lebensalters [125] und Schwere einer CKD [163] zeigt sich, wie bereits vorbeschrieben, eine starke Korrelation von zirkulierender HA. Wir konnten zeigen, dass diese sowohl bei koronargesunden Patienten als auch bei solchen mit koronarangiographisch nachgewiesener KHK vorliegt.

Papanastasopoulou *et al.* haben in ihrer Studie aus dem Jahr 2016 die HA als möglichen, empfindlichen Indikator für das kardiovaskuläre Risiko benannt. Sie kalkulierten das kardiovaskuläre Risiko für eine gesunde Population mithilfe des Framingham-Scores, der das Risiko für die Entwicklung einer KHK innerhalb der nächsten zehn Jahre vorhersagt [193]. Signifikant erhöhte HA-Werte konnten hierbei im Zusammenhang mit dem metabolischen Syndrom (Adipositas, erhöhte Nüchternblutzuckerwerte > 120 mg/dl, manifester Diabetes mellitus, Hyperlipidämie und erhöhte Triacylglyceride) festgestellt werden [193].

Bezüglich Diabetes – als bedeutende Komorbidität bei der KHK – konnten wir in unserer Studie zeigen, dass Patienten mit einem bekannten T2DM im Vergleich zu gesunden, normoglykämien Patienten signifikant höhere Plasma-HA-Spiegel aufweisen. Abhängig von steigendem HbA1c und unter oraler antidiabetischer Therapie (OAD), vor allem in Kombinationstherapie, ließen sich tendenziell niedrigere Werte im Vergleich zu den Diabetikern ohne medikamentöse Therapie nachweisen. Diese Unterschiede stellten sich jedoch als nicht signifikant dar, was jedoch insgesamt in der geringen n-Zahl begründet liegen könnte.

Erhöhte Serum-HA-Werte, speziell bei solchen Patienten mit bereits manifesten Komplikationen (Nephropathie, Neuropathie, Retinopathie) konnten bereits von Mine *et al.* nachgewiesen werden [194]. Zur Untersuchung, ob es Unterschiede zwischen Typ-1 (T1DM) und Typ-2 (T2DM) hinsichtlich zirkulierender HA gibt, analysierten Nagy *et al.* [195] in ihrer im Jahr 2019 veröffentlichten Studie, die Menge von HA im Muskel und Serum bei Maus und Mensch. HA war im Serum und in den Muskeln sowohl bei an T2DM erkrankten Mäusen als auch beim Menschen erhöht; es fand sich keine Korrelation zwischen HA-Leveln und dem C-Peptid-Niveau, dem BMI, oder der Dauer

der T2DM-Erkrankung. Interessanterweise konnte bei an T1DM erkrankten Individuen in dieser Studie keine erhöhten Serum-HA-Spiegel nachgewiesen werden [195]. Davon abweichend wurden von Chajara *et al.* [196] im Jahr 2000 bei T1DM-Ratten erhöhte zirkulierende Serum-HA-Werte nachgewiesen. Die zirkulierenden HA-Level konnten durch Insulin-Gabe reduziert werden, erreichten jedoch nicht das niedrige Level gesunder Ratten [196]. Auch Nieuwdorp *et al.* fanden bei gesunden Patienten während eines normo-insulinämisch-hyperglykämischen Klemmversuchs einen akuten Anstieg der Plasma-HA mit Glykokalyx-Störung [35]. Darüber hinaus konnten sie bei Patienten mit T1DM eine inverse Korrelation zwischen Plasma-HA und Plasma-HYAL zum Glykokalyx-Volumen darstellen [197], die eine durch Hyperglykämie induzierte Störung des HA-Stoffwechsels und erhöhte endotheliale Vulnerabilität (mit Begünstigung einer Atherosklerose) durch gesteigerte HYAL-Aktivität und konsekutiv erhöhte Plasma-HA-Spiegel nahelegt [198]. Hinsichtlich T1DM können wir keine valide Aussage treffen, da lediglich ein Proband einen T1DM aufwies und nicht in die statistische Analyse mitging.

Wir konnten in unserer Studie bei den Patienten mit angiographisch nachgewiesener KHK keinen relevanten Zusammenhang zwischen zirkulierender Plasma-HA und dem Vorliegen einer AHTN feststellen.

Umso erstaunlicher ließ sich in unseren Untersuchungen eine signifikante Reduktion zirkulierender HA bei Patienten mit aktivem Nikotinabusus demonstrieren. Diese Reduktion zirkulierender HA zeigte sich auch abhängig von der Dauer und Intensität (gemessen in PY) des fortgeführten Tabakkonsums. Unterschiede zwischen aktiven koronargesunden Rauchern und solchen mit stabiler KHK bzw. ACS waren nicht vorhanden. Wir konnten ebenfalls demonstrieren, dass sich zirkulierende Plasma-HA-Werte nach andauerndem Rauchstopp (> 4 Wochen) den Werten der Nichtraucher tendenziell wieder angleichen. Unsere Daten stimmen mit den Erkenntnissen von McDevitt *et al.* [199] überein, die *in vitro* eine prompte Reduktion der Kettenlänge von HA durch Exposition mit Zigarettenrauch nachweisen konnten. Dieser Effekt zeigte sich ebenfalls abhängig von der Menge an Zigaretten. Die Kettenlängenreduktion schwächte sich über die Zeit nach beendeter Zigarettenrauchexposition ab [199]. Savas *et al.* konnten *in vivo* bei Patienten mit ACS und aktiver Rauchanamnese eine verstärkte HYAL-2 Genexpression feststellen. HYAL sind in der Lage HMW-HA in pro-inflammatorische Fragmente bis zu 20 kDa enzymatisch zu zersetzen. Wir konnten in unserer Untersuchung keine Unterschiede zirkulierender Plasma-HA bei aktiven Rauchern ohne KHK, mit stabiler KHK respektive ACS nachweisen.

Ebenso ließ sich für Patienten mit erhöhtem LDL-Blutspiegel eine signifikante Reduktion zirkulierender Plasma-HA darstellen. Zirkulierende HA-Spiegel waren mit zunehmendem BMI, erhöhtem Gesamt-Cholesterin, Triacylglyceriden (TAG) und Lipoprotein a nicht signifikant korreliert. Die Plasma-HA-Spiegel von Patienten mit Hyperlipoproteinämie unter lipidsenkender Therapie (Statine, Cholesterinresorptionshemmer oder Fibrate) zeigten sich annähernd signifikant höher ($p=0,06$) als von Therapie-naiven.

Hinsichtlich Hyperlipoproteinämie konnten Berg *et al.* [23] im Mausmodell bei atherogener Diät – sprich fett- und cholesterinreich – eine inverse Korrelation zwischen eGC-Dicke und dem Intima-Media-Verhältnis feststellen. Vink *et al.* [200] zeigten darauf, dass die Verabreichung von ox-LDL zu einer Degradation der eGC mit Abbau endogener Schutzenzyme, wie z.B. der SOD, mit Störung der Mikrozirkulation durch lokale Plättchenadhäsion im Cremaster-Muskel beim Hamster führte. Eine gleichzeitige Infusion dieser Schutzenzyme zusammen mit ox-LDL hob den schädigen Effekt auf und reduzierte den oxidativen Stress auf die Endothelzellen.

Sowohl Zigarettenrauch als auch LDL nehmen über freie Radikale schädigenden Einfluss auf die Integrität der eGC und EZM. Die Annahme läge nahe, dass durch den schädigen Einfluss wie auch bei anderen Erkrankungszuständen mehr zirkulierende Plasma-HA in den Blutstrom freigesetzt und somit messbar wird.

An unseren *in vivo* Ergebnissen ist bemerkenswert, dass T2DM und Hypercholesterinämie – primär als eGC-schädigend angesehene Erkrankungen – einen gegenteiligen Effekt in Hinblick auf zirkulierende HA zu haben scheinen.

Über mögliche Ursachen für die deutliche Reduktion zirkulierender Plasma-HA lässt sich nur spekulieren. Möglicherweise könnte neben der HYAL-vermittelten Degradation von HA, die durch ROS-vermittelte in noch kleinere Fragmente ($< 6,4$ kDA) erfolgen, sodass diese Fragmente durch unser HA-Test-Kit nicht detektierbar waren und folglich deutlich weniger zirkulierende HA $> 6,4$ kDA gemessen werden konnte. Fragmente < 6 kDA konnten bereits bei malignen Tumorerkrankungen im Blut [144] – jedoch mit einem anderen als dem von uns genutzten Test-Kit – nachgewiesen werden.

Auf Basis unserer Erkenntnisse kann womöglich einem schädigenden Einfluss mit eGC/EZM-Destruktion und HA-Degradation unter Nikotinverzicht und mit medikamentöser Reduktion zirkulierenden LDLs messbar entgegengewirkt werden.

Zukünftige Elektrophorese-Untersuchungen hinsichtlich der Größe der freigesetzten HA-Moleküle im Blut wären von großem wissenschaftlichem Interesse.

4.2. Zeigen sich Unterschiede zirkulierender Plasma-HA-Level zwischen Patienten mit stabiler KHK und ACS?

In unserer Studie konnten wir tendenziell höhere, wenn auch nicht das Signifikanzniveau erreichende Werte zirkulierender HA bei Patienten mit koronarangiographisch nachgewiesener KHK im Vergleich zur koronargesunden Gruppe feststellen. Übereinstimmend konnten Grundmann *et al.* bei Patienten mit stabiler KHK in Blutproben, die aus Koronarkollateralen während der Herzkatheteruntersuchung gewonnen wurden, erhöhte HA-Werte im Vergleich zu systemisch gewonnenem Blut feststellen [84]. Bei nicht-diabetischen Patienten mit angiographisch nachgewiesener stabiler KHK im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe maßen Kucur *et al.* [201] erhöhte Werte von Serum-HYAL, die wohlmöglich an der vermehrten Degradation und Freisetzung von HA in den Blutstrom beteiligt sind.

Hinsichtlich Patienten mit stabiler KHK und ACS konnten wir mit marginaler Korrelation erniedrigte Werte beim ACS nachweisen ($p=0,07$). Eine deutlicheres Signifikanzniveau würde vermutlich bei höherer n-Zahl erreicht werden. Die Entität – ob NSTEMI oder STEMI – sowie das Ausmaß der Koronargefäßbeteiligung (1, 2 oder 3 Gefäße) scheint unseren Ergebnissen nach keinen Einfluss auf die Höhe zirkulierender HA zu haben.

Passend zu unseren Erkenntnissen konnten auch Li *et al.* [202] bei Patienten mit STEMI im Vergleich zu koronargesunden Patienten signifikant niedrigere Werte von zirkulierender Plasma-HA als auch seines Rezeptors CD44 nachweisen. Die Beurteilung des Grads der Koronarsklerose erfolgte *via* optischer Kohärenztomographie (OCT). Darüber hinaus zeigten sie, dass sich in Abhängigkeit von der Ätiologie des ACS – Plaqueeosion *versus* Plaqueruptur – eine signifikante Reduktion von Plasma-HA bei Patienten mit Plaqueeosion, nun auch gegenüber Patienten mit stabiler KHK und Plaqueruptur nachweisen ließ. Plaqueeosionen weisen höhere Konzentrationen von HA [10] und CD44 [10], [96] auf und werden häufiger bei jüngeren und weiblichen Patienten beobachtet, weshalb eine geringere KHK-prädisponierende Komorbiditätslast als ursächlich angenommen wurde [202].

Über die zugrundeliegenden Mechanismen der Reduktion von Plasma-HA bei Patienten mit ACS lässt sich auch hier nur spekulieren. Die Reduktion von Plasma-HA bzw. ihre Fragmentierung kann im Rahmen der Koronarischämie durch ROS [71] bzw. Hochregulierung von HYAL, u.a. auch auf aktivierten Blutplättchen am Thrombus [203], ausgelöst werden. Blutplättchen exprimieren auch den HA-Rezeptor CD44 [204], der an freies HA im Plasma binden könnte und somit nicht mehr frei messbar wäre.

Darüber hinaus konnte im entzündeten Gewebe, wie auch bei der Atherosklerose nachgewiesen werden, dass HA mit Monozyten sogenannte HA-*cables* [88], [89] bildet,

sodass freigewordenes HA hypothetisch in Interaktion mit zirkulierenden Blutzellen Komplexe bilden und so aus dem Plasma gebunden werden könnte. Ein entsprechendes Phänomen ist bisher jedoch nur interstitiell und nicht im Blutstrom beschrieben.

Die meisten der vorherigen Studien haben sich im Rahmen kardialer Ischämie auf HA im Gewebe bzw. im Plaque konzentriert. Daher sind Untersuchungen in diesem Kontext sowohl in Bezug auf freiwerdende Fragmente, als auch mögliche Zell-/Rezeptor-Interaktionen zum weiteren Verständnis unerlässlich.

4.3 Kann zirkulierende Plasma-HA als Biomarker bei nekrotischem Myokarduntergang dienen?

Biomarker im Allgemeinen sind körpereigene Moleküle, die anhand objektiv gemessener Abweichungen eines vordefinierten Normbereiches einen Krankheitsprozess oder eine Organschädigung anzeigen können.

Ein optimaler Biomarker muss spezifisch, in hoher Konzentration exprimiert und bei Zellschädigung in ebenfalls hoher Konzentration in den Blutstrom freigesetzt werden, sodass durch die gemessenen Veränderungen physiologische von pathologischen Prozessen abgegrenzt werden können. Herzbiomarker sind degradierte Proteinkomplexe zellulärer Strukturen, die in den Blutstrom übergehen, wenn es zur Schädigung von Myokardzellen kommt. Dies kann sowohl bei akutpathologischen als auch bei chronischen Prozessen auftreten. Die Bestimmung kardioischämischer Biomarker spielt eine besonders wichtige Rolle bei der spezifischen Diagnostik, Klassifizierung und Risikostratifizierung bei vermutetem ACS, die die Einleitung einer zeitnahen therapeutischen Revaskularisierung ermöglicht und somit prognosebestimmend ist.

Der erste Biomarker, der zur Diagnosefindung des AMI in den 1960er Jahren verwendet wurde, war die Aspartattransaminase (AST) [205]. Im Laufe der Jahre wurden weitere Biomarker wie die Laktatdehydrogenase (LDH) und die Creatinkinase (CK) genutzt. Allen gemein ist, dass sie neben dem Herzmuskel auch von anderen Geweben synthetisiert werden und sich daher nicht als spezifischer Myokardischämie-Marker erweisen [206]. Durch Elektrophoreseuntersuchungen konnten schließlich kardiospezifische Isoenzyme der CK (CK-MB) und LDH (LDH1, LDH2) detektiert werden. Sie haben eine geringere Spezifität und höhere Rate an falsch positiven Ergebnissen im Vergleich zu Markern wie dem kardialen Troponin [207]. Ein weiteres Protein, das Myoglobin, ein kugelförmiges, Häm-basiertes Protein, welches für den Sauerstofftransport innerhalb von Herz- und Skelettmuskelzellen verantwortlich ist, versprach spezifischer den ischämischen Muskelzerfall abzubilden. Da jedoch nicht nur nach Myokardischämie, sondern auch Schädigung der Skelettmuskulatur Myoglobin ins Blut freigesetzt wird, eignet sich Myoglobin ebenfalls nicht als spezifischer myokardialer Nekrosemarker [207]. Troponin wurde 1963 als zusätzliches Protein im kontraktilem Apparat von Skelett- und Herzmuskelzellen erstbeschrieben [208]. Zusammen mit Calciumionen regulieren die Troponin-Proteine die Wechselwirkung zwischen Aktin- und Myosinfilamenten bei der Muskelkontraktion. Kardiales Troponin (cTn) ist ein Komplex, der aus drei Untereinheiten besteht: Troponin T (cTnT; Tropomyosin-bindende Untereinheit), Troponin C (cTnC; Calcium-bindende Untereinheit), Troponin I (cTnI;

inhibitorische Untereinheit). cTnT und cTnI werden speziell im Herzmuskel exprimiert, wohingegen Troponin C auch im Skelettmuskel synthetisiert wird. Daher sind cTnT und cTnI-Konzentrationen hochspezifische und sensitive Blutserum-Marker als Zeichen untergegangenen Herzmuskelgewebes, die mit der Infarktgröße korrelieren [209] und aktuell den Goldstandard in der myokardialen Infarkt Diagnostik ausmachen.

Seit Mitte der 1980-er Jahre wurde an einem zuverlässigen Radioimmuno-Assay zum Nachweis cTns im Blutserum gearbeitet [210]. Obwohl cTnT und cTnI vergleichbare diagnostische Exaktheit aufweisen, hat sich cTnT gegenüber cTnI durch bessere prognostische Vorhersagekraft abgegrenzt [211].

Den heutigen Goldstandard macht die sogenannte *high-sensitive* Messmethode aus, die im Gegensatz zu den üblichen Troponin-Bestimmungen höhere diagnostische Messgenauigkeit aufweist [212].

Um den früheren diagnostischen Ein-/Ausschluss bei vermutetem ACS bzw. eine prognostische Risikostratifizierung zu ermöglichen, gab es Überlegungen, ob ergänzende Multimarker-Bestimmungen z.B. von Copeptin, *high sensitive C-reactive protein* (hsCRP), *heart-type fatty acid binding protein* (H-FABP) bzw. *growth differentiation factor 15* (GDF-15) hilfreich sein könnten [189].

Denn trotz hoher Test-Spezifität können multiple Variablen [213]–[215] die cTn-Konzentration beeinflussen. Hierzu gehören u.a. Lebensalter, akute bzw. chronische Niereninsuffizienz, Zeit seit Eintreten der thorakalen Beschwerden und das Geschlecht. Neben diesen können auch eine Vielzahl anderer kardialer Erkrankungszustände für eine myokardiale Zellschädigung sorgen und somit zu einer cTn-Elevation führen. Hierzu gehören z.B. Herzrhythmusstörungen, Herzinsuffizienz, hypertensive Entgleisung, Myokarditis, Herzklappenerkrankungen, Aortendissektion und medikamentös-toxische Herzschädigung. Auch nicht-kardiogene Entitäten wie Sepsis, akute neurologische Ereignisse (Infarkt oder Blutung), Schilddrüsenfunktionsstörungen oder extreme Ausdaueranstrengung können einen Anstieg des cTns auslösen.

Auch für zirkulierende HA konnten ähnliche Zustände (so z.B. Lebensalter, CKD, Sepsis, Ausdaueranstrengung; siehe Kapitel 1.4.3) nachgewiesen werden, die zu einem Anstieg in den Blutstrom freigesetzter HA führten. Tatsächlich gilt Serum-HA bereits seit mehreren Jahren als etablierter und zuverlässiger Biomarker für die Leberzirrhose [149].

Zunächst untersuchten wir die Verläufe von cTnT. Diese zeigten sich kongruent mit der bereits beschriebenen Kinetik von cTnT nach ACS [216]: So konnte demonstriert werden, dass bereits eine Stunde nach Einsetzen der Symptome bei einem Patienten mit AMI cTnT im Serum ansteigt und sein Maximum nach 12 Stunden findet.

Katus *et al.* wiesen bei früh-revaskularisierten Patienten ($\leq 3,5$ h nach Beschwerdebeginn) erhöhte Spiegel von frei zirkulierendem zytosolischen cTnT mit einem starken Anstieg an Tag 1 nach Beschwerdebeginn bzw. Intervention (sogenanntes *wash out*) nach [217].

In unserer Untersuchung konnte nach perkutaner Koronarintervention ein rascher Anstieg des hs-cTnT-Niveaus demonstriert werden (Stunde 24) mit in etwa stabilem Verlauf bis zu Stunde 96. Der Verlauf von zirkulierender Plasma-HA nach kardialer Ischämie stellte sich fast invers zu den cTnT-Messwerten dar. Die Ausgangswerte bei Aufnahme in der Notfallambulanz waren im Vergleich zu dem berechneten Normbereich koronargesunder Patienten (Gruppe „keine KHK“) niedriger und flachten auf ein Minimalniveau von ca. 20 ng/ml ab (Stunde 48). In Stunde 72 kam es zu einem erneuten Anstieg auf etwa den oberen kalkulierten Normbereich der gesunden Vergleichsgruppe. Zu Stunde 96 zeigte sich dieser Trend wieder rückläufig. Diese zeitlichen Schwankungen zeigten sich jedoch nicht statistisch signifikant.

Wir untersuchten bei Patienten mit ACS Level zirkulierender Plasma-HA im Zeitfenster von insgesamt 96 Stunden nach Krankenhausaufnahme bei Herzinfarkt in Hinblick darauf, ob Plasma-HA möglicherweise als zusätzlicher Biomarker bei myokardialer Nekrose dienen kann.

Wie bereits im Kapitel 4.2 aufgeführt, konnten bei Patienten mit ACS im Vergleich zu Patienten mit stabiler KHK erniedrigte Plasma-HA-Werte nachgewiesen werden.

Im Vergleich zu gängigen kardialen Nekrosemarkern (cTnT und CK) zeigte Plasma-HA keinen kongruenten Verlauf innerhalb der ersten 96 Stunden nach Krankenhausaufnahme, siehe **Abb. 13**.

Dazu passend konnten Ostrowski *et al.* keine Korrelation zwischen cTn und zirkulierendem Syndecan– einer ebenfalls bedeutenden Komponente der eGC – bei STEMI-Patienten feststellen [218].

Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen wurden im Jahr 2019 bzw. 2021 zwei Studien publiziert, die bei Patienten mit akuter kardialer Ischämie (bei STEMI) zirkulierende Plasma-HA-Level bestimmt haben [202], [219].

Li *et al.* erklärten, dass Plasma-HA möglicherweise dazu dienen kann, Patienten mit ACS abhängig von der Ätiologie (Plaqueruptur bzw. -erosion) voneinander zu determinieren, da bei Patienten mit Plaqueruptur deutlich niedrigere Plasma-HA-Werte festgestellt werden konnten [202].

Savas *et al.* [219] analysierten Plasma-HA-Level an Tag 0, 7 und 30 nach AMI.

Sie proklamierten, dass es während eines ACS zu einem Plasma-HA-Anstieg komme.

Bei differenzierter Betrachtung kann man den Daten in der Akutphase ebenfalls niedrige zirkulierende HA-Level von $33,2 \pm 3,1$ ng/ml entnehmen, die somit nicht in Widerspruch zu unseren Daten und denen von Li *et al.* stehen.

Savas *et al.* konnten an Tag 7 signifikant steigende Werte ($46,2 \pm 5,9$ ng/ml) zeigen, die an Tag 30 auf eleviertem Niveau (max. $50,1 \pm 5,1$ ng/ml) verblieben. Weiterhin konnten sie an Tag 30 erhöhte HA-Werte bei Patienten mit einem Vorderwandinfarkt nachweisen, was sie in einer anzunehmenden größeren Infarktzone begründet sahen [219].

Ein Wiederanstieg der Plasma-HA nach akutem ischämischen Ereignis mit Degradation von Plasma-HA kann zum einen eine „Normalisierung“ der HA-Spiegel auf ein anzunehmendes Ausgangsniveau eines Patienten mit stabiler KHK nach überwundenem ACS darstellen. Wir konnten bei Patienten mit stabiler KHK, die bereits in der Vorgeschichte ein ischämisches Ereignis (Schlaganfall oder ACS) erlitten haben, signifikant höhere zirkulierende Plasma-HA-Spiegel nachweisen, als bei solchen, die keine ischämische Komplikationen aufwiesen (**Abb. 12b**).

Es konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass degradierte HA, speziell in der Größenordnung 3-10 Disaccharide, die Angiogenese fördern kann, hier speziell auch nach Myokardinfarkt [220]. *Post*-ischämisch induzierte Angiogenese führt zur Bildung von Kollateral-Koronargefäßen. Bereits bei Patienten mit stabiler KHK konnten Xi *et al.* zeigen, dass je besser die Koronar-Kollateraläste ausgebildet, desto höher die Plasma-HA-Level nachweisbar waren [221].

Möglicherweise kann der *post*-ischämische Wiederanstieg zirkulierender Plasma-HA Ausdruck von Adaptationsmechanismen im Rahmen des *remodelings* sein, die den Erhalt der Organfunktion zum Ziel haben.

Zirkulierende Plasma-HA kann womöglich als ergänzender kardialer Marker bei nekrotischem Myokarduntergang dienen, auch wenn sich ihr Verlauf – eher untypisch – im Vergleich zu bewährten Nekrosemarkern wie dem cTnT, mit inversem Verlauf darstellt. Aber gerade dieses Merkmal ist für die Bestimmung der Plasma-HA – trotz ihres ubiquitären Vorkommens im Organismus – vorteilhaft. Obwohl sie in Abhängigkeit von Lebensalter, Ausdaueranstrengung und bei den meisten Krankheitszuständen (so z.B. Leberzirrhose, CKD, Sepsis, Tumoren, T2DM) erhöht im Blut nachzuweisen ist, zeigt sie sich bei Patienten mit ACS, wie nun in drei Studien bestätigt werden konnte, erniedrigt im Vergleich zu Patienten mit stabiler KHK. So könnte sie zumindest ergänzend zu cTnT (als dem Goldstandard) eingesetzt werden, wobei für ihre Bestimmung im Notfall schnellere, validierte und breitverfügbare Testverfahren von Nöten wären.

4.4 Limitationen

Diese Studie weist mehrere potenzielle Limitationen auf.

Zum einen wurde unsere Studie nur an einem einzigen Zentrum mit begrenzter Patientenzahl durchgeführt. Zum anderen mussten durch die vordefinierten, strengen Ein- und Ausschlusskriterien einige primär rekrutierte Patienten von dieser Studie wieder ausgeschlossen werden, siehe **Abb. 3**. In der KHK-Kohorte wurden nur solche Patienten eingeschlossen, bei denen mindestens eine > 50%ige Diameter-Stenose eines Koronargefäßes nachgewiesen wurde. Die Koronarangiographie als Luminographie der Herzkranzgefäße gilt als Goldstandard zur Detektion von Koronarstenosen. Jedoch ist dieses Verfahren bei rein visueller Beurteilung untersucherabhängig, und so eine mögliche Unterschätzung der Plaquelast nicht auszuschließen.

Die Stichprobengröße ist eher klein und ein möglicher Auswahlbias trotz der vordefinierten Kriterien nicht auszuschließen. Eine multizentrische Studie mit einer größeren Anzahl von Patienten ist notwendig, um die Gültigkeit unserer Schlussfolgerungen zu bestätigen.

Zum anderen hat das verwendete Testkit (*Hyaluronic Acid Test Kit*, Corgenix Incorporation, Broomfield, Colorado 80020, USA; *European Patent Number* (EP) 283779) zwar eine geringe Test-Variabilität und hohe Akkuranz, jedoch konnten Haserodt *et al.* zeigen, dass es für die Bestimmung von LMW-HA < 6,4 kDA nicht geeignet ist [222]. Daher kann in dieser Arbeit keine abschließende Aussage über Spiegel zirkulierender LMW-HA dieser Größe getroffen werden.

4.5 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die vorliegende Studie ist eine der ersten, die bei Patienten mit angiographisch gesicherter KHK zirkulierende Plasma-HA-Spiegel untersucht hat.

Zusammenfassend deuten die vorliegenden Ergebnisse erstmalig *in vivo* darauf hin, dass sowohl mit aktivem Nikotinabusus als auch LDL- Hyperlipoproteinämie zirkulierende HA im Plasma reduziert vorliegt. Ebenso konnte niedrigere HA-Werte bei Patienten mit ACS im Vergleich zu den beiden anderen Kohorten nachgewiesen werden. Unseren Erkenntnissen zufolge kann wohlmöglich durch anhaltenden Rauchverzicht und Einsatz medikamentöser Lipidsenker einem schädigenden Einfluss mit eGC/EZM-Destruktion und HA-Degradation messbar entgegengewirkt werden.

Zum anderen könnte Plasma-HA – da sie anders als bei anderen Erkrankungszuständen nicht erhöht im Blutstrom messbar ist – als ergänzender Marker zu cTnT bei kardialer Ischämie dienen und auch zwischen Plaqueruptur und -erosion diskriminieren [202]. Dies könnte helfen, die therapeutische Versorgung entsprechender Patienten zu optimieren.

Gründe für die messbare Reduktion von Plasma-HA bleiben bis jetzt unklar, und über sie lässt sich spekulieren. Multizentrische Studien mit einem größeren Patientenkollektiv sind hinsichtlich zirkulierender HA unerlässlich, um Fragen betreffend der Relevanz von Fragmentgröße, als auch möglicher HA-bindender Zell-/Rezeptor-Interaktionen zu beantworten. Übergeordnet können die Erkenntnisse zu zirkulierender HA helfen, um endotheliale Schädigung zu detektieren und therapeutische – bestenfalls präventive – Möglichkeiten zu entwickeln, die die endotheliale Glykokalyx als wichtigste vaskuläre Schutzbarriere präservieren. Es gibt Hinweise, dass Infusion von eGC-Bestandteilen helfen kann, geschädigte eGC zu rekonstituieren. Ziel sollte sein, den Prozess der Atherogenese abzumildern bzw. aufzuhalten, um ischämische Komplikationen, die jährlich weiterhin noch zu viele Menschenleben kosten, zu verhindern. Um Plasma-HA als ergänzenden Marker bei Myokardnekrose einzusetzen, müsste im Rahmen der Akutversorgung ein schnelleres, validiertes und flächendeckend verfügbares Messverfahren für Plasma-HA entwickelt werden.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

- [1] A. Gößwald, A. Schienkiewitz, E. Nowossadeck, and M. A. Busch, "Prävalenz von Herzinfarkt und koronarer Herzkrankheit bei Erwachsenen im Alter von 40 bis 79 Jahren in Deutschland," *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, vol. 56, no. 5–6, pp. 650–655, 2013, doi: 10.1007/s00103-013-1666-9.
- [2] "Nationale VersorgungsLeitlinie Chronische KHK - Langfassung, 5. Auflage. Version 1." <https://www.leitlinien.de/mdb/downloads/nvl/khk/khk-5aufl-vers1-lang.pdf> (accessed Jan. 20, 2021).
- [3] S. Yusuf *et al.*, "Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study," *Lancet*, vol. 364, no. 9438, pp. 937–952, 2004, doi: 10.1016/s0140-6736(04)17018-9.
- [4] P. et al., "ESC-Pocket-Leitlinie Prävention von Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Deutsche Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung (DGK)," 2016. https://leitlinien.dgk.org/files/PL_Pr%c3%a4vention_Internet_13.pdf (accessed Jan. 20, 2021).
- [5] E. Falk, "Plaque rupture with severe pre-existing stenosis precipitating coronary thrombosis. Characteristics of coronary atherosclerotic plaques underlying fatal occlusive thrombi.," *Brit Heart J*, vol. 50, no. 2, p. 127, 1983, doi: 10.1136/hrt.50.2.127.
- [6] M. J. Davies and A. C. Thomas, "Plaque fissuring--the cause of acute myocardial infarction, sudden ischaemic death, and crescendo angina.," *Brit Heart J*, vol. 53, no. 4, p. 363, 1985, doi: 10.1136/hrt.53.4.363.
- [7] N. G. Frangogiannis, "Comprehensive Physiology," *Compr Physiol*, vol. 5, no. 4, pp. 1841–1875, 2015, doi: 10.1002/cphy.c150006.
- [8] G. K. Hansson, P. Libby, and I. Tabas, "Inflammation and plaque vulnerability," *J Intern Med*, vol. 278, no. 5, pp. 483–493, 2015, doi: 10.1111/joim.12406.
- [9] E. Arbustini *et al.*, "Plaque erosion is a major substrate for coronary thrombosis in acute myocardial infarction," *Heart*, vol. 82, no. 3, p. 269, 1999, doi: 10.1136/hrt.82.3.269.
- [10] R. A. Partida, P. Libby, F. Crea, and I.-K. Jang, "Plaque erosion: a new in vivo diagnosis and a potential major shift in the management of patients with acute coronary syndromes," *Eur Heart J*, vol. 39, no. 22, pp. 2070–2076, 2018, doi: 10.1093/eurheartj/ehx786.
- [11] M. T. Roe *et al.*, "Treatments, Trends, and Outcomes of Acute Myocardial Infarction and Percutaneous Coronary Intervention," *J Am Coll Cardiol*, vol. 56, no. 4, pp. 254–263, 2010, doi: 10.1016/j.jacc.2010.05.008.
- [12] A. E. Moran *et al.*, "The Global Burden of Ischemic Heart Disease in 1990 and 2010," *Circulation*, vol. 129, no. 14, pp. 1493–1501, 2014, doi: 10.1161/circulationaha.113.004046.

- [13] R. A. Kloner, "Current State of Clinical Translation of Cardioprotective Agents for Acute Myocardial Infarction," *Circ Res*, vol. 113, no. 4, pp. 451–463, 2013, doi: 10.1161/circresaha.112.300627.
- [14] B. Ibáñez, G. Heusch, M. Ovize, and F. V. de Werf, "Evolving Therapies for Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury," *J Am Coll Cardiol*, vol. 65, no. 14, pp. 1454–1471, 2015, doi: 10.1016/j.jacc.2015.02.032.
- [15] F. H. Epstein and R. Ross, "Atherosclerosis — An Inflammatory Disease," *New Engl J Med*, vol. 340, no. 2, pp. 115–126, 1999, doi: 10.1056/nejm199901143400207.
- [16] J. M. Wells, A. Gaggari, and J. E. Blalock, "MMP generated matrikines," *Matrix Biol*, vol. 44, pp. 122–129, 2015, doi: 10.1016/j.matbio.2015.01.016.
- [17] E. Tremoli, M. Camera, V. Toschi, and S. Colli, "Tissue factor in atherosclerosis," *Atherosclerosis*, vol. 144, no. 2, pp. 273–283, 1999, doi: 10.1016/s0021-9150(99)00063-5.
- [18] A. N. Nowbar, M. Gitto, J. P. Howard, D. P. Francis, and R. Al-Lamee, "Mortality From Ischemic Heart Disease," *Circulation Cardiovasc Qual Outcomes*, vol. 12, no. 6, p. e005375, 2019, doi: 10.1161/circoutcomes.118.005375.
- [19] A. R. Pries, T. W. Secomb, and P. Gaehtgens, "The endothelial surface layer," *Pflügers Archiv - European J Physiology*, vol. 440, no. 5, pp. 653–666, 2000, doi: 10.1007/s004240000307.
- [20] S. Reitsma, D. W. Slaaf, H. Vink, M. A. M. J. van Zandvoort, and M. G. A. oude Egbrink, "The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization," *Pflügers Archiv - European J Physiology*, vol. 454, no. 3, pp. 345–359, 2007, doi: 10.1007/s00424-007-0212-8.
- [21] L. N. Broekhuizen, H. L. Mooij, J. J. Kastelein, E. S. Stroes, H. Vink, and M. Nieuwdorp, "Endothelial glycocalyx as potential diagnostic and therapeutic target in cardiovascular disease," *Curr Opin Lipidol*, vol. 20, no. 1, pp. 57–62, 2009, doi: 10.1097/mol.0b013e328321b587.
- [22] H. Vink and B. R. Duling, "Capillary endothelial surface layer selectively reduces plasma solute distribution volume," *Am J Physiol-heart C*, vol. 278, no. 1, pp. H285–H289, 2000, doi: 10.1152/ajpheart.2000.278.1.h285.
- [23] B. M. van den Berg, J. A. E. Spaan, T. M. Rolf, and H. Vink, "Atherogenic region and diet diminish glycocalyx dimension and increase intima-to-media ratios at murine carotid artery bifurcation," *Am J Physiol-heart C*, vol. 290, no. 2, pp. H915–H920, 2006, doi: 10.1152/ajpheart.00051.2005.
- [24] M. Rehm *et al.*, "Shedding of the Endothelial Glycocalyx in Patients Undergoing Major Vascular Surgery With Global and Regional Ischemia," *Circulation*, vol. 116, no. 17, pp. 1896–1906, 2007, doi: 10.1161/circulationaha.106.684852.
- [25] B. F. Becker, M. Jacob, S. Leipert, A. H. J. Salmon, and D. Chappell, "Degradation of the endothelial glycocalyx in clinical settings: searching for the sheddases.," *Brit J Clin Pharmacol*, vol. 80, no. 3, pp. 389–402, 2015, doi: 10.1111/bcp.12629.

- [26] M. Nieuwdorp, M. C. Meuwese, H. Vink, J. B. Hoekstra, J. J. Kastelein, and E. S. Stroes, "The endothelial glycocalyx; a potential barrier between health and vascular disease," *Curr Opin Lipidol*, vol. 16, no. 5, pp. 507–511, 2005, doi: 10.1097/01.mol.0000181325.08926.9c.
- [27] M. L. Ballinger, J. Nigro, K. V. Frontanilla, A. M. Dart, and P. J. Little, "Regulation of glycosaminoglycan structure and atherogenesis," *Cell Mol Life Sci Cmls*, vol. 61, no. 11, pp. 1296–1306, 2004, doi: 10.1007/s00018-004-3389-4.
- [28] D. Bruegger *et al.*, "Acute degradation of the endothelial glycocalyx in infants undergoing cardiac surgical procedures.," *Ann Thorac Surg*, vol. 99, no. 3, pp. 926–31, 2015, doi: 10.1016/j.athoracsur.2014.10.013.
- [29] Q. Wu *et al.*, "Correlation between acute degradation of the endothelial glycocalyx and microcirculation dysfunction during cardiopulmonary bypass in cardiac surgery," *Microvasc Res*, vol. 124, pp. 37–42, 2019, doi: 10.1016/j.mvr.2019.02.004.
- [30] Z. Abassi, Z. Armaly, and S. N. Heyman, "Glycocalyx degradation in ischemia-reperfusion injury.," *Am J Pathology*, vol. 190, no. 4, pp. 752–767, 2020, doi: 10.1016/j.ajpath.2019.08.019.
- [31] B. J. Ward and J. L. Donnelly, "Hypoxia induced disruption of the cardiac endothelial glycocalyx: implications for capillary permeability," *Cardiovasc Res*, vol. 27, no. 3, pp. 384–389, 1993, doi: 10.1093/cvr/27.3.384.
- [32] A. Nelson, I. Berkestedt, and M. Bodelsson, "Circulating glycosaminoglycan species in septic shock.," *Acta Anaesth Scand*, vol. 58, no. 1, pp. 36–43, 2013, doi: 10.1111/aas.12223.
- [33] T. Iba and J. H. Levy, "Derangement of the endothelial glycocalyx in sepsis," *J Thromb Haemost*, vol. 17, no. 2, pp. 283–294, 2019, doi: 10.1111/jth.14371.
- [34] T. H. Nguyen, S. Liu, G. J. Ong, I. Stafford, M. P. Frenneaux, and J. D. Horowitz, "Glycocalyx shedding is markedly increased during the acute phase of Takotsubo cardiomyopathy," *Int J Cardiol*, vol. 243, pp. 296–299, 2017, doi: 10.1016/j.ijcard.2017.04.085.
- [35] M. Nieuwdorp *et al.*, "Loss of Endothelial Glycocalyx During Acute Hyperglycemia Coincides With Endothelial Dysfunction and Coagulation Activation In Vivo," *Diabetes*, vol. 55, no. 2, pp. 480–486, 2006, doi: 10.2337/diabetes.55.02.06.db05-1103.
- [36] H. Vink, A. A. Constantinescu, and J. A. E. Spaan, "Oxidized Lipoproteins Degrade the Endothelial Surface Layer," *Circulation*, vol. 101, no. 13, pp. 1500–1502, 2000, doi: 10.1161/01.cir.101.13.1500.
- [37] M. Rienks, A.-P. Papageorgiou, N. G. Frangogiannis, and S. Heymans, "Myocardial Extracellular Matrix," *Circ Res*, vol. 114, no. 5, pp. 872–888, 2014, doi: 10.1161/circresaha.114.302533.
- [38] N. G. Frangogiannis, "The Extracellular Matrix in Ischemic and Nonischemic Heart Failure," *Circ Res*, vol. 125, no. 1, pp. 117–146, 2019, doi: 10.1161/circresaha.119.311148.

- [39] H. Järveläinen, A. Sainio, M. Koulu, T. N. Wight, and R. Penttinen, "Extracellular Matrix Molecules: Potential Targets in Pharmacotherapy," *Pharmacol Rev*, vol. 61, no. 2, pp. 198–223, 2009, doi: 10.1124/pr.109.001289.
- [40] F. A. Venning, L. Wullkopf, and J. T. Erler, "Targeting ECM Disrupts Cancer Progression," *Frontiers Oncol*, vol. 5, p. 224, 2015, doi: 10.3389/fonc.2015.00224.
- [41] A. D. Theocharis, S. S. Skandalis, C. Gialeli, and N. K. Karamanos, "Extracellular matrix structure," *Adv Drug Deliver Rev*, vol. 97, pp. 4–27, 2016, doi: 10.1016/j.addr.2015.11.001.
- [42] H. Yang, T. K. Borg, Z. Wang, Z. Ma, and B. Z. Gao, "Role of the Basement Membrane in Regulation of Cardiac Electrical Properties," *Ann Biomed Eng*, vol. 42, no. 6, pp. 1148–1157, 2014, doi: 10.1007/s10439-014-0992-x.
- [43] P. Kong, P. Christia, and N. G. Frangogiannis, "The pathogenesis of cardiac fibrosis," *Cell Mol Life Sci*, vol. 71, no. 4, pp. 549–574, 2014, doi: 10.1007/s00018-013-1349-6.
- [44] L. Li, Q. Zhao, and W. Kong, "Extracellular matrix remodeling and cardiac fibrosis," *Matrix Biol*, vol. 68–69, pp. 490–506, 2018, doi: 10.1016/j.matbio.2018.01.013.
- [45] I. Russo and N. G. Frangogiannis, "Diabetes-associated cardiac fibrosis: Cellular effectors, molecular mechanisms and therapeutic opportunities," *J Mol Cell Cardiol*, vol. 90, pp. 84–93, 2016, doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.12.011.
- [46] K. R. Hutchinson, C. K. Lord, T. A. West, and J. A. Stewart, "Cardiac Fibroblast-Dependent Extracellular Matrix Accumulation Is Associated with Diastolic Stiffness in Type 2 Diabetes," *Plos One*, vol. 8, no. 8, p. e72080, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0072080.
- [47] C. Gonzalez-Quesada *et al.*, "Thrombospondin-1 Induction in the Diabetic Myocardium Stabilizes the Cardiac Matrix in Addition to Promoting Vascular Rarefaction Through Angiopoietin-2 Upregulation," *Circ Res*, vol. 113, no. 12, pp. 1331–1344, 2013, doi: 10.1161/circresaha.113.302593.
- [48] V. W. Fischer, H. B. Barner, and L. S. Larose, "Pathomorphologic aspects of muscular tissue in diabetes mellitus," *Hum Pathol*, vol. 15, no. 12, pp. 1127–1136, 1984, doi: 10.1016/s0046-8177(84)80307-x.
- [49] K. H. van Hoeven and S. M. Factor, "A comparison of the pathological spectrum of hypertensive, diabetic, and hypertensive-diabetic heart disease.," *Circulation*, vol. 82, no. 3, pp. 848–855, 2018, doi: 10.1161/01.cir.82.3.848.
- [50] B. C. Berk, K. Fujiwara, and S. Lehoux, "ECM remodeling in hypertensive heart disease," *J Clin Invest*, vol. 117, no. 3, pp. 568–575, 2007, doi: 10.1172/jci31044.
- [51] H. E. Kim, S. S. Dalal, E. Young, M. J. Legato, M. L. Weisfeldt, and J. D'Armiento, "Disruption of the myocardial extracellular matrix leads to cardiac dysfunction," *J Clin Invest*, vol. 106, no. 7, pp. 857–866, 2000, doi: 10.1172/jci8040.

- [52] K. E. Porter and N. A. Turner, "Cardiac fibroblasts: At the heart of myocardial remodeling," *Pharmacol Therapeut*, vol. 123, no. 2, pp. 255–278, 2009, doi: 10.1016/j.pharmthera.2009.05.002.
- [53] P. H. Weigel, V. C. Hascall, and M. Tammi, "Hyaluronan Synthases*," *J Biol Chem*, vol. 272, no. 22, pp. 13997–14000, 1997, doi: 10.1074/jbc.272.22.13997.
- [54] N. Itano and K. Kimata, "Mammalian Hyaluronan Synthases," *Iubmb Life*, vol. 54, no. 4, pp. 195–199, 2002, doi: 10.1080/15216540214929.
- [55] P. Prehm, "Hyaluronate is synthesized at plasma membranes," *Biochem J*, vol. 220, no. 2, pp. 597–600, 1984, doi: 10.1042/bj2200597.
- [56] T. C. Laurent and J. R. Fraser, "Hyaluronan.," *Faseb J Official Publ Fed Am Soc Exp Biology*, vol. 6, no. 7, pp. 2397–404, 1992, doi: 10.1096/fasebj.6.7.1563592.
- [57] B. P. Toole, "Hyaluronan in morphogenesis," *Semin Cell Dev Biol*, vol. 12, no. 2, pp. 79–87, 2001, doi: 10.1006/scdb.2000.0244.
- [58] K. M. Stuhlmeier and C. Pollaschek, "Differential Effect of Transforming Growth Factor β (TGF- β) on the Genes Encoding Hyaluronan Synthases and Utilization of the p38 MAPK Pathway in TGF- β -induced Hyaluronan Synthase 1 Activation*," *J Biol Chem*, vol. 279, no. 10, pp. 8753–8760, 2004, doi: 10.1074/jbc.m303945200.
- [59] R. H. Tammi *et al.*, "Transcriptional and post-translational regulation of hyaluronan synthesis," *Febs J*, vol. 278, no. 9, pp. 1419–1428, 2011, doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08070.x.
- [60] N. Itano *et al.*, "Three Isoforms of Mammalian Hyaluronan Synthases Have Distinct Enzymatic Properties*," *J Biol Chem*, vol. 274, no. 35, pp. 25085–25092, 1999, doi: 10.1074/jbc.274.35.25085.
- [61] P. Heldin, C.-Y. Lin, C. Kolliopoulos, Y.-H. Chen, and S. S. Skandalis, "Regulation of hyaluronan biosynthesis and clinical impact of excessive hyaluronan production," *Matrix Biol*, vol. 78, pp. 100–117, 2019, doi: 10.1016/j.matbio.2018.01.017.
- [62] D. Vigetti, E. Karousou, M. Viola, S. Deleonibus, G. D. Luca, and A. Passi, "Hyaluronan: Biosynthesis and signaling," *Biochimica Et Biophysica Acta Bba - Gen Subj*, vol. 1840, no. 8, pp. 2452–2459, 2014, doi: 10.1016/j.bbagen.2014.02.001.
- [63] B. P. Toole, "Hyaluronan and its binding proteins, the hyaladherins," *Curr Opin Cell Biol*, vol. 2, no. 5, pp. 839–844, 1990, doi: 10.1016/0955-0674(90)90081-o.
- [64] W. Knudson and C. B. Knudson, "Assembly of a chondrocyte-like pericellular matrix on non-chondrogenic cells. Role of the cell surface hyaluronan receptors in the assembly of a pericellular matrix," *J Cell Sci*, vol. 99, no. 2, pp. 227–235, 1991, doi: 10.1242/jcs.99.2.227.
- [65] A. Aruffo, I. Stamenkovic, M. Melnick, C. B. Underhill, and B. Seed, "CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate," *Cell*, vol. 61, no. 7, pp. 1303–1313, 1990, doi: 10.1016/0092-8674(90)90694-a.

- [66] J. R. E. Fraser, T. C. Laurent, and U. B. G. Laurent, "Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover," *J Intern Med*, vol. 242, no. 1, pp. 27–33, 1997, doi: 10.1046/j.1365-2796.1997.00170.x.
- [67] R. Stern, A. A. Asari, and K. N. Sugahara, "Hyaluronan fragments: An information-rich system," *Eur J Cell Biol*, vol. 85, no. 8, pp. 699–715, 2006, doi: 10.1016/j.ejcb.2006.05.009.
- [68] G. Lepperdinger, B. Strobl, and G. Kreil, "HYAL2, a Human Gene Expressed in Many Cells, Encodes a Lysosomal Hyaluronidase with a Novel Type of Specificity*," *J Biol Chem*, vol. 273, no. 35, pp. 22466–22470, 1998, doi: 10.1074/jbc.273.35.22466.
- [69] E. J. Bates, G. S. Harper, D. A. Lowther, and B. N. Preston, "Effect of oxygen-derived reactive species on cartilage proteoglycan-hyaluronate aggregates.," *Biochem Int*, vol. 8, no. 5, pp. 629–37, 1984.
- [70] A. Panasyuk, E. Frati, D. Ribault, and D. Mitrovic, "Effect of reactive oxygen species on the biosynthesis and structure of newly synthesized proteoglycans," *Free Radical Bio Med*, vol. 16, no. 2, pp. 157–167, 1994, doi: 10.1016/0891-5849(94)90139-2.
- [71] L. Šoltés, R. Mendichi, G. Kogan, J. Schiller, M. Stankovská, and J. Arnhold, "Degradative Action of Reactive Oxygen Species on Hyaluronan," *Biomacromolecules*, vol. 7, no. 3, pp. 659–668, 2006, doi: 10.1021/bm050867v.
- [72] D. Nikitovic, K. Kouvidi, R.-M. Kavasi, A. Berdiaki, and G. N. Tzanakakis, "Hyaluronan/Hyaladherins - a Promising Axis for Targeted Drug Delivery in Cancer," *Curr Drug Deliv*, vol. 13, no. 4, pp. 500–511, 2016, doi: 10.2174/1567201813666151109103013.
- [73] C. A. de la Motte, V. C. Hascall, J. Drazba, S. K. Bandyopadhyay, and S. A. Strong, "Mononuclear Leukocytes Bind to Specific Hyaluronan Structures on Colon Mucosal Smooth Muscle Cells Treated with Polyinosinic Acid:Polycytidylic Acid Inter- α -Trypsin Inhibitor Is Crucial to Structure and Function," *Am J Pathology*, vol. 163, no. 1, pp. 121–133, 2003, doi: 10.1016/s0002-9440(10)63636-x.
- [74] T. A. Jokela *et al.*, "Induction of Hyaluronan Cables and Monocyte Adherence in Epidermal Keratinocytes," *Connect Tissue Res*, vol. 49, no. 3–4, pp. 115–119, 2009, doi: 10.1080/03008200802148439.
- [75] S. P. Kessler, D. R. Obery, and C. de la Motte, "Hyaluronan Synthase 3 Null Mice Exhibit Decreased Intestinal Inflammation and Tissue Damage in the DSS-Induced Colitis Model," *Int J Cell Biology*, vol. 2015, pp. 1–13, 2015, doi: 10.1155/2015/745237.
- [76] Y. Y. Sun and K. E. Keller, "Hyaluronan cable formation by ocular trabecular meshwork cells," *Exp Eye Res*, vol. 139, pp. 97–107, 2015, doi: 10.1016/j.exer.2015.07.018.
- [77] A. J. Day and C. A. de la Motte, "Hyaluronan cross-linking: a protective mechanism in inflammation?," *Trends Immunol*, vol. 26, no. 12, pp. 637–643, 2005, doi: 10.1016/j.it.2005.09.009.

- [78] C. Termeer *et al.*, "Oligosaccharides of Hyaluronan Activate Dendritic Cells via Toll-like Receptor 4," *J Exp Medicine*, vol. 195, no. 1, pp. 99–111, 2002, doi: 10.1084/jem.20001858.
- [79] F. Gao *et al.*, "Extracellular Superoxide Dismutase Inhibits Inflammation by Preventing Oxidative Fragmentation of Hyaluronan*," *J Biol Chem*, vol. 283, no. 10, pp. 6058–6066, 2008, doi: 10.1074/jbc.m709273200.
- [80] T. Nakamura, K. Takagaki, S. Shibata, K. Tanaka, T. Higuchi, and M. Endo, "Hyaluronic-Acid-Deficient Extracellular Matrix Induced by Addition of 4-Methylumbelliferone to the Medium of Cultured Human Skin Fibroblasts," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 208, no. 2, pp. 470–475, 1995, doi: 10.1006/bbrc.1995.1362.
- [81] V. B. Lokeshwar *et al.*, "Antitumor Activity of Hyaluronic Acid Synthesis Inhibitor 4-Methylumbelliferone in Prostate Cancer Cells," *Cancer Res*, vol. 70, no. 7, pp. 2613–2623, 2010, doi: 10.1158/0008-5472.can-09-3185.
- [82] N. Nagy *et al.*, "4-Methylumbelliferone Treatment and Hyaluronan Inhibition as a Therapeutic Strategy in Inflammation, Autoimmunity, and Cancer," *Front Immunol*, vol. 6, p. 123, 2015, doi: 10.3389/fimmu.2015.00123.
- [83] M. Nieuwdorp *et al.*, "Perturbation of hyaluronan metabolism predisposes patients with type 1 diabetes mellitus to atherosclerosis," *Diabetologia*, vol. 50, no. 6, pp. 1288–1293, 2007, doi: 10.1007/s00125-007-0666-4.
- [84] S. Grundmann *et al.*, "Endothelial glycocalyx dimensions are reduced in growing collateral arteries and modulate leucocyte adhesion in arteriogenesis," *J Cell Mol Med*, vol. 13, no. 9b, pp. 3463–3474, 2009, doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00735.x.
- [85] M. Nieuwdorp *et al.*, "Tumor necrosis factor- α inhibition protects against endotoxin-induced endothelial glycocalyx perturbation," *Atherosclerosis*, vol. 202, no. 1, pp. 296–303, 2009, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2008.03.024.
- [86] R. Riessen, T. N. Wight, C. Pastore, C. Henley, and J. M. Isner, "Distribution of Hyaluronan During Extracellular Matrix Remodeling in Human Restenotic Arteries and Balloon-Injured Rat Carotid Arteries," *Circulation*, vol. 93, no. 6, pp. 1141–1147, 1996, doi: 10.1161/01.cir.93.6.1141.
- [87] N. Nagy *et al.*, "Inhibition of hyaluronan synthesis accelerates murine atherosclerosis: novel insights into the role of hyaluronan synthesis.," *Circulation*, vol. 122, no. 22, pp. 2313–22, 2010, doi: 10.1161/circulationaha.110.972653.
- [88] T. S. Wilkinson, S. L. Bressler, S. P. Evanko, K. R. Braun, and T. N. Wight, "Overexpression of hyaluronan synthases alters vascular smooth muscle cell phenotype and promotes monocyte adhesion," *J Cell Physiol*, vol. 206, no. 2, pp. 378–385, 2006, doi: 10.1002/jcp.20468.
- [89] M. Grandoch *et al.*, "Novel effects of adenosine receptors on pericellular hyaluronan matrix: implications for human smooth muscle cell phenotype and interactions with monocytes during atherosclerosis," *Basic Res Cardiol*, vol. 108, no. 2, p. 340, 2013, doi: 10.1007/s00395-013-0340-6.

- [90] J. W. Fischer, "Role of hyaluronan in atherosclerosis: Current knowledge and open questions," *Matrix Biol*, vol. 78–79, pp. 324–336, 2019, doi: 10.1016/j.matbio.2018.03.003.
- [91] S. Chai *et al.*, "Overexpression of Hyaluronan in the Tunica Media Promotes the Development of Atherosclerosis," *Circ Res*, vol. 96, no. 5, pp. 583–591, 2005, doi: 10.1161/01.res.0000158963.37132.8b.
- [92] Y. Kashima *et al.*, "Crucial Role of Hyaluronan in Neointimal Formation after Vascular Injury," *Plos One*, vol. 8, no. 3, p. e58760, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0058760.
- [93] S. Homann *et al.*, "Hyaluronan synthase 3 promotes plaque inflammation and atheroprogession.," *Matrix Biology J Int Soc Matrix Biology*, vol. 66, pp. 67–80, 2017, doi: 10.1016/j.matbio.2017.09.005.
- [94] L. S. Kiene *et al.*, "Deletion of Hyaluronan Synthase 3 Inhibits Neointimal Hyperplasia in Mice," *Arteriosclerosis Thrombosis Vasc Biology*, vol. 36, no. 2, pp. e9–e16, 2018, doi: 10.1161/atvbaha.115.306607.
- [95] C. A. Cuff *et al.*, "The adhesion receptor CD44 promotes atherosclerosis by mediating inflammatory cell recruitment and vascular cell activation," *J Clin Invest*, vol. 108, no. 7, pp. 1031–1040, 2001, doi: 10.1172/jci12455.
- [96] F. D. Kolodgie *et al.*, "Differential Accumulation of Proteoglycans and Hyaluronan in Culprit Lesions: Insights Into Plaque Erosion," *Arteriosclerosis Thrombosis Vasc Biology*, vol. 22, no. 10, pp. 1642–1648, 2002, doi: 10.1161/01.atv.0000034021.92658.4c.
- [97] R. A. Shirk, N. Parthasarathy, J. D. S. Antonio, F. C. Church, and W. D. Wagner, "Altered Dermatan Sulfate Structure and Reduced Heparin Cofactor II-stimulating Activity of Biglycan and Decorin from Human Atherosclerotic Plaque*," *J Biol Chem*, vol. 275, no. 24, pp. 18085–18092, 2000, doi: 10.1074/jbc.m001659200.
- [98] M. Grandoch *et al.*, "Loss of Biglycan Enhances Thrombin Generation in Apolipoprotein E-Deficient Mice," *Arteriosclerosis Thrombosis Vasc Biology*, vol. 36, no. 5, pp. e41–e50, 2016, doi: 10.1161/atvbaha.115.306973.
- [99] S. P. Evanko, E. W. Raines, R. Ross, L. I. Gold, and T. N. Wight, "Proteoglycan distribution in lesions of atherosclerosis depends on lesion severity, structural characteristics, and the proximity of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta.," *Am J Pathology*, vol. 152, no. 2, pp. 533–46, 1998.
- [100] A. Farb *et al.*, "Extracellular Matrix Changes in Stented Human Coronary Arteries," *Circulation*, vol. 110, no. 8, pp. 940–947, 2004, doi: 10.1161/01.cir.0000139337.56084.30.
- [101] T. N. Wight and M. J. Merrilees, "Proteoglycans in Atherosclerosis and Restenosis," *Circ Res*, vol. 94, no. 9, pp. 1158–1167, 2004, doi: 10.1161/01.res.0000126921.29919.51.
- [102] D. Chappell *et al.*, "TNF- α induced shedding of the endothelial glycocalyx is prevented by hydrocortisone and antithrombin," *Basic Res Cardiol*, vol. 104, no. 1, p. 78, 2008, doi: 10.1007/s00395-008-0749-5.

- [103] D. Chappell *et al.*, "Glycocalyx Protection Reduces Leukocyte Adhesion After Ischemia/Reperfusion," *Shock*, vol. 34, no. 2, pp. 133–139, 2010, doi: 10.1097/shk.0b013e3181cdc363.
- [104] M. E. Lauer, D. Mukhopadhyay, C. Fulop, C. A. de la Motte, A. K. Majors, and V. C. Hascall, "Primary Murine Airway Smooth Muscle Cells Exposed to Poly(I,C) or Tunicamycin Synthesize a Leukocyte-adhesive Hyaluronan Matrix*," *J Biol Chem*, vol. 284, no. 8, pp. 5299–5312, 2009, doi: 10.1074/jbc.m807965200.
- [105] J. Monslow, N. Sato, J. A. Mack, and E. V. Maytin, "Wounding-Induced Synthesis of Hyaluronic Acid in Organotypic Epidermal Cultures Requires the Release of Heparin-Binding EGF and Activation of the EGFR," *J Invest Dermatol*, vol. 129, no. 8, pp. 2046–2058, 2009, doi: 10.1038/jid.2009.9.
- [106] P. Teder *et al.*, "Resolution of Lung Inflammation by CD44," *Science*, vol. 296, no. 5565, pp. 155–158, 2002, doi: 10.1126/science.1069659.
- [107] A. Waldenström, H. J. Martinussen, B. Gerdin, and R. Hällgren, "Accumulation of hyaluronan and tissue edema in experimental myocardial infarction.," *J Clin Invest*, vol. 88, no. 5, pp. 1622–1628, 1991, doi: 10.1172/jci115475.
- [108] A. Waldenström, J. Fohlman, N. G. Ilbäck, G. Ronquist, R. Hällgren, and B. Gerdin, "Coxsackie B3 myocarditis induces a decrease in energy charge and accumulation of hyaluronan in the mouse heart," *Eur J Clin Invest*, vol. 23, no. 5, pp. 277–282, 1993, doi: 10.1111/j.1365-2362.1993.tb00774.x.
- [109] U. Hellman *et al.*, "Parallel up-regulation of FGF-2 and hyaluronan during development of cardiac hypertrophy in rat," *Cell Tissue Res*, vol. 332, no. 1, pp. 49–56, 2008, doi: 10.1007/s00441-007-0562-8.
- [110] U. Hellman *et al.*, "Growth Factor PDGF-BB Stimulates Cultured Cardiomyocytes to Synthesize the Extracellular Matrix Component Hyaluronan," *Plos One*, vol. 5, no. 12, p. e14393, 2010, doi: 10.1371/journal.pone.0014393.
- [111] A. Petz *et al.*, "Cardiac Hyaluronan Synthesis Is Critically Involved in the Cardiac Macrophage Response and Promotes Healing After Ischemia Reperfusion Injury.," *Circ Res*, vol. 124, no. 10, pp. 1433–1447, 2019, doi: 10.1161/circresaha.118.313285.
- [112] C.-H. Law, J.-M. Li, H.-C. Chou, Y.-H. Chen, and H.-L. Chan, "Hyaluronic acid-dependent protection in H9C2 cardiomyocytes: A cell model of heart ischemia–reperfusion injury and treatment," *Toxicology*, vol. 303, pp. 54–71, 2013, doi: 10.1016/j.tox.2012.11.006.
- [113] M. Dobaczewski, M. Bujak, P. Zymek, G. Ren, M. L. Entman, and N. G. Frangogiannis, "Extracellular matrix remodeling in canine and mouse myocardial infarcts.," *Cell Tissue Res*, vol. 324, no. 3, pp. 475–88, 2006, doi: 10.1007/s00441-005-0144-6.
- [114] J. Müller *et al.*, "Interleukin-6-dependent phenotypic modulation of cardiac fibroblasts after acute myocardial infarction," *Basic Res Cardiol*, vol. 109, no. 6, p. 440, 2014, doi: 10.1007/s00395-014-0440-y.

- [115] J. Scheller, C. Garbers, and S. Rose-John, "Interleukin-6: From basic biology to selective blockade of pro-inflammatory activities," *Semin Immunol*, vol. 26, no. 1, pp. 2–12, 2014, doi: 10.1016/j.smim.2013.11.002.
- [116] D. R. Anderson *et al.*, "IL-6 and its receptors in coronary artery disease and acute myocardial infarction," *Cytokine*, vol. 62, no. 3, pp. 395–400, 2013, doi: 10.1016/j.cyto.2013.03.020.
- [117] S. Meran *et al.*, "Hyaluronan Facilitates Transforming Growth Factor- β 1-mediated Fibroblast Proliferation*," *J Biol Chem*, vol. 283, no. 10, pp. 6530–6545, 2008, doi: 10.1074/jbc.m704819200.
- [118] R. M. L. Simpson *et al.*, "Age-Related Changes in Pericellular Hyaluronan Organization Leads to Impaired Dermal Fibroblast to Myofibroblast Differentiation," *Am J Pathology*, vol. 175, no. 5, pp. 1915–1928, 2009, doi: 10.2353/ajpath.2009.090045.
- [119] J. Webber, S. Meran, R. Steadman, and A. Phillips, "Hyaluronan Orchestrates Transforming Growth Factor- β 1-dependent Maintenance of Myofibroblast Phenotype*," *J Biol Chem*, vol. 284, no. 14, pp. 9083–9092, 2009, doi: 10.1074/jbc.m806989200.
- [120] J. Webber, R. H. Jenkins, S. Meran, A. Phillips, and R. Steadman, "Modulation of TGF β 1-Dependent Myofibroblast Differentiation by Hyaluronan," *Am J Pathology*, vol. 175, no. 1, pp. 148–160, 2009, doi: 10.2353/ajpath.2009.080837.
- [121] G. Abatangelo, M. Martelli, and P. Vecchia, "Healing of hyaluronic acid-enriched wounds: Histological observations," *J Surg Res*, vol. 35, no. 5, pp. 410–416, 1983, doi: 10.1016/0022-4804(83)90030-6.
- [122] P. Huebener *et al.*, "CD44 Is Critically Involved in Infarct Healing by Regulating the Inflammatory and Fibrotic Response," *J Immunol*, vol. 180, no. 4, pp. 2625–2633, 2008, doi: 10.4049/jimmunol.180.4.2625.
- [123] M. Dobaczewski, C. Gonzalez-Quesada, and N. G. Frangogiannis, "The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction," *J Mol Cell Cardiol*, vol. 48, no. 3, pp. 504–511, 2010, doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.07.015.
- [124] T. D. Camenisch *et al.*, "Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme," *J Clin Invest*, vol. 106, no. 3, pp. 349–360, 2000, doi: 10.1172/jci10272.
- [125] A. Engström-Laurent, U. B. G. Laurent, K. Lilja, and T. C. Laurent, "Concentration of sodium hyaluronate in serum," *Scand J Clin Laboratory Investigation*, vol. 45, no. 6, pp. 497–504, 1985, doi: 10.3109/00365518509155249.
- [126] U. Lindqvist and T. C. Laurent, "Serum hyaluronan and aminoterminal propeptide of type III procollagen: Variation with age," *Scand J Clin Laboratory Investigation*, vol. 52, no. 7, pp. 613–621, 2009, doi: 10.3109/00365519209115504.
- [127] A. Rössler, Z. László, E. Kvas, and H. G. Hinghofer-Szalkay, "Plasma hyaluronan concentration: no circadian rhythm but large effect of food intake in humans," *Eur J Appl Physiol*, vol. 78, no. 6, pp. 573–577, 1998, doi: 10.1007/s004210050463.

- [128] H. G. Hinghofer-Szalkay, W. Mekonen, A. Rössler, G. Schwabegger, M. Lamprecht, and P. Hofmann, "Post-exercise decrease of plasma hyaluronan: increased clearance or diminished production?," *Physiological Res Acad Sci Bohemoslovaca*, vol. 51, no. 2, pp. 139–44, 2002.
- [129] J. R. E. Fraser and P. R. Gibson, "Mechanisms by which food intake elevates circulating levels of hyaluronan in humans," *J Intern Med*, vol. 258, no. 5, pp. 460–466, 2005, doi: 10.1111/j.1365-2796.2005.01564.x.
- [130] J. R. E. Fraser, T. C. Laurent, A. Engström-Laurent, and U. G. B. Laurent, "Elimination of hyaluronic acid from the blood stream in the human," *Clin Exp Pharmacol P*, vol. 11, no. 1, pp. 17–25, 1984, doi: 10.1111/j.1440-1681.1984.tb00235.x.
- [131] K. D. Bentsen, J. H. Henriksen, S. Boesby, K. Hørslev-Petersen, and I. Lorenzen, "Hepatic and renal extraction of circulating type III procollagen amino-terminal propeptide and hyaluronan in pig," *J Hepatol*, vol. 9, no. 2, pp. 177–183, 1989, doi: 10.1016/0168-8278(89)90048-2.
- [132] T. C. Laurent *et al.*, "Urinary excretion of hyaluronan in man.," *Scand J Clin Laboratory Investigation*, vol. 47, no. 8, pp. 793–9, 1987.
- [133] B. Zhou, J. A. Weigel, L. Fauss, and P. H. Weigel, "Identification of the Hyaluronan Receptor for Endocytosis (HARE)*," *J Biol Chem*, vol. 275, no. 48, pp. 37733–37741, 2000, doi: 10.1074/jbc.m003030200.
- [134] O. Politz *et al.*, "Stabilin-1 and -2 constitute a novel family of fasciclin-like hyaluronan receptor homologues," *Biochem J*, vol. 362, no. 1, p. 155, 2002, doi: 10.1042/0264-6021:3620155.
- [135] S. Banerji *et al.*, "LYVE-1, a New Homologue of the CD44 Glycoprotein, Is a Lymph-specific Receptor for Hyaluronan," *J Cell Biology*, vol. 144, no. 4, pp. 789–801, 1999, doi: 10.1083/jcb.144.4.789.
- [136] M. Brecht, U. Mayer, E. Schlosser, and P. Prehm, "Increased hyaluronate synthesis is required for fibroblast detachment and mitosis," *Biochem J*, vol. 239, no. 2, pp. 445–450, 1986, doi: 10.1042/bj2390445.
- [137] Chen, J. Yu, Z. Lu, and J. Qiu, "Clinical significance of serum hyaluronic acid level alteration in patient with nasopharyngeal carcinoma," *Biomedical Research*, 2017, [Online]. Available: <https://www.biomedres.info/biomedical-research/clinical-significance-of-serum-hyaluronic-acid-level-alteration-in-patient-with-nasopharyngeal-carcinoma.html>.
- [138] I. M. Chen *et al.*, "Clinical value of serum hyaluronan and propeptide of type III collagen in patients with pancreatic cancer," *Int J Cancer*, vol. 146, no. 10, pp. 2913–2922, 2020, doi: 10.1002/ijc.32751.
- [139] M. Wu *et al.*, "A novel role of low molecular weight hyaluronan in breast cancer metastasis," *Faseb J*, vol. 29, no. 4, pp. 1290–1298, 2015, doi: 10.1096/fj.14-259978.

- [140] A. Thylén, J. Wallin, and G. Martensson, "Hyaluronan in serum as an indicator of progressive disease in hyaluronan-producing malignant mesothelioma," *Cancer*, vol. 86, no. 10, pp. 2000–2005, 1999, doi: 10.1002/(sici)1097-0142(19991115)86:10<2000::aid-cncr17>3.0.co;2-n.
- [141] H. Hasselbalch, P. Junker, I. Lisse, U. Lindqvist, and A. Ö. E. Laurent, "Circulating hyaluronan in the myelofibrosis/osteomyelosclerosis syndrome and other myeloproliferative disorders," *Am J Hematol*, vol. 36, no. 1, pp. 1–8, 1991, doi: 10.1002/ajh.2830360102.
- [142] H. Hasselbalch, D. Hovgaard, N. Nissen, and P. Junker, "Serum hyaluronan is increased in malignant lymphoma," *Am J Hematol*, vol. 50, no. 4, pp. 231–233, 1995, doi: 10.1002/ajh.2830500402.
- [143] E. Anagnostopoulou *et al.*, "Serum Hyaluronic Acid Levels Are Altered in Acute Leukemia Patients: Potential Prognostic Implications," *Acta Haematol-basel*, vol. 138, no. 1, pp. 44–51, 2017, doi: 10.1159/000477574.
- [144] G. Zhang *et al.*, "Colorectal cancer-associated ~ 6 kDa hyaluronan serves as a novel biomarker for cancer progression and metastasis," *Febs J*, vol. 286, no. 16, pp. 3148–3163, 2019, doi: 10.1111/febs.14859.
- [145] C. Peng *et al.*, "Plasma hyaluronic acid level as a prognostic and monitoring marker of metastatic breast cancer," *Int J Cancer*, vol. 138, no. 10, pp. 2499–2509, 2016, doi: 10.1002/ijc.29975.
- [146] Y. Sasaki *et al.*, "Quantitative measurement of serum hyaluronic acid molecular weight in rheumatoid arthritis patients and the role of hyaluronidase," *Int J Rheum Dis*, vol. 14, no. 4, pp. 313–319, 2011, doi: 10.1111/j.1756-185x.2011.01683.x.
- [147] T. Körner, J. Kropf, and A. M. Gressner, "Serum laminin and hyaluronan in liver cirrhosis: markers of progression with high prognostic value," *J Hepatol*, vol. 25, no. 5, pp. 684–688, 1996, doi: 10.1016/s0168-8278(96)80239-x.
- [148] A. Pares *et al.*, "Serum hyaluronate reflects hepatic fibrogenesis in alcoholic liver disease and is useful as a marker of fibrosis," *Hepatology*, vol. 24, no. 6, pp. 1399–1403, 1996, doi: 10.1002/hep.510240615.
- [149] J. N. Plevris *et al.*, "Serum hyaluronan - a non-invasive test for diagnosing liver cirrhosis," *Eur J Gastroen Hepat*, vol. 12, no. 10, pp. 1121–1127, 2000, doi: 10.1097/00042737-200012100-00009.
- [150] T. Frébourg *et al.*, "Serum hyaluronate in liver diseases: Study by enzymeimmunological assay," *Hepatology*, vol. 6, no. 3, pp. 392–395, 1986, doi: 10.1002/hep.1840060310.
- [151] M. Plebani and A. Burlina, "Biochemical markers of hepatic fibrosis," *Clin Biochem*, vol. 24, no. 3, pp. 219–239, 1991, doi: 10.1016/0009-9120(91)80013-s.
- [152] A. Nyberg, U. Lindqvist, and A. Engström-Laurent, "Serum hyaluronan and aminoterminal propeptide of type III procollagen in primary biliary cirrhosis: relation to clinical symptoms, liver histopathology and outcome," *J Intern Med*, vol. 231, no. 5, pp. 485–491, 1992, doi: 10.1111/j.1365-2796.1992.tb00964.x.

- [153] J. George and R. Stern, "Serum hyaluronan and hyaluronidase: very early markers of toxic liver injury," *Clin Chim Acta*, vol. 348, no. 1–2, pp. 189–197, 2004, doi: 10.1016/j.cccn.2004.05.018.
- [154] A. Engström-Laurent, L. Lööf, A. Nyberg, and T. Schröder, "Increased serum levels of hyaluronate in liver disease," *Hepatology*, vol. 5, no. 4, pp. 638–642, 1985, doi: 10.1002/hep.1840050420.
- [155] J. R. Fraser, A. Engström-Laurent, A. Nyberg, and T. C. Laurent, "Removal of hyaluronic acid from the circulation in rheumatoid disease and primary biliary cirrhosis," *J Laboratory Clin Medicine*, vol. 107, no. 1, pp. 79–85, 1986.
- [156] P. R. Gibson, J. R. E. Fraser, J. C. Colman, P. A. Jones, G. Jennings, and F. J. Dudley, "Change in serum hyaluronan: A simple index of short-term drug-induced changes in hepatic sinusoidal perfusion," *Gastroenterology*, vol. 105, no. 2, pp. 470–474, 1993, doi: 10.1016/0016-5085(93)90721-n.
- [157] I. V. Deaciuc, J. J. Spitzer, J. E. Shellito, and N. B. D'Souza, "Acute alcohol administration to mice induces hepatic sinusoidal endothelial cell dysfunction," *Int Hepatol Commun*, vol. 2, no. 2, pp. 81–86, 1994, doi: 10.1016/0928-4346(94)90016-7.
- [158] G. Li, Q. Yan, and L. Wei, "Serum concentrations of hyaluronic acid, procollagen type III NH2-terminal peptide, and laminin in patients with chronic congestive heart failure," *Chin Medical Sci J Chung-kuo Hsüeh K'o Hsüeh Tsa Chih Chin Acad Medical Sci*, vol. 21, no. 3, pp. 175–8, 2006.
- [159] R. Hällgren, A. Engström-Laurent, and U. Nisbeth, "Circulating Hyaluronate," *Nephron*, vol. 46, no. 2, pp. 150–154, 1987, doi: 10.1159/000184331.
- [160] E. Honkanen, B. Frøseth, and C. Grönhagen-Riska, "Serum Hyaluronic Acid and Procollagen III Amino Terminal Propeptide in Chronic Renal Failure," *Am J Nephrol*, vol. 11, no. 3, pp. 201–206, 1991, doi: 10.1159/000168304.
- [161] P. Stenvinkel, O. Heimbürger, T. Wang, B. Lindholm, J. Bergström, and C.-G. Elinder, "High serum hyaluronan indicates poor survival in renal replacement therapy," *Am J Kidney Dis*, vol. 34, no. 6, pp. 1083–1088, 1999, doi: 10.1016/s0272-6386(99)70014-4.
- [162] A. Engström-Laurent and R. Hällgren, "Circulating hyaluronate in rheumatoid arthritis: relationship to inflammatory activity and the effect of corticosteroid therapy," *Ann Rheum Dis*, vol. 44, no. 2, p. 83, 1985, doi: 10.1136/ard.44.2.83.
- [163] J.-S. Padberg *et al.*, "Damage of the endothelial glycocalyx in chronic kidney disease," *Atherosclerosis*, vol. 234, no. 2, pp. 335–343, 2014, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.03.016.
- [164] M. Sallisalmi, J. Tenhunen, A. Kultti, M. Tammi, and V. Pettilä, "Plasma hyaluronan and hemorheology in patients with septic shock: a clinical and experimental study," *Clin Hemorheol Micro*, vol. 56, no. 2, pp. 133–44, 2014, doi: 10.3233/ch-131677.
- [165] S. Berg, J. F. Hesselvik, and T. C. Laurent, "Influence of surgery on serum concentrations of hyaluronan," *Crit Care Med*, vol. 22, no. 5, pp. 810–814, 1994, doi: 10.1097/00003246-199405000-00016.

- [166] H. Onarheim, R. K. Reed, and T. C. Laurent, "Increased plasma concentrations of hyaluronan after major thermal injury in the rat.," *Circ Shock*, vol. 37, no. 2, pp. 159–63, 1992.
- [167] E. Yagmur, A. Koch, M. Haumann, R. Kramann, C. Trautwein, and F. Tacke, "Hyaluronan serum concentrations are elevated in critically ill patients and associated with disease severity," *Clin Biochem*, vol. 45, no. 1–2, pp. 82–87, 2012, doi: 10.1016/j.clinbiochem.2011.10.016.
- [168] M. Sallialmi, J. Tenhunen, A. Kultti, M. Tammi, and V. Pettilä, "Plasma hyaluronan and hemorheology in patients with septic shock: a clinical and experimental study.," *Clin Hemorheol Micro*, vol. 56, no. 2, pp. 133–44, 2014, doi: 10.3233/ch-131677.
- [169] S. Berg, B. Brodin, F. Hesselvik, T. C. Laurent, and R. Maller, "Elevated levels of plasma hyaluronan in septicaemia," *Scand J Clin Laboratory Investigation*, vol. 48, no. 8, pp. 727–732, 1988, doi: 10.3109/00365518809088752.
- [170] S. Berg, J. F. Hesselvik, U. Lindqvist, and T. C. Laurent, "Reduced Plasma Clearance of Hyaluronan in Human Septic Shock.," *Crit Care Med*, vol. 23, no. 1, p. A172, 1995, doi: 10.1097/00003246-199501001-00296.
- [171] S. Berg, A. Engman, F. J. Hesselvik, and T. C. Laurent, "Crystalloid infusion increases plasma hyaluronan," *Crit Care Med*, vol. 22, no. 10, pp. 1563–1567, 1994, doi: 10.1097/00003246-199422100-00010.
- [172] R. G. W. Osmers *et al.*, "Increased serum levels of hyaluronic acid in pregnancies complicated by preeclampsia or hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome," *Am J Obstet Gynecol*, vol. 178, no. 2, pp. 341–345, 1998, doi: 10.1016/s0002-9378(98)80023-9.
- [173] S. Berg, A. Engman, and T. C. Laurent, "Increased Plasma Hyaluronan in Pre-Eclampsia," *Crit Care Med*, vol. 26, no. Supplement, p. 78A, 1998, doi: 10.1097/00003246-199801001-00196.
- [174] S. Berg, A. Engman, S. Holmgren, T. Lundahl, and T. C. Laurent, "Increased plasma hyaluronan in severe pre-eclampsia and eclampsia," *Scand J Clin Laboratory Investigation*, vol. 61, no. 2, pp. 131–137, 2001, doi: 10.1080/00365510151097647.
- [175] K. F. Hofmann-Kiefer *et al.*, "Increased Serum Concentrations of Circulating Glycocalyx Components in HELLP Syndrome Compared to Healthy Pregnancy: An Observational Study," *Reprod Sci*, vol. 20, no. 3, pp. 318–325, 2013, doi: 10.1177/1933719112453508.
- [176] M. E. Lauer *et al.*, "Hyaluronan and Its Heavy Chain Modification in Asthma Severity and Experimental Asthma Exacerbation*," *J Biol Chem*, vol. 290, no. 38, pp. 23124–23134, 2015, doi: 10.1074/jbc.m115.663823.
- [177] M. A. Dentener, J. H. J. Vernooij, S. Hendriks, and E. F. M. Wouters, "Enhanced levels of hyaluronan in lungs of patients with COPD: relationship with lung function and local inflammation," *Thorax*, vol. 60, no. 2, p. 114, 2005, doi: 10.1136/thx.2003.020842.

- [178] E. Papakonstantinou *et al.*, “Serum levels of hyaluronic acid are associated with COPD severity and predict survival,” *Eur Respir J*, vol. 53, no. 3, p. 1801183, 2019, doi: 10.1183/13993003.01183-2018.
- [179] E. P. Schmidt *et al.*, “The Circulating Glycosaminoglycan Signature of Respiratory Failure in Critically Ill Adults*,” *J Biol Chem*, vol. 289, no. 12, pp. 8194–8202, 2014, doi: 10.1074/jbc.m113.539452.
- [180] Y. Inokoshi *et al.*, “Clinical significance of serum hyaluronan in chronic fibrotic interstitial pneumonia,” *Respirology*, vol. 18, no. 8, pp. 1236–1243, 2013, doi: 10.1111/resp.12144.
- [181] R. L. Goldberg, V. S. Ganu, B. Kotyuk, J. R. Doughty, and A. Raychaudhuri, “Elevation of plasma hyaluronan and urinary pyridinoline in mouse collagen induced arthritis,” *Acta Orthop Scand*, vol. 66, no. sup266, pp. 145–147, 2009, doi: 10.3109/17453679509157672.
- [182] G. Partsch *et al.*, “Low serum hyaluronan in psoriatic arthritis patients in comparison to rheumatoid arthritis patients.,” *Clin Exp Rheumatol*, vol. 14, no. 4, pp. 381–6, 1996.
- [183] B. A. Gäre and A. Fasth, “Serum Concentration of Hyaluronan, IgM and IgA Rheumatoid Factors in a Population Based Study of Juvenile Chronic Arthritis,” *Scand J Rheumatol*, vol. 23, no. 4, pp. 183–190, 2009, doi: 10.3109/03009749409103058.
- [184] A. Yoshizaki *et al.*, “Clinical significance of serum hyaluronan levels in systemic sclerosis: association with disease severity.,” *J Rheumatology*, vol. 35, no. 9, pp. 1825–9, 2008.
- [185] A. Scheja, A. Åkesson, and K. Hørslev-petersen, “Serum Levels of Aminoterminal Type III Procollagen Peptide and Hyaluronan Predict Mortality in Systemic Sclerosis,” *Scand J Rheumatol*, vol. 21, no. 1, pp. 5–9, 2009, doi: 10.3109/03009749209095054.
- [186] A. Lundin, A. Engström-Laurent, R. Hallgren, and G. Michaelsson, “Circulating hyaluronate in psoriasis,” *Brit J Dermatol*, vol. 112, no. 6, pp. 663–671, 1985, doi: 10.1111/j.1365-2133.1985.tb02334.x.
- [187] D. C. West and M. Yaqoob, “Serum hyaluronan levels follow disease activity in vasculitis.,” *Clin Nephrol*, vol. 48, no. 1, pp. 9–15, 1997.
- [188] A. F. Members *et al.*, “ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevationThe Task Force on the management of ST-segment elevation acute myocardial infarction of the European Society of Cardiology (ESC),” *Eur Heart J*, vol. 33, no. 20, pp. 2569–2619, 2012, doi: 10.1093/eurheartj/ehs215.
- [189] M. Roffi *et al.*, “2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevationTask Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC),” *Eur Heart J*, vol. 37, no. 3, pp. 267–315, 2016, doi: 10.1093/eurheartj/ehv320.

- [190] M. Grandoch, P. L. Bollyky, and J. W. Fischer, "Hyaluronan: A Master Switch Between Vascular Homeostasis and Inflammation," *Circ Res*, vol. 122, no. 10, pp. 1341–1343, 2018, doi: 10.1161/circresaha.118.312522.
- [191] I.-H. Bae *et al.*, "The Control of Drug Release and Vascular Endothelialization after Hyaluronic Acid-Coated Paclitaxel Multi-Layer Coating Stent Implantation in Porcine Coronary Restenosis Model," *Korean Circ J*, vol. 47, no. 1, pp. 123–131, 2016, doi: 10.4070/kcj.2016.0203.
- [192] M. I. M. Noble, A. J. Drake-Holland, and H. Vink, "Hypothesis: arterial glycocalyx dysfunction is the first step in the atherothrombotic process," *Qjm Int J Medicine*, vol. 101, no. 7, pp. 513–518, 2008, doi: 10.1093/qjmed/hcn024.
- [193] C. Papanastasopoulou, M. Papastamataki, P. Karampatsis, E. Anagnostopoulou, I. Papassotiriou, and N. Sitaras, "Cardiovascular Risk and Serum Hyaluronic Acid: A Preliminary Study in a Healthy Population of Low/Intermediate Risk.," *J Clin Lab Anal*, vol. 31, no. 1, p. e22010, 2016, doi: 10.1002/jcla.22010.
- [194] S. Mine, Y. Okada, C. Kawahara, T. Tabata, and Y. Tanaka, "Serum Hyaluronan Concentration as a Marker of Angiopathy in Patients with Diabetes Mellitus," *Endocr J*, vol. 53, no. 6, pp. 761–766, 2006, doi: 10.1507/endocrj.k05-119.
- [195] N. Nagy *et al.*, "Hyaluronan levels are increased systemically in human type 2 but not type 1 diabetes independently of glycemic control," *Matrix Biol*, vol. 80, pp. 46–58, 2019, doi: 10.1016/j.matbio.2018.09.003.
- [196] A. Chajara, M. Raoudi, B. Delpech, M. Leroy, J. P. Basuyau, and H. Levesque, "Circulating hyaluronan and hyaluronidase are increased in diabetic rats," *Diabetologia*, vol. 43, no. 3, pp. 387–388, 2000, doi: 10.1007/s001250050061.
- [197] M. Nieuwdorp *et al.*, "Endothelial Glycocalyx Damage Coincides With Microalbuminuria in Type 1 Diabetes," *Diabetes*, vol. 55, no. 4, pp. 1127–1132, 2006, doi: 10.2337/diabetes.55.04.06.db05-1619.
- [198] M. Nieuwdorp *et al.*, "Perturbation of hyaluronan metabolism predisposes patients with type 1 diabetes mellitus to atherosclerosis," *Diabetologia*, vol. 50, no. 6, pp. 1288–1293, 2007, doi: 10.1007/s00125-007-0666-4.
- [199] C. A. McDevitt, G. J. Beck, M. J. Ciunga, and J. O'Brien, "Cigarette smoke degrades hyaluronic acid," *Lung*, vol. 167, no. 1, pp. 237–245, 1989, doi: 10.1007/bf02714952.
- [200] H. Vink, A. A. Constantinescu, and J. A. E. Spaan, "Oxidized Lipoproteins Degrade the Endothelial Surface Layer," *Circulation*, vol. 101, no. 13, pp. 1500–1502, 2000, doi: 10.1161/01.cir.101.13.1500.
- [201] M. Kucur *et al.*, "Plasma hyaluronidase activity as an indicator of atherosclerosis in patients with coronary artery disease.," *Bratislavské Lekárske Listy*, vol. 110, no. 1, pp. 21–6, 2009.
- [202] J. Li *et al.*, "The Association Between Plasma Hyaluronan Level and Plaque Types in ST-Segment–Elevation Myocardial Infarction Patients," *Frontiers Cardiovasc Medicine*, vol. 8, p. 628529, 2021, doi: 10.3389/fcvm.2021.628529.

- [203] S. Albeiroti, K. Ayasoufi, D. R. Hill, B. Shen, and C. A. de la Motte, "Platelet hyaluronidase-2: an enzyme that translocates to the surface upon activation to function in extracellular matrix degradation," *Blood*, vol. 125, no. 9, pp. 1460–1469, 2015, doi: 10.1182/blood-2014-07-590513.
- [204] I. Koshiishi, M. Shizari, and C. B. Underhill, "CD44 can mediate the adhesion of platelets to hyaluronan.," *Blood*, vol. 84, no. 2, pp. 390–6, 1994.
- [205] M. Inoue *et al.*, "Immunological determination of serum m-AST activity in patients with acute myocardial infarction.," *Brit Heart J*, vol. 40, no. 11, p. 1251, 1978, doi: 10.1136/hrt.40.11.1251.
- [206] R. L. Fitzgerald, W. L. Frankel, and D. A. Herold, "Comparison of Troponin-T With Other Cardiac Markers in a VA Hospital," *Am J Clin Pathol*, vol. 106, no. 3, pp. 396–401, 1996, doi: 10.1093/ajcp/106.3.396.
- [207] K. Thygesen *et al.*, "How to use high-sensitivity cardiac troponins in acute cardiac care," *Eur Heart J*, vol. 33, no. 18, pp. 2252–2257, 2012, doi: 10.1093/eurheartj/ehs154.
- [208] S. Ebashi, "Third Component Participating in the Super precipitation of 'Natural Actomyosin,'" *Nature*, vol. 200, no. 4910, pp. 1010–1010, 1963, doi: 10.1038/2001010a0.
- [209] A. S. V. Shah *et al.*, "High-sensitivity troponin in the evaluation of patients with suspected acute coronary syndrome: a stepped-wedge, cluster-randomised controlled trial," *Lancet*, vol. 392, no. 10151, pp. 919–928, 2018, doi: 10.1016/s0140-6736(18)31923-8.
- [210] B. Cummins, M. L. Auckland, and P. Cummins, "Cardiac-specific troponin-I radioimmunoassay in the diagnosis of acute myocardial infarction," *Am Heart J*, vol. 113, no. 6, pp. 1333–1344, 1987, doi: 10.1016/0002-8703(87)90645-4.
- [211] M. R. Gimenez *et al.*, "Direct comparison of high-sensitivity cardiac troponin I versus T for the early diagnosis of acute myocardial infarction," *Eur Heart J*, vol. 34, no. suppl_1, 2013, doi: 10.1093/eurheartj/ehs307.20.
- [212] D. Westermann, J. T. Neumann, N. A. Sørensen, and S. Blankenberg, "High-sensitivity assays for troponin in patients with cardiac disease," *Nat Rev Cardiol*, vol. 14, no. 8, pp. 472–483, 2017, doi: 10.1038/nrcardio.2017.48.
- [213] R. Twerenbold *et al.*, "0/1-Hour Triage Algorithm for Myocardial Infarction in Patients With Renal Dysfunction," *Circulation*, vol. 137, no. 5, pp. 436–451, 2018, doi: 10.1161/circulationaha.117.028901.
- [214] E. Miller-Hodges *et al.*, "High-Sensitivity Cardiac Troponin and the Risk Stratification of Patients With Renal Impairment Presenting With Suspected Acute Coronary Syndrome," *Circulation*, vol. 137, no. 5, pp. 425–435, 2018, doi: 10.1161/circulationaha.117.030320.
- [215] M. R. Gimenez *et al.*, "Impact of the US Food and Drug Administration–Approved Sex-Specific Cutoff Values for High-Sensitivity Cardiac Troponin T to Diagnose Myocardial Infarction," *Circulation*, vol. 137, no. 17, pp. 1867–1869, 2018, doi: 10.1161/circulationaha.117.031940.

- [216] K. Solecki *et al.*, "Kinetics of high-sensitivity cardiac troponin T or troponin I compared to creatine kinase in patients with revascularized acute myocardial infarction," *Clin Chem Laboratory Medicine Cclm*, vol. 53, no. 5, pp. 707–714, 2015, doi: 10.1515/cclm-2014-0475.
- [217] H. A. Katus, A. Remppis, T. Scheffold, K. W. Diederich, and W. Kuebler, "Intracellular compartmentation of cardiac troponin T and its release kinetics in patients with reperfused and nonreperfused myocardial infarction," *Am J Cardiol*, vol. 67, no. 16, pp. 1360–1367, 1991, doi: 10.1016/0002-9149(91)90466-x.
- [218] S. R. Ostrowski, S. H. Pedersen, J. S. Jensen, R. Mogelvang, and P. I. Johansson, "Acute myocardial infarction is associated with endothelial glycocalyx and cell damage and a parallel increase in circulating catecholamines," *Crit Care*, vol. 17, no. 1, p. R32, 2013, doi: 10.1186/cc12532.
- [219] G. Savas, N. Kalay, P. Altin, G. K. Dursun, M. Cetin, and M. Aytakin, "Hyaluronan as a Promising Biomarker for Myocardial Damage.," *Tohoku J Exp Medicine*, vol. 248, no. 2, pp. 99–106, 2019, doi: 10.1620/tjem.248.99.
- [220] M. Slevin *et al.*, "Hyaluronan-mediated angiogenesis in vascular disease: Uncovering RHAMM and CD44 receptor signaling pathways," *Matrix Biol*, vol. 26, no. 1, pp. 58–68, 2007, doi: 10.1016/j.matbio.2006.08.261.
- [221] W. Xi *et al.*, "Plasma hyaluronan and collateral development in patients with coronary artery disease," *Coronary Artery Dis*, vol. 21, no. 4, pp. 228–232, 2010, doi: 10.1097/mca.0b013e328338ccf3.
- [222] S. Haserodt, M. Aytakin, and R. A. Dweik, "A comparison of the sensitivity, specificity, and molecular weight accuracy of three different commercially available Hyaluronan ELISA-like assays," *Glycobiology*, vol. 21, no. 2, pp. 175–183, 2010, doi: 10.1093/glycob/cwq145.

6 Anhang

Danksagung

Mein ganz herzlicher Dank gilt Frau Prof. Dr. Maria Grandoch für die Vergabe des äußerst interessanten Themas und ihre engagierte und motivierende Betreuung meiner Promotionsarbeit. Ich habe die fachlichen Diskussionen und das mir entgegengebrachte Vertrauen sehr geschätzt.

Herrn PD Dr. Amin Polzin danke ich für die Übernahme der Mentorenschaft sowie die anregenden Diskussionen im Rahmen der Betreuungsgespräche.

Dem Institutsleiter, Herrn Prof. Dr. Jens W. Fischer, danke ich für die Möglichkeit am Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie promovieren zu dürfen.

Danken möchte ich zudem Frau Kerstin Freidel und Frau Kirsten Bartkowski für ihre stets hilfsbereite und freundliche Unterstützung während der Laborarbeiten. Frau Irmhild Tibbe danke ich für die Durchführung der Plasma-HA-Bestimmungen.