

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung im Walter-Brendel-Zentrum
für experimentelle Medizin der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. U. Pohl

**Die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion in der
pulmonalen Mikrostrombahn –
allgemein während Endotoxinämie und speziell unter dem Einfluss der
PARS**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Sonja Schenkat

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Alwin E. Goetz

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Robert Blum

Prof. Dr. Armin J. Reininger

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Dr. R. Kiefmann

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 22.10.2009

*Meinen Eltern,
Matthias,
und Jule*

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1. Vorbemerkung.....	1
1.2. Pathogenese des ARDS	1
1.3. Die Rolle der Thrombozyten bei der Pathogenese des ARDS.....	2
1.4. Peroxynitrit-Bildung.....	3
1.5. Aktivierung der PARS	4
1.6. Beteiligung der PARS an der Genexpression	4
1.7. P-Selektin und E-Selektin	4
1.8. Ziele und Fragestellungen.....	5
2. METHODIK.....	6
2.1. Versuchstiere.....	6
2.2. Vorbereitung der „Weißen Neuseeländer“ Kaninchen.....	6
2.3. Experimentelles Protokoll.....	7
2.3.1. Makrohämodynamische Parameter	7
2.3.1.1. Katheterimplantationen	7
2.3.1.2. Gemessene und berechnete makrohämodynamische Parameter.....	8
2.3.2. Peripheres Blutbild	9
2.3.3. Mikrohämodynamische Parameter - Intravitalmikroskopie	9
2.3.3.1. Thoraxfenster	9
2.3.3.2. Fluoreszenzmarkierung der Erythrozyten und Thrombozyten	10
2.3.3.3. Videomikroskopie	13
Apparativer Aufbau	13
Zusammensetzung der Filterblöcke zur Differenzierung der fluoreszenz-markierten Zellen	14
Beatmung während der Videomikroskopie	15
Mikroskopierareale	15
2.3.3.4. Gemessene und berechnete mikrohämodynamische Parameter	15
Erythrozytenfließgeschwindigkeit in Arteriolen und Venolen	16
Blutvolumenfluß und Wandscherrate.....	18
Thrombozytenkinetik in Arteriolen und Venolen	19
Erythrozytenfließgeschwindigkeit in Alveolarkapillaren.....	21
Thrombozytenkinetik im Alveolarareal.....	21
Alveolarseptenbreite.....	22

2.3.4.	Ermittlung der Expression der Adhäsionsmoleküle P- und E-Selektin mittels Westernblot-Analyse	22
2.3.4.1.	Gewebeaufbereitung.....	23
2.3.4.2.	Proteinbestimmung.....	23
2.3.4.3.	Trennung der Proteine im Acrylamid-Gel.....	24
2.3.4.4.	Proteinübertragung auf eine Nitrocellulosemembran (Blot)	25
2.3.4.5.	Detektion von P- und E-Selektin durch spezifische Antikörper	25
2.3.4.6.	Entwicklung der Western-Blots	26
2.4.	Applizierte Substanzen	27
2.4.1.	Endotoxin.....	27
2.4.2.	3-Aminobenzamid	27
2.5.	Einschlusskriterien	27
2.6.	Studienprotokoll.....	28
2.7.	Datenverarbeitung und Statistik.....	30
3.	ERGEBNISSE	31
3.1.	Makrohämodynamik, peripheres Blutbild und Blutgasanalyse	31
	Makrohämodynamik.....	31
	Peripheres Blutbild	31
	Arterielle Blutgasanalyse.....	32
3.2.	Mikrohämodynamik in Arteriolen und Venolen.....	33
3.3.	Thrombozytenkinetik in Arteriolen und Venolen	34
3.4.	Alveolarkapillaren.....	37
3.5.	Expression von P- und E-Selektin im Lungengewebe	39
4.	DISKUSSION.....	41
4.1.	Methodik.....	41
4.1.1.	Versuchstiere.....	41
4.1.2.	Experimentelles Modell.....	41
4.1.2.1.	Intravitalmikroskopie der Lungenmikrostrombahn	42
4.1.2.2.	Fluoreszenzmarkierung der Erythrozyten.....	44
4.1.2.3.	Fluoreszenzmarkierung der Thrombozyten	44
4.1.2.4.	Phototoxizität	46
4.1.2.5.	Applizierte Substanzen: Endotoxin und 3-AB.....	46
	Endotoxin.....	46
	3-Aminobenzamid	48
4.1.3.	Konstanz der Rahmenbedingungen.....	49

4.2.	Ergebnisse	50
4.2.1.	Das Verhalten von Thrombozyten in der pulmonalen Mikrostrombahn unter Endotoxinämie	50
4.2.1.1.	Die Thrombozyten –Endothelzell – Interaktion.....	52
4.2.1.2.	Die Thrombozyten –Leukozyten – Interaktion.....	55
	Die Konsequenzen einer gesteigerten Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion in der pulmonalen Mikrostrombahn.....	55
4.2.1.3.	Die Entstehung von Permeabilitätsstörungen unter Endotoxinämie.....	57
4.2.1.4.	Die Entstehung von Zellschäden unter Endotoxinämie	58
	Produktion von Radikalen	58
	Bildung von Peroxynitrit	60
4.2.1.5.	Die Poly-ADP-Ribosyl-Synthetase (PARS).....	62
	PARS und DNA-Reparatur.....	62
	PARS und Transkription.....	64
4.2.2.	Der Einfluss der PARS auf das Verhalten der Thrombozyten in der pulmonalen Mikrostrombahn unter Endotoxinämie.....	65
4.2.2.1.	Die Expression der Adhäsionsmoleküle P- und E-Selektin	66
4.2.2.2.	Die Expression von P-und E-Selektin in PARS (-/-) Mäusen	67
4.2.2.3.	Der Einfluss der PARS auf Zellschädigung und Permeabilitätsstörungen unter Endotoxinämie	68
4.2.3.	Klinischer Ausblick	69
5.	ZUSAMMENFASSUNG	70
6.	ANHANG	73
6.1.	Abkürzungsverzeichnis.....	73
6.2.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	76
7.	LITERATURVERZEICHNIS	79
8.	VERÖFFENTLICHTE TEILASPEKTE DER ARBEIT	90
9.	DANKSAGUNG	91
10.	LEBENS LAUF	92

1. EINLEITUNG

1. EINLEITUNG

1.1. Vorbemerkung

Das „Acute respiratory distress syndrom“, kurz ARDS, wurde 1994 von der American-European Consensus Conference als ein Symptomkomplex definiert, der durch akut einsetzenden Beginn, einen Oxygenierungsindex von kleiner als 200 mmHg, bilateral radiologisch nachweisbare Lungeninfiltrate sowie einem pulmonalarteriellen Wedge-Druck von weniger als 18 mmHg gekennzeichnet ist (12).

Erstmals wurde das akute Lungenversagen schon 1967 von David Ashbough anhand von 12 Patientenberichten beschrieben (2). Auch vier Jahrzehnte später gilt das ARDS immer noch als eine schwere Komplikation nach direkter oder indirekter Lungenschädigung, die mit einer hohen Letalität einhergeht (139). So kann es z.B. nach Aspiration, Pneumonie, Lungenkontusion nach Thoraxtrauma oder nach toxischer Inhalation zu einer direkten Schädigung der Lunge kommen. Eine indirekte oder sekundäre Schädigung der Lunge kann während einer generalisierten Sepsis, nach Schocksymptomatik, Polytrauma, Massivtransfusion, Ischämie/Reperfusion, schweren Verbrennungen, Eklampsie oder nach Luft- oder Fruchtwasserembolien entstehen (12;13;139). Die verschiedenen Ursachen, die die Entwicklung eines ARDS auslösen, enden in einem gemeinsamen Pathomechanismus, der lokalen inflammatorischen Immunantwort (13).

1.2. Pathogenese des ARDS

Eine zentrale Rolle in der Pathogenese des ARDS wird den körpereigenen humoralen und zellulären Mediatorsystemen zugeschrieben (13). So kommt es während systemischer Entzündungsreaktionen wie der Sepsis, nach Trauma oder Schock zur Aktivierung von Komplementsystem, Gerinnungskaskade und Arachnoidatsystem (18;92;100;111;131). Dieser Pathomechanismus wird auch unter dem Begriff „systemic inflammatory response syndrom“, kurz SIRS zusammengefasst. Im Rahmen der zellulären Immunantwort werden von aktivierten Thrombozyten, Leukozyten und Endothelzellen inflammatorische Mediatoren wie Zytokine, Prostaglandine, Leukotriene, Oxidantien und Proteasen freigesetzt (9;109;141).

1.3. Die Rolle der Thrombozyten bei der Pathogenese des ARDS

1.3. Die Rolle der Thrombozyten bei der Pathogenese des ARDS

Der Beitrag neutrophiler Granulozyten zur Entstehung des akuten Lungenschadens ist bereits vielfach untersucht worden (46;110;121). Der Bedeutung der Thrombozyten wurde allerdings erst wieder in jüngerer Zeit Beachtung geschenkt, nachdem sich die Hinweise durch klinische Erfahrungen und experimentelle Forschung verdichteten, dass auch sie eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des akuten Lungenschadens spielen (59;99;132). Bereits Ende der achtziger Jahre wurde erstmals beobachtet, dass Patienten mit ARDS parallel zur Entwicklung der Hypoxämie eine Thrombozytopenie ausbildeten (15;35). Weitere klinische Untersuchungen (56;57) sowie bioptische und autoptische Studien (61;105) konnten eine pulmonale Thrombozytensequestration zeigen. Zu diesem Zeitpunkt konnte allerdings nicht geklärt werden, ob den Thrombozyten eine aktive Rolle zukommt oder sie sekundär nach Aktivierung durch z.B. Endothelzellen oder Leukozyten dieses sequestrierende Verhalten zeigten. Einige Jahre später konnten *Barry et al.* am Rattenmodell nach Induktion einer erhöhten Sauerstoffradikalbildung durch Hyperoxygenierung nachweisen, dass aktivierte Thrombozyten noch vor neutrophilen Granulozyten in den pulmonalen Mikrogefäßen retinieren (6).

Die Adhärenz der Thrombozyten am Gefäßendothel erfolgt ähnlich der Leukozyten in mehreren Schritten. Die Thrombozyten werden mit dem Blutfluss in den Randstrom gespült und kommen dort mit der Gefäßwand in Berührung. Der erste, noch lockere Kontakt mit dem Gefäßendothel zeigt sich im sogenannten „Rollphänomen“ der Thrombozyten entlang der Endothelzellen (37;38;137). Dieser erste, reversible Kontakt wird über Adhäsionsmoleküle der Selektinfamilie vermittelt, während erst in einem weiteren Schritt die feste Bindung der Thrombozyten mit den Endothelzellen durch andere Adhäsionsmoleküle wie z.B. den endothelialen Integrinen und durch eine weitere Stabilisierung z.B. über Fibrinogenbrücken ermöglicht wird (38;137). Die Adhäsion der Thrombozyten bedeutet ihre Aktivierung und damit die Freisetzung eines Arsenal an potenter proinflammatorischer und vasoaktiver Mediatoren, wie z.B. Thromboxan A₂, Leukotriene, Chemokine, Serotonin, PF4 und platelet derived growth factor sowie die Freisetzung von Sauerstoffradikalen. Diese Substanzen sind in der Lage, per se einen Gewebeschaden zu verursachen sowie Endothelzellen und Leukozyten zu aktivieren (25;34;38;82;104).

1.4. Peroxynitrit-Bildung

Die Thrombozyten sind also über die Freisetzung von Entzündungsmediatoren in der Lage, neutrophile Granulozyten zu aktivieren, ihre Rekrutierung zu fördern und ihre immunologische Antwort zu steigern und damit einen pulmonalen Endothelschaden weiter zu verstärken. So konnten *Ruf et al.* zeigen, dass aktivierte Thrombozyten über Fibrinogenbindungen neutrophile Granulozyten stimulieren, was zu einer „respiratory burst“-Reaktion der neutrophilen Granulozyten mit einer gesteigerter Sauerstoffradikalbildung führt (112). Die Aktivierung neutrophiler Granulozyten durch Thrombozyten könnte dabei vor allem in der Lunge von wichtiger Bedeutung sein, da hier bereits unter physiologischen Bedingungen die Leukozytenzahl im Vergleich zu anderen Organen deutlich erhöht ist (26;74).

Die aktivierten neutrophilen Granulozyten sezernieren ebenfalls Entzündungsmediatoren, die eine weitere Aktivierung von Thrombozyten zur Folge haben (59). Nach inflammatorischer Stimulation und Aktivierung von Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen erfolgt eine weitere gegenseitige Verstärkung ihrer Immunantwort. Die Entstehung eines Circulus vitiosus könnte somit angenommen werden (17).

1.4. Peroxynitrit-Bildung

Als Folge der zellulären und humoralen Immunantwort auf ein inflammatorisches Geschehen kommt es u.a. durch die gesteigerte Expression der induzierbaren NO-Synthase zu einer vermehrten Produktion des Stickstoffmonoxid-Radikals NO. Wie bereits beschrieben findet parallel dazu eine gesteigerte Bildung von Sauerstoffradikalen, wie den Superoxidanionen, statt. *Beckmann et al.* konnten zeigen, dass NO-Radikale und Superoxidanionen unter pathophysiologischen Bedingungen das weitaus aggressivere und zytotoxischere Peroxynitrit bilden (8;36). Peroxynitrit schädigt Zellen und Organe durch Oxidation von Lipiden und Proteinen, durch direkte Enzymhemmung z.B. der mitochondrialen Atmungskette und durch Reaktionen mit Membranpumpen und Zytoskelettkomponenten. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass Peroxynitrit DNA-Strangbrüche verursacht und somit zu einer bedeutenden Schädigung der zellulären DNA beiträgt (122).

1.5. Aktivierung der PARS

1.5. Aktivierung der PARS

Die Schädigung der DNA induziert eine massive Aktivitätssteigerung des Enzyms Poly-(ADP-Ribosyl)-Synthetase, kurz PARS (64;122;123). Die PARS ist ein nucleär lokalisiertes Enzym, das über ADP-Ribosylierungen Protein-Strukturen und -Funktionen modifiziert und eine zentrale Stellung bei der DNA-Reparatur, im Zellzyklus und bei der Zelldifferenzierung einnimmt (64;134). Die PARS katalysiert bei der Modifikation der nucleären Proteine im Rahmen der DNA-Reparatur die Übertragung der ADP-Ribose von NAD^+ auf ein Zellkernprotein. NAD^+ wird dabei zu Nicotinamid gespalten, weshalb die intrazellulären NAD^+ -Reserven schnell aufgebraucht werden. Da NAD^+ u.a. einen essentiellen Bestandteil für den Elektronentransport in der mitochondrialen Atmungskette darstellt, wird die Resynthese unter einem gesteigerten ATP-Verbrauch notwendig. Dieser Energieverbrauch kann die zellulären Energiereserven der bereits vorgeschädigten Zelle so weit erschöpfen, dass es zum Zelltod durch Apoptose oder Nekrose kommt (7;31;64;135).

1.6. Beteiligung der PARS an der Genexpression

Neben den bereits erwähnten Funktionen der PARS besitzt dieses Enzym außerdem eine regulatorische Funktion bei der Genexpression. Mittels pharmakologischer und genetischer Hemmung der PARS konnte nach zahlreichen Studien ein Zusammenhang zwischen der PARS-Aktivierung und akuten sowie chronischen Entzündungsreaktionen beobachtet werden. Durch den Einfluss der PARS auf die Signaltransduktion fördert sie die Produktion von inflammatorischen Mediatoren wie z.B. auch Adhäsionsmolekülen und ist damit in der Lage, Entzündungsreaktionen zu verstärken (7;31;64;95;135). *Zingarelli et al.* konnten z.B. nach Inhibierung bzw. Inaktivierung der PARS eine reduzierte Expression der Adhäsionsmoleküle P-Selektin und ICAM-1 nachweisen (147;148). Auch weitere Autoren berichten von der regulatorischen Funktion der PARS bei der Expression von Adhäsionsmolekülen (14;143).

1.7. P-Selektin und E-Selektin

P-Selektin (CD62P) ist ein Adhäsionsmolekül aus der Selektinfamilie, die für den ersten Kontakt der frei zirkulierenden Thrombozyten mit dem Gefäßendothel verantwortlich sind. P-Selektin wird sowohl in den α -Granula der Thrombozyten als auch in den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen gespeichert. Kommt es im Rahmen akuter

1.8. Ziele und Fragestellungen

Entzündungsreaktionen, wie z.B. während Sepsis oder nach Ischämie/Reperfusion, zur Stimulation, sind die Thrombozyten und Endothelzellen in der Lage, P-Selektin innerhalb von Sekunden auf ihrer Zelloberfläche zu exprimieren (38). Auch E-Selektin, das nur von Endothelzellen gebildet wird, wird bei entsprechender Stimulation auf der Zelloberfläche exprimiert (38). *Massberg et al.* konnten am Mesenterium von Mäusen nach Ischämie/Reperfusion beobachten, dass die Hemmung von P-Selektin das initiale Rollphänomen der Thrombozyten entlang des Gefäßendothels signifikant abschwächt. Außerdem konnten sie zeigen, dass die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen im Mäusemesenterium nach Ischämie/Reperfusion vor allem durch die Expression von endothelialelem P-Selektin stattfinden (87).

1.8. Ziele und Fragestellungen

Die Interaktion von Thrombozyten mit den Gefäßendothelzellen der pulmonalen Mikrostrombahn während einer systemischen Entzündungsreaktion wurde bisher noch nicht untersucht. Zudem liegen bisher keine experimentellen Daten von Versuchen vor, in denen die Rolle der PARS bei dieser Interaktion beschrieben wurde.

Deshalb war es das erste Ziel dieser Studie, ein Modell zu entwickeln, mit dem man unter Verwendung der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie direkt *in vivo* die Dynamik der Thrombozyten in den pulmonalen Arteriolen, Kapillaren und Venolen unter inflammatorischen Bedingungen bestimmen und somit Aussagen zu ihrem Verhalten am pulmonalen Gefäßendothel treffen kann.

Als zweites Studienziel untersuchten wir in vorliegender Arbeit den Einfluss der PARS auf die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion in der pulmonalen Mikrostrombahn während einer generalisierten Entzündungsreaktion. Dafür hemmten wir die PARS pharmakologisch mit dem Hemmstoff 3-Aminobenzamid und analysierten die pulmonale Expression der Adhäsionsmoleküle P-Selektin und E-Selektin, die für den ersten Kontakt der Thrombozyten mit Endothelzellen verantwortlich gemacht werden.

2. METHODIK

2. METHODIK

2.1. Versuchstiere

Die Versuche wurden an „Weißen Neuseeländer“ Kaninchen durchgeführt. Die experimentellen Arbeiten an den „Weißen Neuseeländer“ Kaninchen fanden im Zeitraum Juli 1999 bis Juni 2001 am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität statt, nachdem die Genehmigung der Versuche durch die zuständigen Regierungsbehörden erteilt worden waren. Für die vorliegenden Studien wurden 16 männliche „Weißen Neuseeländer“ Kaninchen mit einem mittleren Körpergewicht von 2,5 bis 3,3 kg von der Firma Charles River Deutschland GmbH, Kißlegg, bezogen. Bis zum jeweiligen Versuch wurden die Tiere entsprechend den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes im Tierstall des Institutes für Chirurgische Forschung in Einzelkäfigen mit freiem Zugang zu Wasser und Trockenfutter (ssniff Mü Z®, ssniff Versuchstierdiäten GmbH, Soest) unter konstanten Bedingungen bei 24 Grad Celsius, 50% Luftfeuchtigkeit und einem 12stündigen Tag-/ Nachtrhythmus gehalten.

2.2. Vorbereitung der „Weißen Neuseeländer“ Kaninchen

Die Versuchstiere erhielten an der hinteren Ohrvene einen Verweilkatheter (22G, Insyte-W, Becton Dickinson, Heidelberg). Über diesen venösen Zugang wurde die Narkose mittels Thiopental (Trapanal, Fa. Byk Gulden, Konstanz, Dosierung 50 mg/kg KG) eingeleitet. Die Analgesie erfolgte mit Piritramid (Dipidolor, Janssen GmbH, Neuss, Dosierung 1,5 mg/kg KG), zur Muskelrelaxierung wurde 1 mg Pancuronium (Pancuronium, Organon Technica, Oberschleißheim) verwendet. Nach Erlöschen des Kornealreflexes wurden die Tiere im anterioren Hals- und Thoraxbereich, sowie in der linken Leiste enthaart. Für die nun folgende Tracheotomie wurde die Trachea stumpf freipräpariert und infraglottisch zwischen zwei Knorpelringen quer inzidiert, so dass ein auf ca. 10 cm gekürzter 5 mm nicht blockbarer Baby-Trachealtubus (Code 520, Fa. Vygon) 2 cm in das Lumen vorgeschoben werden konnte. Der Tubus wurde mit Zwirnfäden (1-Leinenzwirn, Fa. Ethicon, Nordersted) an der Trachea fixiert.

Die Narkose wurde mit 50 mg/kg KG α -D-(+)-Glucocloralose (Fa. Merck, Darmstadt) aufrechterhalten, die innerhalb von 30 min über den peripheren venösen Zugang appliziert

2.3. Experimentelles Protokoll

wurden. Zusätzlich erhielten die Versuchstiere über den gesamten Versuchsverlauf 0,6 mg/h Pancuronium sowie 5 ml/h physiologische Kochsalzlösung (Isotone Kochsalzlösung 0,9%, B.Braun, Melsungen) zum Ausgleich von Flüssigkeitsverlusten.

Die maschinelle Beatmung (Infant Ventilator IV-100, Sechrist Industries, Inc., Anaheim, USA) erfolgte druckkontrolliert, wobei ein in das Beatmungsgerät integriertes Manometer die kontinuierliche Messung der Atemwegsdrücke ermöglichte. Dabei betrug der inspiratorische Spitzendruck 8 cmH₂O, endexpiratorisch wurde zur Vermeidung von Mikroatelektasen ein positiver Druck von 2 cmH₂O gewählt. Die inspiratorische Sauerstoff-Fraktion lag bei 0,4, das Inspirations- zu Expirationsverhältnis bei 1:2. Die Atemfrequenz wurde an die Zielwerte, arterieller Kohlendioxidpartialdruck von 35 mmHg sowie arterieller pH-Wert von ca. 7,4, angepasst und lag damit durchschnittlich bei 20/min.

Die Körpertemperatur der Versuchstiere wurde während der gesamten Versuchszeit mittels einer Heizplatte (Fa. Effenberger, München) konstant gehalten und über eine rektale Temperatursonde kontrolliert.

2.3. Experimentelles Protokoll

2.3.1. Makrohämodynamische Parameter

2.3.1.1. Katheterimplantationen

Zur kontinuierlichen Messung der Makrohämodynamik wurden den Versuchstieren insgesamt drei Katheter implantiert:

Zur Bestimmung des arteriellen und zentralvenösen Blutdrucks wurde ein Katheter in die rechte Arteria carotis communis und ein weiterer Katheter in die rechte Vena jugularis interna gelegt. Nach stumpfer Präparation wurden die Gefäße mit 3.0 Leinenzwirn (Fa. Ethicon, Nordersted) cranial ligiert und proximal mittels eines Mikroclips (Fa. Aesculap, Tuttlingen) abgeklemmt, um sie anschließend zwischen Ligatur und Clip zu durchtrennen. In die nun eröffneten Gefäßlumen wurde der mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllte Katheter (Cavatheter 1,1 x 1,7 mm, Fresenius AG, Bad Homburg) eingeführt und nach Entfernung der Mikroclips in Richtung Herz vorgeschoben. Die Fixierung der Katheter erfolgte ebenfalls mit

2.3. Experimentelles Protokoll

3.0 Leinenzwirn, der Hautschnitt wurde mittels Naht (3.0-Ethibond, Fa. Ethicon, Nordersted) verschlossen.

Für die Implantation des pulmonalarteriellen Katheters wurden im linken zweiten Intercostalraum parasternal unter sorgfältiger Blutstillung die Muskulatur und die Arteria thoracica interna nach vorausgegangener Ligatur durchtrennt. Das dadurch sichtbar gewordene Perikard wurde vorsichtig eröffnet und der rechte Ventrikel dargestellt. Durch den rechten Ventrikel wurde der ebenfalls mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllte Katheter (Cavafix MT 134, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) transmural bis in die Arteria pulmonalis vorgeschoben und mittels U-Naht (5.0-Prolene, Fa. Ethicon, Nordersted) fixiert, die zuvor im subepikardialen Myokard angelegt wurde.

2.3.1.2. Gemessene und berechnete makrohämodynamische Parameter

Die Katheter wurden nach der Implantation über mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllte Druckleitungen mit Statham-Druck-Transducern (P23XL-1, Fa. Spectram, Düsseldorf) verbunden. Die von den Druckwandlern gemessenen arteriellen, zentralvenösen und pulmonalarteriellen Drücke wurden kontinuierlich an einen Monitor (pDg, Servonid) angezeigt. Durch die Messung der systolischen (P_s) und diastolischen (P_d) Drücke konnte nach folgender Formel der arterielle Mitteldruck (P_m) berechnet werden:

$$P_m = P_d + (P_s - P_d) / 3$$

P_m :	Mitteldruck
P_d :	diastolischer Druck
P_s :	systolischer Druck

Die arteriellen, zentralvenösen und pulmonalarteriellen Druckkurven wurden zusätzlich mit Hilfe eines 6-Kanal-Schreibers (Oscilloreg, Siemens AG, Erlangen) kontinuierlich aufgezeichnet. Die Schreibergeschwindigkeit (v_s) betrug während der Messzeiträume 50 mm/s, ansonsten 5 mm/s. Die Herzfrequenz wurde anhand des gemessenen Abstandes von 10 aufeinanderfolgenden Druckkurvenmaxima (s_{10}) und der bekannten Schreibergeschwindigkeit nach folgender Formel berechnet:

2.3.2. Peripheres Blutbild

$$HF = 10 \cdot 60 \cdot v_s / s_{10}$$

HF: Herzfrequenz

v_s : Schreibergeschwindigkeit

s_{10} : Abstand von 10 aufeinanderfolgenden Druckmaxima

2.3.2. Peripheres Blutbild

Den Versuchstieren wurden während jeder Versuchsphase ca. 0,5 ml arterielles Blut zur Analyse des peripheren Blutbildes entnommen. Mit Hilfe eines Coulters (Coulter Counter, Coulter Electronics Inc., Krefeld) wurden die Erythrozyten- (RBC), Leukozyten- (WBC) und Thrombozytenkonzentrationen (PLT) sowie der Hämoglobingehalt (Hb) und der Hämatokrit (Hk) gemessen.

2.3.3. Mikrohämodynamische Parameter - Intravitalmikroskopie

2.3.3.1. Thoraxfenster

Zur quantitativen intravitalmikroskopischen Bestimmung der Mikrohämodynamik und der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion in den einzelnen Abschnitten der pulmonalen Mikrostrombahn erfolgte bei den Versuchstieren eine Fensterimplantation in die rechte Thoraxwand. Nach der von *Kuhnle et al.* beschriebenen Operationstechnik wurde nach Umlagerung in Linksseitenlage an der rechten Thoraxseite die Haut auf Höhe der vierten und fünften Rippe sowie der Musculus serratus anterior reseziert (79). Unter sorgfältiger Blutstillung und Schonung der Pleura parietalis erfolgte danach die Durchtrennung der Interkostalmuskulatur. Anschließend wurden Teile der vierten und fünften Rippe reseziert und das transparente Thoraxfenster implantiert. Zur Lungenprotektion wurde ein maximaler Abstand zwischen Lungenoberfläche und Thoraxwand durch Modifikation der Beatmungsparameter geschaffen. So wurden während der Pleuraspaltung und Rippenteilresektion minimale Beatmungsdrücke von inspiratorisch 4 cmH₂O, ein Verzicht auf einen positiven endexpiratorischen Druck und eine inspiratorische Sauerstoff-Fraktion von 100% gewählt. Das Thoraxfenster (Abbildung 1) besteht aus einem Metallzylinder, an dessen

2.3.3. Mikrohämodynamische Parameter - Intravitalmikroskopie

Boden eine transparente Teflonmembran (YSI Model 5793, Standard Membrane Kit, Yellow Springs Instruments Co., Ohio, USA) gespannt ist, die den optischen Zugang auf die Lungenoberfläche mittels Wasserimmersionsmikroskopie ermöglicht. In der Wand des Metallzylinders befinden sich 16 vertikale Bohrlöcher von je 500 μm Durchmesser, an die ein Unterdruck von $-0,4$ bar angelegt und darüber die Lungenoberfläche an das Fenster fixiert wurde. Zum Schutz der Lungenoberfläche vor Auskühlung und Austrocknung wurde die Teflonmembran mit einer Tyrode-Pufferlösung kontinuierlich superfundiert (76). Ein Liter dieser Lösung beinhaltet 8708 mg NaCl, 201 mg KCl, 1950 mg NaHCO_3 , 265 mg CaCl_2 , 102 mg MgCl_2 , 55 mg NaH_2PO_4 , 991 mg Glucose, aufgefüllt auf einen Liter mit H_2O . Die Thyrode-Lösung wurde zudem auf eine Osmolarität von 300 mosm und einen pH-Wert von 7,4 eingestellt, sowie vor Superfusion der Teflonmembran auf 37°C erwärmt und durch Sättigung mit einem Gasgemisch aus 12% Sauerstoff, 5% Kohlendioxid und 83% Stickstoff auf arterielle Blutgaswerte äquilibriert.

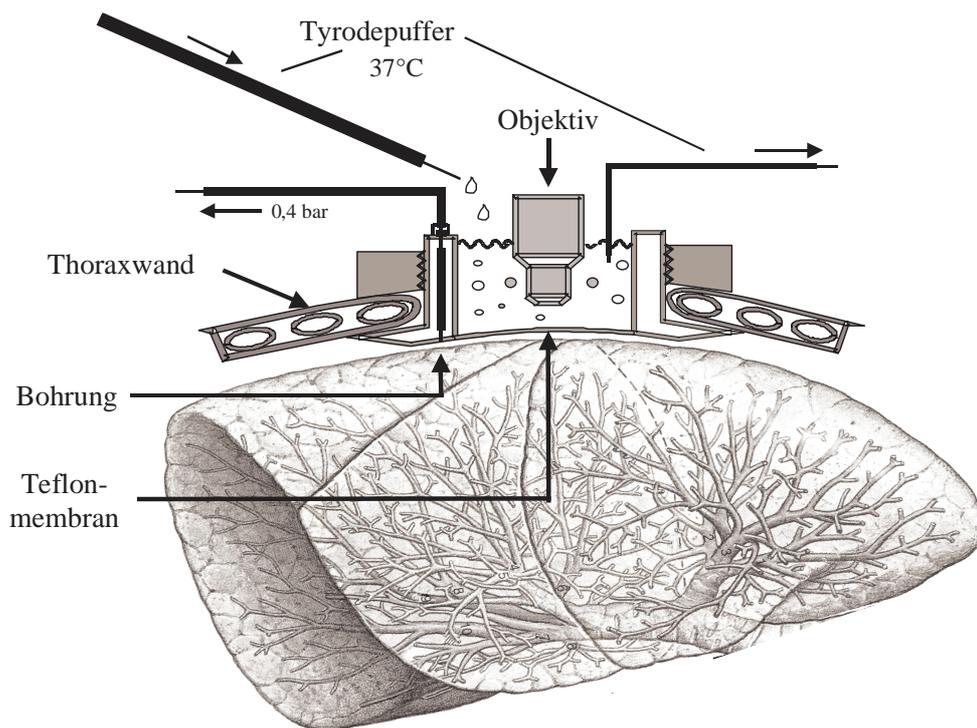


Abbildung 1: Querschnitt durch das implantierte Thoraxfenster. Modifiziert nach *Kuhnle et al.* (79)

2.3.3.2. Fluoreszenzmarkierung der Erythrozyten und Thrombozyten

Um die Mikrohämodynamik und Thrombozytenkinetik in der pulmonalen Mikrozirkulation mittels Intravitalmikroskopie visualisieren und analysieren zu können, wurden die

2.3.3. Mikrohämodynamische Parameter - Intravitalmikroskopie

Erythrozyten und Thrombozyten fluoreszenzmarkiert. Um die Zellen voneinander differenzieren zu können, wurden zwei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe mit unterschiedlichen optischen Filtern verwendet.

Die Markierung der Erythrozyten erfolgte *in vitro* mit Fluoresceinisothiocyanat FITC (Fluorescein Isothiocyanate Isomer I No. F7250, Sigma Chemical Company, St. Louis, USA).

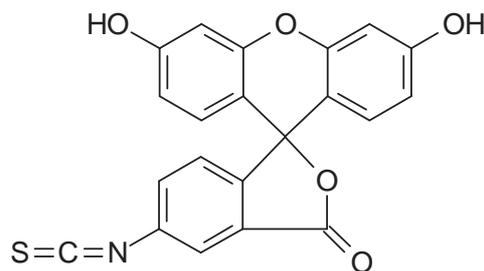


Abbildung 2: Fluoresceinisothiocyanat (FITC)

Nach der von *Berger* (10) und *Goetz* (40) beschriebenen Methode wurden dem Kaninchen während der Präparationszeit 5 ml arterielles Blut entnommen und heparinisiert (Heparin-Natrium, Fa. B. Braun, Melsungen). Um die Erythrozyten aus dem Vollblut zu separieren, wurde dieses anschließend mit 45 ml Alsever's Puffer (20,5 g Glucose, 8,0 g Natriumcitrat, 0,55 g Zitronensäure, H₂O ad 1000 ml) dreimal gewaschen, indem das Erythrozyten-Alsever's-Gemisch bei 4°C für 10 min bei 2000 U/min zentrifugiert (Ritoxa/K, Hettich, Tuttlingen) und das Pellet jeweils wieder mit Alsever's-Puffer resuspendiert wurde. Das so entstandene Produkt wurde jetzt mit Bicine-Puffer (3,264 g Bicine, 8,766 g NaCl, 10 ml 1N NaOH, H₂O ad 1000 ml, pH 8,3) gewaschen und das Pellet im Verhältnis 1:1 mit Bicine-Puffer verdünnt. Danach wurde das Gemisch mit 1,5 mg/ml FITC, welches zuvor mit zwei Tropfen DMF (*N,N*-Dimethylformamid, Fa. Merck, Darmstadt) in Lösung gebracht worden war, für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden drei bis vier weitere Waschvorgänge mit Bicine-Puffer durchgeführt, bis der Überstand keine sichtbare Färbung mehr hatte. Im letzten Schritt wurden die FITC-markierten Erythrozyten mit physiologischer Kochsalzlösung auf einen Hämatokrit-Wert (Hk) von 0,5 verdünnt und dem Versuchstier nach Beendigung der Präparation und Überprüfung der Einschlußkriterien reinfundiert.

2.3.3. Mikrohämodynamische Parameter - Intravitalmikroskopie

Die Fluoreszenzmarkierung der Thrombozyten erfolgte ebenfalls *in vitro* mit Rhodamin 6G (Fa. Merck, Darmstadt).

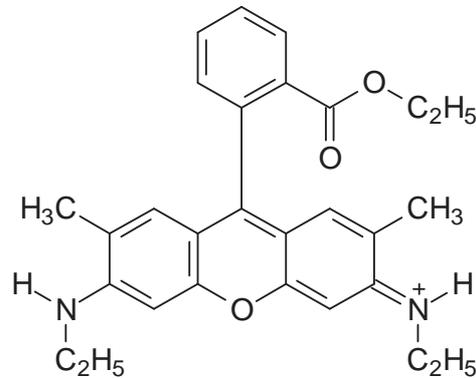


Abbildung 3: Rhodamin 6G

Rhodamin G6 ist ein positiv geladener lipophiler Fluoreszenzfarbstoff, der sich aufgrund seiner chemisch-physikalischen Eigenschaften spezifisch in Mitochondrien anreichert (3). Nach einem Protokoll von *Massberg et al.* (87) wurden 10 ml Vollblut ohne Aspiration aus dem geöffneten Dreiwegehahn direkt in ein Polypropylenröhrchen (Nennvolumen 15 ml) entnommen. Die Röhrchen wurden zuvor mit 3 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung gefüllt. In 0,55 ml Aqua ad injectione gelöst, wurden dieser Vorlage 15,2 µmol Citrat, 30 µmol Tri-Natriumcitrat, 40 µmol Dextrose sowie 3 µg Prostaglandin E1 (alle Sigma Chemical Company, St.Louis, USA) zugesetzt. Nach zehnminütiger Zentrifugation der Suspension mit 250 G wurde das plättchenreiche Plasma vorsichtig in ein weiteres Röhrchen überführt. Dieses Röhrchen enthielt als Vorlage 15,2 µmol Citrat, 30 µmol Tri-Natriumcitrat, 40 µmol Dextrose sowie 3 µg Prostaglandin E1 in 0,55 ml Aqua ad injectione. Anschließend erfolgte der Zusatz des Fluorochroms Rhodamin 6G (Sigma Chemical Company, St.Louis, USA) als 0,05% Lösung in der Dosierung 15 µl Lösung pro ml plättchenreiches Plasma. Die Thrombozytensuspension wurde diesmal mit 2000 G erneut für 10 min zentrifugiert. Nach Abpipettieren des Überstandes wurde das Sediment mit 2 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung resuspendiert und die Reinheit der Suspension mittels eines Coulter-Zytometers (Coulter AcT, Coulter Corp. Miami, FL, USA) überprüft. Die Reinjektion erfolgte unmittelbar vor der Durchführung der Intravitalmikroskopie.

2.3.3. Mikrohämodynamische Parameter - Intravitalmikroskopie

2.3.3.3. Videomikroskopie

Apparativer Aufbau

Nach Beendigung der Katheter- und Thoraxfensterimplantation wurde das Kaninchen auf einen in der Horizontalen beweglichen Kipptisch unter dem Mikroskop gelagert. Das Thoraxfenster wurde durch Neigen des Kipptisches in eine zum Lichtstrahlengang des Mikroskops senkrechte Position gebracht und anschließend mit einem am Fenster befestigten Fixierstab an einem Mikromanipulator so arretiert, dass seine Position in Bezug auf den Kipptisch stets konstant blieb und außerdem weder Druck noch Zug über den Metallzylinder auf die darunter liegende Lunge ausgeübt werden konnte. Das Verhalten der fluoreszenzmarkierten Erythrozyten und Thrombozyten in den subpleural gelegenen Mikrogefäßen der Lunge wurde mittels eines Intravitalmikroskops (Orthoplan, Fa. Leitz GmbH, Wetzlar) visualisiert und über eine hochauflösende Silikon-intensivierte Restlichtvideokamera (C2400-08, Fa. Hamamatsu, Herrsching) und einen Videorekorder zur späteren *off-line* Analyse auf Videoband analog aufgenommen. Als Lichtquelle des Auflichtilluminators (Ploemopak, Leica GmbH, Wetzlar) diente eine 75 W Xenon-Lampe (XBO 75 W/2, Fa. Leitz, München). Das Licht passierte dabei einen 7 mm Hitzefilter, eine variable Irisblende und einen Anregungsfilter. Über einen Teilerspiegel mit Reflexionskurzpaßfilter wurde das Licht durch das Objektiv (Salzwasser-Immersionsobjektiv 25x, n.A. 0.6, Leitz GmbH, Wetzlar), welches gleichzeitig als Kondensator fungierte, und durch das Thoraxfenster auf die Lungenoberfläche geleitet. Nach Anregung der jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffe in der Lungenmikrozirkulation wurde das emittierte längerwellige Fluoreszenzlicht vom Objektiv gebündelt und gelangte zum Reflexionspaßfilter, an dem es aufgrund seiner größeren Wellenlänge abgelenkt und über Sperrfilter und einen weiteren Spiegel zum Okular (Periplan 10x, Leitz GmbH, Wetzlar) bzw. direkt über einen C-Mount-Adapter zu der Restlichtkamera gelenkt wurde. Diese besitzt eine hohe Sensitivität ($>50 \mu\text{A}/\mu\text{W}$; maximale Sensitivität: 4×10^{-4} Lux) im Wellenlängenbereich von 400-650 nm sowie eine räumliche Auflösung von 500 TV-Linien bei einer geometrischen Verzerrung von maximal 3%. Die Sensitivität kann durch Shading den Ausleuchtungsbedingungen angepasst werden. Die videomikroskopischen Bilder wurden auf einem Monitor in insgesamt 930facher Vergrößerung sichtbar gemacht. Über einen Videozeitgenerator (VTG 33, FOR-A-Company Ltd., Japan) wurden simultan Datum (MM:TT) und aktuelle Uhrzeit (hh:mm:ss:s/100) in das Videobild eingespielt. Mit einer

2.3.3. Mikrohämodynamische Parameter - Intravitalmikroskopie

zeitlichen Auflösung von 50 Halbbildern pro Sekunde wurden die Bilder mit einem Recorder auf Videoband gespeichert. Zur Einstellung der Fokusebene konnte die Mikroskop-Kamera-Einheit in vertikaler Richtung sowohl über einen motorgetriebenen Spindeltrieb (Fa. Leitz, München) als auch über einen manuell bedienbaren Grob-/Feintrieb bewegt werden. Das Versuchstier war unter dem Mikroskop auf einem Schrittmotor-getriebenen Kreuztisch (Sonderanfertigung, Fa. Leitz, München) gelagert und in horizontaler Ebene beweglich. Die Bewegung des Kreuztisches erfolgte elektronisch gesteuert in Schritten von 25 µm mit einer Genauigkeit von 1 µm in einem Verschiebereal von 10 x 10 cm, wobei die Koordinaten jeder beliebigen Position auf einem Computer gespeichert und somit jederzeit wieder exakt angesteuert werden konnten. Zur Vermeidung von Erschütterungen war die Mikroskopeinheit schwingungsfrei auf einer 300 kg schweren Granitplatte montiert, die wiederum auf einem massiven Metallunterbau pneumatisch gelagert war.

Zusammensetzung der Filterblöcke zur Differenzierung der fluoreszenz-markierten Zellen

Um die mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierten Erythrozyten und Thrombozyten von einander unterscheiden zu können, wurden in den Strahlengang des Mikroskops Filterkombinationen aus Anregungsfilter, Teilerspiegel und Sperrfilter (alle Fa. Leitz, München) eingeschoben. Dabei konnten die FITC-markierten Erythrozyten selektiv mittels eines L3-Filterblocks und die Rhodamin 6G-markierten Thrombozyten selektiv mit einem N2-Filterblock dargestellt werden. Durch die zusätzliche Verwendung eines I2/3-Filterblocks war die gleichzeitige Visualisierung beider Zelltypen möglich. Die Anregungs- und Emissionsmaxima von FITC und von Rhodamin 6G lassen sich Tabelle 1 entnehmen. Tabelle 2 zeigt die in den Filterkombinationen verwendeten Anregungsfilter, Teilerspiegel und Sperrfilter.

Farbstoff	markierter Zelltyp	Anregungsmaximum	Emissionsmaximum
FITC	Erythrozyten	490 nm	525 nm
Rhodamin 6G	Thrombozyten	540 nm	625 nm

Tabelle 1: Maximale Anregungs- und Emmissionswellenlängen der mit den Fluoreszenzfarbstoffen FITC- und Rhodamin 6G-markierten Erythrozyten und Thrombozyten.

2.3.3. Mikrohämodynamische Parameter - Intravitalmikroskopie

Filterblock	Darstellung	Anregungsfilter	Teilerspiegel	Sperrfilter
L3	FITC	BP 450 – 490 nm	RKP 510 nm	BP 525 nm
N2	Rhodamin 6G	BP 530 – 560 nm	RKP 580 nm	LP 580 nm
I2/3	FITC/Rhodamin 6G	BP 450 – 490 nm	RKP 510 nm	LP 515 nm

Tabelle 2: Wellenlängenbereiche der in den verwendeten Filterblöcken eingebauten Anregungsfilter, Teilerspiegel und Sperrfilter (alle Teile Fa. Leitz, München); BP: Bandpaßfilter, LP: Langpaßfilter, RKP: Reflexionskurzpassfilter

Beatmung während der Videomikroskopie

Um die durch die Atemexkursionen entstehenden Abstandsänderungen zwischen Lungenoberfläche und Mikroskop zu vermeiden, wurden die videomikroskopischen Sequenzen während mehrerer inspiratorischer Plateauphasen von je 10 sec Dauer aufgenommen. Zwischen den einzelnen Plateauphasen wurden die Versuchstiere nach den anfangs beschriebenen Beatmungsparametern beatmet.

Mikroskopierareale

Unter Verwendung des L3-Filterblockes wurden am Unterrand des rechten Lungenoberlappens oder Mittellappens pro Versuchstier 2-3 Arteriolen, 2-3 Venolen und entsprechend 2-3 Kapillargebiete aufgesucht. Die ausgewählten Gefäße sollten sich in ihrem gesamten Verlauf in der Focusebene darstellen lassen und klare Gefäßgrenzen aufweisen. Die Positionen der untersuchten Areale konnten aufgrund der im Computer gespeicherten Koordinaten in den darauffolgenden Versuchsphasen wieder exakt angesteuert werden, so dass ein direkter quantitativer Vergleich zwischen den einzelnen Versuchsphasen möglich wurde. Während jeder Phase wurden die identischen Gebiete mit dem L3- und dem N2-Filterblock während mehrerer inspiratorischer Plateaus beobachtet.

2.3.3.4. Gemessene und berechnete mikrohämodynamische Parameter

Die Auswertung der videomikroskopischen Sequenzen erfolgte *off line* in einer Computergestützten Einzelbild-Analyse mittels des digitalen Bildverarbeitungssystems OPTIMAS

2.3.3. Mikrohämodynamische Parameter - Intravitalmikroskopie

(Optimas, Bioscan, Edmonds, USA). Durch den an die Video-Einheit angeschlossenen Personalcomputer konnten Videosequenzen digitalisiert und per Computermaus Markierungen in die Videobilder eingeblendet werden. Das OPTIMAS System war dabei interaktiv mit einer eigens entwickelten Datenverarbeitung verbunden (*Kuhnle et al.*, unveröffentlicht), mit deren Hilfe alle ermittelten Einzelwerte in speziell konzipierte Tabellen des Kalkulationsprogramms MS-Excel übertragen wurden. So konnten der innere Gefäßdurchmesser d und die Länge l der untersuchten Arteriolen und Venolen sowie die Alveolarseptenbreite s nach erfolgtem Einzeichnen numerisch über den Videoschirm ermittelt werden. Verzerrungen des Videobilds, die sowohl durch die optische Einheit des Intravitalmikroskops als auch durch den Bildschirm selbst bedingt waren, konnten, wie von *Kuhnle et al.* beschrieben, ausgeglichen und Messfehler somit weitgehend vermieden werden (79).

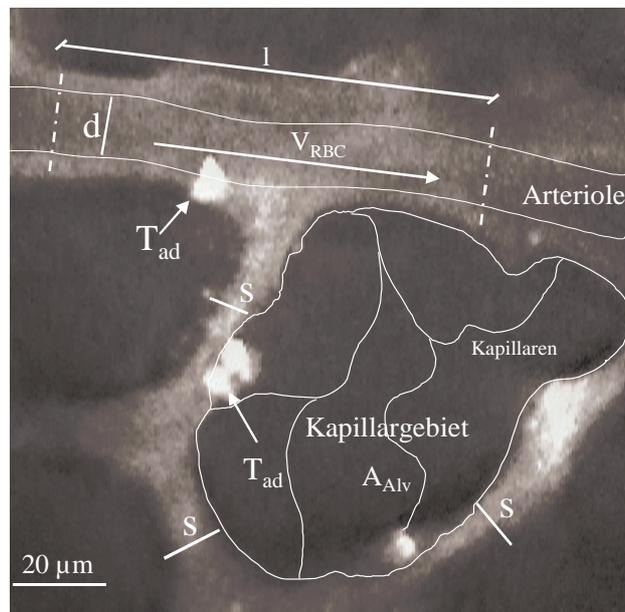


Abbildung 4: Exemplarisches fluoreszenzmikroskopisches Standbild eines subpleuralen Gefäßareals, hier mit dem Thrombozytenfilter N2 aufgenommen. Schematisch eingezeichnet ist der Verlauf einer Arteriole mit dem Durchmesser d und der Länge l des Gefäßes sowie das kapillare Netzwerk einer Alveole mit der Fläche A_{Alv} und den Alveolarseptenbreiten S . In der Arteriole und im Kapillargebiet sind adhärenente Thrombozyten mit T_{ad} gekennzeichnet.

Erythrozytenfliessgeschwindigkeit in Arteriolen und Venolen

Die Erythrozytenfliessgeschwindigkeit v_{RBC} wurde während jeder Versuchsphase in je 2-3 identischen Arteriolen und Venolen pro Versuch bestimmt, indem in den digitalisierten

2.3.3. Mikrohämodynamische Parameter - Intravitalmikroskopie

Bildsequenzen die von FITC-markierten Erythrozyten zurückgelegten Wegstrecken Δs gemessen wurden. Das für die Geschwindigkeitsberechnung benötigte Zeitintervall Δt konnte an den eingeblendeten Uhrzeiten abgelesen werden. Die Geschwindigkeit der einzelnen Erythrozyten v_{RBC} ließ sich nun als Quotient aus der Wegstrecke Δs und der dafür benötigten Zeit Δt berechnen. Das harmonische Mittel der Einzelgeschwindigkeiten wurde nach *Sarelius et al.* (113) und wie folgt gebildet:

$$v_{RBC} = n / \sum (1/v_{RBC1}, 1/v_{RBC2}, 1/v_{RBC3}, \dots, 1/v_{RBCn})$$

v_{RBC} : harmonisches Mittel der Einzelgeschwindigkeiten

n : Anzahl der gemessenen Erythrozyten

$v_{RBC1, \dots, n}$: Geschwindigkeiten der Einzelerthrozyten

Dabei ergibt sich nach *Sarelius et al.* folgender Variationskoeffizient $cv_{v_{RBC}}$:

$$cv_{v_{RBC}} = \sqrt{\sigma_{v_{RBC}}^2 / n \cdot v_{RBC}^2}$$

$cv_{v_{RBC}}$: Variationskoeffizient der Erythrozytenfliessgeschwindigkeiten

$\sigma_{v_{RBC}}^2$: Varianz der Erythrozytenfliessgeschwindigkeiten (Einzelmesswerte)

v_{RBC} : harmonisches Mittel der Erythrozytenfliessgeschwindigkeiten [$\mu\text{m/s}$]

n : Anzahl der gemessenen Erythrozyten

Es wurden von so vielen einzelnen Erythrozyten die jeweiligen Fliessgeschwindigkeiten bestimmt, bis der Variationskoeffizient unter 10% lag. Dafür war die Geschwindigkeitsmessung von durchschnittlich 30 Erythrozyten notwendig. Der Erythrozytenfluß N_{RBC} , d.h. die Anzahl der Erythrozyten, die einen bestimmten Gefäßabschnitt pro definierte Zeiteinheit passieren, wurde ebenfalls in den identischen 2-3 Arteriolen bzw. Venolen ausgezählt.

2.3.3. Mikrohämodynamische Parameter - Intravitalmikroskopie

Blutvolumenfluß und Wandscherrate

Der Blutvolumenfluß Q_b in einem Gefäß, d.h. das Blutvolumen, das pro Zeiteinheit einen imaginären Gefäßabschnitt passiert, kann aus dem Gefäßdurchmesser d und der Blutflussgeschwindigkeit v_b errechnet werden. Die Blutflussgeschwindigkeit v_b lässt sich wiederum unter Berücksichtigung des Fahraeus-Effektes von der mittleren Erythrozytenflussgeschwindigkeit v_{RBC} ableiten. Bei dieser Ableitung gilt, dass das Verhältnis zwischen dynamischem Mikrohämatokrit (Tubular Hämatokrit, H_T) im untersuchten Gefäß und Abflusshämatokrit (Discharge Hämatokrit, H_D) dem Verhältnis zwischen v_b und v_{RBC} entspricht (106). Für jede Arteriole und Venole wurde das jeweilige Verhältnis zwischen H_T / H_D nach der Methode von *Pries et al.* berechnet (106):

$$H_T / H_D = H_D + (1 - H_D) \cdot (1 + 1,7e^{-0,415d} - 0,6e^{-0,011d})$$

Dabei wurde davon ausgegangen, dass der Abflusshämatokrit H_D dem im aortalen Blut gemessenem Hämatokrit H_k entspricht. Die Blutflussgeschwindigkeit v_b wurde anschließend bestimmt als:

$$v_b = v_{RBC} \cdot H_T / H_D$$

Daraus folgend ergibt sich nun unter der Annahme einer zylindrischen Gefäßgeometrie die Berechnung des Blutvolumenflusses Q_b als:

$$Q_b = v_b \cdot \pi \cdot (d / 2)^2$$

An den inneren Gefäßwänden auftretende Scherkräfte können vor allem die Interpretation der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion beeinflussen. Um dies zu vermeiden, wurde die

2.3.3. Mikrohämodynamische Parameter - Intravitalmikroskopie

Wandscherrate γ unter Annahme einer zylindrischen Gefäßgeometrie und Verwendung des Poiseuille'schen Gesetzes für Newton'sche Flüssigkeiten berechnet als:

$$\gamma = (v_b / d) \cdot 8$$

Thrombozytenkinetik in Arteriolen und Venolen

Die Thrombozytenkinetik bzw. Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion wurde mittels der Thrombozytenfliessgeschwindigkeiten, den an den Gefäßwänden adhärenen Thrombozyten und der jeweiligen Thrombozytengefäßkonzentration beschrieben. Die mittlere Thrombozytenfliessgeschwindigkeit v_{PLT} wurde analog zu den Erythrozyten als harmonisches Mittel aller Thrombozyten ermittelt, die einen definierten Gefäßquerschnitt in einem definierten Beobachtungszeitraum passierten. Die Berechnung erfolgte wie die von *Kuebler et al.* beschriebene Berechnung der Fliessgeschwindigkeiten von Leukozyten in diesen Gefäßabschnitten (73):

$$v_{\text{PLT}} = n / \sum (1/ v_{\text{PLT}1}, 1/ v_{\text{PLT}2}, 1/ v_{\text{PLT}3}, \dots, 1/ v_{\text{PLT}n})$$

Zu adhärenen Thrombozyten (n_{ST}) wurden die Thrombozyten erklärt, die ihre Position am Gefäßendothel eines definierten Gefäßabschnittes während eines Beobachtungszeitraumes von 10 sec nicht veränderten. Unter der Annahme einer zylindrischen Gefäßgeometrie kann die Anzahl ortständiger Thrombozyten bezogen auf die Gefäßwandoberfläche (PLT_{ad}) in $[1/\text{mm}^2]$ ermittelt werden. Da es sich um die identischen Gefäßsegmente handelt, die auch zur Bestimmung der mikrohämodynamischen Parameter verwendet wurden, sind der Gefäßdurchmesser d und die Gefäßsegmentlänge l bereits bekannt.

$$\text{PLT}_{\text{ad}} = n_{\text{ST}} / (d \cdot \pi \cdot l)$$

2.3.3. Mikrohämodynamische Parameter - Intravitalmikroskopie

Die Konzentration der im Gefäß frei abfließenden Thrombozyten $[PLT]_D$ lässt sich wie folgt ausdrücken:

$$[PLT]_D = N_{PLT} / Q_b$$

N_{PLT} : Thrombozytenfluss

Q_b : Blutvolumenfluss

Die totale Thrombozytengefäßkonzentration $[PLT]_T$ beschreibt hingegen alle Thrombozyten, sowohl die fließenden als auch die ortständigen, die in einem definierten Gefäßabschnitt und Beobachtungszeitraum vorhanden sind.

$$[PLT]_T = [PLT]_D \cdot v_b / v_{PLT} + n_{ST} / (l \pi [d/2]^2)$$

v_b : Blutflussgeschwindigkeit

v_{PLT} : Thrombozytenflussgeschwindigkeit

n_{ST} : Anzahl der adhärenen Thrombozyten

l : Länge des Gefäßabschnittes

d : Gefäßdurchmesser

Das Verhältnis der frei fließenden Thrombozytengefäßkonzentration $[PLT]_D$ zu der totalen Thrombozytengefäßkonzentration $[PLT]_T$ lässt auf den Retentionseffekt der Thrombozyten in den unterschiedlichen Gefäßabschnitten schließen (78). Zum Thrombozytenfluß N_{PLT} werden die Thrombozyten gezählt, die pro Sekunde einen definierten Gefäßabschnitt passieren. Zu

2.3.3. Mikrohämodynamische Parameter - Intravitalmikroskopie

allen Versuchsphasen wurden die identischen Arteriolen und Venolen beobachtet, die auch schon zur Bestimmung der Mikrohämodynamik verwendet wurden.

Erythrozytenfliessgeschwindigkeit in Alveolarkapillaren

Da in den einzelnen Kapillaren ein niedriger Erythrozytenfluß und geringe Erythrozytenfliessgeschwindigkeiten vorliegen, wären für die Erfassung mikrohämodynamischer Parameter in den einzelnen Kapillarabschnitten extrem lange Beobachtungszeiträume notwendig gewesen. Deshalb wurden mit Hilfe des zuvor beschriebenen Bildverarbeitungssystems zuerst die subpleurale Wandfläche einer untersuchten Alveole am Bildschirm markiert und die Fläche dieses Kapillarareals (A_{ALV}) vom Computer berechnet. Anschließend wurden alle Kapillaren eines Alveolarareals zu einer Einheit zusammengefasst und die mikrozirkulatorischen Parameter im gesamten kapillaren Netzwerk eines Alveolargebietes bestimmt. Pro Versuch wurden 2-3 Kapillargebiete ausgewertet. Zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten wurden jeweils wieder die identischen Kapillargebiete aufgesucht. Die mittlere Erythrozytenfliessgeschwindigkeit in den Kapillaren wurde analog zu den Arteriolen und Venolen anhand des Quotienten aus zurückgelegter Wegstrecke Δs und der dafür benötigten Zeit Δt bestimmt und das harmonische Mittel berechnet. Der Variationskoeffizient konnte durch die Geschwindigkeitsmessung von 20-30 Erythrozyten pro Alveolarareal unter 10 % gesenkt werden.

Thrombozytenkinetik im Alveolarareal

Die mittlere harmonische Thrombozytenfliessgeschwindigkeit in den Alveolarkapillaren wurde entsprechend der Erythrozytenfliessgeschwindigkeiten ermittelt. Gezählt wurden nur die Thrombozyten, die während des Beobachtungszeitraumes nicht an derselben Stelle im Kapillarnetz statisches Verhalten zeigten. Die Zahl der adhärenenten Thrombozyten (PLT_{ad}) wurde in den identischen Alveolarabschnitten ausgezählt, die auch zur Messung der Erythrozytenfliessgeschwindigkeiten verwendet wurden. Als adhärenent galten wieder jene Thrombozyten, die ihre Gefäßwandständigkeit während 10 sec Beobachtungsdauer nicht veränderten. Ihre Anzahl (n_{ST}) wurde bestimmt und auf die entsprechende Alveolarfläche (A_{ALV}) als $[1/mm^2]$ bezogen.

2.3.4. Ermittlung der Expression der Adhäsionsmoleküle P- und E-Selektin mittels Westernblot-Analyse.

$$PLT_{ad} = n_{ST} / A_{ALV}$$

Alveolarseptenbreite

Die Alveolarseptenbreite wurde ebenfalls intravitalmikroskopisch gemessen und gilt als Maß für die Entwicklung eines interstitiellen Lungenödems, das wiederum ein Merkmal für eine beginnende pulmonale Entzündungsreaktion darstellt. Als Alveolarseptenbreite wurde definitionsgemäß der kürzeste Abstand zweier benachbarter Alveolen bestimmt. Die Messung erfolgte pro Alveole an mindestens 4-5 verschiedenen Stellen durch Markierung der Alveolarsepten im digitalisierten Videobild. Die Alveolarseptenbreite wurde anschließend mittels des digitalen Bildverarbeitungssystems berechnet.

2.3.4. Ermittlung der Expression der Adhäsionsmoleküle P- und E-Selektin mittels Westernblot-Analyse

P-Selektin wird während akuter Entzündungsreaktionen innerhalb von Sekunden aus Speicherorganellen von Thrombozyten und Endothelzellen mobilisiert und auf den jeweiligen Zelloberflächen exprimiert. E-Selektin kann nach inflammatorischer Stimulation auf der Zelloberfläche von Endothelzellen nachgewiesen werden. Von beiden Adhäsionsmolekülen ist bekannt, dass sie für den ersten Kontakt der frei zirkulierenden Thrombozyten mit den Gefäßendothelzellen verantwortlich sind (38).

Um den Einfluss der PARS auf die Expression von P- und E-Selektin unter Endotoxinämie zu untersuchen wurde die Expression qualitativ mit der Westernblot-Analyse bestimmt. Dafür wurden aus den einzelnen Lungengewebeproben mit einem speziellen Verfahren Proteine extrahiert. Nach Bestimmung des Proteingehaltes wurden gleiche Mengen Protein verschiedener zu untersuchender Proben in einem Acrylamid-Gel entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Nach Übertragung der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran konnten die gesuchten Adhäsionsmoleküle durch die spezifische Detektion mit einem jeweils eigenen Antikörper identifiziert werden. Der Antikörper-Adhäsionsmolekül-Komplex wurde durch eine Antikörper-gebundene Enzymreaktion eingefärbt und somit sichtbar gemacht. Die Farbintensität der Banden korreliert mit der

2.3.4. Ermittlung der Expression der Adhäsionsmoleküle P- und E-Selektin mittels Westernblot-Analyse.

Menge des gesuchten Proteingehaltes und wurde mittels densitometrischer Analyse bestimmt.

2.3.4.1. Gewebeaufbereitung

Von den nach Versuchsende entnommenen und bei -80°C eingefrorenen Lungen wurden ca. 100mg schwere Gewebeprobe abgetrennt und mit 4 ml Lysispuffer in ein Potterröhrchen versetzt. Dieses Gemisch wurde anschließend bei 1200 Umdrehungen pro Minute (U) für 60 Sekunden und dann bei 1400 U für 30 Sekunden homogenisiert (Potter, Typ853203, Fa. Braun, Melsungen). Das Homogenisat wurde in spitz zulaufende 15ml Röhrchen transferiert und bei 2000 U für 60 Sekunden zentrifugiert. Die zellunlöslichen Bestandteile blieben so als Pellet in der Spitze des Röhrchens zurück. Der Überstand wurde in ein frisches 15 ml Röhrchen pipettiert und zum Auflösen der Zellmembran für 5 min auf Eis gestellt. Danach wurde die Lösung erneut bei 5000 U für 10 min zentrifugiert. Der neu gewonnene Überstand enthielt nun die gesuchte zytoplasmatische Proteinfraction. Nach Abnahme des Überstandes wurde dieser in Kryoröhrchen bei -80°C tiefgefroren und das Pellet zur Gewinnung von nukleärem Protein weiterverwendet. Der oben erwähnte Lysispuffer enthielt: 0,6% Nonidet P-40, 150 mM NaCl, 10 mM Hepes und 1 mM EDTA. Unmittelbar vor der Gewebekomogenisierung wurden zu 10 ml Puffer 400 μl einer Proteinase-Inhibitor-Lösung zugesetzt. Dafür wurde eine Tablette Roche Complete (CompleteTM Mini, Proteaseinhibitor cocktail tablets, Roche Diagnostics, Mannheim) in 2 ml H_2O aufgelöst. Um die Aktivität der gewebeeigenen Proteinase weiterhin zu reduzieren, wurden alle Proben zwischen den einzelnen Arbeitsschritten auf Eis gelagert.

2.3.4.2. Proteinbestimmung

Um die in der Westernblot-Analyse entstehenden Proteinbanden untereinander vergleichen zu können, müssen exakt gleiche Proteinmengen aus jeder Probe verwendet werden. Dafür wurde der Proteingehalt jeder Probe auf der Grundlage der Biuret-Reaktion mittels Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay) nach Smith et al. (118) bestimmt. Proteine bilden im alkalischen Milieu mit Cu^+ -Ionen einen violetten Farbkomplex (Biuret-Reaktion), der durch BCA verstärkt wird und bei einem Absorptionsmaximum von 562 nm Wellenlänge sichtbar wird. Als Standardprobe diente eine Verdünnungsreihe von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bis 1 mg/ml Rinder-

2.3.4. Ermittlung der Expression der Adhäsionsmoleküle P- und E-Selektin mittels Westernblot-Analyse.

Serumalbumin (BSA, PAA Laboratories, Linz, Österreich) in einem Lysispuffer. Die BCA-Reagenz wurde hergestellt aus 24,5 ml Lösung A: 1% BCA, 2% $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,16% Natriumtartrat; 0,4% NaOH und 0,95% NaHCO_3 in wässriger Lösung; pH 11,25 und 0,5 ml Lösung B: 4% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ in wässriger Lösung.

Für die Proteinbestimmung wurde eine 96 Well-Platte (Nunclon Microwell 96U, Nunc, Roskilde, Dänemark) mit je 20 μl der aufbereiteten Gewebeprobe und je 20 μl der Verdünnungsreihe bestückt und mit je 200 μl BCA-Reagenz aufgefüllt. Anschließend wurde die Platte 30 min bei 37°C in einem Wärmeschrank inkubiert und photometrisch-quantitativ in einem Plattenreader (EAR 400 AT Easy Reader, SLT Labinstrument Austria, Tecan Deutschland, Crailsheim) ausgewertet. Alle Messungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt. Mit Hilfe der aus der Verdünnungsreihe erstellten Eichgeraden konnte die Proteinmenge jeder Probe berechnet und mit dem Lysis-Puffer auf 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ verdünnt werden.

2.3.4.3. Trennung der Proteine im Acrylamid-Gel

Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch die Anlage von elektrischer Spannung an eine spezielle Kammer. Damit alle Proteine während der Trennung in die gleiche Richtung liefen, wurden je 60 μl Versuchsprobe mit 20,6 μl Probenpuffer versetzt und für 8 min zum Sieden gebracht. Dadurch wurden alle Proteine mit der anionischen Detergenz SDS beladen und ihre Eigenladung soweit überdeckt, so dass anschließend die verschiedenen Proteine nur noch als Anionen vorlagen. Der Probenpuffer enthielt: (5 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8); 2 ml 1 M 2-Mercaptoethanol (Fa. Serva, Heidelberg); 1 ml 0,05% Bromphenolblau; 0,8 g Natriumdodecylsulfat (SDS); 2 ml H_2O). Die Trennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte in der Elektrophorese-Kammer (Blue Vertical 100/C, Serva, Heidelberg) in einem Polyacrylamid-(PAA)-Trenngel. Das Gel wurde hergestellt aus 4,85 ml H_2O ; 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8); 100 μl 10% SDS; 2,5 ml 30% PAA und 50 μl 10% Ammoniumpersulfat (APS). Kurz vor dem Einfüllen des Gels in die vorbereiteten Gießformen wurden 15 μl Tetramethylethyldiamin (TEMED) als Polymerisationskatalysator hinzugefügt. In der Gießform wurde das noch flüssige Gel durch eine Wasserschicht vor dem Austrocknen geschützt. Der Polymerisationsvorgang war nach ca. 60 min abgeschlossen. Das Wasser wurde mit Filterpapier abgezogen und auf das Trenngel 10 ml Sammelgel gegossen. Das Sammelgel enthielt 6,1 ml H_2O ; 2,5 ml 0,5 M Tris-

2.3.4. Ermittlung der Expression der Adhäsionsmoleküle P- und E-Selektin mittels Westernblot-Analyse.

HCl (pH 6,8); 100 µl 10% SDS; 1,3 ml 30% PAA; 50 µl 10% APS sowie 10µl TEMED. Ein Probenkamm wurde während des Polymerisationsvorganges in das Sammelgel getaucht und so 75 mm tiefe Kammern geformt, die ca. 60 µl Probenmaterial fassten. Auch das Sammelgel war nach ca. 60 min ausgehärtet. In die einzelnen Gelkammern wurden anschließend je 30 µl Probenmaterial pipettiert und zur späteren Identifizierung der Banden in die äußerste Kammer ein Molekulargewichtsmarker aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels Elektrophorese in einem Laufpuffer: 1 g Tris; 14,4 g Glycin; 1g SDS; ad 100 ml H₂O; pH 8,3. Es wurde eine Spannung (Blue Power 500, Serva Electrophoresis, Heidelberg) von 100 V für 90 – 120 min angelegt.

2.3.4.4. Proteinübertragung auf eine Nitrocellulosemembran (Blot)

Durch die Übertragung der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran entstand der eigentliche Blot. Dafür wurde das Trenngel vorsichtig auf die Membran (Serva, Heidelberg) gelegt und zwischen feuchtem Whatman-Filterpapier so fixiert, dass sich Gel und Membran weder gegeneinander abheben noch verrutschen konnten. Anschließend wurde diese Einheit senkrecht in eine spezielle Blotkammer (BlueBlot Wet/100, Serva Electrophoresis, Heidelberg) getaucht, die mit einem Transfer-Puffer gefüllt war. Der Transfer-Puffer bestand aus: 400 ml Methanol; 24 g Glycin; 6 g Tris; ad 2 l H₂O; pH 8,3. Durch Anlegen einer Spannung (Blue Power 500, Serva Electrophoresis, Heidelberg) von 100 V über 12 h senkrecht zur Membranebene wurden die aufgetrennten Proteine von dem Gel auf die Nitrozellulosemembran übertragen.

2.3.4.5. Detektion von P- und E-Selektin durch spezifische Antikörper

Nach Beendigung des Blot-Vorganges wurde die Nitrocellulosemembran zur Blockade freier Bindungsstellen für 1 h in eine Blockierungspuffer gelegt. Diese bestand aus TBST-Puffer (1 ml Tween 20; 20 ml 1 M Tris-HCl mit pH 8,0; 60 ml 5 M NaCl ad 2 l H₂O) und 5 % Milchpulver. Anschließend wurde die Membran zur Detektion von P-Selektin mit einem kaninchenspezifischen gegen P-Selektin gerichteten Antikörper (Psel.KO2.10) für 2 h inkubiert. Dieser Antikörper wurde uns freundlicher Weise von Herrn Pizcueta (85) zur Verfügung gestellt und im Verhältnis 1:500 (20 µl) zu 10 ml Blockierungspuffer verdünnt. Zur Detektion von E-Selektin verwendeten wir für einen weiteren Blot einen polyclonalen

2.3.4. Ermittlung der Expression der Adhäsionsmoleküle P- und E-Selektin mittels Westernblot-Analyse.

Goat Anti-Human Antikörper (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Germany) im Verdünnungsverhältnis 1:1000 (10µl).

Nach drei Waschvorgängen zu je 10 min mit TBST-Puffer erfolgte die einstündige Inkubation der Nitrozellulosemembranen mit einem zweiten Antikörper, an den eine alkalische Phosphatase konjugiert war. Der Anti-P-Selektin-Antikörper-Komplex wurde mittels eines Anti-Mouse-Immunglobulin(IgG) detektiert. Das Anti-Mouse-IgG (Anti-Mouse IgG, Alkaline Phosphatase Conjugate, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) wurde im Verhältnis 1:1000 (10µl) zu 10 ml Blockierungspuffer gemischt. Zur Lokalisation des Anti-E-Selektin-Antikörper-Komplexes wurde ein Anti-Goat-IgG (Anti-Goat IgG, Alkaline Phosphatase Conjugate, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) im Verdünnungsverhältnis 1:2000 (5µl) verwendet. Nach Inkubation mit dem zweiten Antikörper erfolgten drei weitere Waschvorgänge zu je 10 min mit TBST-Puffer.

2.3.4.6. Entwicklung der Western-Blots

Die Adhäsionsmoleküle konnten nun über die an die Immunglobuline gebundene alkalische Phosphatase-Reaktion angefärbt werden. Bei dieser Enzymreaktion wird ein Chromophor zu einem sichtbaren violetten Farbstoff umgesetzt. Dadurch werden die gesuchten Adhäsionsmoleküle in unterschiedlicher Intensität als violette Banden sichtbar. Die unterschiedlichen Farbintensitäten der einzelnen Banden entstehen durch die verschiedenen Mengen an Protein in den jeweiligen Proben. Für den Färbeprozess wurde der Blot mit einer Entwicklerlösung benetzt. Diese setzte sich zusammen aus: 33 µl 5-Brom-4-chlor-3-indolphosphat (BCIP) (Serva, Heidelberg); 66 µl Nitroblautetrazolium (NBT) (Serva, Heidelberg) in 901 µl Entwicklungspuffer: pH 9,4; 20 ml 100 mM NaCl; 100 ml 100 mM Tris; 5 ml 5 mM MgCl₂. Die Entwicklerlösung wurde 3 mal ausgetauscht und je nach Färbungsergebnis für 2-5 h auf der Membran belassen. Anschließend wurde die Membran mehrmals mit Wasser gewaschen, getrocknet und nach densitometrischer Auswertung lichtgeschützt aufbewahrt.

2.4. Applizierte Substanzen

2.4. Applizierte Substanzen

2.4.1. Endotoxin

Die Applikation von Endotoxinen zur Induktion einer systemischen Entzündungsreaktion findet am Tiermodell häufige Anwendung (39;91). Daher wurde einem Teil der Versuchstiere hochgereinigtes Endotoxin (LPS) von *Escherichia coli* Serotyp 0111:B4 (Lipopolysaccharide from *Escherichia coli* Serotype 0111:B4, Sigma Chemical, St. Louis, USA) infundiert. Jedes der Kaninchen erhielt zuerst intravenös (i.v.) einen Bolus von 100 µg des zuvor in 10 ml Kochsalzlösung gelösten Endotoxins. Danach erfolgte die kontinuierliche i.v. Applikation über einen Perfusor in der Dosierung 20 µg / (kg KG · h). Zur Dosisfindung dienten sowohl Vorversuche als auch vorangegangene Studien unserer Arbeitsgruppe.

2.4.2. 3-Aminobenzamid

Ein Studienziel war den Einfluss der PARS auf die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion in der pulmonalen Mikrostrombahn unter Endotoxinämie zu untersuchen. Dafür wurde die PARS in einer Versuchsgruppe mit dem kompetitiven Inhibitor 3-Aminobenzamid (3-AB) (Sigma, Deisenhofen, Germany) gehemmt. 3-AB, einer der am häufigsten *in vitro* und *in vivo* verwendeten und am besten untersuchten PARS-Inhibitoren (114;135), hat sich in umfangreichen Studien von *Banasik et al.* (4;5) und *Rankin et al.* (107) als potenter, selektiver und nicht toxischer Inhibitor der PARS bewehrt. Applikation und Dosierung erfolgten modifiziert nach *Szabo et al.* (124) und *Thiemermann et al.* (130). Nach einer intravenösen Bolusgabe von je 10 mg des zuvor in 10 ml Kochsalzlösung gelösten 3-AB wurde der Inhibitor über einen Perfusor kontinuierlich mit der Dosierung 5mg / (kg KG · h) über die Ohrvene appliziert.

2.5. Einschlusskriterien

Die intravitalmikroskopischen Untersuchungen wurden begonnen wenn nach chirurgischer Präparation, einschließlich Thoraxfensterimplantation, und erfolgter Stabilisierungsphase folgende Kriterien erfüllt waren: kein nennenswerter Blutverlust und Traumatisierung der Lunge während der chirurgischen Präparation, konstante mittlere arterielle Blutdruck-Werte über 65 mmHg, sowie keine sichtbaren Perfusionsausfälle, Hämorrhagien oder Atelektasen im Mikroskopierareal.

2.6. Studienprotokoll

2.6. Studienprotokoll

Die Kaninchen wurden vor Versuchsbeginn drei verschiedenen Versuchsgruppen randomisiert zugeteilt. Die Versuchstiere erhielten je nach Versuchsgruppe unmittelbar nach der Narkoseeinleitung und noch vor Beginn der Präparation die in der Tabelle angeführten Mengen an Endotoxin (Lipopolysaccharid LPS), 3-AB bzw. physiologische Kochsalzlösung (NaCl).

Gruppen	Substanzen	Dosierungen
1. Kontrolle	NaCl: Bolus kontinuierlich	2 ml 1 ml / (kg KG · h)
2. Endotoxin	LPS: Bolus kontinuierlich	100 µg 20 µg / (kg KG · h)
3. Endotoxin + 3-AB	LPS: siehe 2. 3-AB: Bolus kontinuierlich	10 mg 5 mg / (kg KG · h)

Tabelle 3: Versuchsgruppen

Nach der Präparation und erfolgter Stabilisierungsphase wurden die Einschlusskriterien erfasst und mit der Intravitalmikroskopie begonnen. Wie in Abbildung 5 dargestellt, wurden zuerst die FITC gelabelten Erythrozyten reinfundiert und nach einer weiteren halben Stunde die ersten intravitalmikroskopischen Aufnahmen durchgeführt. Diese Zeitspanne wurde eingehalten um sicher zu gehen, dass alle geschädigten, funktionslosen Erythrozyten durch die Milz eliminiert wurden.

2.6. Studienprotokoll

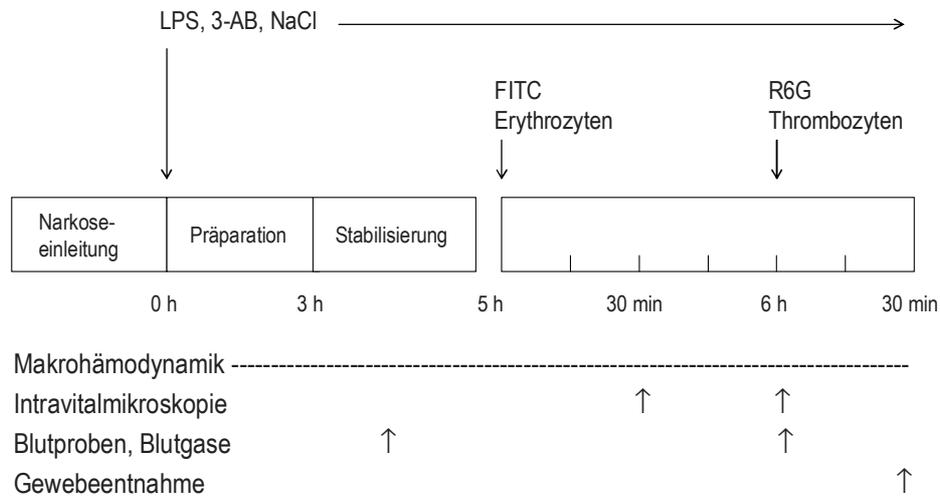


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes

Die mit Rhodamin 6G gefärbte Thrombozytencharge wurde den Versuchstieren 6 h nach Versuchsbeginn appliziert. Das Verhalten der Thrombozyten wurde gleich im Anschluss mit dem Intravitalmikroskop beobachtet, da die Färbung nur für einige Minuten gut sichtbar ist. Die makrohämodynamischen Parameter wurden während des gesamten Versuchsablaufes kontinuierlich gemessen. Die Analyse des peripheren Blutbildes und der Blutgase erfolgte während der Stabilisierungsphase und nach Abschluss der Versuche. Anschließend wurden die Tiere durch Injektion gesättigter KCl-Lösung getötet und die entnommenen Lungenflügel in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Aufbereitung des Lungengewebes für weitere Untersuchungen erfolgte zu einem späteren Zeitpunkt.

2.7. Datenverarbeitung und Statistik

2.7. Datenverarbeitung und Statistik

Die durch digitale computergestützte Bildanalyse (Optimas, Bioscan, Edmonds, Washington, USA) gewonnenen Daten der intravitalmikroskopischen Videoaufnahmen wurden in das Tabellenkalkulationsprogramm MS-Excel (Microsoft GmbH, München) exportiert. Die abgeleiteten Größen, wie z.B. Mittelwerte der Fließgeschwindigkeiten und deren Variationskoeffizienten wurden berechnet und zusammen mit den entsprechenden Stammdaten (Datum, Versuchsnummer und Versuchsphase) abgespeichert. Die Daten der makrohämodynamischen Parameter wurden ermittelt und berechnet und ebenfalls zusammen mit den entsprechenden Stammdaten in Excel-Tabellen eingetragen. Zur graphischen Darstellung dieser Ergebnisse wurde das Computerprogramm SigmaPlot for Windows (Fa. Jandel Corporation, Erkrath) verwendet. Die nicht quantifizierbaren Ergebnisse von Westernblotanalysen wurden zusätzlich zur Archivierung mit einem Scanner und einem Personalcomputer als Pixelgraphiken digitalisiert.

Die statistische Auswertung der gemessenen und berechneten Daten erfolgte am Personalcomputer mittels des Statistikprogrammes SigmaStat (Jandel Corporation, Inc 1995, Erkrath, Germany). Der statistische Vergleich von mehr als zwei Versuchsgruppen erfolgte durch Varianzanalyse nach Kruskal-Wallis mit anschließender post hoc Analyse mittels Dunn`s Test. Für den Intergruppenvergleich zwischen zwei verschiedenen Versuchsgruppen diente der Mann-Whithney Rank Sum Test. Signifikanz wurde jeweils bei einer Wahrscheinlichkeit für den Fehler 1. Art unter 5% angenommen ($p < 0,05$). Falls nicht anders vermerkt, sind alle folgenden Daten als Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung des Mittelwertes (STABW) angegeben.

3. ERGEBNISSE

3. ERGEBNISSE

3.1. Makrohämodynamik, peripheres Blutbild und Blutgasanalyse

Makrohämodynamik

Die während der Versuchsdauer kontinuierlich gemessenen makrohämodynamischen Parameter sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) und der mittlere zentralvenöse Blutdruck (CVP) blieben sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Endotoxin- und Endotoxin + 3-AB- Gruppe über den Versuchszeitraum von 6 h stabil. Auch zwischen den Versuchsgruppen kam es zu keinen wesentlichen Unterschieden zwischen den einzelnen makrohämodynamischen Parametern. Der mittlere pulmonalarterielle Blutdruck (PAP) war in der Endotoxingruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur Endotoxin + 3-AB – Gruppe nicht signifikant erhöht.

	MAP [mmHg]	CVP [mmHg]	PAP [mmHg]
Kontrolle	76 ± 2	2 ± 1	15 ± 1
Endotoxin	74 ± 2	2 ± 1	19 ± 2
Endotoxin + 3-AB	74 ± 5	2 ± 0	15 ± 2

Tabelle 4: Makrohämodynamische Parameter: mittlerer arterieller Druck MAP [mmHg], zentralvenöser Druck CVP [mmHg] und pulmonalarterieller Druck PAP [mmHg], Mittelwerte ± STABW zum Versuchszeitpunkt 6 h, * p < 0,05 vs. Kontroll - Gruppe, # p < 0,05 vs. Endotoxin+3-AB - Gruppe, Mann-Whintney Rank Sum Test.

Peripheres Blutbild

Die Analyse des peripheren Blutbildes wurde unter den Bedingungen des Studienprotokolls nach 4 h und 6 h durchgeführt. Die Konzentration der Erythrozyten (RBC), der Hämoglobinwert (Hb) und der systemische Hämatokrit (Hk) zeigten keine Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen und blieben in allen Versuchsgruppen über die untersuchten Zeitpunkte konstant. Die Konzentrationen der Thrombozyten (PLT) und Leukozyten (WBC) waren in der mit Endotoxin und Endotoxin + 3-AB behandelten Versuchstiere im Vergleich zur Kontrollgruppe reduziert, blieben aber auch innerhalb der

3.1. Makrohämodynamik, peripheres Blutbild und Blutgasanalyse

Versuchsgruppen über die untersuchten Zeitpunkte konstant. Eine Ausnahme bildet die Thrombozytenkonzentration in der Endotoxin + 3-AB – Gruppe, die im Versuchszeitraum abgefallen war.

		RBC [10 ⁶ /μl]	PLT [10 ³ /μl]	WBC [10 ⁶ /μl]	Hb [g/dl]	Hct [%]
Kontrolle	4 h	4,7 ± 0,54	197,3 ± 32,2	4,1 ± 1,7	10,6 ± 1,1	30,9 ± 3,8
	6 h	5,1 ± 0,48	192,8 ± 27	4,2 ± 1,4	11,3 ± 0,7	33,8 ± 4,2
Endotoxin	4 h	4,5 ± 0,8	123 ± 41,1	1,8 ± 0,5	9,7 ± 1,3	28,2 ± 4,7
	6 h	4,1 ± 0,62	113,8 ± 43,7	1,8 ± 1,1	9,0 ± 1,1	25,7 ± 2,3
Endotoxin + 3-AB	4 h	4,3 ± 0,5	122 ± 64	2,2 ± 1	9,5 ± 1,1	27,7 ± 3,4
	6 h	4,2 ± 0,58	86 ± 70,3	2,4 ± 0,9	9,5 ± 1,5	27,1 ± 3,2

Tabelle 5: peripheres Blutbild: Erythrozyten RBC, Thrombozyten PLT, Leukozyten WBC, Hämoglobinkonzentration Hb und systemischer Hämatokrit Hk, Mittelwerte ± STABW zum Versuchszeitpunkt 4 h und 6 h.

Arterielle Blutgasanalyse

Die Ergebnisse der arteriellen Blutgasanalyse sind in Tabelle 6 für die Zeitpunkte 4 h und 6 h zusammengefasst. Auffallend ist, dass der Sauerstoffpartialdruck pO₂ in der mit Endotoxin behandelten Gruppe nach 6 h deutlich, wenn auch nicht signifikant, im Vergleich zum Sauerstoffpartialdruck pO₂ zum Zeitpunkt 4 h erniedrigt war. Während sich der mittlere Kohlenstoffdioxidpartialdruck pCO₂ sowohl innerhalb der Versuchsgruppen als auch zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten nur unwesentlich veränderte, lässt der Blick auf den Säure-Base-Haushalt vor allem in der Endotoxin – Gruppe eine noch nicht kompensierte, metabolische Azidose erkennen. In der Kontrollgruppe war der Säure-Base-Haushalt dagegen ausgeglichen.

3.2. Mikrohämodynamik in Arteriolen und Venolen

		pO ₂ [mmHg]	pCO ₂ [mmHg]	pH	HCO ₃ ⁻ [mmol/l]	BE [mmol/l]
Kontrolle	4 h	127,2 ± 33,2	35,5 ± 6,1	7,41 ± 0,1	22,1 ± 3,5	-1,9 ± 3,8
	6 h	140,6 ± 6,8	36,8 ± 6,5	7,39 ± 0,1	21,9 ± 3,9	-2,5 ± 3,9
Endotoxin	4 h	145,8 ± 55,4	39,3 ± 9,1	7,24 ± 0,1	16,5 ± 2,8	-10,2 ± 2,9
	6 h	119,9 ± 33,3	42,6 ± 8,3	7,22 ± 0,1	17,1 ± 0,9	-10,1 ± 2,1
Endotoxin + 3-AB	4 h	151,8 ± 24	38,9 ± 3,8	7,3 ± 0,1	18,7 ± 1,6	-7,1 ± 2
	6 h	155,2 ± 27,6	37,7 ± 3,6	7,25 ± 0,1	17,3 ± 1	-7,4 ± 1,5

Tabelle 6: arterielle Blutgasanalysen: Sauerstoffpartialdruck pO₂, Kohlendioxidpartialdruck pCO₂, pH-Wert, Bikarbonatkonzentration HCO₃⁻, Basenüberschuss BE, Mittelwerte ± STABW zum Versuchszeitpunkt 4 h und 6 h, p < 0,05

3.2. Mikrohämodynamik in Arteriolen und Venolen

Die gemessenen und berechneten Parameter zur Mikrohämodynamik in Arteriolen und Venolen sind in Tabellen im Anschluss an den Text zusammengefasst. Der mittlere Durchmesser d der untersuchten Arteriolen und Venolen lag bei allen drei Versuchsgruppen zwischen 28 µm und 33 µm. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Arteriolen und Venolen oder zwischen den einzelnen Versuchsgruppen festgestellt werden. Aufgrund dieser Übereinstimmung der Gefäßkaliber konnten die in Arteriolen und Venolen erhobenen Daten direkt miteinander verglichen werden.

Der Erythrozytenfluß N_{RBC} , die Erythrozytenfliessgeschwindigkeit v_{RBC} die Blutfliessgeschwindigkeit v_b , der Blutvolumenfluß Q_b sowie die Wandscherrate γ wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen Arteriolen und Venolen auf. Auch die Gabe von Endotoxin bzw. Endotoxin + 3-AB hatte keinen Einfluss auf die angeführten mikrohämodynamischen Parameter im Vergleich zur Kontrollgruppe.

3.3. Thrombozytenkinetik in Arteriolen und Venolen

Arteriolen	d [μm]	N_{RBC} [1/sec]	V_{RBC} [$\mu\text{m}/\text{sec}$]	v_b [$\mu\text{m}/\text{sec}$]	Q_b [$\mu\text{l}/\text{sec}$]	γ [l/sec]
Kontrolle	28 \pm 2	6,0 \pm 1,9	2276 \pm 206	1597 \pm 103	950 \pm 55	469 \pm 54
Endotoxin	33 \pm 4	7,0 \pm 0,0	2366 \pm 147	1620 \pm 84	1434 \pm 356	397 \pm 48
Endotoxin + 3-AB	28 \pm 4	5,8 \pm 0,8	2140 \pm 108	1452 \pm 117	999 \pm 348	424 \pm 21

Tabelle 7: Durchmesser d , Erythrozytenfluß N_{RBC} , Erythrozytenfliessgeschwindigkeit V_{RBC} , Blutfliessgeschwindigkeit v_b , Blutvolumenfluß Q_b und Wandscherrate γ in Arteriolen, Mittelwerte \pm STABW zum Zeitpunkt 6 h der Versuchsreihe, $p < 0,05$

Venolen	d [μm]	N_{RBC} [1/sec]	V_{RBC} [$\mu\text{m}/\text{sec}$]	v_b [$\mu\text{m}/\text{sec}$]	Q_b [$\mu\text{l}/\text{sec}$]	γ [l/sec]
Kontrolle	29 \pm 2	8,3 \pm 1,4	2210 \pm 272	1563 \pm 180	986 \pm 39	445 \pm 69
Endotoxin	29 \pm 1	8,4 \pm 2,0	2297 \pm 192	1552 \pm 121	1026 \pm 69	429 \pm 38
Endotoxin + 3-AB	28 \pm 4	6,0 \pm 1,0	2832 \pm 244	1910 \pm 160	1253 \pm 356	574 \pm 79

Tabelle 8: Durchmesser d , Erythrozytenfluß N_{RBC} , Erythrozytenfliessgeschwindigkeit V_{RBC} , Blutfliessgeschwindigkeit v_b , Blutvolumenfluß Q_b und Wandscherrate γ in Venolen, Mittelwerte \pm STABW zum Zeitpunkt 6 h der Versuchsreihe, $p < 0,05$

3.3. Thrombozytenkinetik in Arteriolen und Venolen

Der Thrombozytenfluß N_{PLT} , der die Anzahl der fluoreszenzmarkierten, pro Sekunde einen definierten Gefäßabschnitt passierenden Thrombozyten beschreibt, veränderte sich weder in den Arteriolen und Venolen noch zeigte er Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. Die ermittelten Werte sind in nachstehenden Tabellen aufgeführt. Die aus den Einzelwerten berechnete mittlere Thrombozytenfliessgeschwindigkeit v_{PLT} war in der mit Endotoxin behandelten Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontroll - Gruppe und zur Endotoxin+3-AB - Gruppe sowohl in den Arteriolen als auch Venolen um bis zu zwei Drittel signifikant reduziert. Die Versuchstiere, denen nach erfolgter Endotoxingabe zusätzlich 3-AB appliziert wurde, wiesen dagegen nach 6 h in den untersuchten pulmonalen Arteriolen und Venolen nahezu identische Thrombozytenfliessgeschwindigkeiten v_{PLT} wie die Kontroll-Gruppe auf. Die Anzahl der pro Gefäßoberfläche adhärenen Thrombozyten PLT_{ad} , sowie die Konzentration der im Gefäß gefundenen adhärenen Thrombozyten $[\text{PLT}]_{\text{T}}$ war in den

3.3. Thrombozytenkinetik in Arteriolen und Venolen

Arteriolen und vor allem in den Venolen in der Endotoxin- im Vergleich zur Kontroll- und Endotoxin + 3-AB-Gruppe signifikant erhöht.

Arteriolen	v_{PLT} [$\mu\text{m}/\text{sec}$]	N_{PLT} [1/sec]	PLT_{ad} [1/ mm^2]	$[\text{PLT}]_{\text{T}}$ [$10^3/\text{L}$]
Kontrolle	2077 \pm 196	2,3 \pm 0,3	0 \pm 0	1,7 \pm 0,3
Endotoxin	861 \pm 304*#	3,0 \pm 0,7	23 \pm 28*#	21,1 \pm 2,6*#
Endotoxin + 3-AB	2163 \pm 194	2,8 \pm 0,4	0 \pm 0	2,6 \pm 0,7

Tabelle 9: Thrombozytenfliessgeschwindigkeiten v_{PLT} , Thrombozytenfluß N_{PLT} , adhärenenten Thrombozyten PLT_{ad} und totale Thrombozytengefäßkonzentration $[\text{PLT}]_{\text{T}}$ in Arteriolen, Mittelwerte \pm STABW zum Versuchszeitpunkt 6 h, * $p < 0,05$ vs. Kontroll - Gruppe, # $p < 0,05$ vs. Endotoxin+3-AB - Gruppe, Mann-Whintey Rank Sum Test

Venolen	v_{PLT} [$\mu\text{m}/\text{sec}$]	N_{PLT} [1/sec]	PLT_{ad} [1/ mm^2]	$[\text{PLT}]_{\text{T}}$ [$10^3/\text{L}$]
Kontrolle	2160 \pm 408	2,0 \pm 0,8	0 \pm 0	1,5 \pm 0,6
Endotoxin	735 \pm 195*#	3,8 \pm 1,0	232 \pm 64*#	25,9 \pm 8,8*#
Endotoxin + 3-AB	2873 \pm 289	3,4 \pm 0,9	0 \pm 0	2,9 \pm 1,4

Tabelle 10: Thrombozytenfliessgeschwindigkeiten v_{PLT} , Thrombozytenfluß N_{PLT} , adhärenenten Thrombozyten PLT_{ad} und totale Thrombozytengefäßkonzentration $[\text{PLT}]_{\text{T}}$ in Venolen, Mittelwerte \pm STABW zum Versuchszeitpunkt 6 h, * $p < 0,05$ vs. Kontroll - Gruppe, # $p < 0,05$ vs. Endotoxin+3-AB - Gruppe, Mann-Whintey Rank Sum Test

In folgender Abbildung wurde die Erythrozytenfliessgeschwindigkeit v_{RBC} , die Thrombozytenfliessgeschwindigkeit v_{PLT} und die Anzahl adhärenenten Thrombozyten PLT_{ad} in den Arteriolen und Venolen grafisch veranschaulicht. Die Thrombozytenfliessgeschwindigkeiten unterscheiden sich innerhalb der Kontroll - Gruppe und innerhalb der Endotoxin+3-AB - Gruppe nur unwesentlich von den Erythrozytenfliessgeschwindigkeiten, eine Thrombozytenadhärenz war nicht zu beobachten. Eine Interaktion der fluoreszenzmarkierten Thrombozyten mit dem Gefäßendothel ließ sich in diesen beiden Versuchsgruppen mit den angewandten mikrohämodynamischen Messungen nicht nachweisen. Dagegen steht, wie deutlich erkennbar, die signifikant verminderte Thrombozytenfliessgeschwindigkeit in der Endotoxin - Gruppe sowie der signifikante Anstieg adhärenenten Thrombozyten.

3.3. Thrombozytenkinetik in Arteriolen und Venolen

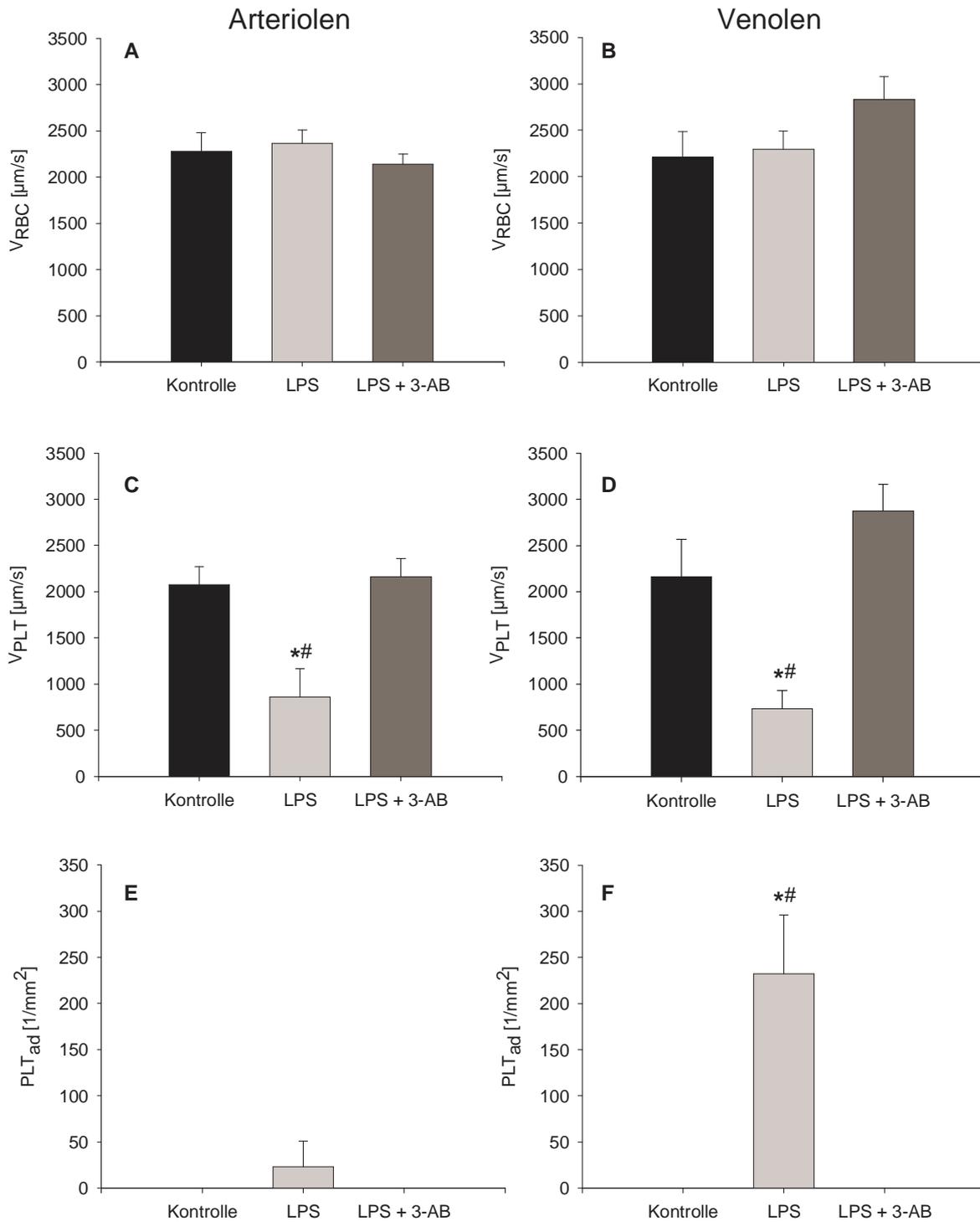


Abbildung 6: Erythrozytenfließgeschwindigkeit v_{RBC} , Thrombozytenfließgeschwindigkeit v_{PLT} und Anzahl adhärenter Thrombozyten PLT_{ad} in Arteriolen und Venolen, Mittelwerte \pm STABW zum Versuchszeitpunkt 6 h, * $p < 0,05$ vs. Kontroll - Gruppe, # $p < 0,05$ vs. Endotoxin+3-AB - Gruppe, Mann-Whitney Rank Sum Test.

3.4. Alveolarkapillaren

3.4. Alveolarkapillaren

Die Erythrozytenfliessgeschwindigkeit war in der mit Endotoxin behandelten Versuchsgruppe im Vergleich zu den beiden anderen Versuchsgruppen in den untersuchten Alveolarkapillaren tendenziell, jedoch nicht signifikant erhöht. Die Geschwindigkeit der Thrombozyten war in der Endotoxin-Gruppe auch in den Alveolarkapillaren signifikant reduziert, verglichen mit der Kontroll - und Endotoxin+3-AB - Gruppe. Dagegen war die Thrombozytenfliessgeschwindigkeit in der Endotoxin+3-AB – Gruppe wieder annähernd so hoch wie in der Kontroll - Gruppe. Retinierte Thrombozyten Ret_{PLT} , zu denen per Definition die Thrombozyten zählten, die mindestens 10 Sekunden ihre Position im alveolären Netzwerk nicht veränderten, waren zum Zeitpunkt 6 h nach Versuchsbeginn in den untersuchten Arealen der Alveolarkapillaren in der Kontroll - Gruppe nicht messbar. Bei den Versuchstieren die ausschließlich Endotoxin erhalten hatten, wurde zum gleichen Zeitpunkt eine hohe Anzahl retinierter Thrombozyten beobachtet. Dagegen wurde in der Gruppe, die zusätzlich mit 3-AB behandelt worden war, eine signifikant niedrigere Anzahl retinierter Thrombozyten ermittelt.

Die Alveolarseptenbreite, die als Maß der interstitiellen Ödembildung ebenfalls 6 h nach Versuchsbeginn gemessen wurde, war in der Endotoxin – Gruppe signifikant zur Kontroll – Gruppe verbreitert. Diese Verbreiterung konnte bei den mit 3-AB behandelten Tieren nicht nachgewiesen werden, die gemessene mittlere Alveolarseptenbreite in dieser Versuchsgruppe erreichte annähernd die Werte der Kontroll – Gruppe.

Alveolarkapillaren	v_{RBC} [$\mu\text{m}/\text{sec}$]	v_{PLT} [$\mu\text{m}/\text{sec}$]	Ret_{PLT} [1/mm]	Alveolarsepten- breite [μm]
Kontrolle	628 ± 19	555 ± 62	0 ± 0	16 ± 2
Endotoxin	760 ± 68	$276 \pm 85^{*#}$	$299 \pm 157^{*#}$	$27 \pm 3^*$
Endotoxin + 3-AB	628 ± 32	589 ± 124	28 ± 20	18 ± 2

Tabelle 11: Erythrozytenfliessgeschwindigkeit v_{RBC} , Thrombozytenfliessgeschwindigkeit v_{PLT} , Retinierte Thrombozyten Ret_{PLT} und Alveolarseptenbreite der Alveolarkapillaren, Mittelwerte \pm STABW zum Versuchszeitpunkt 6 h, * $p < 0,05$ vs. Kontroll - Gruppe, # $p < 0,05$ vs. Endotoxin+3-AB - Gruppe, Mann-Whintney Rank Sum Test.

3.4. Alveolarkapillaren

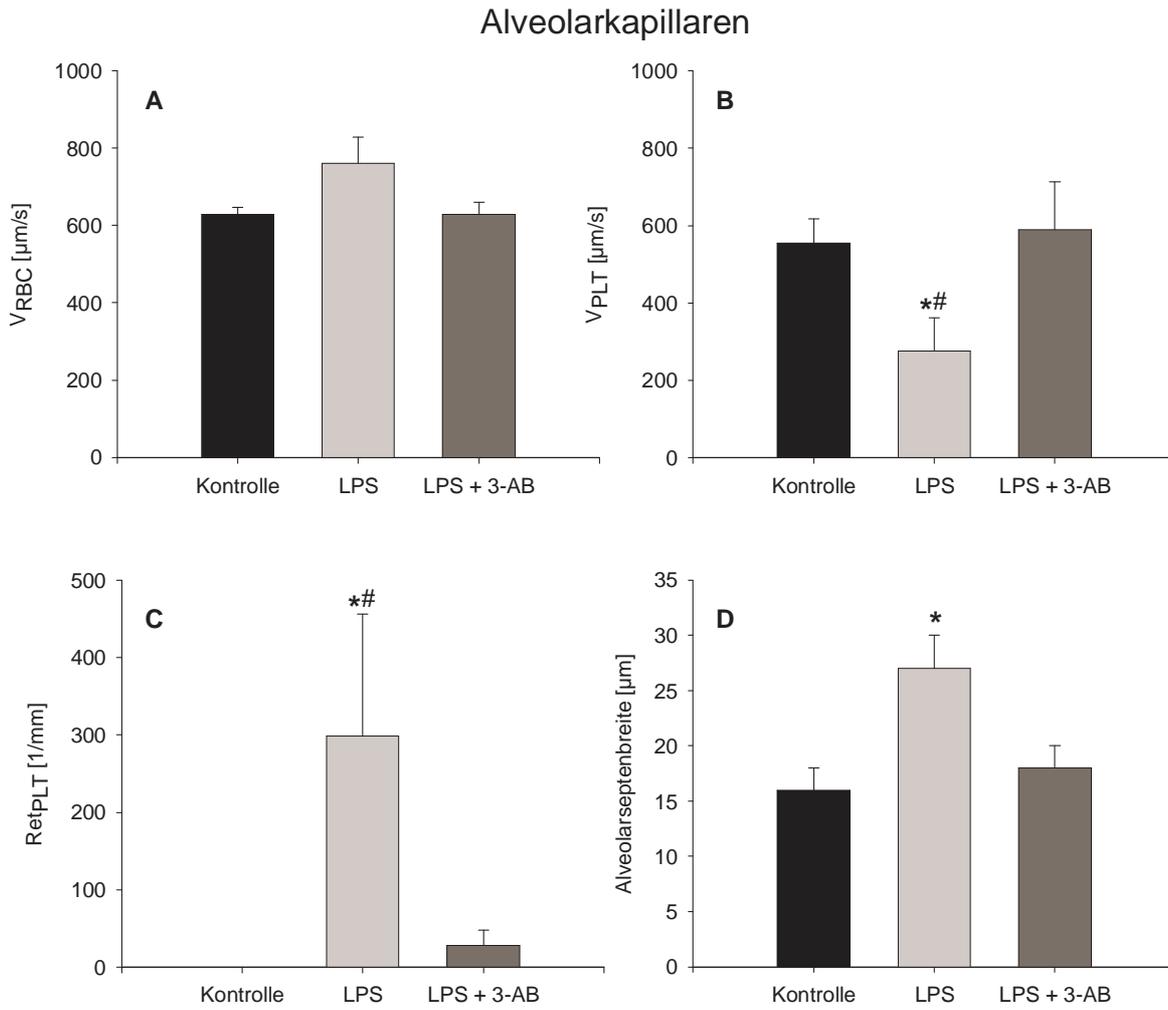


Abbildung 7: Erythrozytenfliessgeschwindigkeit v_{RBC} , Thrombozytenfliessgeschwindigkeit v_{PLT} , Retinierte Thrombozyten Ret_{PLT} und Alveolarseptenbreite der Alveolarkapillaren, Mittelwerte \pm STABW zum Versuchszeitpunkt 6 h, * $p < 0,05$ vs. Kontroll - Gruppe, # $p < 0,05$ vs. Endotoxin+3-AB - Gruppe, Mann-Whitney Rank Sum Test.

3.5. Expression von P- und E-Selektin im Lungengewebe

3.5. Expression von P- und E-Selektin im Lungengewebe

Um den Einfluß der PARS unter Endotoxinämie auf die Expression der Adhäsionsmoleküle P-Selektin und E-Selektin zu untersuchen, wurden die Proteine mit Hilfe der Westernblotmethode qualitativ analysiert. In Abbildung 8 A wurde exemplarisch ein Ausschnitt des Westernblots mit dem Nachweis von P-Selektin für alle drei Versuchsgruppen dargestellt. Die Bande von P-Selektin wurde auf Höhe 140 kD detektiert, was der Größe dieses Proteins entspricht. Die Banden der Endotoxin – Gruppe waren deutlich kräftiger im Vergleich zur Kontroll – Gruppe und Endotoxin+3-AB – Gruppe zu erkennen. Die einzelnen Westernblotanalysen wurden zudem densitometrisch ausgewertet und die Daten als Grafiken visualisiert. Auch hier bestätigte sich eine deutlich erhöhte Konzentration von P-Selektin in der mit Endotoxin behandelten Versuchsgruppe. Erfolgte nach Endotoxinapplikation die zusätzliche Hemmung der PARS mittels 3-AB, entsprach die Expression von P-Selektin wieder annähernd der Konzentration der Kontroll - Gruppe.

Analog zum P-Selektin wurde die Expression des Adhäsionsmoleküls E-Selektin ermittelt und in Abbildung 8 B dargestellt. Die Molekülgröße von E-Selektin beträgt 97 kD, auf entsprechender Höhe konnten die Proteinbanden auf der Westernblot-Membran detektiert werden. Die einzelnen Westernblotanalysen wurden ebenfalls densitometrisch ausgewertet und die Daten als Grafiken visualisiert. Die Expression des Adhäsionsmoleküls E-Selektin war in der Endotoxingruppe im Vergleich zur Kontroll – Gruppe signifikant erhöht. Anhand der Grafiken kann man gut erkennen, dass auch die Expression von E-Selektin, ähnlich wie bei P-Selektin, in der Endotoxin+3-AB - Gruppe wieder deutlich reduziert war und sich den Konzentrationen der Kontroll – Gruppe annäherte.

3.5. Expression von P- und E-Selektin im Lungengewebe

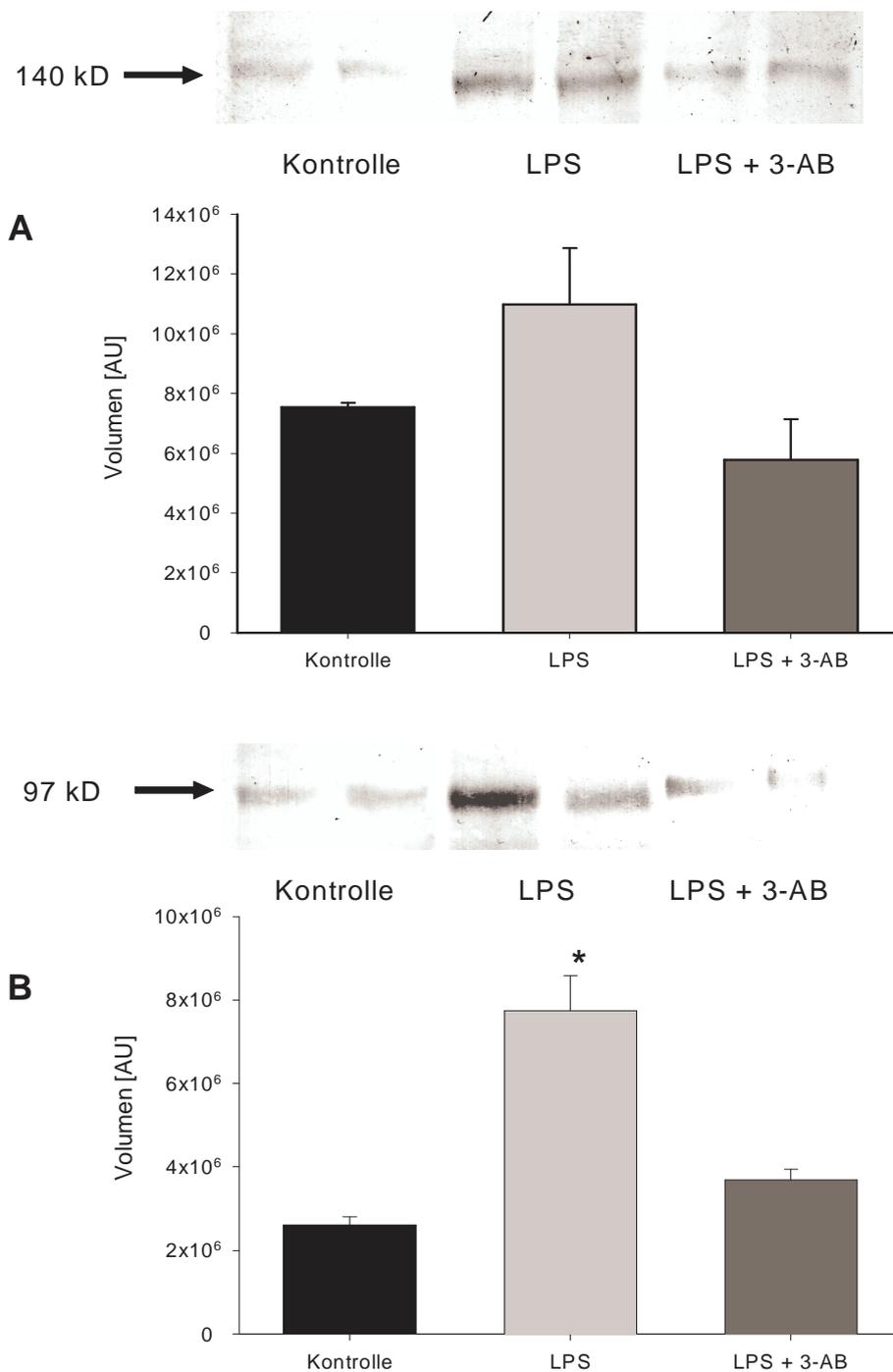


Abbildung 8 A + B: repräsentativer Ausschnitt der Westernblotanalyse von P-Selektin (A) und E-Selektin (B) mit einer Molekulargröße von 140 kD (A) und 97 kD (B), densitometrische Auswertung der Blots und grafische Darstellung der ermittelten Werte, Mittelwerte \pm STABW zum Versuchszeitpunkt 6,5 h, n = 5 pro Versuchsgruppe, * $p < 0,05$ vs. Kontroll – Gruppe, Mann-Whintney Rank Sum Test

4. DISKUSSION

4. DISKUSSION

4.1. Methodik

4.1.1. Versuchstiere

Die *in vivo* Versuche dieser Studie wurden an dem von *Kuhnle et al.* etablierten Kaninchen-Modell durchgeführt (75;76;76-79).

Größere Tiere, wie z.B. Hunde haben einen erhöhten hydrostatischen Druckgradienten innerhalb der Lunge. Dies führt zu einer Inhomogenität der Perfusion in der pulmonalen Zirkulation, weshalb die Untersuchung einzelner subpleuraler Gefäßabschnitte keine Gesamtaussage über die Mikrozirkulation der ganzen Lunge zulassen würde.

Die Arbeit mit kleineren Versuchstieren wie Mäusen, Ratten oder Hamstern ist für dieses Versuchsmodell ungeeignet, da die Implantation eines Thoraxfensters aufgrund ihrer Körpergröße nicht möglich wäre. Am Kaninchenmodell ist die Platzierung eines arteriellen, zentralvenösen und pulmonalarteriellen Katheters ohne große Beeinflussung des Versuchsmodells möglich, welches die Voraussetzung für eine kontinuierliche Bestimmung makrohämodynamischer Parameter darstellt. Da Kaninchen über ein ausreichend großes Blutvolumen verfügen, war eine wiederholte Blutabnahme z.B. zur Zellseparierung oder arteriellen Blutgasanalyse problemlos durchführbar ohne das entnommene Blut zur Aufrechterhaltung der Makrohodynamik ersetzen zu müssen. Die jeweils zum Ende der Versuche postmortem explantierte Kaninchenlunge bietet mit ihrer Größe ausreichend Gewebe für weitere z.B. molekularbiologische oder immunhistochemische Untersuchungen. In unserer Versuchsreihe wurden Gewebeproben für die Westernblotanalyse entnommen. Kaninchen besitzen allerdings gegenüber wesentlich häufiger erforschten Tieren wie Mäusen oder Hamstern den Nachteil, das für molekularbiologische Untersuchungen deutlich weniger Material wie z.B. Antikörper oder Primer-Sequenzen bekannt oder käuflich zu erwerben ist.

4.1.2. Experimentelles Modell

Ziel der vorliegenden Studie war die Rolle der PARS auf die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion in der pulmonalen Mikrostombahn unter Endotoxinämie zu untersuchen. Da die

4.1.2. Experimentelles Modell

Initialphase des durch Endotoxinämie verursachten Lungenschadens pathophysiologisch primär mit Veränderungen der pulmonalen Mikrozirkulation und auch Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen einhergeht, war dieses Modell sehr gut geeignet um diese Veränderungen intravitalmikroskopisch zu analysieren und zu quantifizieren.

4.1.2.1. Intravitalmikroskopie der Lungenmikrostrombahn

Die Geschichte der Intravitalmikroskopie der Lunge reicht zurück bis ins 17. Jahrhundert. Marcello Malphigi war ein italienischer Naturforscher und Anatom, sowie Professor für praktische und theoretische Medizin und Leibarzt von Papst Innozenz XII. 1661 untersuchte er mit einem der ersten Mikroskope und einer Kerze als Lichtquelle die Mikrozirkulation der Froschlunge und entdeckte dabei das kapillare Netzwerk als Bindeglied zwischen zuführenden und abführenden Gefäßen (30). 1934 wurden erste Untersuchungen von Wearn *et al.* am geschlossenen Thorax durchgeführt, hierbei wurde die Lunge durch die geschlossene Pleura parietalis mikroskopiert (140). Das erste Thoraxfenster wurde 1939 von Terry bei einer Katze implantiert (129), doch erst durch die Weiterentwicklung des Thoraxfensters am Hundemodell gelang es Wagner und Filley 1965 mikrohämodynamische Parameter in der pulmonalen Mikrozirkulation exakt zu quantifizieren (138).

Goetz *et al.* (42) und Berger *et al.* (10) entwickelten 1988 an Sprague-Dawley Ratten ein intrathorakales Fenster zur intravitalmikroskopischen Untersuchung der subpleuralen Lunge. Dafür resezierten sie Teile der rechten Thoraxwand. Die so entstandene Öffnung wurde mit einer transparenten Teflonmembran abgedichtet. In weiteren *in vivo* als auch histologischen Untersuchungen konnten die gute Gewebeverträglichkeit der Teflonmembran nachgewiesen werden. Ein Nachteil an diesem Modell stellten Luftpolster dar, die sich mit zunehmender Versuchsdauer zwischen Pleura parietalis und Teflonmembran bildeten und den Zeitrahmen der Versuche limitierten.

Kuhnle *et al.* etablierte 1993 im Institut für Chirurgische Forschung der LMU München das in dieser Studie verwendete Kaninchenmodell als Weiterentwicklung basierend auf dem zuvor beschriebenen Modell von Goetz *et al.* und Berger *et al.* (79). Das starre Metallfenster wurde mit dem Thorax verschraubt, so dass die Verhältnisse des geschlossenen Thorax wieder optimal hergestellt waren. Über kleine Bohrlöcher im Metallzylinder konnten Luftpolster abgesaugt werden. Die Lungenoberfläche wurde dadurch an der Teflonmembran fixiert und damit kardiorespiratorische Bewegungsartefakte minimiert. Die Traumatisierung der Lunge

4.1.2. Experimentelles Modell

durch den Unterdruck blieb dabei auf die Bohrlöcher mit 0,5 mm Durchmesser beschränkt, die jeweils mindestens 1cm vom Beobachtungsareal entfernt lagen. Die Verfälschung der Ergebnisse durch eine lokale Gewebetraumatisierung konnte somit ausgeschlossen werden.

Die mikroskopierte Lungenoberfläche wurde mit Hilfe eines auf Körpertemperatur angewärmten Tyrode-Puffers vor Auskühlung und Austrocknung geschützt indem die Teflonmembran kontinuierlich mit der Tyrode-Pufferlösung superfundiert wurde. Elektrolytgehalt, pH-Wert, Osmolarität und Gaspartialdrücke des Tyrode-Puffers waren den Normalwerten des Kaninchenserums angepasst.

Das von *Kuhnle et al.* weiterentwickelte Thoraxfenster am Kaninchenmodell bietet mit einem Durchmesser von 3 cm ein deutlich größeres Beobachtungsareal als das am Rattenmodell. Zudem ermöglicht die Weiterentwicklung Untersuchungen mit reproduzierbaren Ergebnissen über mehrere Stunden. *Kuhnle* und *Goetz* konnte mittels radioaktiv markierter Mikrosphären nachweisen, dass weder die Eröffnung des Thorax noch die Implantation des Thoraxfensters Änderungen der lokalen Perfusion im mikroskopierten Lungenareal verursachen (41;44;79;90). Zudem können an diesem Modell Untersuchungen von Alveolarkapillaren sowie subpleuralen Arteriolen und Venolen mit einem Durchmesser von bis zu 150 µm durchgeführt werden (79).

Die Aussagekraft des verwendeten intravitalmikroskopischen Modells beschränkt sich allerdings auf die Untersuchung der subpleuralen Gefäße. Das diese untersuchten, subpleuralen Gefäße auch tatsächlich Bestandteil der pulmonalen Mikrozirkulation sind, konnte von *McLaughlin et al.* und *Defouw et al.* nachgewiesen werden (24;90). Die mikroskopierten kapillaren Netzwerke an der Lungenoberfläche besitzen, bei im Mittel größerem Kapillardurchmesser, eine geringere Dichte im Vergleich zu zentralen Lungenarealen (19;94). Dagegen unterscheiden sich die mikrovaskulären Drücke in den subpleuralen Gefäßen nicht von den Gefäßen tiefer gelegener Lungenabschnitte (102). Diese Beobachtungen lassen die Schlussfolgerung zu, dass Untersuchungen der Mikrohämodynamik in den oberflächlichen Arteriolen, Kapillaren und Venolen auch auf die gesamte pulmonale Mikrozirkulation übertragbar sind.

Das von *West et al.* beschriebene „Drei-Zonen-Modell“ berücksichtigt hydrostatische Druckunterschiede bei der regionalen Perfusion der Lunge (142). Bei einem aufrecht stehenden Menschen ist die Durchblutung der Lunge in den apikalen Lungenarealen aufgrund

4.1.2. Experimentelles Modell

des hydrostatischen Druckgradienten geringer als in den basalen Lungenabschnitten. Dieses Gradientenmodell gilt auch in Linksseitenlage des Kaninchens. Aufgrund der geringen Thoraxbreite von nur 5-7 cm und den damit verbundenen geringeren Druckdifferenzen kommt dem Gradientenmodell beim Kaninchen eine deutlich geringere Bedeutung zu als beim Menschen oder größeren Versuchstieren.

Durch die Ventilation der Versuchstiere mit einem positiven endexpiratorischen Beatmungsdruck wird der vertikale Perfusionsgradient verstärkt und die Umverteilung der Lungenperfusion zugunsten hypostatischer Lungenareale begünstigt (79). *Goetz et al.* und *Kuhnle et al.* untersuchten ebenfalls mit Hilfe der Mikropärentchnik die Gefäße an der apikalen Lungenoberfläche am Kaninchen in Linksseitenlage und ordneten sie der Zone 2 des „Drei-Zonen-Modells“ nach West zu (41;79).

4.1.2.2. Fluoreszenzmarkierung der Erythrozyten

Um eine quantitative Analyse der pulmonalen Mikrohämodynamik durchführen zu können, wurden die Erythrozyten *in vitro* mit Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) angefärbt und anschließend reinjiziert. Diese *in vitro* Markierung wurde nach dem von *Zimmerhackel et al.* etablierten (145) und von *Berger et al.* (11) modifizierten Verfahren durchgeführt. Beide Autoren konnten anhand von Untersuchungen zeigen, dass die Verformbarkeit und damit die rheologischen Eigenschaften eines Teils der Erythrozyten nach Fluoreszenzmarkierung verändert sind. Diese alterierten Zellen werden jedoch nach Reinjektion in der Milz abgebaut und somit rasch aus der Zirkulation eliminiert (45). Nach einer Rezirkulationszeit von 30 Minuten, wie sie in vorliegendem Modell eingehalten wurde, bleibt der Anteil der zirkulierenden, fluoreszenzmarkierten Erythrozyten über mehrere Stunden annähernd konstant (113). Die Halbwertszeit der in der Zirkulation verbleibenden markierten Erythrozyten beträgt etwa 20 Tage und unterscheidet sich damit nicht von nativen Erythrozyten (45;128). Das Verfahren hatte zu keinem Zeitpunkt Auswirkungen auf die Makrohämodynamik.

4.1.2.3. Fluoreszenzmarkierung der Thrombozyten

Um das rheologische Verhalten der Thrombozyten zu untersuchen, färbten *Tangelder et al.* Thrombozyten *in vivo* mittels Injektion von Acridin-Rot an (127). Eine wiederholte Injektion dieses Farbstoffes führte jedoch dosisabhängig zu einer Veränderung der

4.1.2. Experimentelles Modell

Thrombozytenfunktion, die eine Verlängerung der Blutungszeit zur Folge hatte. Damit sind funktionelle Untersuchungen mit dieser Methode nicht möglich.

Da keine weiteren geeigneten Verfahren zur *in vivo* Markierung bekannt sind, wurden in unserer Studie die Thrombozyten nach dem Protokoll von *Massberg et al.* mittels Differentialzentrifugation separiert und *in vitro* mit dem Fluorochrom Rhodamin 6G angefärbt (87). Die Gewinnung der Thrombozyten für funktionelle Untersuchungen durch Zentrifugation ist allerdings kritisch zu beurteilen. So konnten *Vollmar et al.* nachweisen, dass Thrombozyten nach Zentrifugation eine gesteigerte P-Selektin Expression aufzeigten und nach Reinjektion ohne weitere Stimulation mit Endothelzellen interagierten (136). Die Antwort dieser Thrombozyten auf Stimulation mit dem Thrombin Receptor Activating Protein (TRAP) war dagegen abgeschwächt. *Karadogan et al.* verwendeten zur Thrombozytengewinnung die zellschonendere Methode der Thrombozytenapherese und wiesen auch nach diesem Verfahren zwar eine reduzierte aber dennoch vorhandene Expression von P-Selektin nach (65). Auch sie konnten eine abgeschwächte Reaktion der gewonnenen Thrombozyten nach Stimulation mit ADP, Ristocetin oder Kollagen mittels Impedanzaggregometrie zeigen.

Massberg et al. konnten dagegen keine gesteigerte Expression des Adhäsionsmoleküls P-Selektin nachweisen. Diese Abweichung von den zuvor zitierten Arbeiten könnte damit erklärt werden, dass die Thrombozyten bereits durch den Zusatz von Prostaglandin E₁ in das Abnahmemedium inaktiviert wurden. Die Fähigkeit zur Expression von P-Selektin bleibt dabei jedoch erhalten. Nach Stimulation dieser Zellen mit Thrombin konnte eine um das Zehnfache gesteigerte Expression dieses Adhäsionsmoleküls im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden. *Massberg et al.* konnten außerdem zeigen, dass über 99% der separierten Zellen bei Anwendung dieser Methode mit Rhodamin 6G angefärbt werden und der Anteil anderer Zellreihen in der so gewonnenen Thrombozytensuspension nur minimal ist (86). *Eichhorn et al.* konnte in lichtmikroskopischen Untersuchungen der Suspension keine Thrombozytenaggregate erkennen, die Zellen wiesen eine physiologische Form auf (29). Die Entnahme des für die Separation notwendigen Blutes und die Reinjektion der markierten Thrombozyten zeigten in vorliegendem Versuchsmodell keinen Einfluss auf Gasaustausch oder Makrohämodynamik.

4.1.2. Experimentelles Modell

4.1.2.4. Phototoxizität

Nach der Reinfusion der fluoreszenzmarkierten Erythrozyten und Thrombozyten in den Organismus lassen sich unvermeidbar freie Fluorochrome im Organismus nachweisen. Die Aufnahme dieser freien Fluorochrome in Endothelzellen und die folgende Lichtexposition mit der in dieser Studie eingesetzten Wellenlängen und Lichtintensität zeigten bei *Lehr et al.* und *Nolte et al.* keinen Einfluss auf die Integrität des vaskulären Endothels (81;97). *Harris et al.* konnte bei vergleichbaren Lichtintensitäten und vergleichbarer Expositionsdauer keinen Einfluss einer Kombination der Farbstoffe FITC-Dextran und Rhodamin 6G auf die Durchmesser von Arteriolen und Venolen oder auf das Adhärenzverhalten von Leukozyten nachweisen (53). Auch *Steinbauer et al.* konnten keine phototoxische Wirkung nach Applikation von FITC oder Rhodamin 6G bei Lichtdosen von 1333,5-2099,4 J/cm² an der Rückenhautkammer im Hamstermodell beobachten (120). *Herrmann et al.* konnten dagegen durch die Gabe von FITC eine intravasale Thrombenbildung induzieren (60), allerdings überstiegen die Plasmakonzentration von FITC sowie die Lichtintensität die in unserer Studie verwendeten Werte um ein Vielfaches. Durch den Einsatz einer Silikon-intensivierten (SIT) Kamera waren in der vorliegenden Arbeit die Voraussetzungen für äußerst geringe phototoxische Nebenwirkungen geschaffen, da zur Darstellung der fluoreszenzmarkierten Zellen auf Beleuchtungsintensitäten > 2500 J/cm² verzichtet werden konnte. Zudem war das untersuchte Lungengewebe nur während der kurzen Mikroskopierphasen dem Auflicht exponiert. *Kuebler et al.* konnten für dieses Modell eine Konstanz sämtlicher intravitalmikroskopisch erhobener Parameter über 60 min nach erfolgter Reinfusion fluoreszenzmarkierter Zellen nachweisen (73). Dieses Ergebnis lässt auch in vorliegender Arbeit die auftretenden phototoxischen Effekte als vernachlässigbar gering einschätzen.

4.1.2.5. Applizierte Substanzen: Endotoxin und 3-AB

Endotoxin

In der vorliegenden Studie wurde das Verhalten der Thrombozyten in der pulmonalen Mikrostrombahn während einer systemischen Entzündungsreaktion untersucht. Diese systemische Entzündungsreaktion wurde, wie in zahlreichen tierexperimentellen Studien zuvor, durch die intravenöse Gabe von Endotoxin induziert (39;91). Endotoxin wird beim Zerfall der Bakterienwand freigesetzt und entspricht in seiner chemischen Struktur den

4.1.2. Experimentelles Modell

Lipopolysacchariden (LPS). Es gilt als auslösende Ursache des septischen Schocks und lässt sich häufig schon vor Entdecken eigentlicher Infektionsherde quantitativ im peripheren Blut nachweisen. Die von uns verwendete Dosierung bestand aus einem initialen Bolus von 100 µg Endotoxin und anschließender kontinuierlicher Infusion von 20 µg /kg KG /h. Da die Halbwertszeit von Endotoxin nur ca. 30 Minuten beträgt, können durch die kontinuierliche Infusion mit einem zeitlichen Vorspann von mindestens vier Halbwertszeiten annähernd konstante Endotoxinspiegel im Blut erreicht werden (16). Die Wirksamkeit dieser Dosierung wurde bereits in anderen Studien gezeigt (96;98). So konnten *McCandless et al.* nach einmaliger Gabe von 100 µg Endotoxin eine gesteigerte Sequestration radioaktiv markierter Leukozyten in der Kaninchenlunge beobachten (88). Darüber hinaus konnte unsere Arbeitsgruppe in vorausgegangenen Studien am identischen Versuchsmodell die Entwicklung eines akuten Lungenschadens unter zuvor genannten Endotoxindosierungen nachweisen (58). Neben dem Erreichen einer gewünschten Wirkung einerseits wurde die Konzentration andererseits so niedrig gewählt, dass die Versuchstiere über den gesamten Versuchsverlauf makrohämodynamisch stabil blieben. Die Konstanz der makrohämodynamischen Parameter war eine wichtige Voraussetzung, um Aussagen über Veränderungen in der Mikrohämodynamik und Thrombozytenkinetik treffen zu können.

3-Aminobenzamid

Die Poly (ADP-Ribosyl) Synthetase, kurz PARS, ist ein nucleär lokalisiertes Enzym, von dem zwei Hauptaufgaben bekannt sind: sie hat eine regulatorische Funktion während der DNA-Reparatur und beeinflusst die Transkription und damit auch die Expression verschiedener proinflammatorischer Gene (4;64;135). Um den Einfluss der PARS auf das rheologische Verhalten der Thrombozyten in der pulmonalen Mikrostrombahn während einer generalisierten Entzündungsreaktion zu untersuchen, wurde das Enzym in vorliegender Arbeit mit dem Inhibitor 3-Aminobenzamid (3-AB) gehemmt. 3-AB ist ein sehr häufig sowohl *in vivo* als auch *in vitro* verwendeter kompetitiver Inhibitor, der sich auch in umfangreichen Studien von *Banasik et al.* (4;5) und *Rankin et al.* (107) als potenter und selektiver Hemmstoff erwiesen hat. Die in dieser Studie applizierte Dosis von einem initialen Bolus von 10 mg /kg KG und anschließender kontinuierlicher Infusion von 5 mg /kg KG /h erfolgte modifiziert nach *Szabo et al.* und *Thiemermann et al.* (124;130). Sie konnten nach Applikation von 10-20 mg /KG 3-AB eine suffiziente Dosierung nachweisen und dabei keine toxischen Effekte beobachten.

Neben 3-Aminobenzamid mit einer IC_{50} von 33 μ M (IC_{50} beschreibt die Konzentration die notwendig ist, um die Hälfte eines Substrates zu hemmen) existieren noch weitere, teilweise spezifischere PARS-Inhibitoren, wie z.B. 1,5-Dihydroxyisoquinolinone (IC_{50} 0,4 μ M) oder 1,8-Naphtalimide (IC_{50} 1,4 μ M) (4). Allerdings muss bei der Auswahl dieser Inhibitoren beachtet werden, dass sie auch eine hemmende Wirkung auf das Enzym Mono (ADP-Ribosyl) Transferase haben können, das einzelne ADP-Ribosylierungen von NAD^+ auf verschiedene Proteine katalysiert (4). Setzt man die einzelnen IC_{50} von Poly (ADP-Ribosyl) Synthetase und Mono (ADP-Ribosyl) Transferase zueinander in Beziehung, lässt sich über die jeweilige Relation der Werte eine Spezifität ermitteln. 3-Aminobenzamid mit einer Relation von 550 hemmt somit die PARS spezifischer als 1,8-Naphtalimide (Relation 14), wirkt im Vergleich zu 1,5-Dihydroxyisoquinolinone (Relation 2282) dagegen unspezifischer (4). Der Hemmstoff 1,5-Dihydroxyisoquinolinone hat aber den Nachteil, dass er in Dimethylsulfoxide (DMSO) gelöst werden muss. Diese Substanz könnte eine Verfälschung der Ergebnisse induzieren, da sie per se als potenter Sauerstoffradikalfänger bekannt (89). Die Weiterentwicklung von 1,5-Dihydroxyisoquinolinone durch *McDonald et al.* beschreibt den wasserlöslichen PARS-Inhibitor 5-Amino-isoquinoline (IC_{50} 12 μ M), allerdings konnten keine

4.1.3. Konstanz der Rahmenbedingungen

genauen Angaben über eine hemmende Wirkung der Mono (ADP-Ribosyl) Transferase nachgewiesen werden (89).

4.1.3. Konstanz der Rahmenbedingungen

Eine Grundvoraussetzung experimenteller Untersuchungen stellt die Gewährleistung einer Konstanz der Messwerte über den Untersuchungszeitraum unter gleichbleibenden Bedingungen dar. Die Konstanz der makrohämodynamischen und mikrozirkulatorischen Parameter im unstimulierten Modell über einen Zeitraum von 60 Minuten konnte schon in zahlreichen am vorliegenden Modell durchgeführten Studien bestätigt werden (67;73;79;80). Auch in vorliegender Arbeit konnte eine Konstanz der Messgrößen über einen Untersuchungszeitraum von 60 Minuten bei konstanten Rahmenbedingungen, d.h. ohne weitere Stimulation gezeigt werden. Änderungen der Parameter sind folglich auf die Interventionen gemäß des Versuchsprotokolls und den Versuchsgruppen und nicht auf modellimmanente Veränderungen zurück zu führen.

4.2. Ergebnisse

4.2. Ergebnisse

4.2.1. Das Verhalten von Thrombozyten in der pulmonalen Mikrostrombahn unter Endotoxinämie

Als erstes Studienziel wurde in vorliegender Arbeit das Verhalten der Thrombozyten in der pulmonalen Mikrostrombahn während einer systemischen Entzündungsreaktion untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Fliessgeschwindigkeit der Thrombozyten in allen Abschnitten der pulmonalen Mikrostrombahn unter Endotoxinämie im Vergleich zur Kontroll- oder Endotoxin+3-AB – Gruppe signifikant reduziert war, während die Anzahl adhärenter Thrombozyten vor allem in den Alveolarkapillaren und Venolen signifikant anstieg.

Eine mögliche Ursache für die reduzierte Thrombozytenfliessgeschwindigkeit könnte in Veränderungen der makrohäodynamischen Parameter liegen. *Kuhnle et al.* (78) untersuchten am gleichen Versuchsmodell den Zusammenhang zwischen Blutfluß und rheologischem Verhalten von Leukozyten in der pulmonalen Mikrostrombahn. Sie konnten nachweisen, dass die Leukozytenfliessgeschwindigkeit in den Arteriolen, Venolen und Alveolarkapillaren von der Stärke des Blutflusses abhängt. Wurde der Blutfluß experimentell erhöht, kam es sowohl zu einer Zunahme der Erythrozytenfliessgeschwindigkeit als auch der Leukozytenfliessgeschwindigkeit. Eine Reduktion des Blutflusses korrelierte dagegen mit der Abnahme der Erythrozyten- und auch Leukozytenfliessgeschwindigkeit. Gegenläufig dazu konnte während reduzierter Fliessgeschwindigkeiten eine erhöhte Anzahl rollender und zeitweise adhärenter Leukozyten beobachtet werden. Bisher gibt es allerdings keine Daten über einen möglichen Einfluss der Makrohäodynamik auf die Thrombozytenkinetik. Dennoch wäre theoretisch eine mögliche Übertragbarkeit der Untersuchungsergebnisse von *Kuhnle et al.* zum rheologischen Verhalten der Leukozyten in Abhängigkeit vom Blutfluß auf das der Thrombozyten denkbar. In der vorliegenden Studie wurden über den gesamten Versuchszeitraum der mittlere arterielle Blutdruck (MAP), der zentralvenöse Blutdruck (CVP) und der pulmonalarterielle Blutdruck (PAP) als makrohäodynamische Parameter bestimmt. Da sich die Werte über den gesamten Versuchszeitraum nicht signifikant veränderten und annähernd mit der Kontrollgruppe identisch waren, können Veränderungen der Thrombozytenfliessgeschwindigkeit und der Thrombozytenadhärenz in vorliegender Studie nicht mit veränderten makrohäodynamischen Vorgängen erklärt werden.

4.2.1. Das Verhalten von Thrombozyten in der pulmonalen Mikrostrombahn unter Endotoxinämie

Neben Veränderungen der Makrohämodynamik müssen ebenfalls Veränderungen mikrohämodynamischer Parameter als mögliche Ursache der reduzierten Thrombozytenfliessgeschwindigkeit und der gesteigerten Thrombozytenadhärenz unter Endotoxinämie in Betracht gezogen werden.

Bezüglich des kinetischen Verhaltens von Thrombozyten in der pulmonalen Mikrostrombahn lassen sich in der derzeitigen Literatur immer noch wenig vergleichbare Daten finden. In der vorliegenden Arbeit waren sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Therapiegruppe die gemessenen mittleren Fliessgeschwindigkeiten der Thrombozyten in der gesamten pulmonalen Mikrostrombahn nahezu identisch mit den ermittelten mittleren Fliessgeschwindigkeiten der Erythrozyten. Diese Daten stimmen mit den von *Eichhorn et al.* (29) erhobenen Ergebnissen am gleichen Versuchsmodell unter Kontrollbedingungen überein. Auch *Tangelder et al.* konnten an mesenterialen Arteriolen von Kaninchen zeigen, dass sich die Geschwindigkeitsprofile von Thrombozyten und Erythrozyten unter physiologischen Bedingungen nicht voneinander unterscheiden (126). Nach den Untersuchungen von *Tangelder et al.* ist die Thrombozytenkonzentration in Arteriolen nahe der Gefäßwand signifikant höher als in Venolen. Eine daraus folgernd erhöhte Thrombozytenkonzentration im Zentralstrom der Venolen im Vergleich zum Randstrom konnte von der Arbeitsgruppe nachgewiesen werden (126). Unter der Annahme eines parabolischen Geschwindigkeitsprofils innerhalb eines Mikrogefäßes muss in den Arteriolen als Konsequenz dieser Ergebnisse eine reduzierte Thrombozytenfliessgeschwindigkeit im Vergleich zu Venolen erwartet werden. Diese Annahme konnten die in vorliegender Arbeit gemessenen Ergebnisse nicht bestätigen, da sich die Thrombozytenfliessgeschwindigkeiten in Arteriolen und Venolen nicht signifikant voneinander unterschieden.

In der mit Endotoxin behandelten Versuchsgruppe wurde eine signifikante Reduktion der Thrombozytenfliessgeschwindigkeit in allen Abschnitten der pulmonalen Mikrozirkulation im Vergleich zur Kontroll- und Endotoxin+3-AB - Gruppe gemessen. Dabei konnte allerdings nur in den Venolen und in den Kapillaren ein signifikanter Anstieg adhärenter Thrombozyten im Vergleich sowohl zu den Arteriolen der mit Endotoxin behandelten Tiere als auch zur Kontroll- und Endotoxin+3-AB - Gruppe festgestellt werden. Eine Reduktion der Thrombozytenfliessgeschwindigkeit als Zeichen einer gesteigerten Interaktion der Thrombozyten mit dem Gefäßendothel setzt ihre Margination in den Randstrom voraus. *Eckstein et al.* beschreiben für diese Margination ein „random walk“-Modell: Abhängig von

4.2.1. Das Verhalten von Thrombozyten in der pulmonalen Mikrostrombahn unter Endotoxinämie

den im Gefäß herrschenden Wandscherraten kommt es zu einer Zunahme zufälliger Kollisionen zwischen Erythrozyten und Thrombozyten die eine Lateralisierung der Thrombozyten in den Randstrom zur Folge haben (28). Dabei wurde von einer ausgeprägten Verteilung der Thrombozyten in den Randstrom bei Scherraten größer 400 s^{-1} berichtet, Werte, die auch in vorliegender Arbeit ermittelt wurden. Da sich die Wandscherraten im vorliegenden Versuchmodell allerdings zwischen den einzelnen Versuchsgruppen nicht signifikant voneinander unterscheiden, ist die Möglichkeit, die gesteigerte Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion mit rheologischen Mechanismen zu erklären, eher unzutreffend. Auch die in allen Abschnitten der pulmonalen Mikrostrombahn reduzierte Thrombozytenflussgeschwindigkeit bei nur in Venolen und Kapillaren gesteigener Thrombozytenadhärenz würde diesem Modell widersprechen.

Da sowohl makrohämodynamische als auch mikrohämodynamische Mechanismen als Ursache für eine erhöhte Thrombozytenadhärenz nach Endotoxingabe als unwahrscheinlich betrachtet werden können, müssen mögliche direkte Interaktionen der durch Endotoxin aktivierten Thrombozyten mit den Gefäßendothelzellen oder anderen marginierten Zellen wie z.B. den Leukozyten, diskutiert werden.

4.2.1.1. Die Thrombozyten – Endothelzell – Interaktion

Thrombozyten treten über Adhäsionsmoleküle mit vaskulären Endothelzellen in Kontakt. Dabei lassen sich die bekannten Adhäsionsmoleküle nach ihrer Struktur in verschiedene Gruppen einteilen. Zu einer dieser Gruppen zählen die Selektine, die einen bedeutenden Anteil der Adhäsionsmoleküle darstellen (14). P-Selektin wird in den Thrombozyten in α -Granulas und in Endothelzellen gemeinsam mit dem von-Willebrand-Faktor in den Weibel-Palade-Körperchen gespeichert (87). Kommt es zur Aktivierung der Thrombozyten und Endothelzellen z.B. im Rahmen einer Entzündungsreaktion, wird P-Selektin binnen kürzester Zeit auf der jeweiligen Zelloberfläche exprimiert (38).

Frenette et al. untersuchten intravitalmikroskopisch mesenteriale Venolen von Mäusen nach inflammatorischer Stimulation mit Tumornekrosefaktor TNF- α . Sie konnten nachweisen, dass der erste, noch lockere Kontakt der Thrombozyten mit den Endothelzellen, das sogenannte „Roll-Phänomen“, sowohl über endotheliales P-Selektin als auch über E-Selektin vermittelt

4.2.1. Das Verhalten von Thrombozyten in der pulmonalen Mikrostrombahn unter Endotoxinämie

wird (37;38;137). Das Adhäsionsmolekül E-Selektin wird ebenfalls auf der Oberfläche von entzündlich veränderten Endothelzellen exprimiert (137).

Die Arbeitsgruppe um *Khandoga et al.* konnte an der Leber von Mäusen nach Setzen eines Ischämie-Reperfusionsschadens das endotheliale P-Selektin als entscheidendes Adhäsionsmolekül für den ersten Kontakt der Thrombozyten mit den Endothelzellen der präsinusoidalen Arteriolen und postsinusoidalen Venolen identifizieren (66). Auch die Versuche von *Massberg et al.* an postischämischen Mikrogefäßen des Mesenteriums der Maus führten zu gleichen Ergebnissen, allerdings konnten sie eine stärkere Thrombozytenadhärenz in den Arteriolen als in den Venolen beobachten (87).

Um auch in vorliegender Arbeit nach einem Zusammenhang zwischen der Expression der Adhäsionsmoleküle P- und E-Selektin und einer gesteigerten Thrombozytenadhärenz zu suchen, wurde die Menge von P- und E-Selektin quantitativ mit Hilfe der Westernblot-Analyse und anschließender densitometrischer Auswertung bestimmt. Dabei war der Nachweis von P-Selektin und E-Selektin deutlich bzw. signifikant in der mit Endotoxin behandelten Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Dieses Ergebnis korreliert mit der in der Endotoxingruppe beobachteten gesteigerten Thrombozytenadhärenz im Vergleich zur Kontrollgruppe. Daraus könnte man folgern, dass auch in der vorliegenden Studie die reduzierte Thrombozytenflussgeschwindigkeit und die erhöhte Thrombozytenadhärenz in der pulmonalen Mikrozirkulation unter Endotoxinämie mit einer gesteigerten Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion, vermittelt über P- und E-Selektin, erklärbar wären.

Da für die Westernblot-Analyse Gewebeproben der Lunge von den einzelnen Tieren nach Beendigung der Versuche aufbereitet wurden, lassen die Ergebnisse nur Vergleiche unter den einzelnen Versuchsgruppen zu, erlauben jedoch keine Aussage bezüglich der Verteilung der einzelnen Adhäsionsmoleküle in den verschiedenen Abschnitten der pulmonalen Mikrogefäße.

Eine Erklärung für das von uns beobachtete unterschiedliche Adhärenzverhalten der Thrombozyten in Arteriolen und Venolen könnten die verschiedenen Expressionsmuster der Adhäsionsmoleküle und ihrer Liganden darstellen. So konnten *Perry und Granger* (103) eine erhöhte Dichte von Immunglobulin-Adhäsionsmolekülen auf dem Endothel mesenterialer Venolen im Vergleich zu den Arteriolen nachweisen. *Feuerhake et al.* untersuchten in der pulmonalen Zirkulation die Verteilungsmuster von P- und E-Selektin, ICAM-1 und VECAM-

4.2.1. Das Verhalten von Thrombozyten in der pulmonalen Mikrostrombahn unter Endotoxinämie

1 und konnten eine vermehrte Expression dieser Adhäsionsmoleküle auf dem Endothel venöser Gefäße gegenüber Arterien beschreiben. Allerdings sind dieser Arbeit keine Informationen über Verteilungsmuster auf arteriolärer oder venulärer Ebene zu entnehmen (33). Wie bereits zuvor erwähnt, wird P-Selektin in den Endothelzellen gemeinsam mit dem von Willebrand-Faktor gespeichert und sezerniert (87;137). In der pulmonalen Mikrostrombahn wurde der von-Willebrand-Faktor vor allem in Venolen und nur in geringem Ausmaß in Arteriolen, nicht dagegen in Alveolarkapillaren nachgewiesen (116). Demnach könnte man also für die pulmonale Mikrostrombahn auf eine bevorzugte venuläre Expression von P-Selektin schließen und damit die mögliche Ursache für die gesteigerte Thrombozytenadhärenz in den Venolen im Vergleich zu den Arteriolen unter Endotoxinämie erklären.

Der größte Teil der Thrombozytensequestrierung wurde in vorliegender Arbeit jedoch in den Alveolarkapillaren gemessen und wäre trotz fehlendem Nachweis des von-Willebrand-Faktors allein schon mit der Überlegung, dass die gesamte Gefäßoberfläche der Kapillaren die gesamte Gefäßoberfläche der Arteriolen und Venolen um das ca. 45-fache übertrifft, erklärbar (62;117). *Doerschuk et al.* untersuchten mittels Radioisotopenmarkierung die Passage verschiedener Zelllinien durch die pulmonale Zirkulation und kamen zu der Schlussfolgerung, dass die jeweiligen Zellgrößen den entscheidenden Faktor über die Verweildauer in der pulmonalen Mikrozirkulation darstellen (27). So können Leukozyten bereits unter unstimulierten Bedingungen aufgrund der Diskrepanz ihres Durchmessers zu dem der Alveolarkapillaren in diesen zurückgehalten werden. Die Annahme eines rein mechanischen Retentionsvorganges lässt sich allerdings nicht auf die Thrombozyten übertragen, da sie mit einem mittleren Durchmesser von 2-3 μm deutlich unter dem mittleren pulmonalen Kapillardurchmesser von etwa 6 μm liegen (47). Der gesteigerten Thrombozytenadhärenz in den Alveolarkapillaren unter Endotoxinämie könnten also auch adhäsionsmolekül-medierte Mechanismen zugrunde liegen. So konnte unsere Arbeitsgruppe in einer weiteren Studie das thrombozytäre P-Selektin als das entscheidende Adhäsionsmolekül für eine erste Thrombozyten-Endothel-Interaktion in den pulmonalen Kapillaren nachweisen (68).

Eine weitere mögliche Erklärung, warum die Anzahl adhärenter Thrombozyten in den Venolen und Alveolarkapillaren nach Auslösen einer systemischen Entzündungsreaktion signifikant gegenüber den Arteriolen erhöht ist, könnte auch in der Ausbildung von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten zu finden sein.

4.2.1. Das Verhalten von Thrombozyten in der pulmonalen Mikrostrombahn unter Endotoxinämie

4.2.1.2. Die Thrombozyten –Leukozyten – Interaktion

Bereits unter physiologischen Bedingungen befindet sich ein großer Anteil marginierter Leukozyten, bzw. neutrophiler Granulozyten in der Lunge, der in einem dynamischen Austausch mit den zirkulierenden neutrophilen Granulozyten steht (26). *Kuebler et al.* beschreiben in ihrem Review „The Marginated Pool“ wie zuvor auch viele andere Autoren den größten Anteil dieser Leukozyten in den Alveolarkapillaren (74). Zudem konnten sie nach weiteren intravitalmikroskopischen Untersuchungen nachweisen, dass die Anzahl Endothel-adhärenter Leukozyten in den Venolen im Vergleich zu den Arteriolen um den Faktor von annähernd 3,5 erhöht ist (75). Aktivierte Thrombozyten gehen über das thrombozytäre P-Selektin und PSGL-1, einem Rezeptor, der von neutrophilen Granulozyten und Monozyten exprimiert wird, erste, noch lockere, temporäre Interaktionen mit den Leukozyten ein (38). Eine Stabilisierung dieser Verbindung erfolgt vor allem über das Glycoprotein-IIb/IIIa (GP-IIb/IIIa), das verschiedene adhäsive Proteine bindet und es den Thrombozyten ermöglicht, z.B. über Fibrinogenbrücken untereinander Aggregate oder festere Verbindungen zu Leukozyten und Endothelzellen herzustellen (70). Diese Interaktionen könnten die Thrombozytenfliessgeschwindigkeit primär reduzieren und damit die Entwicklung einer festen, Adhäsionmolekül-assoziierten Thrombozytenadhärenz am Gefäßendothel begünstigen. Dies wäre eine weitere mögliche Erklärung, warum in der vorliegenden Studie in der mit Endotoxin stimulierten Versuchsgruppe vor allem in den Alveolarkapillaren und Venolen eine erhöhte Thrombozytenadhärenz nachgewiesen wurde.

Die Konsequenzen einer gesteigerten Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion in der pulmonalen Mikrostrombahn

Eine der Hauptaufgaben der Thrombozyten ist es, die Hämostase zu wahren und nach Endothelverletzung entstandene Blutungen unter Kontrolle zu bringen. Allerdings tragen die Thrombozyten unter pathophysiologischen Bedingungen, ähnlich wie die Leukozyten, über verschiedene Mechanismen zu inflammatorischen Reaktionen bei. Schon seit längerer Zeit ist bekannt, dass Thrombozyten eine entscheidende Rolle bei der Entstehung des ARDS sowie dem Ischämie-Reperfusionssyndrom nach Lungentransplantationen spielen (29).

Thrombozyten besitzen α -Granula, Dense-Körperchen und Lysosome als Speicherorganelle. In den α -Granula sind verschiedene Mediatoren enthalten, wie z.B. der Platelet-Faktor-4

4.2.1. Das Verhalten von Thrombozyten in der pulmonalen Mikrostrombahn unter Endotoxinämie

(PF-4) und das β -Thromboglobulin (β -TG). Erfolgt die Aktivierung der Thrombozyten, werden die gespeicherten Mediatoren freigesetzt. Dabei gelten PF-4 und β -TG als die entscheidenden chemotaktisch wirksamen Botenstoffe, deren Freisetzung die Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten zur Folge hat (25;38;70). Bilden Thrombozyten Aggregate oder werden durch Thrombin aktiviert, wird der Vascular Endothelial Growth Faktor (VEGF) aus den α -Granula sezerniert, einer von vielen gespeicherten Wachstumsfaktoren, welcher die Extravasation von Plasmaproteinen und die Migration von Leukozyten in umliegendes Gewebe fördert und damit u.a. die Bildung eines Lungenödems begünstigt. Ein weiterer Wachstumsfaktor, der Platelet Derived Growth Faktor (PDGF), wirkt ebenfalls chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten und Monozyten und kontrolliert die Rekrutierung und Zellproliferation der Fibroblasten und glatten Muskelzellen im Rahmen der Wundheilung (70). Die Dense-Körperchen enthalten neben Serotonin auch ADP, ATP, GDP, GTP und Histamine. Serotonin wirkt nach seiner Freisetzung hauptsächlich an den präkapillären Gefäßen als lokaler Vasokonstriktor, steigert die Gefäßpermeabilität und verstärkt die chemotaktische Antwort der Leukozyten. ADP ist in der Lage die oxidative Burst-Reaktion in neutrophilen Granulozyten zu verstärken (70). Auch das Cytosol der Thrombozyten enthält wichtige proinflammatorische Mediatoren, wie den CD40 Liganden (CD40L). CD40L wird nach erfolgter Thrombozytenaktivierung innerhalb weniger Sekunden auf deren Zelloberfläche exprimiert und stimuliert die Endothelzellen zur Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin, was wiederum erhöhte Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen zur Folge hat. Zudem regt CD40L die Thrombozyten zur weiteren Sekretion von Mediatoren an und stabilisiert Thrombozytenaggregate über Verbindungen mit GP-IIb/IIIa (38).

Thrombozyten sind neben der Speicherung von Substanzen auch in der Lage, lipidhaltige Botenstoffe zur Regulation von Hämostase und akuter inflammatorischer Prozesse zu bilden. Zu diesen Lipidmediatoren gehören u.a. der Platelet-Activating Factor (PAF), Thromboxan A₂ (TxA₂), Platelet-Derived Lysophosphatic Acid (LPA) und das Prostaglandin E₂ (PGE₂). PAF und TxA₂ sind potente proinflammatorische Substanzen, die ebenfalls die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion sowie die Migration der Leukozyten in das umliegende Gewebe fördern und zusätzlich weitere Thrombozyten aktivieren (59). Das zelluläre Phospholipid LPA induziert eine gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und E-Selektin, erhöhte Leukozyten- bzw. Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen sind auch hier

4.2.1. Das Verhalten von Thrombozyten in der pulmonalen Mikrostrombahn unter Endotoxinämie

die Folge (38). Die aktivierten Leukozyten sezernieren ebenfalls chemotaktisch wirksame Mediatoren wie z.B. den Tumornekrosefaktor TNF- α , was zu einer sich weiter verstärkenden Aktivierung von Thrombozyten und Leukozyten führt.

Die soeben beschriebenen Vorgänge, ausgelöst durch inflammatorische Prozesse, stellen nur einen Ausschnitt der Interaktionen zwischen Thrombozyten, Leukozyten und Endothelzellen dar und lassen die Komplexität im Zusammenspiel der immunologischen Antworten erahnen. Hinzu kommt, dass die durch Sekretionsprodukte der Thrombozyten aktivierten neutrophilen Granulozyten ihrerseits inflammatorische Mediatoren, wie z.B. den Platelet-Activating Factor (PAF) oder den bereits erwähnten Tumornekrosefaktor TNF- α sezernieren, die wiederum eine aktivierende Wirkung auf Thrombozyten haben (59). Folglich könnte nach einer inflammatorischen Stimulation, z.B. durch zirkulierendes Endotoxin, die Entstehung eines Circulus vitiosus angenommen werden (17).

4.2.1.3. Die Entstehung von Permeabilitätsstörungen unter Endotoxinämie

Die Freisetzung von Entzündungsmediatoren, Proteasen und lytischen Enzymen durch aktivierte Thrombozyten und neutrophile Granulozyten hat eine Störung der Gefäßpermeabilität zur Folge. In der pulmonalen Mikrostrombahn kommt es durch eine Beeinträchtigung der vaskulären Gefäßendothelzellintegrität, durch eine gesteigerte Kapillarpermeabilität und die Migration von Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten zum Eintritt proteinhaltiger Flüssigkeit in das Interstitium. Daraus resultiert die Entwicklung eines interstitiellen und alveolären Lungenödems (54;59;84), eines der ersten klinischen Symptome während der Entstehung des ARDS. Als Maß für die Entwicklung eines interstitiellen Lungenödems wurde in vorliegender Arbeit die Alveolarseptenbreite intravitalmikroskopisch bestimmt. Bereits 6 Stunden nach kontinuierlicher Endotoxinzufuhr war eine signifikante Verbreiterung des interstitiellen Raumes im Vergleich zur Kontrollgruppe messbar. In zuvor durchgeführten Studien unserer Arbeitsgruppe am identischen Versuchsmodell konnten mittels Elektronenmikroskopie 6 Stunden nach Induktion einer systemischen Entzündungsreaktion eine deutliche Vakuolisierung und Verdickung der Endothelzellen und Alveozyten beschrieben werden. Dagegen wurden zu diesem Zeitpunkt noch keine Lücken in der Endothelzellreihe beobachtet (58). Nachdem die in dieser Versuchsreihe gemessenen Alveolarseptenbreiten unter Endotoxinämie annähernd

4.2.1. Das Verhalten von Thrombozyten in der pulmonalen Mikrostrombahn unter Endotoxinämie

identisch mit den in vorliegender Studie gemessenen Ergebnissen sind, ist eine Übertragung der elektronenmikroskopischen Beobachtungen denkbar.

Ein weiteres sehr frühes Kriterium bei der Entwicklung eines akuten Lungenschadens stellt die Störung des Gasaustausches dar. Ursachen dafür liegen in einer ödembedingten Diffusionsstörung der Atemgase, in der Zunahme mangelhaft ventilierter Lungenareale sowie einer inflammationsbedingten Supprimierung der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion und damit konsekutiven Erhöhung des Shuntvolumens. Der in der vorliegenden Arbeit allerdings nur tendenziell im Verlauf reduzierte arterielle Sauerstoffpartialdruck bei konstantem arteriellem Kohlendioxidpartialdruck in der mit Endotoxin behandelten Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe könnte mit dem gewählten Beatmungsverfahren erklärt werden. Durch die für das Versuchsmodell notwendige Beatmung mit positiven endexpiratorischen Beatmungsdrücken wird einerseits der Bildung von Mikroatelektasen und andererseits der Bildung eines interstitiellen Lungenödems entgegengewirkt.

4.2.1.4. Die Entstehung von Zellschäden unter Endotoxinämie

Produktion von Radikalen

Während einer generalisierten Entzündungsreaktion kommt es zur Produktion hochreaktiver Sauerstoffmetabolite (43;52). Diesen hochreaktiven Sauerstoffradikalen wird nicht nur unter inflammatorischen Bedingungen sondern auch während eines Ischämie/Reperfusionsschadens, während eines akuten Myokardinfarkts, im hämorrhagischen Schock sowie bei thermischen Gewebeschäden eine entscheidende Rolle bei vielen pathophysiologischen Reaktionen zugeschrieben (43;52). Molekularer Sauerstoff kann unter pathophysiologischen Bedingungen von fast allen aeroben Zellen zu verschiedenen hochreaktiven Radikalen wie den Superoxidanionen ($O_2^{\cdot-}$) reduziert werden. Die meisten Superoxidanionen bilden extrazellulär mit Wasserstoffionen das Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Wasserstoffperoxid, selbst kein freies Radikal, reagiert zusammen mit Superoxidanionen unter Bildung von noch reaktiveren Hydroxylradikalen (HO^{\cdot}) (34). *Leo et al.* konnten nach Simulation einer Ischämie/Reperfusionssituation *in vitro* die Bildung von Superoxidanionen und Hydroxylradikalen durch Thrombozyten nachweisen (63;82). Superoxidanionen werden

4.2.1. Das Verhalten von Thrombozyten in der pulmonalen Mikrostrombahn unter Endotoxinämie

z.B. auch über die Aktivierung des NADPH-Oxidase-Systems von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Makrophagen gebildet (1;43). Eine weitere Quelle stellt der Arachidonsäuremetabolismus dar, indem Sauerstoffradikale als Nebenprodukte aus Reaktionen von Cyclooxygenasen und Lipooxygenasen entstehen (34). Der Bildung hochreaktiver Sauerstoffradikale steht ein Arsenal an Antioxidantien gegenüber, wie der Superoxiddismutase, der Katalase und Glutathionperoxidase sowie weitere Radikalfängern, wie Vitamin C und E (22;43;93). Steht die Produktion von Sauerstoffradikalen im Ungleichgewicht mit der Kapazität antioxidativer Schutzmechanismen, resultiert daraus der sogenannte „oxidative Stress“ (7). In der Folge kann es zu Veränderungen der DNA, zu Lipidperoxidationen von Zellmembranen oder Modifikationen von Proteinen kommen, die wiederum zu Zellschädigungen führen können (7).

Bildung von Peroxynitrit

Zusätzlich bewirkt eine Endotoxinämie die gesteigerte Synthese der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS), eine der drei bekannten Isoformen der Stickstoffmonoxid-Synthasen (20;122). Dabei können von aktivierten Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten sezernierte Zytokine aber auch Endotoxine direkt die Enzyymbildung in verschiedenen Zelltypen wie in Endothelzellen und Alveolarmakrophagen, aber z.B. auch in Pankreasinseln oder Neuronen induzieren (146). Stickstoffmonoxid (NO) hat einerseits physiologische und protektive Wirkungsmechanismen, die Aktivierung der iNOS hat dagegen die Bildung großer Mengen zytotoxisch wirkender freier NO-Radikale (NO^\bullet) zur Folge. NO-Radikale können die mitochondriale Atmungskette unterdrücken und Einfluß auf Apoptose und Zelluntergang nehmen (146).

Kommt es zu einer gleichzeitigen Überproduktion von Superoxidanionen (O_2^-) und Stickstoffmonoxid (NO), erfolgt aus diesen beiden Substraten die Bildung von Peroxynitrit (ONOO^-) (122). *Wizemann et al.* konnten an isolierten Alveolarmakrophagen und interstitiellen Makrophagen *in vitro* die Produktion von Peroxynitrit in der Lunge während einer akuten Endotoxinämie nachweisen (144). Auch *Szabo et al.* zeigten anhand von *in vivo* Untersuchungen am Rattenmodell während eines Endotoxin-induzierten und hämorrhagischen Schocks sowie nach Ischämie und Reperfusion die Bildung von Peroxynitrit (125). *Kooy et al.* konnten bei septischen Patienten mit akutem Lungenversagen Peroxynitrit in der Lunge nachweisen und *Haddad et al.* quantifizierten immunfluoreszenzmikroskopisch die Peroxynitrit-induzierte Bildung von Nitrotyrosin in der Lunge von Patienten mit ARDS (51;71).

Peroxynitrit hat ein wesentlich höheres oxidatives Potential als Superoxidanionen oder NO-Radikale alleine. Reaktivität und Zerfall werden stark von den chemischen Voraussetzungen in der unmittelbaren Umgebung beeinflusst. Nach *Pryor* und *Squadrito* ist die zuerst entstehende cis-Konfiguration des deprotonierten Peroxynitrit relativ stabil und kann mit einer Halbwertszeit von 2 Sekunden über mehrere Zelldurchmesser hinweg diffundieren (119). Unter physiologischen pH-Werten wird ein Teil des Peroxynitrits zur peroxosalpetrigen Säure (ONOOH) protoniert. Die peroxosalpetrige Säure gilt als sehr instabil und zerfällt unter der Bildung von hochreaktiven Zwischenprodukten wie Hydroxylradikalen (HO^\bullet) und Stickstoffdioxidradikalen (NO_2^\bullet) sofort zu Nitrat (133). In *in vitro* Untersuchungen konnten

4.2.1. Das Verhalten von Thrombozyten in der pulmonalen Mikrostrombahn unter Endotoxinämie

als Folge Nitrierungen und Hydroxylierungen von aromatischen Komponenten wie Tyrosin, Tryptophan und Guanosin gezeigt werden. Laufen diese Reaktionen mit Enzymen, Makromolekülen oder Lipiden ab, werden zelluläre Funktionen schädigend beeinflusst: die Nitrierung von Tyrosin zu Nitrotyrosin führt z.B. zu einer Dysfunktion nitrierter Proteine, wie der Superoxiddismutase, dem zytoskelettalen Aktin und der neuronalen Tyrosin-Hydroxylase, die für die Dopamin-Biosynthese notwendig ist (122). Peroxynitrit wirkt nicht nur hemmend auf die Superoxiddismutase sondern auch auf andere antioxidative Moleküle und Systeme. So konnten *Cuzzocrea et al.* eine durch Peroxynitrit medierte Verringerung von Glutathion, einer wichtigen zellulären Antioxidanz, nachweisen und als Folge eine gesteigerte zelluläre Oxidantienbildung und Exazerbation des oxidativen Zellschadens beobachten (23). Peroxynitrit hat zudem eine hemmende Wirkung auf die Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität von Zellmembranen und kann eine Inaktivierung von membranständigen Na^+ -Kanälen verursachen. Über diese hemmenden Mechanismen konnte in Typ-II-Pneumozyten eine direkte Schädigung von Surfactantproteinen gezeigt werden (21;49;50;122). Des Weiteren wurde bei Versuchen mit Neuronen und Gliazellen, mit isolierten Makrophagen und isolierten glatten Muskelzellen aus der Rattenaorta die hemmende Wirkung von Peroxynitrit auf die mitochondriale Atmungskette beobachtet. Hohe Konzentrationen von Peroxynitrit führen durch den unmittelbaren Einfluss auf den Energiehaushalt der Zellen zu einem schnellen Zelltod, während niedrigere Konzentrationen über mehrere Stunden den Zelltod durch Apoptose verursachen können (122).

Eine der schädigsten Reaktionen von Peroxynitrit ist allerdings der Angriff auf die DNA. Peroxynitrit kann Nukleinsäuren oxidieren und deaminieren, freigelegte DNA-Fragmente von DNA-Strängen abspalten sowie DNA-Doppelstrangbrüche und DNA-Einzelstrangbrüche verursachen. Ein Mechanismus, der zu DNA-Strangbrüchen führt, beruht möglicherweise auf der Abspaltung von Wasserstoffatomen von der Außenseite der Nukleotidketten, was zu einer Destabilisierung der Zuckerreste durch Öffnung der Ribose-Ringe führen könnte (83;122). Die entstandenen DNA-Strangbrüche lösen wiederum eine bis zu ein 100-fach verstärkte Aktivierung der in Zellkernen vorkommenden Poly-ADP-Ribosyl-Synthetase, kurz PARS, aus (64;123).

4.2.1. Das Verhalten von Thrombozyten in der pulmonalen Mikrostrombahn unter Endotoxinämie

4.2.1.5. Die Poly-ADP-Ribosyl-Synthetase (PARS)

Chambon et al. beschrieben 1963 erstmals nach Zugabe von NAD^+ zu Zellkernextrakten aus der Rattenleber die gesteigerte Synthese einer polyadenylierenden Säure, die später als Poly-ADP-Ribose identifiziert wurde. Dies führte zu weiteren intensiven Forschungen auf dem Gebiet der Poly-ADP-Ribosylierung und zur Entdeckung der ersten Isoform der Poly-ADP-Ribosyl-Polymerase, kurz PARP-1 (64). Für die PARP-1 werden in der Literatur synonym die Bezeichnungen Poly-ADP-Ribosyl-Transferase und Poly-ADP-Ribosyl-Synthetase, kurz PARS, verwendet (95). Auch wenn inzwischen verschiedene weitere Isoformen von Poly-ADP-Ribosyl-Polymerasen entdeckt wurden, bleibt die PARS das bisher am genauesten und besten untersuchte Enzym (64), das 90 Prozent der zellulären Poly-ADP-Ribosylierungen übernimmt (134). Dafür spaltet die PARS NAD^+ in Nicotinamid und ADP-Ribose und verwendet diese zur Synthese langkettiger Poly-ADP-Ribose Polymere. Diese werden über kovalente Bindungen mit nukleären Akzeptorproteinen verknüpft, zu denen u.a. Histone, DNA-Reparaturenzyme und Transkriptionsfaktoren zählen. Damit beeinflusst die PARS unter physiologischen Bedingungen viele verschiedene nukleäre Zielproteine (64;135). Die Aktivierung der PARS bringt dem einzelnen Individuum aber nicht nur Vorteile. Als Schattenseite der Poly-ADP-Ribosylierungen können Gewebeschäden im Zusammenhang mit akuten und chronischen inflammatorischen Reaktionen, nach Schockzuständen und nach myokardialen und cerebralen Ischämie-Reperfusionsschäden entstehen. Mit Hilfe der pharmakologischen und genetischen Hemmung der PARS entdeckte man nach zahlreichen Untersuchungen zwei dafür verantwortliche Mechanismen: den Zelltod durch den Verbrauch zellulärer Energiereserven nach Überaktivierung der PARS sowie den Einfluss auf die Signaltransduktion und damit auf eine gesteigerte Produktion inflammatorischer Mediatoren mit folglich verstärkten Entzündungsreaktionen (31;64;95;135).

PARS und DNA-Reparatur

Unter physiologischen Bedingungen scheint die PARS eine relativ untergeordnete Rolle bei der DNA-Reparatur zu spielen. Kommt es jedoch zur Schädigung der DNA durch unterschiedliche genotoxische Stimuli, reguliert die PARS je nach Intensität des Stimulus drei verschiedene Verläufe: Erfolgt die Aktivierung der PARS durch milde DNA-schädigende Substanzen, unterstützt sie die DNA-Reparatur durch Interaktionen mit DNA-Reparaturenzymen und die Zelle überlebt ohne genetische Folgeschäden. Wird die DNA

4.2.1. Das Verhalten von Thrombozyten in der pulmonalen Mikrostrombahn unter Endotoxinämie

stärker und damit irreparabel geschädigt kommt es zur Induktion des apoptotischen Zelltods und damit zur Eliminierung der betroffenen Zellen und Beseitigung durch Makrophagen (31).

Sind Zellen dagegen schwerem oxidativem Stress, wie z.B. durch Peroxynitrit induziert, ausgesetzt, entsteht ein massiver DNA-Schaden, der eine Überaktivierung der PARS zur Folge hat. Diese Überaktivierung führt zu einem schnellen Verbrauch von zellulärem NAD^+ , dem Substrat der PARS. Dadurch sinkt die Glykolyserate, der Transport von Elektronen wird reduziert und die ATP-Synthese kommt zum Erliegen. In der Folge kommt es zu Zelldysfunktion und Zelltod (7;64). Durch den Verbrauch der Energiereserven wird die Kaskade, die zum apoptotischen Zelltod führt, funktionsunfähig, woraus ein nekrotischer Zelluntergang resultiert. Die Freisetzung von Zellinhalten aus nekrotischen Zellen in das umliegende Gewebe verstärkt wiederum inflammatorische Reaktionen.

Unter inflammatorischen Bedingungen wie z.B. der auch in vorliegender Arbeit vorhandenen Endotoxinämie, kommt es zum oxidativen Stress durch die Bildung von hochreaktiven Sauerstoffradikalen und freien Stickstoffmonoxid-Radikalen (146). Daraus entstehendes Peroxynitrit führt zu massiven DNA-Schäden der umliegenden Zellen, was wiederum eine Überaktivierung der PARS zur Folge hat (146). Diese Überaktivierung bedeutet letztendlich den Verbrauch der zellulären Energiereserven und führt damit zum Zelltod.

Unsere Arbeitsgruppe konnte anhand von Vorversuchen mit identischem Versuchsprotokoll mittels immunhistochemischer Analysen von pulmonalem Gewebe die gesteigerte Aktivierung der PARS unter den auch in dieser Arbeit beschriebenen Versuchsbedingungen nachweisen und veröffentlichen (69). Methodik und Daten zu diesen Untersuchungen werden in der vorliegenden Arbeit nicht beschrieben. Auch Größe und Umfang des zu erwartenden nekrotischen Zellschadens wurde in dieser Arbeit weder histologisch noch radiologisch untersucht. Jedoch könnte die Entwicklung eines interstitiellen Lungenödems einen Anhaltspunkt für einen beginnenden Gewebeschaden, als Zeichen einer gestörten Zellintegrität und Endothelpermeabilität, geben. Wie bereits beschrieben waren in vorliegender Arbeit die Alveolarsepten in der mit Endotoxin behandelten Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant verbreitert.

PARS und Transkription

Die PARS ist in der Lage, die Transkription proinflammatorischer Gene zu fördern. Zum einen ist sie direkt an der Modifizierung der Histone durch Poly-ADP-Ribosylierung und damit an Veränderungen der Chromatinstruktur, an DNA-Methylierungen und an der Bildung von Promotor-Bindungskomplexen beteiligt (64;135). Durch die Co-Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B reguliert sie die Synthese von Zytokinen, Chemokinen, Adhäsionsmolekülen und Entzündungsmediatoren (55;108;135). In der Literatur gibt es bisher keine übereinstimmende Meinung über die genaue Funktionsweise der PARS als Co-Aktivator für NF- κ B, die beobachteten Interaktionen scheinen aber abhängig vom Zelltyp, dem verwendeten Versuchsmodell und vom verwendeten Stimulus zu sein (64;135). Weitere Co-Aktivator Funktionen der PARS sind für das Aktivator-Protein 1 und 2 (AP1, AP2), den transkriptionssteigernden Faktor 1 (TEF1) und weitere Transkriptionsfaktoren, die die Synthese von Mediatoren für eine frühe Abwehr – bzw. Entzündungsreaktion induzieren, bekannt (72;135). Durch die pharmakologische oder genetische Hemmung der PARS konnten anhand von zahlreichen Untersuchungen viele Mediatoren und Proteine rund um Entzündungsreaktionen ermittelt werden, deren Expression unter dem Einfluss der PARS steht. *Farivar et al.* konnten an Versuchen zum Ischämie-Reperfusionsschaden der Lunge am Rattenmodell nach pharmakologischer Hemmung der PARS eine reduzierte Aktivierung von NF- κ B und AP-1 nachweisen und erklärten damit auch die signifikante Reduktion untersuchter Zytokine (32). *Ha et al.* beobachteten in Endotoxin stimulierten Gliazellen nach Hemmung der PARS eine reduzierte Expression von Interleukin-6 (IL-6), pro-IL-1, dem interzellulären Adhäsionsmolekül ICAM-1, des Tumornekrosefaktors TNF- α , der induzierbaren Cyclooxygenase 2 (COX 2) und der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) (48). Arbeitsgruppen um *Zingarelli et al.*, *Oshima et al.* und *Sharp et al.* zeigten nach Hemmung der PARS die reduzierte Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, P-Selektin und E-Selektin in zytokinstimulierten Endothelzellen humaner Nabelschnurvenen (101;115;147).

Zusammenfassend führt die Aktivierung der PARS über zwei bekannte Mechanismen zur Schädigung des Organismus: Zum einen kommt es durch den Verbrauch zellulärer Energiereserven zum Zelluntergang, zum anderen fördert die aktivierte PARS die Transkription proinflammatorischer Gene und steigert damit die Synthese von weiteren Entzündungsmediatoren und Adhäsionsmolekülen, wodurch die schon vorhandene

4.2.2. Der Einfluss der PARS auf das Verhalten der Thrombozyten in der pulmonalen Mikrostrombahn unter Endotoxinämie

generalisierte Entzündungsreaktion weiter verstärkt wird. Aus dieser Überlegung heraus untersuchten wir im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit den Einfluss der PARS auf die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion in der pulmonalen Mikrostrombahn während einer systemischen Entzündungsreaktion.

4.2.2. Der Einfluss der PARS auf das Verhalten der Thrombozyten in der pulmonalen Mikrostrombahn unter Endotoxinämie

Das zweite Ziel der vorliegenden Studie war es, den Einfluss der PARS auf die Interaktion von Thrombozyten mit Endothelzellen in der pulmonalen Mikrostrombahn während einer systemischen Entzündungsreaktion zu untersuchen. Dafür wurde die PARS zu Beginn der Versuche mit 3-Aminobenzamid (3-AB) gehemmt. Dieser selektive und kompetente Hemmstoff wurde zuvor in zahlreichen *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen verwendet und bereits im Rahmen der Diskussion zur Methodik in vorliegender Arbeit besprochen (4;5;107;124;130).

Nach der Gabe von Endotoxin unter gleichzeitiger Hemmung der PARS mittels 3-AB waren die nach alleiniger Gabe von Endotoxin beschriebenen Beobachtungen annähernd aufgehoben. Die Thrombozytenfliessgeschwindigkeit entsprach in allen Abschnitten der pulmonalen Mikrozirkulation der der Kontroll – Gruppe. Parallel dazu ließen sich in den Arteriolen und Venolen keine adhärenenten Thrombozyten nachweisen. Die Anzahl adhärenenten Thrombozyten in den Alveolarkapillaren war im Vergleich zu der Versuchsgruppe, die nur Endotoxin erhalten hatten, signifikant reduziert.

Versucht man diese Ergebnisse analog zu den Ergebnissen des ersten Studienziels zu diskutieren, erscheinen makrohämodynamische und mikrohämodynamische Mechanismen als Ursache auch hier eher unwahrscheinlich. Zum einen blieben die gemessenen makrohämodynamischen Parameter wie der mittlere arterielle Blutdruck (MAP), der zentralvenöse Blutdruck (CVP) und der pulmonalarterielle Blutdruck (PAP) auch in der Endotoxin + 3-AB – Versuchsgruppe über den gesamten Versuchszeitraum konstant. Zudem unterschieden sich die Werte nicht signifikant zu der mit Endotoxin behandelten Versuchsgruppe oder zur Kontrollgruppe. Zum anderen zeigten auch die ermittelten mikrohämodynamischen Parameter der mit Endotoxin und 3-AB behandelten Tiere nur geringfügige Abweichungen zu den anderen Versuchsgruppen. Während in den Arteriolen

4.2.2. Der Einfluss der PARS auf das Verhalten der Thrombozyten in der pulmonalen Mikrostrombahn unter Endotoxinämie

und Venolen keine adhärenen Thrombozyten mit der von uns verwendeten Methode nachweisbar waren, konnten in den Kapillaren noch einige adhärenente Thrombozyten identifiziert werden. Bei einem gleichzeitig gemessenen Anstieg der Thrombozytenfliessgeschwindigkeit in allen Abschnitten der pulmonalen Mikrostrombahn könnten die noch geringe Anzahl adhärenenter Thrombozyten in den Alveolarkapillaren mit der Größe des Kapillarnetzes erklärt werden, das mit seiner gesamten Gefäßoberfläche die der Arteriolen und Venolen um das ca. 45-fache übertrifft (62;117).

4.2.2.1. Die Expression der Adhäsionsmoleküle P- und E-Selektin

In der vorliegenden Arbeit haben wir nach Hemmung der PARS die Adhäsionsmoleküle P-Selektin und E-Selektin untersucht. Auch hier wurden Westernblot-Analysen durchgeführt und nach densitometrischer Auswertung mit den Ergebnissen der beiden anderen Versuchsgruppen verglichen. Nach Hemmung der PARS mittels 3-AB war die Expression von P-Selektin und E-Selektin zwar nicht signifikant, dennoch aber im Vergleich zur Endotoxin – Gruppe deutlich reduziert. Im Rahmen der Diskussion zur ersten Fragestellung dieser Studie kamen wir nach Ausschluß möglicher makro- oder mikrohämodynamischer Mechanismen zu der Schlussfolgerung, dass die reduzierte Thrombozytenfliessgeschwindigkeit und die erhöhte Anzahl adhärenenter Thrombozyten unter Endotoxinämie mit einer Adhäsionsmolekül-assoziierten gesteigerten Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion erklärt werden könnte. Betrachtet man die Adhäsionsmoleküle P- und E-Selektin, sind über sie bereits einige Daten bezüglich ihrer Speicherung und Exprimierung auf Zelloberflächen bekannt (38;87;137). Wir konnten in der vorliegenden Arbeit mittels Westerblottechnik zeigen, dass die PARS-Inhibition in der Lunge die Endotoxin-induzierte Expression der Adhäsionsmoleküle P- und E-Selektin reduziert.

Aus der Tatsache, dass unter der Hemmung der PARS bei gleichzeitiger Endotoxinämie die Expression der Adhäsionsmoleküle P- und E-Selektin reduziert war, während parallel dazu die Thrombozytenfliessgeschwindigkeiten wieder angestiegen und eine Thrombozytenadhärenz kaum mehr nachweisbar war, lässt sich folgern, dass die Hemmung der PARS maßgeblich durch eine verminderte Expression der Adhäsionsmoleküle P- und E-Selektin zu einer reduzierten Thrombozytenadhärenz in der pulmonalen Mikrostrombahn während Endotoxinämie führen kann.

4.2.2. Der Einfluss der PARS auf das Verhalten der Thrombozyten in der pulmonalen Mikrostrombahn unter Endotoxinämie

4.2.2.2. Die Expression von P- und E-Selektin in PARS (-/-) Mäusen

Dem PARS-Hemmstoff 3-Aminobenzamid werden antioxidative Eigenschaften zugeschrieben, mit denen in älteren Studien vorteilhafte Effekte von 3-AB erklärt wurden (135). Die antioxidative Wirkung von 3-AB könnte bedeuten, dass durch die alleinige Gabe von 3-AB unter inflammatorischen Bedingungen die Anzahl der Radikale reduziert wird. Weniger Radikale können wiederum zu einer abgeschwächten Entzündungsreaktion, reduzierten Peroxynitritbildung mit geringerem DNA-Schaden und konsekutiv abgeschwächter PARS-Aktivierung führen. Vorteile die durch die Hemmung der PARS mit 3-AB entstanden sein könnten, wären also eigentlich nur auf eine reduzierte Aktivierung der PARS zurückzuführen. Jüngere Studien verglichen ihre Ergebnisse zur pharmakologischen PARS-Hemmung zunehmend mit Ergebnissen von PARS-knockout-Mäusen (-/-) und konnten nur in seltenen Fällen Unterschiede nachweisen (64;135). Im Versuchsmodell des zirkulatorischen Schock konnten z.B. bezüglich Letalität und Organdysfunktionen keine Unterschiede zwischen der Hemmung der PARS mit 3-AB und der genetischen Hemmung festgestellt werden (135).

Um auch in vorliegender Arbeit den Einfluss eines antioxidativen Effekt von 3-AB auf die Ergebnisse auszuschließen, wurde die Expression von P- und E-Selektin in der Lunge zusätzlich an PARS-defizienten Mäusen (-/-) und ihren zurückgekreuzten Wildtypen (+/+) getestet. Die Tierversuche wurden am Institut für Krebsforschung der Universität Wien, nach den österreichischen Richtlinien für Tierschutz und Tierversuche, unter der Leitung von Frau Professor Dr. Józefa Węsierska-Gądek durchgeführt. Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere randomisiert zwei verschiedenen Versuchsgruppen zugeteilt. Die Tiere der Kontroll - Gruppe erhielten einen Bolus von je 1 ml physiologischer Kochsalzlösung (NaCl), die Tiere der Endotoxin - Gruppe je einen Bolus Endotoxin (Lipopolysaccharid LPS) in der Dosierung 1 mg / kgKG intraperitoneal injiziert. Nach 6 h wurden die Tiere per Enthauptung getötet und die Lunge entnommen. Das Lungengewebe wurde sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Zu einem späteren Zeitpunkt wurde das Lungengewebe auf Trockeneis per Spezialversand an das Institut für Chirurgische Forschung nach München geschickt, wobei zu jedem Zeitpunkt die geschlossene Gefrierkette gewährleistet war. Die Aufbereitung vom Lungengewebe für die Westernblot-Analyse erfolgte analog zur Aufbereitung der Kaninchenlungen. Zur Detektion von P-Selektin wurde als primärer Antikörper ein monoklonaler Anti-Mouse Antikörper aus der Ratte (BD

4.2.2. Der Einfluss der PARS auf das Verhalten der Thrombozyten in der pulmonalen Mikrostrombahn unter Endotoxinämie

Biosciences, Heidelberg, Germany) im Verdünnungsverhältnis 1:333 verwendet. Als zweiter Antikörper wurde ein mit alkalischer Phosphatase konjugiertes Anti-Rat-Immunglobulin (Anti-Rat IgG, Alkaline Phosphatase Conjugate, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) im Verhältnis 1:666 aufgetragen. Die Detektion von E-Selektin in der Lunge der Maus erfolgte mit identischen Antikörpern und Verdünnungsverhältnissen zum Kaninchen.

Die Ergebnisse der Westernblot-Analysen von den PARS (-/-) und PARS (+/+) Mäusen waren äquivalent zu den Ergebnissen der Westernblot-Analysen nach pharmakologischer Hemmung der PARS mittels 3-AB. Die PARS-defizienten Tiere zeigten während einer induzierten, generalisierten Entzündungsreaktion eine reduzierte pulmonale Expression der Adhäsionsmoleküle P- und E-Selektin im Vergleich zu den Wildtypen (69). Aufgrund dieser Übereinstimmung ist in vorliegender Arbeit ein Einfluss der möglichen antioxidativen Wirkung von 3-AB auf die von uns ermittelten Ergebnisse eher unwahrscheinlich.

4.2.2.3. Der Einfluss der PARS auf Zellschädigung und Permeabilitätsstörungen unter Endotoxinämie

Die signifikante Verbreiterung der Alveolarsepten, als Zeichen des Lungenödems, in der mit Endotoxin behandelten Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontroll – Gruppe konnte durch die zusätzliche Gabe von 3-AB nicht beobachtet werden. Der vorteilhafte Effekt der PARS-Hemmung auf die Entwicklung eines Lungenödems wurde auch von anderen Autoren nach Bestimmung des Lungengewichtes und Messung von Proteinkonzentrationen aus bronchoalveolären Lavagen beschrieben (112;114). Betrachtet man zudem Veränderungen des Gasaustausches, die ein sehr frühes Kriterium bei der Entwicklung eines akuten Lungenschadens darstellen, so konnten in vorliegender Arbeit nach zusätzlicher Gabe von 3-AB nur tendenzielle Verbesserungen des Sauerstoffpartialdrucks sowie des Kohlendioxidpartialdrucks gemessen werden. Diese Ergebnisse sind jedoch nicht überraschend, da schon die Veränderungen des Gasaustausches im Sinne einer zu erwartenden Verschlechterung in der mit Endotoxin behandelten Versuchsgruppe nur geringfügig im Vergleich zur Kontroll – Gruppe ausgefallen sind.

Eine zytoprotektive Wirkung der PARS-Hemmung mit 3-AB ist auch in vorliegender Studie denkbar, sollte es durch die Hemmung doch zu einem weniger starken Verbrauch zellulärer Energiereserven und damit auch zu einer Reduktion von Apoptoserate und der Entwicklung

4.2.3. Klinischer Ausblick

von Zellnekrosen kommen. Welchen Anteil diese potentiellen Mechanismen an einer Verminderung des durch Endotoxin verursachten Lungenschadens besitzen, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

4.2.3. Klinischer Ausblick

Seit mehreren Jahren wird die pharmakologische Inhibierung der PARS als mögliche therapeutische Strategie zur Behandlung unterschiedlicher Krankheitsbilder erforscht. Bei chronischen entzündlichen Erkrankungen, wie beispielsweise der rheumatoide Arthritis oder chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, konnten in experimentellen Studien bereits gute therapeutische Erfolge durch eine PARS-Inhibierung erzielt werden. Trotz der zentralen Bedeutung der PARS in unterschiedlichen Organsystemen, besitzen neu entwickelte pharmakologische Hemmstoffe, wie beispielsweise INO-1001 oder AG140699, eine niedrige Toxizität nach systemischer Applikation. Diese neuen Hemmstoffe werden derzeit bereits in klinischen Phase I/II Studien auf Wirksamkeit und Verträglichkeit getestet. So wird INO-1001 beispielsweise im Rahmen einer Phase II Studie bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt und Notfall-Angioplastie untersucht (64).

Bislang liegen keine klinischen Ergebnisse bezüglich einer therapeutischen Behandlungsstrategie durch PARS-Inhibierung bei Patienten mit ARDS vor. Bei gesicherter klinischer Verträglichkeit wäre jedoch aufgrund der vielversprechenden experimentellen Datenlage eine Untersuchung am Patienten prinzipiell vertretbar. Allerdings erscheint eine therapeutische Intervention bei ausgeprägtem ARDS in der Spätphase aufgrund der manifesten Organveränderungen nicht vielversprechend. Eine pharmakologische Hemmung der PARS unmittelbar in der Frühphase des ARDS oder bei Patienten mit beginnender gram-negativer Sepsis könnte dagegen eine mögliche Therapieoption zur Reduktion der pulmonalen Organdysfunktion darstellen. Allerdings sind hierbei auch weiterführende experimentelle Studien über mögliche Nebenwirkungen der systemischen PARS-Hemmung notwendig, insbesondere da während der generalisierten Entzündungsreaktion nicht nur von einer PARS-Aktivierung in der Lunge, sondern auch in anderen Organsystemen ausgegangen werden muss.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Während einer generalisierten Entzündungsreaktion, wie der Endotoxinämie, kommt es u.a. zur Aktivierung der zellulären und humoralen Immunantwort. Findet diese Immunantwort in der Lunge statt, kann daraus die Entwicklung eines „Acute respiratory distress syndrom“, kurz ARDS, resultieren. Der Beitrag der neutrophilen Granulozyten zur Entstehung des akuten Lungenschadens ist schon vielfach untersucht worden. Vermutete man in ihnen die Zellen, die in der Lunge die initiale Entzündungsreaktion auslösen, verdichten sich inzwischen die Hinweise, dass diese Rolle auch den Thrombozyten zukommt. Die aktivierten Thrombozyten sezernieren Entzündungsmediatoren, lagern sich vermittelt über die Adhäsionsmoleküle P- und E-Selektin an die Gefäßendothelzellen der pulmonalen Mikrostrombahn und führen zu einer Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und Gefäßendothelzellen. Daraus folgt die Freisetzung von weiteren Entzündungsmediatoren sowie die gesteigerte Produktion von Radikalen. Aus den Radikalen entsteht das weitaus zytotoxischere Peroxynitrit, das durch die Induktion von DNA-Schäden die Aktivierung der nukleären Poly-(ADP-Ribosyl)-Synthetase, kurz PARS, verursacht. Die PARS trägt unter inflammatorischen Bedingungen vor allem über zwei Mechanismen zur Entwicklung von Gewebeschäden bei: zum einen kommt es nach massiver DNA-Schädigung zum PARS-induzierten Verbrauch zellulärer Energiereserven, der letztendlich zum Untergang der Zellen führen kann. Zum anderen bewirkt die PARS, über ihren Einfluss auf die Signaltransduktion, eine gesteigerte Produktion von Adhäsionsmolekülen und inflammatorischer Mediatoren, woraus eine weitere Rekrutierung von Entzündungszellen und somit die Entstehung eines *circulus vitiosus* resultiert.

In einem ersten Schritt sollte überprüft werden, ob die Thrombozyten in der pulmonalen Mikrostrombahn während einer systemischen Entzündungsreaktion sequestriert werden. Hierzu wurden nach Induktion einer Endotoxinämie, *in vivo* Untersuchungen an der pulmonalen Mikrozirkulation von Weissen Neuseeländer Kaninchen mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Daraus resultierten folgende wesentliche Ergebnisse:

5. ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Thrombozytenfliessgeschwindigkeit als Zeichen einer Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion, war unter Endotoxinämie in allen Abschnitten der pulmonalen Mikrostrombahn signifikant reduziert.
2. Die Anzahl adhärenter Thrombozyten war unter Endotoxinämie in den Alveolarkapillaren und Venolen signifikant erhöht.

Zudem führten wir zur quantitativen Beurteilung der Adhäsionsmoleküle P- und E-Selektin Westernblot-Analysen an nach Versuchsende gewonnenen pulmonalen Gewebeproben durch und konnten eine deutliche bis signifikante Steigerung der Expression dieser Adhäsionsmoleküle nach erfolgter Endotoxinämie nachweisen.

Da die Makro- und Mikrohämodynamik in allen Versuchsgruppen über den Beobachtungszeitraum stabil blieb, kamen wir zu der Schlussfolgerung, dass die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion unter Endotoxinämie durch die gesteigerte Expression der Adhäsionsmoleküle P- und E-Selektin hervorgerufen wurde. Resultiert aus dieser Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion die Freisetzung von Radikalen, wie Peroxynitrit, und konsekutiv auch die Aktivierung der PARS, könnte der Einfluss der PARS auf die Genexpression zu einer weiteren Zunahme von P- und E-Selektin geführt haben.

Um den Einfluss der PARS auf die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion in der pulmonalen Mikrostrombahn unter Endotoxinämie näher zu untersuchen, wurde die PARS in einer zweiten Versuchsreihe mit 3-Aminobenzamid gehemmt. Die anschließend mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie durchgeführten *in vivo* Analysen zeigten folgende Ergebnisse:

1. Die signifikant reduzierte Thrombozytenfliessgeschwindigkeit unter Endotoxinämie war in allen Abschnitten der pulmonalen Mikrostrombahn aufgehoben und erreichte annähernd die Werte der Kontroll - Gruppe.
2. Die deutlich gesteigerte Anzahl adhärenter Thrombozyten in den Alveolarkapillaren und Venolen unter Endotoxinämie war ebenfalls aufgehoben und erreichte annähernd die Werte der Kontroll - Gruppe.

Analog zu diesen Ergebnissen zeigte die Westernblot-Analyse nach pharmakologischer Hemmung der PARS eine Reduktion der Adhäsionsmoleküle P- und E-Selektin. Zusätzlich durchgeführte Westernblot-Analysen an PARS defizienten Mäusen und ihren Wildtypen während induzierten Endotoxinämie konnten dieses Ergebnis bestätigen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals *in vivo* die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion in der pulmonalen Mikrostrombahn während einer systemischen Entzündungsreaktion untersucht. Wir konnten einen Zusammenhang zwischen dem veränderten Fliessverhalten der Thrombozyten und der Expression der Adhäsionsmoleküle P- und E-Selektin während Endotoxinämie nachweisen. Zudem könnte die PARS unter inflammatorischen Bedingungen einen regulatorischen Einfluss auf die Expression der Adhäsionsmoleküle P- und E-Selektin in der pulmonalen Mikrostrombahn haben und damit die schon vorhandene Entzündungsreaktion, und folglich auch die Gewebeschädigung verstärken.

5. ZUSAMMENFASSUNG

6. ANHANG

6.1. Abkürzungsverzeichnis

[PLT] _D	Konzentration im Gefäß frei abfließender Thrombozyten
[PLT] _T	totale Thrombozytengefäßkonzentration
3-AB	3-Aminobenzamid
A _{Alv}	Fläche einer Alveole
ADP	Adenosindiphosphat
ARDS	Acute respiratory distress syndrom
ATP	Adenosintriphosphat
BE	Basenüberschuss
cv	Variationskoeffizient
CVP	mittlerer zentralvenöser Blutdruck
d	Gefäßdurchmesser
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
Hb	Hämoglobingehalt
HCO ₃ ⁻	Bicarbonat
H _D	Abflußhämatokrit
HF	Herzfrequenz

7. LITERATURVERZEICHNIS

Hk	Hämatokrit
HO·	Hydroxylradikal
H _T	dynamischer Mikrohämatokrit
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
l	Gefäßlänge
LPS	Lipopolysaccharid
MAP	mittlerer arterieller Blutdruck
n	Anzahl
NAD ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NO	Stickstoffmonoxid
NO·	Stickstoffdioxidradikal
N _{PLT}	Thrombozytenfluß
N _{RBC}	Erythrozytenfluß
O ₂ ^{-·}	Superoxidanion
ONOO ⁻	Peroxynitrit
PAP	pulmonalarterieller Blutdruck
PARS	Poly-(ADP-Ribosyl)-Synthetase
pCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck
P _d	diastolischer Blutdruck
PEEP	Positive Endexpiratory Pressure
PF4	Platelet Faktor 4

7. LITERATURVERZEICHNIS

PLT	Thrombozyten
PLT _{ad}	Anzahl adhärenter Thrombozyten
P _m	mittlerer Blutdruck
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
P _s	systolischer Blutdruck
Q _b	Blutvolumenfluß
R6G	Rhodamin 6G
RBC	Erythrozyten
Ret _{PLT}	retinierte Thrombozyten
s ₁₀	Abstand 10 aufeinanderfolgender Druckmaxima
SIRS	systemic inflammatory response syndrom
STABW	Standardabweichung
v _b	Blutflussgeschwindigkeit
v _{PLT}	Thrombozytenflussgeschwindigkeit
v _{RBC}	Erythrozytenflussgeschwindigkeit
v _s	Schreibergeschwindigkeit
WBC	Leukozyten
γ	Wandscherrate
σ	Varianz

7. LITERATURVERZEICHNIS

6.2. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Querschnitt durch das implantierte Thoraxfenster. Modifiziert nach <i>Kuhnle et al.</i> (79).....	10
Abbildung 2: Fluoresceinisothiocyanat (FITC).....	11
Abbildung 3: Rhodamin 6G	12
Abbildung 4: Exemplarisches fluoreszenzmikroskopisches Standbild eines subpleuralen Gefäßareals, hier mit dem Thrombozytenfilter N2 aufgenommen. Schematisch eingezeichnet ist der Verlauf einer Arteriole mit dem Durchmesser d und der Länge l des Gefäßes sowie das kapillare Netzwerk einer Alveole mit der Fläche A_{Alv} und den Alveolarseptenbreiten S . In der Arteriole und im Kapillargebiet sind adhärenente Thrombozyten mit T_{ad} gekennzeichnet.	16
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes.....	29
Abbildung 6: Erythrozytenfliessgeschwindigkeit v_{RBC} , Thrombozytenfliessgeschwindigkeit v_{PLT} und Anzahl adhärenenten Thrombozyten PLT_{ad} in Arteriolen und Venolen, Mittelwerte \pm STABW zum Versuchszeitpunkt 6 h, * $p < 0,05$ vs. Kontroll - Gruppe, # $p < 0,05$ vs. Endotoxin+3-AB - Gruppe, Mann-Whintney Rank Sum Test.....	36
Abbildung 7: Erythrozytenfliessgeschwindigkeit v_{RBC} , Thrombozytenfliessgeschwindigkeit v_{PLT} , Retinierte Thrombozyten Ret_{PLT} und Alveolarseptenbreite der Alveolarkapillaren, Mittelwerte \pm STABW zum Versuchszeitpunkt 6 h, * $p < 0,05$ vs. Kontroll - Gruppe, # $p < 0,05$ vs. Endotoxin+3-AB - Gruppe, Mann-Whintney Rank Sum Test.....	38
Abbildung 8 A + B: repräsentativer Ausschnitt der Westernblotanalyse von P-Selektin (A) und E-Selektin (B) mit einer Molekulargröße von 140 kD (A) und 97 kD (B), densitometrische Auswertung der Blots und grafische Darstellung der ermittelten Werte, Mittelwerte \pm STABW zum Versuchszeitpunkt 6,5 h, $n = 5$ pro Versuchsgruppe, * $p < 0,05$ vs. Kontroll – Gruppe, Mann-Whintney Rank Sum Test.....	40

7. LITERATURVERZEICHNIS

Tabelle 1: Maximale Anregungs- und Emmissionswellenlängen der mit den Fluoreszenzfarbstoffen FITC- und Rhodamin 6G-markierten Erythrozyten und Thrombozyten.....	14
Tabelle 2: Wellenlängenbereiche der in den verwendeten Filterblöcken eingebauten Anregungsfilter, Teilerspiegel und Sperrfilter (alle Teile Fa. Leitz, München); BP: Bandpaßfilter, LP: Langpaßfilter, RKP: Reflexionskurzpassfilter	15
Tabelle 3: Versuchsgruppen.....	28
Tabelle 4: Makrohämodynamische Parameter: mittlerer arterieller Druck MAP [mmHg], zentralvenöser Druck CVP [mmHg] und pulmonalarterieller Druck PAP [mmHg], Mittelwerte \pm STABW zum Versuchszeitpunkt 6 h, * $p < 0,05$ vs. Kontroll - Gruppe, # $p < 0,05$ vs. Endotoxin+3-AB - Gruppe, Mann-Whintney Rank Sum Test.....	31
Tabelle 5: peripheres Blutbild: Erythrozyten RBC, Thrombozyten PLT, Leukozyten WBC, Hämoglobinkonzentration Hb und systemischer Hämatokrit Hk, Mittelwerte \pm STABW zum Versuchszeitpunkt 4 h und 6 h.	32
Tabelle 6: arterielle Blutgasanalysen: Sauerstoffpartialdruck pO ₂ , Kohlendioxidpartialdruck pCO ₂ , pH-Wert, Bikarbonatkonzentration HCO ₃ ⁻ , Basenüberschuss BE, Mittelwerte \pm STABW zum Versuchszeitpunkt 4 h und 6 h, $p < 0,05$	33
Tabelle 7: Durchmesser d, Erythrozytenfluß N _{RBC} , Erythrozytenfliessgeschwindigkeit v _{RBC} , Blutfliessgeschwindigkeit v _b , Blutvolumenfluß Q _b und Wandscherrate γ in Arteriolen, Mittelwerte \pm STABW zum Zeitpunkt 6 h der Versuchsreihe, $p < 0,05$	34
Tabelle 8: Durchmesser d, Erythrozytenfluß N _{RBC} , Erythrozytenfliessgeschwindigkeit v _{RBC} , Blutfliessgeschwindigkeit v _b , Blutvolumenfluß Q _b und Wandscherrate γ in Venolen, Mittelwerte \pm STABW zum Zeitpunkt 6 h der Versuchsreihe, $p < 0,05$	34
Tabelle 9: Thrombozytenfliessgeschwindigkeiten v _{PLT} , Thrombozytenfluß N _{PLT} , adhärenenten Thrombozyten PLT _{ad} und totale Thrombozytengenäßkonzentration [PLT] _T in Arteriolen, Mittelwerte \pm STABW zum Versuchszeitpunkt 6 h, * $p < 0,05$ vs. Kontroll - Gruppe, # $p < 0,05$ vs. Endotoxin+3-AB - Gruppe, Mann-Whintney Rank Sum Test.....	35

7. LITERATURVERZEICHNIS

Tabelle 10: Thrombozytenfliessgeschwindigkeiten v_{PLT} , Thrombozytenfluß N_{PLT} , adhärenenten Thrombozyten PLT_{ad} und totale Thrombozytengefäßkonzentration $[PLT]_T$ in Venolen, Mittelwerte \pm STABW zum Versuchszeitpunkt 6 h, * $p < 0,05$ vs. Kontroll - Gruppe, # $p < 0,05$ vs. Endotoxin+3-AB – Gruppe, Mann-Whintney Rank Sum Test 35

Tabelle 11: Erythrozytenfliessgeschwindigkeit v_{RBC} , Thrombozytenfliessgeschwindigkeit v_{PLT} , Retinierte Thrombozyten Ret_{PLT} und Alveolarseptenbreite der Alveolarkapillaren, Mittelwerte \pm STABW zum Versuchszeitpunkt 6 h, * $p < 0,05$ vs. Kontroll - Gruppe, # $p < 0,05$ vs. Endotoxin+3-AB - Gruppe, Mann-Whintney Rank Sum Test..... 37

7. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Anderson BO, Brown JM, Harken AH. Mechanisms of neutrophil-mediated tissue injury. *J Surg Res* 1991 August;51(2):170-9.
- (2) Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 1967 August 12;2(7511):319-23.
- (3) Baatz H, Steinbauer M, Harris AG, Krombach F. Kinetics of white blood cell staining by intravascular administration of rhodamine 6G. *Int J Microcirc Clin Exp* 1995 March;15(2):85-91.
- (4) Banasik M, Komura H, Shimoyama M, Ueda K. Specific inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase and mono(ADP-ribosyl)transferase. *J Biol Chem* 1992 January 25;267(3):1569-75.
- (5) Banasik M, Ueda K. Inhibitors and activators of ADP-ribosylation reactions. *Mol Cell Biochem* 1994 September;138(1-2):185-97.
- (6) Barry BE, Crapo JD. Patterns of accumulation of platelets and neutrophils in rat lungs during exposure to 100% and 85% oxygen. *Am Rev Respir Dis* 1985 September;132(3):548-55.
- (7) Barth E, Radermacher P, Szabo C. The world according to poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)--update 2006. *Intensive Care Med* 2006 October;32(10):1470-4.
- (8) Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996 November;271(5 Pt 1):C1424-C1437.
- (9) Bellomo R. The cytokine network in the critically ill. *Anaesth Intensive Care* 1992 August;20(3):288-302.
- (10) Berger R. Quantitative Videomikroskopie der Lungenmikrozirkulation unter positiver Druckbeatmung und alveolärer Hypoxie Ludwig-Maximilians-Universität München; 1989.
- (11) Berger R, Goetz AE, Conzen P, Brendel W. FITC-markierte Erythrozyten: Verformbarkeit in-vitro und Rezirkulation in-vivo, 9.Jahrestagung der Gesellschaft für Mikrozirkulation e.V. 9.Jahrestagung der Gesellschaft für Mikrozirkulation e.V.; 1985.
- (12) Bernard GR, Artigas A, Brigham KL et al. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med* 1994 March;149(3 Pt 1):818-24.
- (13) Bhatia M, Moochhala S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J Pathol* 2004 February;202(2):145-56.
- (14) Body SC. Platelet activation and interactions with the microvasculature. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996;27 Suppl 1:S13-S25.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- (15) Bone RC, Francis PB, Pierce AK. Intravascular coagulation associated with the adult respiratory distress syndrome. *Am J Med* 1976 November;61(5):585-9.
- (16) Brigham KL, Meyrick B. Endotoxin and lung injury. *Am Rev Respir Dis* 1986 May;133(5):913-27.
- (17) Brown KK, Henson PM, Maclouf J et al. Neutrophil-platelet adhesion: relative roles of platelet P-selectin and neutrophil beta2 (DC18) integrins. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998 January;18(1):100-10.
- (18) Camussi G, Bussolino F, Salvidio G, Baglioni C. Tumor necrosis factor/cachectin stimulates peritoneal macrophages, polymorphonuclear neutrophils, and vascular endothelial cells to synthesize and release platelet-activating factor. *J Exp Med* 1987 November 1;166(5):1390-404.
- (19) Capen RL, Graham RL, Godbey PS et al. Comparison of subpleural and interior pulmonary capillary diameters in dog. *FASEB J* 1993;1:A541.
- (20) Chlopicki S, Walski M, Bartus JB. Ultrastructure of immediate microvascular lung injury induced by bacterial endotoxin in the isolated, no-deficient lung perfused with full blood. *J Physiol Pharmacol* 2005 September;56 Suppl 4:47-64.
- (21) Cifuentes J, Ruiz-Oronoz J, Myles C et al. Interaction of surfactant mixtures with reactive oxygen and nitrogen species. *J Appl Physiol* 1995 May;78(5):1800-5.
- (22) Crapo JD, Tierney DF. Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity. *Am J Physiol* 1974 June;226(6):1401-7.
- (23) Cuzzocrea S, Zingarelli B, Caputi AP. Role of constitutive nitric oxide synthase and peroxynitrite production in a rat model of splanchnic artery occlusion shock. *Life Sci* 1998;63(9):789-99.
- (24) DeFouw DO, Shumko JZ. Pulmonary microcirculation: differences in endothelia of subpleural and alveolar capillaries. *Microvasc Res* 1986 November;32(3):348-58.
- (25) Deuel TF, Senior RM, Chang D et al. Platelet factor 4 is chemotactic for neutrophils and monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981 July;78(7):4584-7.
- (26) Doerschuk CM, Allard MF, Hogg JC. Neutrophil kinetics in rabbits during infusion of zymosan-activated plasma. *J Appl Physiol* 1989 July;67(1):88-95.
- (27) Doerschuk CM, Downey GP, Doherty DE et al. Leukocyte and platelet margination within microvasculature of rabbit lungs. *J Appl Physiol* 1990 May;68(5):1956-61.
- (28) Eckstein EC, Bilsker DL, Waters CM et al. Transport of platelets in flowing blood. *Ann N Y Acad Sci* 1987;516:442-52.
- (29) Eichhorn ME, Ney L, Massberg S, Goetz AE. Platelet kinetics in the pulmonary microcirculation in vivo assessed by intravital microscopy. *J Vasc Res* 2002 July;39(4):330-9.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- (30) Epistle II. Bologna. Malpigi M. De pulmonibus. Proc Roy Soc Med 1929;23: 7-62: Translation by J. Young; 1661.
- (31) Erdelyi K, Bakondi E, Gergely P et al. Pathophysiologic role of oxidative stress-induced poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation: focus on cell death and transcriptional regulation. Cell Mol Life Sci 2005 April;62(7-8):751-9.
- (32) Farivar AS, Woolley SM, Fraga CH et al. Intratracheal poly (ADP) ribose synthetase inhibition ameliorates lung ischemia reperfusion injury. Ann Thorac Surg 2004 June;77(6):1938-43.
- (33) Feuerhake F, Fuchsl G, Bals R, Welsch U. Expression of inducible cell adhesion molecules in the normal human lung: immunohistochemical study of their distribution in pulmonary blood vessels. Histochem Cell Biol 1998 October;110(4):387-94.
- (34) Forde RC, Fitzgerald DJ. Reactive oxygen species and platelet activation in reperfusion injury. Circulation 1997 February 18;95(4):787-9.
- (35) Fowler AA, Hamman RF, Zerbe GO et al. Adult respiratory distress syndrome. Prognosis after onset. Am Rev Respir Dis 1985 September;132(3):472-8.
- (36) Freeman B. Free radical chemistry of nitric oxide. Looking at the dark side. Chest 1994 March;105(3 Suppl):79S-84S.
- (37) Frenette PS, Moyna C, Hartwell DW et al. Platelet-endothelial interactions in inflamed mesenteric venules. Blood 1998 February 15;91(4):1318-24.
- (38) Gawaz M. Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. Cardiovasc Res 2004 February 15;61(3):498-511.
- (39) Ghosh S, Latimer RD, Gray BM et al. Endotoxin-induced organ injury. Crit Care Med 1993 February;21(2 Suppl):S19-S24.
- (40) Goetz AE. Quantitative Mikrozirkulationsanalyse im amelanotischen Hamstermodell A-Mel-3 Ludwig-Maximilians-Universität München; 1987.
- (41) Goetz AE. Quantitative Analyse der pulmonalen Mikrozirkulation, Med.Habilitationsschrift. Ludwig-Maximilians-Universität München: 1995.
- (42) Goetz AE, Berger R, Conzen P, Brendel W. Intravitalmikroskopie der Lungenmikrozirkulation. Intensivth Notfallmed Anästh 1988;67:14-21.
- (43) Gonzalez PK, Zhuang J, Doctrow SR et al. Role of oxidant stress in the adult respiratory distress syndrome: evaluation of a novel antioxidant strategy in a porcine model of endotoxin-induced acute lung injury. Shock 1996;6 Suppl 1:S23-S26.
- (44) Groh J, Kuhnle GE, Sckell A et al. Isoflurane inhibits hypoxic pulmonary vasoconstriction. An in vivo fluorescence microscopic study in rabbits. Anesthesiology 1994 December;81(6):1436-44.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- (45) Groom AC. Microvascular transit of normal, immature and altered red blood cells in spleen versus skeletal muscle. 229-259. 1980. New York: A.R.Liss, Inc. Erythrocyte mechanics and blood flow. Coklet, G. R., Meiselman H.J., and Brooks, D. E.
Ref Type: Serial (Book, Monograph)
- (46) Gropper MA, Wiener-Kronish J. The epithelium in acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. *Curr Opin Crit Care* 2008 February;14(1):11-5.
- (47) Guntheroth WG, Luchtel DL, Kawabori I. Pulmonary microcirculation: tubules rather than sheet and post. *J Appl Physiol* 1982 August;53(2):510-5.
- (48) Ha HC, Hester LD, Snyder SH. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 dependence of stress-induced transcription factors and associated gene expression in glia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 March 5;99(5):3270-5.
- (49) Haddad IY, Crow JP, Hu P et al. Concurrent generation of nitric oxide and superoxide damages surfactant protein A. *Am J Physiol* 1994 September;267(3 Pt 1):L242-L249.
- (50) Haddad IY, Ischiropoulos H, Holm BA et al. Mechanisms of peroxynitrite-induced injury to pulmonary surfactants. *Am J Physiol* 1993 December;265(6 Pt 1):L555-L564.
- (51) Haddad IY, Pataki G, Hu P et al. Quantitation of nitrotyrosine levels in lung sections of patients and animals with acute lung injury. *J Clin Invest* 1994 December;94(6):2407-13.
- (52) Halliwell B. Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J Exp Pathol* 1989 December;70(6):737-57.
- (53) Harris AG, Sinitsina I, Messmer K. Intravital fluorescence microscopy and phototoxicity: effects on leukocytes. *Eur J Med Res* 2002 March 28;7(3):117-24.
- (54) Hasleton PS, Roberts TE. Adult respiratory distress syndrome - an update. *Histopathology* 1999 April;34(4):285-94.
- (55) Hassa PO, Hottiger MO. The functional role of poly(ADP-ribose)polymerase 1 as novel coactivator of NF-kappaB in inflammatory disorders. *Cell Mol Life Sci* 2002 September;59(9):1534-53.
- (56) Hechtman HB, Lonergan EA, Shepro D. Platelet and leukocyte lung interactions in patients with respiratory failure. *Surgery* 1978 February;83(2):155-63.
- (57) Hechtman HB, Lonergan EA, Staunton HP et al. Pulmonary entrapment of platelets during acute respiratory failure. *Surgery* 1978 March;83(3):277-83.
- (58) Heckel K. In vivo Analyse des Einflusses der Poly-(ADP-Ribosyl)-Synthetase (PARS) auf die Pathogenese des Endotoxin-induzierten akuten Lungenschadens Ludwig-Maximilians-Universität München; 2002.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- (59) Heffner JE, Sahn SA, Repine JE. The role of platelets in the adult respiratory distress syndrome. Culprits or bystanders? *Am Rev Respir Dis* 1987 February;135(2):482-92.
- (60) Herrmann KS, Seuter F. Platelet aggregation in arterioles of the hamster cheek pouch and in heart transplants: its tissue-dependent influencibility by acetylsalicylic acid and nafazatom. *Haemostasis* 1984;14(3):281-7.
- (61) Hill JD, Ratliff JL, Parrott JC et al. Pulmonary pathology in acute respiratory insufficiency: lung biopsy as a diagnostic tool. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1976 January;71(1):64-71.
- (62) Hogg JC. Neutrophil kinetics and lung injury. *Physiol Rev* 1987 October;67(4):1249-95.
- (63) Iuliano L, Colavita AR, Leo R et al. Oxygen free radicals and platelet activation. *Free Radic Biol Med* 1997;22(6):999-1006.
- (64) Jagtap P, Szabo C. Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 2005 May;4(5):421-40.
- (65) Karadogan I, Undar L. Automated plateletpheresis does not cause an increase in platelet activation in volunteer donors. *Ther Apher* 1997 May;1(2):174-7.
- (66) Khandoga A, Biberthaler P, Messmer K, Krombach F. Platelet-endothelial cell interactions during hepatic ischemia-reperfusion in vivo: a systematic analysis. *Microvasc Res* 2003 March;65(2):71-7.
- (67) Kiefmann R. In vivo Analyse der Hämodynamik und Leukozytenkinetik in der pulmonalen Mikrozirkulation nach Komplementaktivierung mit Cobra Venom Faktor Ludwig-Maximilians-Universität München; 1998.
- (68) Kiefmann R, Heckel K, Schenkat S et al. Role of p-selectin in platelet sequestration in pulmonary capillaries during endotoxemia. *J Vasc Res* 2006;43(5):473-81.
- (69) Kiefmann R, Heckel K, Schenkat S et al. Platelet-endothelial cell interaction in pulmonary micro-circulation: the role of PARS. *Thromb Haemost* 2004 April;91(4):761-70.
- (70) Klinger MH, Jelkmann W. Role of blood platelets in infection and inflammation. *J Interferon Cytokine Res* 2002 September;22(9):913-22.
- (71) Kooy NW, Royall JA, Ye YZ et al. Evidence for in vivo peroxynitrite production in human acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 1995 April;151(4):1250-4.
- (72) Kraus WL, Lis JT. PARP goes transcription. *Cell* 2003 June 13;113(6):677-83.
- (73) Kuebler WM. In-vivo Analyse der Leukozyten-Kinetik in der pulmonalen Mikrozirkulation Ludwig-Maximilians-Universität München; 1997.
- (74) Kuebler WM, Goetz AE. The marginated pool. *Eur Surg Res* 2002 January;34(1-2):92-100.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- (75) Kuebler WM, Kuhnle GE, Groh J, Goetz AE. Leukocyte kinetics in pulmonary microcirculation: intravital fluorescence microscopic study. *J Appl Physiol* 1994 January;76(1):65-71.
- (76) Kuhnle GE. Das Mikrogefäßsystem der Lunge: Netzwerkarchitektur und Mikrohämodynamik arteriolärer Netzwerke der Kaninchenlunge unter verschiedenen alveolären Drücken. *Med. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München*; 1993.
- (77) Kuhnle GE, Groh J, Leipfinger FH et al. Quantitative analysis of network architecture, and microhemodynamics in arteriolar vessel trees of the ventilated rabbit lung. *Int J Microcirc Clin Exp* 1993 June;12(3):313-24.
- (78) Kuhnle GE, Kuebler WM, Groh J, Goetz AE. Effect of blood flow on the leukocyte-endothelium interaction in pulmonary microvessels. *Am J Respir Crit Care Med* 1995 October;152(4 Pt 1):1221-8.
- (79) Kuhnle GE, Leipfinger FH, Goetz AE. Measurement of microhemodynamics in the ventilated rabbit lung by intravital fluorescence microscopy. *J Appl Physiol* 1993 March;74(3):1462-71.
- (80) Kuhnle GE, Reichenspurner H, Lange T et al. Microhemodynamics and leukocyte sequestration after pulmonary ischemia and reperfusion in rabbits. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998 April;115(4):937-44.
- (81) Lehr HA, Leunig M, Menger MD et al. Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. *Am J Pathol* 1993 October;143(4):1055-62.
- (82) Leo R, Pratico D, Iuliano L et al. Platelet activation by superoxide anion and hydroxyl radicals intrinsically generated by platelets that had undergone anoxia and then reoxygenated. *Circulation* 1997 February 18;95(4):885-91.
- (83) Löffler G, Patrides PE. *Biochemie und Pathobiochemie*. 220-222. 1998. Springer-Verlag.
Ref Type: Serial (Book, Monograph)
- (84) Martin MA, Silverman HJ. Gram-negative sepsis and the adult respiratory distress syndrome. *Clin Infect Dis* 1992 June;14(6):1213-28.
- (85) Massaguer A, Engel P, Perez-del-Pulgar S et al. Production and characterization of monoclonal antibodies against conserved epitopes of P-selectin (CD62P). *Tissue Antigens* 2000 August;56(2):117-28.
- (86) Massberg S, Eisenmenger S, Enders G et al. Quantitative analysis of small intestinal microcirculation in the mouse. *Res Exp Med (Berl)* 1998 July;198(1):23-35.
- (87) Massberg S, Enders G, Leiderer R et al. Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. *Blood* 1998 July 15;92(2):507-15.
- (88) McCandless BK, Kaufman RP, Jr., Cooper JA et al. Mediation of lung neutrophil uptake after endotoxin by CD18-integrin-dependent and -independent mechanisms. *Am J Physiol* 1994 April;266(4 Pt 2):H1451-H1456.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- (89) McDonald MC, Mota-Filipe H, Wright JA et al. Effects of 5-aminoisoquinolinone, a water-soluble, potent inhibitor of the activity of poly (ADP-ribose) polymerase on the organ injury and dysfunction caused by haemorrhagic shock. *Br J Pharmacol* 2000 June;130(4):843-50.
- (90) McLaughlin RF, Tyler WS, Canada RO. A study of subgross pulmonary anatomy in various mammals. *J Amer Med Assoc* 1961;175:149-58.
- (91) Metz C, Sibbald WJ. Anti-inflammatory therapy for acute lung injury. A review of animal and clinical studies. *Chest* 1991 October;100(4):1110-9.
- (92) Meyer JD, Yurt RW, Duhaney R et al. Tumor necrosis factor-enhanced leukotriene B4 generation and chemotaxis in human neutrophils. *Arch Surg* 1988 December;123(12):1454-8.
- (93) Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1994 September;17(3):235-48.
- (94) Morgan BC, Church SC, Guntherroth WG. Hypoxic constriction of pulmonary artery and vein in intact dogs. *J Appl Physiol* 1968;25:356-61.
- (95) Murakami K, Enkhbaatar P, Shimoda K et al. Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase attenuates acute lung injury in an ovine model of sepsis. *Shock* 2004 February;21(2):126-33.
- (96) Nishina K, Mikawa K, Takao Y, Obara H. Inhaled nitric oxide does not prevent endotoxin-induced lung injury in rabbits. *Acta Anaesthesiol Scand* 1997 March;41(3):399-407.
- (97) Nolte D, Bayer M, Lehr HA et al. Attenuation of postischemic microvascular disturbances in striated muscle by hyperosmolar saline dextran. *Am J Physiol* 1992 November;263(5 Pt 2):H1411-H1416.
- (98) Ohgami M, Doerschuk CM, Gie RP et al. Late effects of endotoxin on the accumulation and function of monocytes in rabbit lungs. *Am Rev Respir Dis* 1992 July;146(1):190-5.
- (99) Okada Y, Marchevsky AM, Zuo XJ et al. Accumulation of platelets in rat syngeneic lung transplants: a potential factor responsible for preservation-reperfusion injury. *Transplantation* 1997 September 27;64(6):801-6.
- (100) Olson NC, Dobrowsky RT, Fleisher LN. Dexamethasone blocks increased leukotriene B4 production during endotoxin-induced lung injury. *J Appl Physiol* 1988 May;64(5):2100-7.
- (101) Oshima T, Pavlick KP, Laroux FS et al. Regulation and distribution of MAdCAM-1 in endothelial cells in vitro. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001 October;281(4):C1096-C1105.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- (102) Overholser KA, Bhattacharya J, Staub NC. Microvascular pressures in the isolated, perfused dog lung: comparison between theory and measurement. *Microvasc Res* 1982 January;23(1):67-76.
- (103) Perry MA, Granger DN. Role of CD11/CD18 in shear rate-dependent leukocyte-endothelial cell interactions in cat mesenteric venules. *J Clin Invest* 1991 May;87(5):1798-804.
- (104) Piccardoni P, Evangelista V, Piccoli A et al. Thrombin-activated human platelets release two NAP-2 variants that stimulate polymorphonuclear leukocytes. *Thromb Haemost* 1996 November;76(5):780-5.
- (105) Pietra GG, Ruttner JR, Wust W, Glinz W. The lung after trauma and shock--fine structure of the alveolar-capillary barrier in 23 autopsies. *J Trauma* 1981 June;21(6):454-62.
- (106) Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P, Gross JF. Blood flow in microvascular networks. Experiments and simulation. *Circ Res* 1990 October;67(4):826-34.
- (107) Rankin PW, Jacobson EL, Benjamin RC et al. Quantitative studies of inhibitors of ADP-ribosylation in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 1989 March 15;264(8):4312-7.
- (108) Reale A, Matteis GD, Galleazzi G et al. Modulation of DNMT1 activity by ADP-ribose polymers. *Oncogene* 2005 January 6;24(1):13-9.
- (109) Redl H, Schlag G, Bahrami S et al. Plasma neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8 and neutrophil elastase in a primate bacteremia model. *J Infect Dis* 1991 August;164(2):383-8.
- (110) Reutershan J, Ley K. Bench-to-bedside review: acute respiratory distress syndrome - how neutrophils migrate into the lung. *Crit Care* 2004 December;8(6):453-61.
- (111) Robbins RA, Russ WD, Rasmussen JK, Clayton MM. Activation of the complement system in the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1987 March;135(3):651-8.
- (112) Ruf A, Patscheke H. Platelet-induced neutrophil activation: platelet-expressed fibrinogen induces the oxidative burst in neutrophils by an interaction with CD11C/CD18. *Br J Haematol* 1995 August;90(4):791-6.
- (113) Sarelius IH, Duling BR. Direct measurement of microvessel hematocrit, red cell flux, velocity, and transit time. *Am J Physiol* 1982 December;243(6):H1018-H1026.
- (114) Shall S, de MG. Poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model? *Mutat Res* 2000 June 30;460(1):1-15.
- (115) Sharp C, Warren A, Oshima T et al. Poly ADP ribose-polymerase inhibitors prevent the upregulation of ICAM-1 and E-selectin in response to Th1 cytokine stimulation. *Inflammation* 2001 June;25(3):157-63.
- (116) Simionescu M. Lung Endothelium: Structure - Function correlates. *The Lung: Scientific foundations.* 301-312. 1991. New York: Raven Press. Crystal, R. G. and

7. LITERATURVERZEICHNIS

WEST, J. B.

Ref Type: Serial (Book,Monograph)

- (117) Singhal S, Henderson R, Horsfield K et al. Morphometry of the human pulmonary arterial tree. *Circ Res* 1973 August;33(2):190-7.
- (118) Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985 October;150(1):76-85.
- (119) Squadrito GL, Pryor WA. Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide. *Free Radic Biol Med* 1998 September;25(4-5):392-403.
- (120) Steinbauer M, Harris AG, Abels C, Messmer K. Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model. *Langenbecks Arch Surg* 2000 July;385(4):290-8.
- (121) Stephens KE, Ishizaka A, Wu ZH et al. Granulocyte depletion prevents tumor necrosis factor-mediated acute lung injury in guinea pigs. *Am Rev Respir Dis* 1988 November;138(5):1300-7.
- (122) Szabo C. The pathophysiological role of peroxynitrite in shock, inflammation, and ischemia-reperfusion injury. *Shock* 1996 August;6(2):79-88.
- (123) Szabo C, Cuzzocrea S, Zingarelli B et al. Endothelial dysfunction in a rat model of endotoxic shock. Importance of the activation of poly (ADP-ribose) synthetase by peroxynitrite. *J Clin Invest* 1997 August 1;100(3):723-35.
- (124) Szabo C, Lim LH, Cuzzocrea S et al. Inhibition of poly (ADP-ribose) synthetase attenuates neutrophil recruitment and exerts antiinflammatory effects. *J Exp Med* 1997 October 6;186(7):1041-9.
- (125) Szabo C, Salzman AL, Ischiropoulos H. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123 occurs in early stages of endotoxic and hemorrhagic shock and ischemia-reperfusion injury. *FEBS Lett* 1995 September 25;372(2-3):229-32.
- (126) Tangelder GJ, Slaaf DW, Muijtjens AM et al. Velocity profiles of blood platelets and red blood cells flowing in arterioles of the rabbit mesentery. *Circ Res* 1986 November;59(5):505-14.
- (127) Tangelder GJ, Slaaf DW, Reneman RS. Fluorescent labeling of blood platelets in vivo. *Thromb Res* 1982 December 15;28(6):803-20.
- (128) Tangelder GJ, Slaaf DW, Reneman RS. In vivo behavior of fluorescently labeled blood cells. *Microcirculation* 1987;6:314-7.
- (129) Terry RJ. A thoracic window for observation of the lung in a living animal. *Science* 1939;90:43-4.
- (130) Thiemermann C, Bowes J, Myint FP, Vane JR. Inhibition of the activity of poly(ADP ribose) synthetase reduces ischemia-reperfusion injury in the heart and skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 January 21;94(2):679-83.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- (131) Till GO, Johnson KJ, Kunkel R, Ward PA. Intravascular activation of complement and acute lung injury. Dependency on neutrophils and toxic oxygen metabolites. *J Clin Invest* 1982 May;69(5):1126-35.
- (132) Topol EJ. Aspirin with bypass surgery--from taboo to new standard of care. *N Engl J Med* 2002 October 24;347(17):1359-60.
- (133) van d, V, Eiserich JP, O'Neill CA et al. Tyrosine modification by reactive nitrogen species: a closer look. *Arch Biochem Biophys* 1995 June 1;319(2):341-9.
- (134) Virag L. Structure and function of poly(ADP-ribose) polymerase-1: role in oxidative stress-related pathologies. *Curr Vasc Pharmacol* 2005 July;3(3):209-14.
- (135) Virag L, Szabo C. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev* 2002 September;54(3):375-429.
- (136) Vollmar B, Slotta JE, Nickels RM et al. Comparative analysis of platelet isolation techniques for the in vivo study of the microcirculation. *Microcirculation* 2003 April;10(2):143-52.
- (137) Wagner DD, Burger PC. Platelets in inflammation and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003 December;23(12):2131-7.
- (138) Wagner WW, Jr., Filley GF. Microscopic observation of the lung in vivo. *Vasc Dis* 1965 September;2(5):229-41.
- (139) Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2000 May 4;342(18):1334-49.
- (140) Wean JT, Ernestine AC, Bromer AW et al. The normal behavior of pulmonary blood vessels with observation on the intermittence of the flow of blood in arterioles and capillaries. *Am J Physiol* 1934;109:236-56.
- (141) Welbourn CR, Young Y. Endotoxin, septic shock and acute lung injury: neutrophils, macrophages and inflammatory mediators. *Br J Surg* 1992 October;79(10):998-1003.
- (142) WEST JB, DOLLERY CT, NAIMARK A. DISTRIBUTION OF BLOOD FLOW IN ISOLATED LUNG; RELATION TO VASCULAR AND ALVEOLAR PRESSURES. *J Appl Physiol* 1964 July;19:713-24.
- (143) Williams MJ, Du X, Loftus JC, Ginsberg MH. Platelet adhesion receptors. *Semin Cell Biol* 1995 October;6(5):305-14.
- (144) Wizemann TM, Gardner CR, Laskin JD et al. Production of nitric oxide and peroxynitrite in the lung during acute endotoxemia. *J Leukoc Biol* 1994 December;56(6):759-68.
- (145) Zimmerhackl B, Parekh N, Brinkhus H, Steinhausen M. The use of fluorescent labeled erythrocytes for intravital investigation of flow and local hematocrit in glomerular capillaries in the rat. *Int J Microcirc Clin Exp* 1983;2(2):119-29.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- (146) Zingarelli B, O'Connor M, Wong H et al. Peroxynitrite-mediated DNA strand breakage activates poly-adenosine diphosphate ribosyl synthetase and causes cellular energy depletion in macrophages stimulated with bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 1996 January 1;156(1):350-8.
- (147) Zingarelli B, Salzman AL, Szabo C. Genetic disruption of poly (ADP-ribose) synthetase inhibits the expression of P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circ Res* 1998 July 13;83(1):85-94.
- (148) Zingarelli B, Szabo C, Salzman AL. Blockade of Poly(ADP-ribose) synthetase inhibits neutrophil recruitment, oxidant generation, and mucosal injury in murine colitis. *Gastroenterology* 1999 February;116(2):335-45.

8. VERÖFFENTLICHTE TEILASPEKTE DER ARBEIT

8. VERÖFFENTLICHTE TEILASPEKTE DER ARBEIT

1. Role of p-selektin in platelet sequestration in pulmonary capillaries during endotoxemia.

Kiefmann R, Heckel K, Schenkat S, Dörger M, Goetz AE.

J Vasc Res. 2006;43(5):473-81 . Epub 2006 Aug 22.

2. Role of PARP on iNOS pathway during endotoxin-induced acute lung injury.

Kiefmann R, Heckel K, Doerger M, Schenkat S, Kupatt C, Stoeckelhuber M, Wesierska-Gadek J, Goetz AE.

Intensive Care Med. 2004 Jul;30(7):1421-31. Epub 2004 Jun 10.

3. Platelet-endothelial cell interaction in pulmonary microcirculation: the role of PARS.

Kiefmann R, Heckel K, Schenkat S, Dörger M, Wesierska-Gadek J, Goetz AE.

Thromb Haemost. 2004 Apr;91(4):761-70.

9. DANKSAGUNG

9. DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilian-Universität (ehemaliger Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. K. Meßmer) in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. A.E. Goetz durchgeführt.

Nach Beendigung der Arbeit gilt mein besonderer Dank:

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. K. Meßmer für die freundliche Aufnahme am Institut für Chirurgische Forschung, für seine Anregungen und Ratschläge und seine stets konstruktive Kritik.

Herrn Prof. Dr. med. A.E. Goetz für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Überlassung des Themas der vorliegenden Arbeit und für das in mich gesetzte Vertrauen.

Herrn Dr. med. R. Kiefmann und Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. M. Kiefmann für ihren persönlichen Einsatz bei der Durchführung der Versuche, für ihre aktive Mithilfe und ihre kompetenten fachlichen, sowie freundschaftlichen Ratschläge, die wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Dr. med. K. Heckel für die persönliche Unterstützung bei der Durchführung der Versuche und die kollegiale Zusammenarbeit, sowie Frau Claudia Fahrney für alle labortechnischen Ratschläge.

Nicht zuletzt möchte ich mich vor allem bei meiner Familie und meinen Freunden für all ihre Unterstützung, ihre Geduld und die vielen motivierenden Gespräche bedanken. Mein besonderer Dank gilt dabei Martin Eichhorn, der mit seinem stetigen freundschaftlichen Beistand maßgeblich zum Abschluß dieser Arbeit beigetragen hat.

10. LEBENSLAUF

10. LEBENSLAUF

Sonja Schenkat

Geburtsdatum: 30. Mai 1974

Geburtsort: Erlangen

Eltern: Christa Schenkat, geb. Köhn
Hansjörn Schenkat

Schulbildung: 1980 – 1984: Grundschule Neubiberg
1984 – 1994: Gymnasium Ottobrunn

Schulabschluss: Allgemeine Hochschulreife 1994

1994 - 1995: Auslandsaufenthalt in Großbritannien

1995 – 1996: Freiwilliges soziales Jahr

Studium: 1996 – 2003: Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU)

Studienabschluss: Oktober 2003

Berufliche Tätigkeit: seit Dezember 2003 Assistenzärztin an der Klinik für Anästhesiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, Klinikum Großhadern