

Charité-Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin
Aus dem Institut für Physiologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. A.R. Pries

**Antikoagulanzen und ihr Einfluss auf postischämische
Leukocyten-Endothel-Interaktionen**

Quantifizierung der Unterschiede im Ischämie/Reperusionsmodell
des Rattencremasters

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der
Medizinischen Doktorwürde
der Charité-Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von

Simonida M. Bäter
aus Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. med H. Habazettl

Korreferent: Prof. Dr. med W. Rutsch

Gedruckt mit Genehmigung der Charité-Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 9. September 2011

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung

1. Ischämische Myokarderkrankungen.....	7
2. Möglichkeiten und Problematik einer reperfundierenden Behandlung akuter Myokardischämien.....	8
3. Pathogenese des Ischämie-Reperfusion-Schadens.....	9
4. Methoden zur Verminderung des postischämischen Reperfusionsschadens.....	14
5. Fragestellung der Studie.....	21

II. Material und Methoden

1. Versuchsvorbereitung	22
1.1. Versuchstiere	22
1.2. Narkose und Katheterisierung	23
1.3. Muskelpräparation	23
2. Ischämie	26
3. Aufbau zur Intravitalmikroskopie und zum Videoaufnahmesystem.....	26
4. Versuchsdurchführung	28
4.1. Messung systemischer Parameter	28

4.2. Versuchsablauf und Videoaufzeichnung	28
5. Versuchsauswertung	31
5.1. Technische Grundlagen	31
5.2. Arterielle und venöse Gefäßdurchmesser	32
5.3. Venöse Blutflussgeschwindigkeiten	32
5.4. Leukocyten-Endothel-Interaktionen	32
6. Statistik	34

III. Ergebnisse

1. Systemische Parameter	36
2. Venöse und arterielle Gefäßdurchmesser	36
3. Venöse Blutflussgeschwindigkeiten	38
4. Leukocyten-Endothel-Interaktionen	39
4.1. Leukocytenrollen	40
4.2. Leukocytenadhäsion	40
4.3. Leukocytenemigration	41
4.4. Leukocytenemigrationseffizienz	43

IV. Diskussion

1. Diskussion der Methodik	45
2. Diskussion der Ergebnisse	49

2.1. Systemische Parameter.....	49
2.2. Hämodynamische Parameter.....	50
2.3. Leukocyten-Endothel-Interaktionen.....	51
2.3.1. Leukocytenrollen.....	51
2.3.2. Leukocytenadhäsion.....	55
2.3.3. Leukocytenemigration.....	58
3. Klinische Relevanz der Ergebnisse.....	60
V. Zusammenfassung	63
VI. Referenzen.....	66
VII. Publikationen.....	79
VIII. Eidesstattliche Erklärung.....	81

I. Einleitung

1. Ischämische Myokarderkrankungen

Ischämie (griech. ἰσχεῖν: zurückhalten, hindern) bedeutet eine Verminderung oder Unterbrechung der Durchblutung eines Organs, Organteils oder Gewebes infolge mangelnder arterieller Blutzufuhr (153).

Vor allem das Herz ist für ischämische Erkrankungen prädestiniert. Unter dem Begriff der „ischämischen Herzkrankheit“ werden alle Krankheitsbilder zusammengefasst, die auf einem Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf des Myokards beruhen (157). Der klinische Begriff „koronare Herzkrankheit“ mit seinen einzelnen klinischen Formen beschränkt sich auf alle diejenigen Fälle, bei denen die mangelhafte Versorgung des Myokards auf einer stenosierenden Erkrankung der Herzkranzgefäße beruht: allen voran die Atherosklerose der extramuralen Koronararterien.

Die besondere Neigung der Koronarien, eine Atherosklerose zu entwickeln, lässt sich dadurch erklären, dass sie von allen Organarterien aufgrund ihrer Ventrikelnähe am meisten den systolischen Druckstößen ausgesetzt sind. Hinzu kommt, dass der koronare Gefässbaum durch die Organform zahlreiche Richtungsänderungen erfährt, so dass die Koronararterien vermehrt Scherkräften ausgesetzt sind, auf welche die Gefässwand bereits physiologischerweise mit einer Intimafibrose reagiert (157).

Die Atherosklerose wird von der WHO definiert als „variable Kombination von Intimaveränderungen, bestehend aus herdförmigen Ansammlungen (Plaques) von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut- und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Calciumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia“ (75).

Die Ruptur von atherosklerotischen Plaques mit rascher Ausbildung eines das Gefässlumen zusätzlich einengenden Thrombus führt zum akuten Koronarsyndrom (ACS) ohne ST-Elevation, im Sinn einer instabilen Angina Pectoris. Zudem werden durch die Thrombozytenaktivierung vasokonstriktorische, proaggregatorisch wirkende Substanzen (Thromboxan A₂, Serotonin, ADP) freigesetzt. Der Übergang von der instabilen Angina Pectoris zum intramuralen Infarkt mit erhöhten Herzenzymen (non-Q-wave Infarkt, NSTEMI

= non-ST-elevation Myokardinfarkt) ist fließend. Resultiert ein kompletter Koronarverschluss, kommt es zum ACS mit ST-Elevation im Sinne eines akuten transmuralen Myokardinfarktes (STEMI = ST-Elevation Myokardinfarkt).

In Nordamerika erleidet jährlich eine halbe Million Menschen einen Myokardinfarkt. In Deutschland liegt die Inzidenz bei 300/100.000 Einwohner jedes Jahr (74). Trotz der Fortschritte in der Behandlung sind die ACS die führende Todesursache in der industrialisierten Welt (187).

Die Therapie der Wahl beim akuten Myokardinfarkt (STEMI) ist heutzutage die frühestmögliche Wiederherstellung der Koronardurchblutung (Reperfusion). Für eine Reperfusion gilt dabei: je schneller die Reperfusion, desto geringer der Verlust an vitalem Myokard und desto besser die Prognose.

2. Möglichkeiten und Problematik einer reperfundierenden Behandlung akuter Myokardischämien

Nach den aktuellen Richtlinien sind die derzeit üblichen Verfahren zur Wiederherstellung der Perfusion beim akuten Myokardinfarkt die Thrombolyse und die akut-PTCA (Perkutane Transluminale Coronare Angioplastie) (74).

Bei der konservativen Reperfuionsbehandlung werden Aktivatoren der Fibrinolyse (Thrombolytika) eingesetzt. Eine Rekanalisation durch Auflösen des Thrombus tritt in 60-80% der Fälle ein. Bei Kontraindikationen für eine fibrinolytische Therapie oder in kardiologischen Zentren kommt alternativ zur Lyse die akut-PTCA zum Einsatz, wobei das klinische Outcome nach PTCA besser ist als bei der konservativen Therapie (74). Bei einer PTCA wird ein Ballonkatheter ausgehend von einer peripheren Arterie transluminal bis zu den Koronararterien vorgeschoben und anschliessend wird dort durch eine Ballondilatation ggf. mit Stentimplantation der stenosierte und verschlossene Abschnitt wieder durchlässig für den Blutstrom gemacht.

Aufgrund der Vorteile gegenüber anderen reperfundierenden Verfahren (209, 61) hat die Zahl der Patienten, die einer Angioplastie zugeführt wurden, seit der ersten PTCA durch A. Grüntzig im Jahre 1977 stetig zugenommen und zu einer verbesserten Prognose beim akuten Myokardinfarkt geführt (29).

Die frühestmögliche Reperfusion von ischämischem Myokard ist die Methode der Wahl in der Behandlung von Patienten mit akutem Myokardinfarkt. Doch ist die Reperfusion mit dem Risiko einer weiteren myokardialen Schädigung verbunden. Denn, obwohl die Reperfusion des vorher ischämischen Gewebes unerlässlich zur Verhinderung irreversibler Zellschäden ist, finden während der Reperfusion pathophysiologische Prozesse statt, die eine zusätzliche Zellschädigung hervorrufen können und zu einer Verschlimmerung des bereits entstandenen Schadens führen. Dieses Phänomen, dass die Reperfusion ein ischämisches Gewebe durch verschiedene Mechanismen zusätzlich schädigen kann, ist unter dem Begriff des Ischämie-Reperfusionsschadens (I/R-Schaden) bekannt (15, 5).

Das Phänomen des I/R-Schadens als Komplikation einer reperfundierenden Behandlung ischämischen Gewebes ist ein seit vielen Jahren intensiv untersuchtes Gebiet. Ein I/R-Schaden entsteht aus dem Zusammenspiel verschiedener intrazellulärer und extrazellulärer Mechanismen und Ergebnisse in den letzten Jahren häufen sich, die zeigen, dass inflammatorische Prozesse dabei eine Schlüsselstellung einnehmen (113).

3. Pathogenese des Ischämie-Reperfusionsschadens

Zu den ersten, die die Hypothese einer Zellschädigung durch eine postischämische Reperfusion postulierten, zählen Parks und Granger, die in einem Tiermodell intestinaler Ischämie und Reperfusion beobachteten, dass 3 h Ischämie gefolgt von 1 h Reperfusion einen grösseren Zellschaden anrichtete als 4 h Ischämie alleine (147).

Eine anhaltende Ischämie resultiert in einer Vielzahl von metabolischen und zellulären Veränderungen (36). Unter anderem wird ein Wechsel vom aeroben zum anaeroben Metabolismus initiiert, welcher in einer Verarmung an energiereichen Phosphaten resultiert. ATP-abhängige Ionenpumpen der Zellmembran werden dadurch in ihrer Funktion gestört, was zu einem Einstrom von Elektrolyten und Wasser in die Zelle führt und einen konsekutiven Zellschaden bewirkt. Störungen der intrazellulären Kalzium-Homöostase sind dabei ein bedeutender pathophysiologischer Prozess am Zustandekommen eines I/R-Schadens (146).

In Endothelzellen (EC) und neutrophilen Granulocyten (polymorphokernigen Neutrophilen = PMNs) bewirkt der ATP-Abfall während einer Ischämie über enzymatische Reaktionen die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in der Reperfusionphase (121). Sauerstoff, so

essentiell er für das Überleben von Gewebe ist, kann während der Reperfusion in Form toxischer, reaktiver Sauerstoffspezies schädigenden Einfluss haben, ein Umstand, der als „Oxygen Paradoxon“ bezeichnet wird (146). Neben oxidierenden und reduzierenden Reaktionen können diese Metabolite auch inflammatorische Reaktionen induzieren (188).

Ischämie-induzierte Veränderungen bedingen demnach einen proinflammatorischen Status, der in der nachfolgenden Reperfusion zu einer inflammatorischen Reaktion mit Aktivierung des unspezifischen Immunsystems führt, vor allem des Komplementsystems (231, 50) und der neutrophilen Granulocyten (31, 69, 87).

Neutrophile finden sich unter physiologischen Bedingungen im Blutstrom und im Knochenmark, aber kaum im Gewebe. Sie sind Bestandteil der frühen zellulären Abwehr bei inflammatorischen Prozessen und erfüllen als unspezifische Phagozyten eine wichtige Funktion des Immunsystems.

Doch auf der anderen Seite sind sie auch ein wesentlicher Bestandteil in der Pathophysiologie des I/R-Schaden (69). In der postischämischen Reperfusionphase kommt es zu einer Wechselwirkung zwischen PMNs und Endothelzellen. Dieser Prozess wird als Leukocyten-Endothel-Interaktion (LEI) bezeichnet und in Leukocytenrollen, -adhäsion und -emigration unterteilt. Ermöglicht werden diese nacheinander ablaufenden Schritte durch Interaktionen zwischen Adhäsionsmolekülen auf den Zelloberflächen aktivierter EC und PMNs.

Leukocyten-Endothel-Interaktionen (Abb. 1):

Der erste Schritt der LEI besteht darin, die PMNs des zentralen Blutstromes zu marginalisieren. Dabei werden die Leukocyten in den postkapillären Venolen von den Erythrocyten, welche sich aufgrund ihrer grösseren Verformbarkeit in der Strommitte aufhalten (Axialmigration), an den Gefässrand gedrängt (165). Marginierte Leukocyten können mit der Gefässwand in reversiblen Kontakt treten und bewegen sich zunächst mit verminderter Geschwindigkeit an ihr entlang (Leukocytenrollen).

Für diese adhäsiven Kräfte sind Wechselwirkungen zwischen leukocytären und endothelialen Oberflächenmolekülen mit Rezeptorfunktion, die Selektine, verantwortlich. Die Selektine werden in drei Gruppen unterteilt: Das L-Selektin wird konstitutiv auf Leukocyten exprimiert, erhöht nach einer Leukocytenaktivierung seine Avidität gegenüber seinem Liganden, dem CD34-Membranmolekül (Spg 90) (14) und wird im weiteren Verlauf der LEI von der

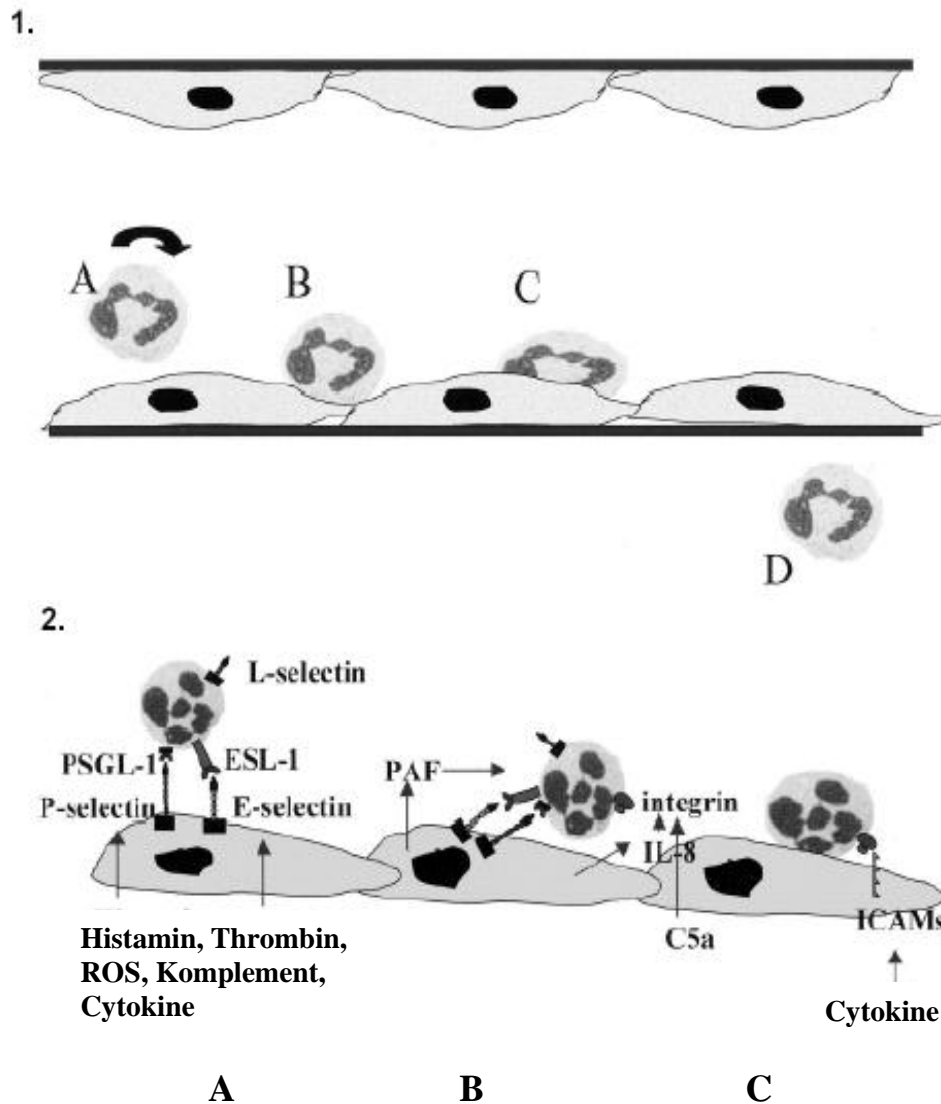


Abb. 1 1. Schematische Darstellung der einzelnen Schritte der LEI in postkapillären Venolen. (A) Als Reaktion auf einen inflamm. Stimulus rollen Leukocyten mit Geschwindigkeiten deutlich unter der des Blutflusses an dem Endothel entlang. (B) Einige der rollenden Zellen adhären an der Wand und nach ein paar Minuten beginnen sie als Reaktion auf lokale chemotaktische Stimuli ihre Form zu verändern (C). Es folgt die Extravasation in extravaskuläres Gewebe (D). Jeder dieser Schritte erfordert entweder eine Hochregulation oder Aktivierung von verschiedenen Gruppen von Adhäsionsmolekülen.

2. Interagierende Stoffe und Rezeptoren während der LEI. (A) Das initiale Anheften der PMNs an das Endothel wird durch Selektine vermittelt. (B) Dies ermöglicht den PMNs an der Venolenwand entlang zu rollen und nach aktivierenden Faktoren zu spüren (wie z.B. IL-8 und C5a). Diese Interaktionen führen zur Aktivierung neutrophiler Integrine. (C) Die feste Adhäsion der Leukocyten wird durch Bindung neutrophiler Integrine an Mitglieder der Immunoglobulin-Superfamilie (ICAMs) vermittelt, exprimiert von stimulierten EC.

Abk.: PSGL-1 = P-Selektin Glycoprotein Ligand-1, ESL-1 = E-Selektin Ligand-1, ROS = reaktive Sauerstoffspezies, PAF = Plättchen aktivierender Faktor, IL-8 = Interleukin 8, ICAM = Intercellular Adhesion Molecule . (54)

Zelloberfläche abgestoßen (L-Selektin-shedding) (51, 175). Das endotheliale E-Selektin wird nach Endothelaktivierung neusynthetisiert und zeigt eine maximale Expression nach 4 h (20), wo es dann u.a. PMNs binden kann (19, 20). P-Selektin wird intrazellulär in EC und Thrombocyten gespeichert und nach einer Zellaktivierung innerhalb von Minuten an die Oberfläche transportiert, wobei aber auch eine Neusynthese durch Cytokine induzierbar ist. Bindungspartner des P-Selektins ist das leukocytaire PSGL-1 (P-Selektin-Glykoprotein-Ligand) (162, 107).

Das Leukocytenrollen tritt ungefähr 1-3 min nach einem entzündlichen Reiz auf. Dieser Reiz führt zur Freisetzung von Cytokinen (19) und Thrombin (126). Durch diese Mediatoren vermittelt kommt es zunächst zu einer Endothelaktivierung. Die Folge der Endothelzellaktivierung ist eine rasche Externalisierung von P-Selektin aus den intrazellulären Speichern. Eine Interaktion mit seinen leukocytären Liganden resultiert in dem Leukocytenrollen (111). P- und L-Selektine spielen vor allem in der frühen Phase des PMN-vermittelten Ischämie-Reperfusion-Schadens eine besondere Rolle (111).

Selektin-vermitteltes Rollen ist ein obligatorischer Prozess, bevor Leukocyten zum nächsten Schritt, der Adhäsion, übergehen können. Dabei haftet der Leukocyt stationär an der Endothelwand. Der langsam rollende Leukocyt ist durch eine längere Kontaktzeit mit dem aktivierten Endothel einer Reihe proinflammatorischer Mediatoren (z.B. Chemokine, reaktive Sauerstoffspezies, aktivierte Thrombocyten (103, 59)) ausgesetzt. Die Folge ist eine Leukocytenaktivierung, welche in einem L-Selektin-shedding resultiert. Diese Abstossung korrespondiert mit einer Steigerung in der Expression sowie Aktivierung von Adhäsionsmolekülen aus der Gruppe der β_2 -Integrine, vor allem des Mac-1 (CD11b/CD18). β_2 -Integrine sind Heterodimere, setzen sich aus einer längeren α (CD11)-Kette und einer kürzeren β (CD18)-Kette zusammen und werden nach der α -Untereinheit unterschieden in CD11a/CD18 (LFA-1), CD11b/CD18 (Mac-1) und CD11c/CD18 (gp150). Das für die Leukocytenadhäsion wichtige Integrin CD11b/CD18 kommt auf Granulocyten und Monocyten vor. Seine Expression ist konstitutiv als auch im Rahmen einer Zellaktivierung induzierbar (Transport an die Zelloberfläche aus intrazellulären Granula) (145). Die CD11b/CD18-Moleküle interagieren bei der Adhäsion mit ihrem endothelialen Bindungspartner, dem ICAM-1. Interzelluläre Adhäsionsmoleküle (ICAM) sind konstitutiv exprimierte endotheliale Oberflächenmoleküle, deren Synthese nach Stimulierung zusätzlich

hochreguliert wird (45, 176). Das Resultat dieser CD11b/CD18- ICAM-1-Interaktion ist eine feste Adhäsion von Leukocyten an das Endothel in dem entzündeten Gewebe.

Die transendotheliale Emigration stellt den letzten Schritt der Leukocytenrekrutierung dar. Der genaue Mechanismus der Transmigration ist noch nicht völlig aufgeklärt (135). Sie ist zum einen abhängig von Interaktionen zwischen neutrophilen β_2 -Molekülen und Integrinen in den endothelialen Interzellularspalten. Die Involvierung von β_2 -Integrinen wird z. B. deutlich in Patienten mit LAD I-Syndrom (Leukocyte Adhesion Deficiency Type I), welche durch einen genetischen Defekt keine β_2 -Integrine exprimieren können und deren Leukocyten zu keiner Diapedese fähig sind (10). Auch dem Zellmembranmolekül PECAM-1 wird eine Rolle in der Transmigration von Leukocyten zugeschrieben (136). Es ist unter anderem in hoher Dichte auf den EC im Bereich der interzellulären Verbindungen zu finden. Eine homophile Bindung zwischen leukocytären und endothelialen PECAM-1 konnte bei der Diapedese beobachtet werden (39).

In postischämisches Gewebe infiltrierte PMNs tragen durch Freisetzung von reaktiven Sauerstoffmetaboliten und Enzymen zu einer weiteren Gewebeschädigung bei. Zusätzlich wird die lokale Entzündungsreaktion durch freigesetzte neutrophile proinflammatorische Mediatoren verstärkt und eine weitere Leukocytenrekrutierung in das Gewebe induziert (30).

Ein I/R-Schaden bei der reperfundierenden Behandlung myokardialer Ischämien ist ein Problem, welches seit einigen Jahren intensiv untersucht wird. Auf molekularer Ebene konnten bei Patienten mit myokardialer Ischämie auch I/R-induzierte inflammatorische Reaktionen nachgewiesen werden (82, 124, 128). Durch die Reperfusionstherapie bei der PTCA kommt es zu einer zusätzlichen Aktivierung inflammatorischer Prozesse (130, 168). Studien konnten zeigen, dass diese induzierten inflammatorische Prozesse einen bedeutenden Einfluss auf das Outcome von Patienten mit ACS ausüben (113).

Klinische Manifestationen eines myokardialen I/R-Schadens sind u.a. „myocardial stunning“ („gelähmtes Myokard“), worunter eine anhaltende postischämische kontraktile Dysfunktion des Myokards verstanden wird (14, 6). Auch das Phänomen des postischämischen „no-reflow“ durch mikrovaskuläre und endotheliale Dysfunktion sowie irreversible Zellschäden oder Nekrosen („letaler Reperfusionsschaden“) sind klinische Auswirkungen eines myokardialen I/R-Schadens (208, 5).

4. Methoden zur Minderung des postischämischen Reperfusionsschadens

Aufgrund der Bedeutung eines I/R-Schadens ist die Forschung schon seit Jahren bestrebt, Strategien zu entwickeln, I/R-Schäden zu reduzieren, indem inhibierend in die zugrundeliegenden pathophysiologischen Prozesse eingegriffen wird.

Es gibt eine Vielzahl experimenteller Studien, die durch unterschiedliche Ansätze eine Reduktion des I/R-Schadens zeigen konnten. Die Beeinflussung des intrazellulären Kalziumspiegels oder Methoden zur Verringerung der Entstehung von reaktiven Sauerstoffmetaboliten führten in verschiedenen Studien zu einer Reduktion eines I/R-Schadens (155, 70, 123).

Der dritte wichtige pathophysiologische Mechanismus ist die Induktion einer inflammatorischen Reaktion. Aufgrund der dabei zahlreichen interagierenden humoralen und zellulären Komponenten bieten sich hier besonders viele Interventionsmöglichkeiten. Die wichtigsten Angriffspunkte stellen das Komplementsystem und die neutrophilen Granulozyten dar. Experimentelle Untersuchungen, in denen auf unterschiedliche Weise das Komplementsystem inhibiert wurde, konnten eine Verringerung von I/R-bedingten Schäden zeigen (190, 36). Besonderes Interesse galt den PMNs, wobei in zahlreichen experimentellen Studien auf verschiedenen Wegen durch eine Inhibition der PMNs eine Reduktion von I/R-Schaden erzielt werden konnten. Untersuchte Methoden waren dabei vor allem eine Verringerung der Zahl zirkulierender Blut-Granulozyten (Neutrophilen-Depletion) (159, 38, 114, 58), sowie eine Inhibition der Leukozyten-Endothel-Interaktionen. Eine Verringerung der LEI wurde durch Blockade der Selektin- und/oder Integrin-Interaktionen in verschiedenen in-vitro und in-vivo-Modellen erreicht (200, 104, 105, 116, 119, 120). Trotz der vielversprechenden Ergebnisse dieser in-vitro und in-vivo Untersuchungen konnten sich die getesteten Ansätze zur Reduktion von I/R-Schäden bisher jedoch klinisch nicht durchsetzen.

Ein weiterer Ansatzpunkt zur Verringerung von I/R-Schäden ist die Inhibition von proinflammatorischen Mediatoren (102, 169). Zu diesen Mediatoren gehören auch bestimmte Komponenten des Gerinnungssystems.

Seit längerem ist schon bekannt, dass Koagulation und Inflammation zusammenhängen (202). Zahlreiche Untersuchungen haben bestätigt, dass Koagulation und Inflammation nicht als getrennte Prozesse angesehen werden können, sondern vielmehr zwei Seiten ein und

derselben Medaille darstellen. Im Rahmen einer endothelialen Reizung durch inflammatorische Prozesse kommt es zu einer Involvierung des Gerinnungssystems mit Aktivierung von Thrombocyten (33, 16), den Faktoren XIIa (192), Fibrinogen (115), Faktor Xa und vor allem Thrombin (210, 90).

Der aktivierte Faktor X (FXa) ist ein sehr potenter proinflammatorischer Mediator. Die entzündungsmodulatorischen Funktionen des FXa werden durch Aktivierung von membrangebundenen, G-Protein-gekoppelten PAR-2-Rezeptoren (Protease-Activated-Receptors) vermittelt. Diese Membranmoleküle werden u.a. von Leukocyten und Endothelzellen exprimiert. Die Aktivierung von PAR-2-Rezeptoren durch FXa führt u.a. via Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zu einer Expression von Adhäsionsmolekülen (100, 28) mit konsekutiver Leukocyten-Endothel-Interaktion (191). Daneben bindet und aktiviert FXa Endothelzellen und Leukocyten über den Gefäßrezeptor EPR-1 (35, 24). Diese Interaktion triggert Signaltransduktionen, welche zu einer Aktivierung inflammatorischer Reaktionen führen (u.a. Cytokinfreisetzung (34), endotheliale Thrombinbildung (4) sowie Leukocytenaktivierung (3)).

Thrombin ist eine Serinprotease aus der Trypsinfamilie und ein Schlüsselenzym im Blutgerinnungssystem. Neben prokoagulatorischen Funktionen (Abb. 2) spielt Thrombin auch eine Rolle bei inflammatorischen und weiteren Prozessen (32, 60). Diese Polyfunktionalität ist bedingt durch seine Struktur: Neben dem klassischen aktiven Zentrum besitzt Thrombin eine Reihe externer Bindungsstellen (Exosites) für Substrate und Rezeptoren.

Während einer inflammatorischen Reaktion wird Thrombin aus seinem Zymogen Prothrombin gebildet und zu den bekanntesten proinflammatorischen Effekten des Thrombins gehört die (rezeptorunabhängige) chemotaktische Wirkung auf neutrophile Granulocyten und Monocyten (12, 86).

Weitere Effekte des Thrombins werden durch PAR-1-Rezeptoren vermittelt. Die Aktivierung stimuliert Signaltransduktions-Kaskaden mit konsekutiver Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. Die Aktivierung endothelialer PAR-1-Rezeptoren durch Thrombin führt zu einer Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren (150, 85). Eine Aktivierung neutrophiler PAR-1-Rezeptoren durch Thrombin trägt zur LEI bei und die Aktivierung thrombocytärer PAR-1-Rezeptoren führt zu einer Plättchenadhäsion an EC mit darauffolgender Aktivierung von Gerinnungsfaktoren und letztlich zu einer PMN-Adhäsion an das Endothel (98).

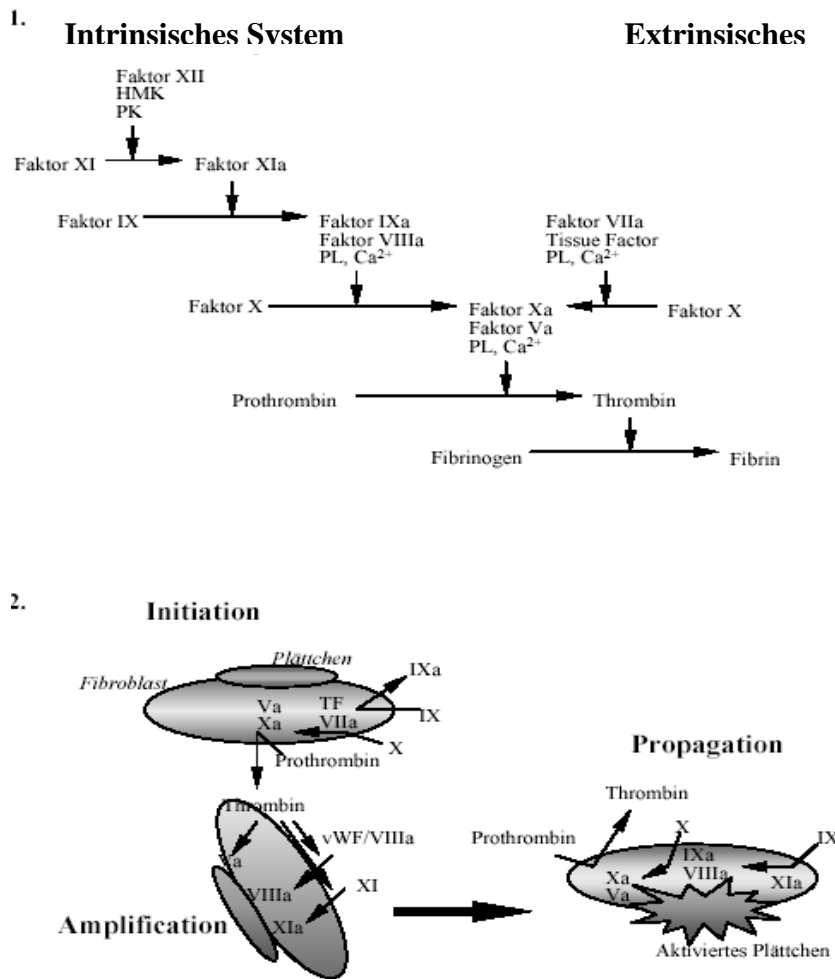


Abb. 2. Das Gerinnungssystem. Die Blutgerinnung setzt sich aus zwei Teilen zusammen, der primären und der sekundären Hämostase.

Unter der primären Hämostase versteht man den initialen Stillstand einer Blutung durch Vasokonstriktion und Aktivierung des Thrombocytensystems. Aktiviert durch Kontakt mit geschädigter/aktivierter Endothelwand oder durch Stase, adhären Plättchen an sub-/endothelialen Strukturen, verformen sich, degranulieren und führen zur Aggregation weiterer Plättchen. Dadurch kommt es zu einer vorläufigen Deckung des Defektes.

1. Die sekundäre Hämostase oder plasmatische Gerinnung (eingeteilt in extrinsisches/exogenes und intrinsisches/endogenes System) wird beim extrinsischen System eingeleitet, wenn Tissue Factor (FIII) dem Blut ausgesetzt wird, entweder als Folge eines Gefäßwandschadens oder nach Endothelaktivierung. Auslöser für das intrinsische System sind der Kontakt von Faktor XII mit Fremdoberflächen oder Kollagenfasern aus verletztem Endothel oder Thrombocytenzerfall.

An den nachfolgenden Reaktionen sind in beiden Systemen verschiedene Faktoren beteiligt: Im exogenen System wird Faktor VII durch seinen spezifischen Aktivator TF in seine aktive Form (FVIIa) überführt. Dieser verbindet sich unter Mitwirkung von Calciumionen mit PL der verletzten Gewebezellen. Dieser Komplex stellt den Faktor-X-Aktivator (extrinsic-factorXase) des exogenen Systems dar. Im endogenen System beginnt die Reaktionsfolge mit der Kontaktaktivierung des Faktors XII. Faktor XIIa bildet zusammen mit Faktor XI und Plättchenfaktor 3 (auf Thrombocytenmembran haftend) einen enzymatisch wirksamen Komplex, der die Umwandlung des Faktors IX in die aktive Form katalysiert. Faktor IXa bildet mit Faktor VIII, Calciumionen und PL den Faktor-X-Aktivator (intrinsic-factorXase) des endogenen Systems.

In dem folgenden, beiden Systemen gemeinsamen Reaktionablauf bildet der aktivierte FX mit FVa, PL, und Calciumionen den Prothrombinaktivator-Komplex, der Prothrombin in Thrombin (Faktor IIa) umwandelt. Thrombin führt die Fibrinogenmoleküle unter Abspaltung der Fibrinopeptide A und B in Fibrinmonomere über, die spontan zu Polymeren aggregieren. Aus diesem Komplex entsteht unter der Wirkung von aktiviertem Faktor XIII Fibrin, welches sich in der sogenannten Nachphase der Blutgerinnung noch zusammenzieht (Blutgerinnungselretraktion).

2. Dieses protein-zentrierte Kaskadenmodell der Gerinnung gilt mittlerweile als überholt, seit bekannt ist, dass die Koagulation in-vivo durch Oberflächeneigenschaften best. Zellen reguliert wird. Heutzutage wird davon ausgegangen, dass die Koagulation nicht als Kaskade, sondern in drei überlappenden Schritten abläuft: 1) „initiation“, welche an einer TF tragenden Zelle (z.B. Fibroblasten) abläuft und wo bei ausreichendem prokoagulatorischen Stimulus genug Faktoren (FXa, FIXa, Thrombin) entstehen, um den Koagulationsprozess erfolgreich zu initiieren; 2) „amplification“, wo Plättchen und Cofaktoren aktiviert werden und so die Voraussetzung für die Thrombingeneration geschaffen wird; und 3) „propagation“, wo die aktivierten Faktoren mit ihren Cofaktoren sich auf der Plättchenoberfläche verbinden und so eine ideale Voraussetzung für die Thrombingeneration entsteht. Die Aktivität der prokoagulatorischen Komplexe resultiert in einer Thrombinbildung, die letztlich zur Fibrinpolymerisation führt.

Abk.: HMK = high molecular weight kininogen, TF = Tissue Factor, PL = Phospholipide. (79)

In-vitro-Studien konnten zeigen, dass Thrombin zudem die endotheliale P-Selektin und ICAM-Expression mit konsekutiver Leukocytenadhäsion induzieren kann (117, 179). Auch die Transmigration von PMNs kann durch Thrombin induziert werden (134, 101, 23).

Aufgrund der Erkenntnisse der proinflammatorischen Eigenschaften von FXa und Thrombin wurden Studien durchgeführt, die zeigen konnten, dass eine Inhibition dieser Faktoren zu einer Verringerung von LEI in-vitro (203) und in-vivo (142, 144) führte. Z.B. verringert Antithrombin III Thrombin-vermittelte PMN-Adhäsion an EC in-vitro und I/R-induzierte Leukocytenrekrutierung in-vivo (199).

In der klinischen Praxis wird eine anti-FXa und/oder eine anti-Thrombin-Aktivität durch Antikoagulanzen erreicht. Zu diesen gehören die indirekten Thrombininhibitoren unfractioniertes und niedermolekulares Heparin und die direkten Thrombininhibitoren wie r-Hirudin oder Bivalirudin.

Heparin ist eine körpereigene Substanz, die in den basophilen Granula von Mastzellen an Histamin und weitere basophile Proteine gebunden vorliegt. Heparin wurde 1916 von dem Medizinstudenten der Johns Hopkins University, Jay McLean, entdeckt, welcher eigentlich auf der Suche nach einer gerinnungsfördernden Substanz war (127). Aufgrund der hohen Konzentration, mit der diese Substanz in der Leber vorkommt, wurde sie „Heparin“ genannt.

Heparin ist ein stark negativ geladenes sulphatiertes Glykosaminoglykan. Die lineare Molekülstruktur setzt sich aus in glykosidischer Bindung zueinander stehendem Aminozucker (D-Glucosamin) und einer Uronsäure (D-Glucuronsäure bzw. L-Iduronsäure) zusammen. Das Molekulargewicht des natürlich vorkommenden Heparins schwankt je nach Kettenlänge zwischen 5000 und 25000 Da und wird deshalb auch als unfractioniertes Heparin bezeichnet.

Heparin wird aus Tiermaterial gewonnen und seine Aktivität wird, wegen des variablen Molekulargewichtes, in standardisierten internationalen Einheiten (IE (bzw. U) nach WHO-Standard angegeben. 1mg sogenanntes Standard- oder unfractioniertes Heparin mit einem mittleren Molekulargewicht von 15000 Da entspricht etwa 120-180 IE.

Als Antikoagulans greift Heparin innerhalb des Gerinnungssystems an verschiedenen Punkten ein. Neben der Inaktivierung von Gerinnungsfaktoren (FXa, FXIIa, FXIa, FIXa) ist der Hauptmechanismus seiner antikoagulatorischen Wirkung vor allem die Thrombininhibition durch den Heparin-Antithrombin III-Komplex. Antithrombin III ist ein endogener

Serinproteaseinhibitor, der vor allem Thrombin inaktivieren kann. Die Antithrombin III-Reaktionen laufen normalerweise relativ langsam ab und werden durch Heparin bis auf das 1000-2000fache beschleunigt (118).

Unfraktioniertes Heparin besitzt eine Reihe von Nachteilen, die eine Weiterentwicklung der Heparine vorangetrieben haben. Durch ladungsbedingte Bindung an Plasmaproteine und Zelloberflächen sowie Neutralisation des Heparins durch den Plättchenfaktor 4 entwickelt UFH einen variablen antikoagulativen Effekt, der ein Monitoring des Gerinnungsparameters aPTT (aktivierte partielle Thromboplastinzeit) notwendig macht. Ausserdem besitzt UFH die Eigenschaft, Thrombocyten zu aktivieren (158).

1976 wurde von Andersson und Mitarbeitern in Kooperation mit der Forschungsabteilung der Firma Kabi die wichtige Entdeckung gemacht, dass das Verhältnis der verschiedenen gerinnungshemmenden Wirkmechanismen von Heparinen je nach Kettenlänge variiert (8). Heparinmoleküle mit mind. 16 Monosacchariden hemmen sowohl den Faktor Xa als auch Thrombin. Heparinmoleküle mit einer Kettenlänge zwischen 8 und 16 Monosacchariden hemmen fast ausschliesslich den Faktor Xa. Heparinmoleküle mit einer Kettenlänge von weniger als 8 Monosacchariden haben keine gerinnungshemmende Wirkung (81).

Ende der 70er Jahre wurden niedermolekulare Heparine (low-molecular-weight heparin = LMWH) erstmals gewonnen. LMWHs sind Fragmente von UFH, die durch kontrollierte enzymatische oder chemische Depolymerisation gewonnen werden. So erhält man Molekülketten von einem mittleren Molekulargewicht von ca. 5000 Da. Im speziellen Falle des in der Studie verwendeten Enoxaparins, welches durch Benzylolation und alkalische Depolymerisation aus UFH gewonnen wird, liegt das mittlere Molekulargewicht bei 4200 Da. LMWHs verfügen in der Regel nur noch über geringe Anteile hochmolekularer Heparine und können daher auch nur in untergeordnetem Maße Thrombin direkt inaktivieren. Die Hauptwirkung entfaltet das LMWH gegenüber dem aktivierten Faktor X, zu dem eine wesentlich höhere Affinität als zum Thrombin besteht. Die Separation der Wirkungen gegenüber Faktor Xa im Vergleich zum Thrombin (FIIa) wird für die einzelnen LMWHs als Xa/IIa-Quotient angegeben. Beim Enoxaparin liegt der anti-Xa/anti-IIa-Quotient bei 3.8:1 (198).

Unfraktionierte und niedermolekulare Heparine weisen beide den Nachteil auf, dass sie fibringebundenes Thrombin nicht inhibieren können. Das ist bei den direkten Thrombin-Inhibitoren nicht der Fall.

Der Blutegel „*Hirudo medicinalis*“ produziert in seinen Speicheldrüsen verschiedene Typen von Protease-Inhibitoren, die als Blutgerinnungshemmstoffe eine wichtige Rolle für seine exklusive Ernährungsform spielen (13). Zu diesen Protease-Inhibitoren gehört auch das Hirudin. Entdeckt wurde es vor über einem Jahrhundert von J. W. Hycraft in Extrakten von Zerebralregionen des Blutegels. Im Jahre 1903 wurde die extrahierte Substanz von Y. Jakobi „Hirudin“ getauft. Hirudin ist ein Glykoprotein aus 65 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 8000-9000 Da. Aufgrund der schwierigen und kostspieligen Gewinnung aus den Egel n waren Pharmakonzerne sehr an der molekularen Struktur interessiert, die schliesslich 1985 komplett aufgeschlüsselt war (42). 1986 erschienen die ersten Berichte von gentechnisch hergestelltem rekombinanten (r-)Hirudin (18). Hirudin besitzt als direkter Thrombininhibitor (DTI) eine besondere Affinität zum Thrombin, mit dem es in einer stöchiometrischen Reaktion einen schwerlöslichen, inaktiven Komplex bildet. Seine Aktivität wird daher auch in Antithrombineinheiten (AT-E) angegeben. Diese komplette, direkte Inaktivierung des Thrombins ist im Gegensatz zum UFH unabhängig vom Antithrombin III und schliesst auch fibringebundenes Thrombin mit ein.

Hirudin ist der Prototyp der Direkten Thrombininhibitoren und wird wegen der sehr geringen therapeutischen Breite in der Klinik nur als Reserveantikoagulans eingesetzt. Neuere Substanzen wie das Bivalirudin sind semi-synthetische Proteine, die nur transient an das aktive Zentrum von Thrombin binden. Dadurch wird eine grössere therapeutische Breite mit geringeren Inzidenzen von Blutungskomplikationen erreicht (7).

Die aktuellen ACC/AHA-Richtlinien der adjuvanten Begleittherapie beim ACS mit ST-Elevation empfehlen eine Kombination aus antithrombocytären Pharmaka und Antithrombinen/Antikoagulanzen.

Antikoagulanzen werden in der Begleittherapie von ACS zur Verhinderung der Entstehung und Progression intramuraler Thromben eingesetzt. Doch besitzen Antikoagulanzen auch antiinflammatorische Effekte:

Erste Untersuchungen auf antiinflammatorische Effekte der Heparine wurden in den 70er Jahren durchgeführt (37, 47). Eine Vielzahl dieser Effekte wird durch die Fähigkeit vermittelt, proinflammatorische Substanzen zu binden und zu inhibieren. Dazu zählen Komplementfaktoren (178, 122), Chemokine (131), freigesetzte Produkte aktivierter Granulocyten (154, 194) sowie Thrombin (via Antithrombin III).

Ausserdem üben Heparine einen inhibitorischen Effekt auf das Komplementsystem aus, welches lange Zeit als der Haupteffekt der antiinflammatorischen Wirkweisen der Heparine angesehen wurde (46, 122).

Neuere Untersuchungen zeigen zusätzlich auch hemmende Einflüsse auf die Leukocytenaktivierung. Durch die Fortschritte in der Molekularbiologie und die Entwicklung neuer Analysetechniken wurde deutlich, dass Heparin direkt P- und L-Selektin (92, 95, 171, 175) sowie an das leukocytäre Integrin Mac-1 (41, 148) binden kann und diese somit zu inhibieren vermag. Diese Inhibitionen der Adhäsionsmoleküle findet auch in-vivo statt, wobei in experimentellen Studien gezeigt werden konnte, dass dadurch hemmende Einflüsse der Heparine auf die LEI und somit auch auf I/R-Schäden bewirkt werden konnten (21, 56, 180, 204).

Aufgrund seiner Wirkung als direkter Thrombininhibitor und der Erkenntnis, dass Thrombin eine wichtige Rolle in inflammatorischen Prozessen spielt, lag es nahe, auch Hirudin auf antiinflammatorische Qualitäten zu testen. Hirudin, welches Thrombin durch Bindung an das aktive Zentrum und an anionenbindende Exosites inhibiert, ist in der Tat in der Lage, die chemotaktische Aktivität des Thrombins gegenüber PMNs zu blocken (23, 133, 160). Zusätzlich konnte durch experimentelle Studien gezeigt werden, dass durch eine direkte Thrombininhibition auch in-vivo Thrombin-vermittelte inflammatorische Prozesse verringert werden können (48, 88).

UFH ist das Antikoagulans der Wahl sowohl im Katheterlabor als auch in der pharmakologischen Begleittherapie des ACS mit ST-Elevation (184).

Niedermolekulare Heparine und direkte Thrombininhibitoren als Antithrombin-Adjuvans bei ACS sind bisher nur im Rahmen von klinischen Studien eingesetzt worden und zeigen dort mitunter positive Ergebnisse (93). Während UFH und LMWH als gleich effektiv in der adjuvanten Behandlung von Patienten mit ACS anzusehen sind (49), zeigen die Ergebnisse einer Meta-Analyse mit Hirudin, dass direkte Thrombininhibitoren den indirekten überlegen

sind in Bezug auf die untersuchten Endpunkte kardiovaskulärer Tod und Myokardinfarkt bei Patienten mit ACS (183). Diese Unterschiede im Outcome der Patienten mögen auf die stärkere Antikoagulation durch die DTIs zurückzuführen sein. Direkte Thrombininhibitoren sind bisher nicht systematisch in einem Kontext von I/R in-vivo analysiert worden. Aufgrund der Erkenntnisse, dass inflammatorische Prozesse am Outcome von Patienten mit ACS beteiligt sind (113), stellt sich die Frage, ob nicht auch ein stärkerer antiinflammatorischer Effekt durch direkte Thrombininhibitoren für die Überlegenheit der DTIs in klinischen Studien mit myokardialen I/R-Schaden mitverantwortlich sein könnte.

5. Fragestellung der Studie

Die vorliegende Studie wurde durchgeführt, um die Effekte des LMWH, des indirekten Thrombininhibitors UFH und des direkten Thrombininhibitors Hirudin auf die Leukocytenaktivierung in I/R zu vergleichen. Das Studiendesign und -protokoll waren ausgelegt, die Frage zu klären, ob und welcher Wirkmechanismus am effektivsten postischämische LEI zu unterdrücken vermag: die anti-FXa-Aktivität des LMWH, die indirekte ATIII-abhängige Antithrombin-Aktivität des UFH oder die direkte Thrombininhibition durch Hirudin. Folgende Fragestellungen galt es im einzelnen zu überprüfen:

1. Sind die drei getesteten Antikoagulanzen, in Dosierungen, die im Hinblick auf antithrombotische Effekte äquipotent sind, in der Lage, eine I/R-induzierte inflammatorische Reaktion in-vivo zu reduzieren?
2. Zeigen sich in den gegebenen Dosierungen quantitative Unterschiede zwischen UFH, LMWH und Hirudin bezüglich der antiinflammatorischen Qualität, I/R-induzierte Leukocyten-Endothel-Interaktionen zu vermindern?

II. Material und Methoden

Um die antiinflammatorischen Effekte von UFH, LMWH und Hirudin in Ischämie und Reperfusion quergestreifter Muskulatur zu untersuchen, wurde ein etabliertes in-vivo-Modell von I/R des M. cremaster der Ratte verwendet. Mit diesem Modell ist es möglich, Arteriolen und postkapilläre Venolen im quergestreiften Skelettmuskel intravitalmikroskopisch zu beobachten. Nach Anfärben mit einem Fluoreszenzfarbstoff können Leukocyten-Endothel-Interaktionen, als Äquivalent für entzündliches Geschehen, optisch dargestellt werden.

In der vorliegenden Studie wurde in dem mikroskopisch beobachteten Gewebe die Blutzufuhr unterbunden und somit eine Ischämie erzeugt. Kurz vor Beendigung der Ischämie wurden die zu untersuchenden Pharmaka systemisch appliziert. Als Messparameter wurden Gefäßdurchmesser und Blutflussgeschwindigkeiten sowie die Leukocyten-Endothel-Interaktionen im Zeitverlauf der Reperfusionsphase auf Veränderungen hin beobachtet.

1. Versuchsvorbereitung

1.1. Versuchstiere

Der Antrag des Tierversuchsvorhabens für vorliegende Studie wurde am 26.10.1998 behördlich genehmigt (Senatsverwaltung für Gesundheit und Soziales, AZ G 0116/98). Alle tierexperimentellen Untersuchungen unterlagen der Kontrolle des örtlichen Tierschutzbeauftragten und wurden unter Einhaltung der Tierschutzbestimmungen durchgeführt (BGBl. I, 1993).

Zwanzig männliche Sprague-Dawley Ratten mit einem Körpergewicht (KG) von 270-320 g (hauseigene Zucht) wurden in vier Gruppen zu jeweils fünf Tieren aufgeteilt. Gruppe 1 stellte die Kontrollgruppe dar (Behandlung mit NaCl), Gruppe 2 wurde mit unfraktioniertem Heparin, Gruppe 3 mit niedermolekularem Heparin und die 4. Gruppe mit Hirudin behandelt.

1.2. Narkose und Katheterisierung

Die Anästhesie und Analgesie wurde mit einer Urethan-Ketamin-Narkose durchgeführt. Hierfür erhielten die Tiere 150 mg/100 g KG Urethan (Sigma-Aldrich, Steinheim) als intraperitoneale Bolusinjektion. Nach erfolgter Sedierung wurden 5 mg/100 g KG Ketamin (Ketavet[®] Pharmacia & Upjohn GmbH, Erlangen) als Einmaldosis intramuskulär verabreicht. Eventuell erforderliche Nachinjektionen zur Aufrechterhaltung der Narkose wurden mit i.p.-Gaben von jeweils 0.2 ml Urethan durchgeführt. Diese Form der Anästhesie hat einen vernachlässigbaren Effekt auf die Spontanatmung (2), so dass eine Beatmung nicht notwendig war.

Nach einem medianen, longitudinalen Schnitt durch Haut und prätracheale Halsmuskulatur wurde die Trachea dargestellt, umschlungen und zwischen zwei Knorpelspangen eröffnet. Durch diese Öffnung wurde ein Polyethen-Mikroschlauch (Innendurchmesser (ID): 1.57 mm, Aussendurchmesser (OD): 2.08 mm, Portex, England) von circa 3 cm Länge eingeführt, um die Ventilation der spontan atmenden Tiere zu erleichtern.

Die linke A. carotis communis wurde freigelegt und mit einem Heparin-gespülten Polyethen-Mikroschlauch (ID: 0.5 mm, OD: 1.0 mm) kanüliert. Dieser Zugang diente der direkten und kontinuierlichen Blutdruckmessung (arterieller Mitteldruck).

Die rechte V. jugularis externa wurde zur Medikamentenapplikation und Fluoreszenzfarbstoffgabe ebenfalls mit einem Mikroschlauch katheterisiert. Auch eine Dauerinfusion von physiologischer NaCl-Lösung (1 ml/h Kochsalzspüllösung 0.9%, Delta-Pharma, Boehringer Ingelheim) wurde durch eine Spritzenpumpe (Perfusor segura FT, B. Braun, Melsungen) über den venösen Zugang verabreicht.

1.3. Muskelpräparation

Zunächst wurde das Versuchstier auf einen Objektisch aus Plexiglas, der mit dem Mikroskopisch des Intravitalmikroskops verschraubt werden konnte, umgelagert. In diesen Objektisch war auf einem Sockel ein rundes Objektglas (circa 4 cm²) innerhalb einer mit Flüssigkeit füllbaren Kammer so eingelassen, dass eine Beobachtung im Durchlicht möglich

war. Über dieses Objektivglas konnte dann später der aufgeschnittene M. cremaster ausgespannt werden (Abb. 3).

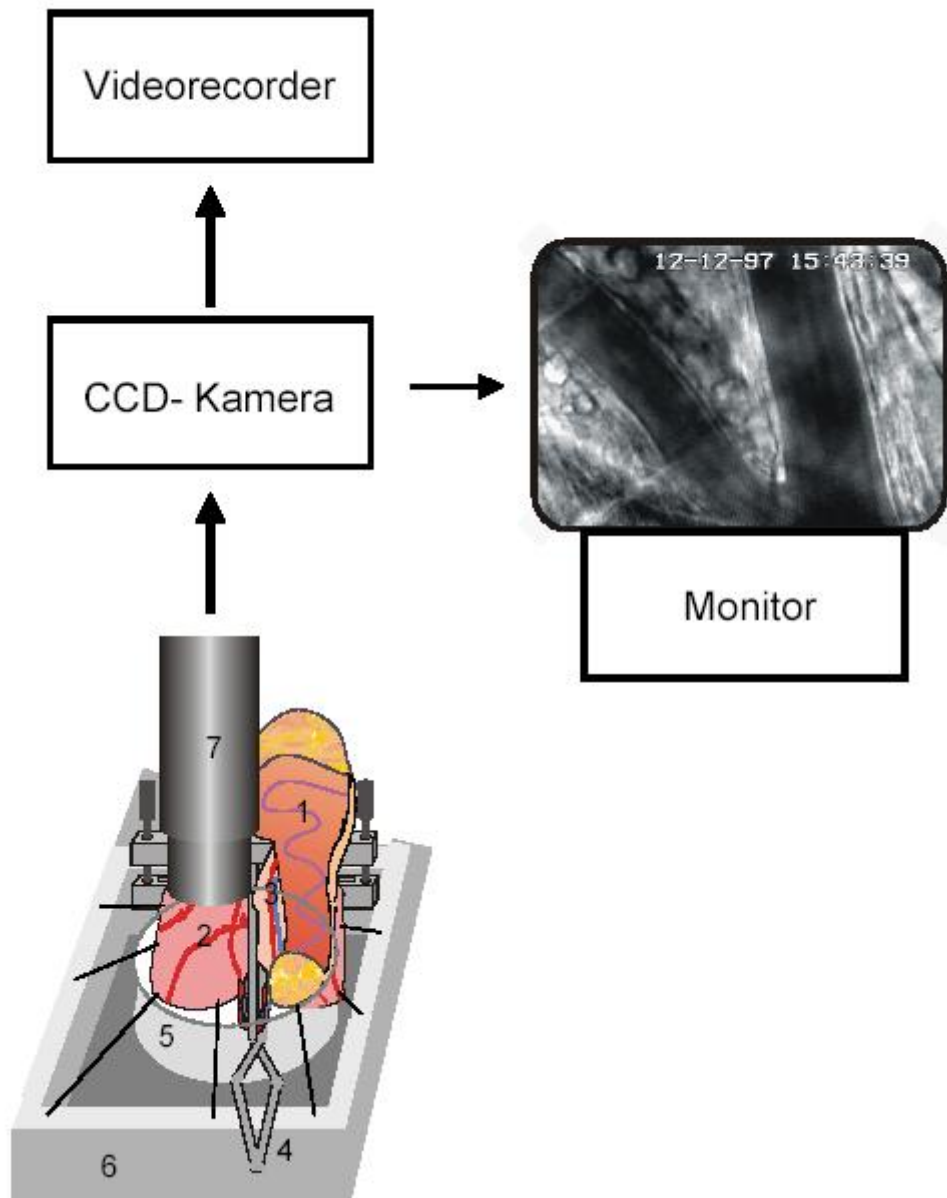


Abb. 3. Schematische Darstellung des Versuchaufbaus. Die Vorgänge im Gefäßbett des M. cremaster werden durch das Intravitalmikroskop sichtbar gemacht, von der CCD-Kamera erfasst und von dem Videorecorder zur späteren Auswertung auf ein Videoband aufgenommen.

1. Hoden mit Nebenhoden
2. M. cremaster mit Gefäßen
3. mesorchiales Ligament

4. chirurg. Klemme
5. Objektträger
6. Flüssigkeitskammer

7. Intravitalmikroskop

Eine thermostatgeregelte Heizmatte (Elmedex Electronic HB, Björklinge, Schweden) mit angeschlossenem Temperaturfühler (Thermistorfühler, Yellow Springs Instrument Co., Yellow Springs, OH, USA) unter dem Tier verhinderte ein Auskühlen während der gesamten Versuchsdauer. Für alle Ischämie Modelle ist es extrem wichtig, die Temperatur unter strikter Kontrolle zu halten, weil erstens auch eine nur leichte Temperaturreduktion das Ausmaß eines zu messenden Schadens reduzieren kann (68) und zweitens kann ein (auch nur transienter) Hitzestress in einer Produktion von heat-shock-Proteinen resultieren und ischämiebedingte Effekte verfälschen (26). Um auch das aufgespannte M. cremaster-Gewebe auf einer konstanten Temperatur von 37 °C zu halten, wurde die Flüssigkeitskammer des Objektisches mit gewärmter, isotonischer Elektrolytlösung durchspült und die Kammer mit haushaltsüblicher Klarsichtfolie (Polyethylen, Selina) abgedeckt.

Die M. cremaster-Präparation wurde durchgeführt in Anlehnung an die Methode von Baez (11) in einer Modifikation nach Hill (76). Nach Rasur wurde das Skrotum durch eine paramediane Längsinzision mit Hilfe eines elektrokauterisierenden Messers (Erbe Simplex, EE Erbe Elektromedizin, Tübingen) eröffnet. Um ein Austrocknen des Präparates zu verhindern, wurde es ab diesem Zeitpunkt bis zum Ende der Präparation mit einer Elektrolyt-Puffer-Lösung (Tyrode-Lösung) betropft. Deren Zusammensetzung war wie folgt: NaCl 131.9 mM, KCl 4.7 mM, CaCl₂ 2.0 mM, MgCl₂ 1.2 mM, NaHCO₃ 18 mM. Diese Superfusion wurde mit einem Gasgemisch aus 95% NO₂ und 5% CO₂ äquilibriert, um einen konstanten pH-Wert von 7.35-7.40 zu gewährleisten.

Durch stumpfe und atraumatische Dissektion erfolgte unter stereomikroskopischer Sicht die Abpräparation des Bindegewebes vom Muskel, um später eine höchstmögliche Transparenz des Gewebes sicherzustellen. Als nächstes wurde mit einer chirurgischen Wundnadel (G 312/16, Acufirm) ein 5/0-USP-Faden (Polyester, Traumatil Catgut GmbH, Markneuenkirchen) durch die Spitze des M. cremaster gezogen und der Muskelsack auf der ventralen Seite von der Spitze bis zur Basis aufgeschnitten. Mit acht bis zehn Befestigungsnähten wurde der M. cremaster über dem Objektglas aufgespannt (Abb. 3). Dabei hatten die Fäden eine Spannung, die gerade so stark war, dass ein regionales Muskelfaserzittern verhindert wurde; ein Problem, welches bei zu geringer Spannung auftreten kann (11). Zuletzt wurden der Muskel sowie der zur Seite geschobene Hoden nach Befeuchtung durch die Superfusionslösung mit der Klarsichtfolie faltenfrei abgedeckt, sodass das Gewebe keinen Kontakt zum Luftsauerstoff hatte und ausschliesslich durch den Blutkreislauf versorgt wurde.

2. Ischämie

Um die Blutzufuhr des M. cremaster zu unterbrechen, konnte ein kleiner Metallbalken, der zur Gewebeschonung mit einem Polyvinylchloridschlauch umhüllt war, auf den Untersuchungstisch geschraubt werden. Mit diesem wurde ein kontrollierter Druck auf den Muskel proximal der Untersuchungsstelle ausgeübt, sodass der Blutzufluss durch die zuführenden Gefäße unterbrochen wurde (Abb. 3).

Für die Platzierung des Balkens wurde der Hoden mitsamt dem mesorchialen Ligament und den darin verlaufenden Gefäßen mit einer Pinzette angehoben und in dem Bindegewebe zwischen dem Ligament und M. cremaster eine Öffnung geschaffen. Durch diese wurde der Metallbalken geführt und mit zwei Schrauben locker befestigt. Um eine Perfusion des Muskelgewebes aus den Gefäßen des mesorchialen Ligaments zu unterbinden, wurde eine chirurgische Krokodil-Klemme (Aesculap, Tuttlingen) in longitudinaler Richtung zwischen dem Muskel und dem Ligament positioniert. Anschliessend wurde der Metallbalken unter mikroskopischer Kontrolle seitengleich soweit abgesenkt, bis der Blutfluss in einer beobachteten, distal gelegenen Arteriole sistierte.

3. Aufbau zur Intravitalmikroskopie und zum Videoaufnahmesystem

Für die Beobachtung der Mikrogefäße und der Leukocyten im M. cremaster wurde ein Intravitalmikroskop (Leitz, Wetzlar) mit einem 25x-Wasser-Immersions-Objektiv (SW 25/0.60; Leitz, Wetzlar) verwendet, welches für teleskopische Projektionen modifiziert war (110). Der bildgebende Strahlengang wurde mit einem Projektionsokular (1,25*) parallelisiert und durch ein Biprisma geleitet. Das Bild konnte durch Drehung des Biprismas um die Längsachse gekippt werden. Nach Passieren des Prismas wurden die Strahlen durch eine Sammellinse fokussiert.

Das mit einer Videokamera (für Durchlichtaufnahmen: Videokamera CV-50 CCD, Phillips, Niederlande, für Auflichtaufnahmen: Restlichtkamera SEM MXRi 5050, HCS Stemmer Imaging GmbH, Puchheim) erfasste Bild wurde mit eingeblendetem Versuchsdatum und -zeit (VTG Videotimer, FOR A LTD, Tokyo, Japan) von einem Videorecorder (S-VHS-Video-recorder AG 5700; Panasonic, Osaka, Japan) auf eine VHS-Videokassette aufgenommen.

Gleichzeitig ermöglichte ein Monitor (Sony Videomonitor PVM-122 CE, Japan) eine sofortige Visualisierung des untersuchten Objektes.

Das System war so aufgebaut, dass zwischen einer Durchlichtbeleuchtung und einer Auflichtbeleuchtung gewählt werden konnte. Für die vorliegende Studie wurde für die Durchmesser- und Geschwindigkeitsmessung die Durchlichtbeleuchtung verwendet und für die Leukocyten-Endothel-Interaktionen die Auflichtbeleuchtung.

Durchmesser- und Geschwindigkeitsmessung:

Als Lichtquelle diente ein stroboskopisches Blitzlichtsystem. Dieses bestand aus einer Stroboskoplampe, die durch ein Synchronisationsmodul (Strobex Modell 11360, Chadwick Helmuth, El Monte, CAL, USA) gesteuert wurde. Dieses wiederum war an das Videosignal gekoppelt. Das ungerade Halbbild des Videosignals wurde knapp vor dem Halbbildwechsel und das darauffolgende gerade Halbbild kurz danach belichtet, sodass der zeitliche Abstand beider Belichtungen 0.5 msec betrug (Doppelblitzverfahren). Durch diese Belichtungstechnik lassen sich aus Videoaufzeichnungen Geschwindigkeiten von bewegten Objekten ermitteln (siehe unten).

Leukocyten-Endothel-Interaktionen:

Für die Darstellung der LEI in Auflichttechnik diente eine 100-Watt Quecksilber-Lampe als Lichtquelle (HBO-100 W, Zeiss).

Um die Leukocyten sichtbar zu machen, wurde der fluoreszierende Farbstoff Rhodamin 6G gewählt. Dieser Farbstoff (Absorptionsmaximum von $\lambda_{\max} = 524$ nm) reichert sich in Mitochondrien an und ist eine etablierte Färbung weisser Blutkörperchen in-vivo. Die Visualisierung der Fluoreszenz wurde unter Verwendung eines Zeiss-15-Filterblocks (Exzitation 546 ± 12 nm, Emission > 590 nm) ermöglicht.

Um ein exaktes Wiederfinden der präischämisch ausgewählten Gefäßabschnitte zu ermöglichen, konnte die Position des Mikroskoptisches in horizontaler und vertikaler Achse kontinuierlich optoelektronisch mittels einer digitalen X/Y-Positionskontrolle bestimmt werden, wobei die Koordinaten auf dem Monitor eingeblendet wurden (CPAG 600, Elesta AG Elektronik, Bad Ragaz, Schweiz).

4. Versuchsdurchführung

4.1. Messung systemischer Parameter

Der arterielle Mitteldruck wurde kontinuierlich über den an einen Druckabnehmer (Statham P23 Db, Hato Rey, Puerto Rico) angeschlossenen Katheter in der A. carotis communis gemessen und auf einem Blutdruckmonitor (Servomed, Hellige, Freiburg/Breisgau) angezeigt. An diesen war ein Herzfrequenzmessgerät (Ratemeter Nr. 6618, Hugo Sachs Elektronik, Buchheim) angeschlossen. Während der gesamten Versuchsdauer wurden die Vitalparameter mit einem Thermodirektschreiber (Recorder 404, W+W Electronic, Scientific Instruments, Basel, Schweiz) kontinuierlich registriert.

Die systemischen Leukocytenzahlen im venösen Blut wurden zu Versuchsbeginn und beim letzten Messzeitpunkt bestimmt. Dafür wurde ein elektronisches Blutzellzählgerät (Modell Dn, Coulter Electronics, Herts, England) verwendet.

4.2. Versuchsablauf und Videoaufzeichnung

Der Untersuchungstisch mit dem Versuchstier wurde auf den Mikroskoptisch geschraubt und nach einer Stabilisierungsphase von 15 min wurden dem Tier 0.2 ml Rhodamin 6G (0.2 g/l saline, C.I. 45160; Basic Red 1, Sigma-Aldrich, Steinheim) als Bolus über den venösen Katheter verabreicht (entsprechend 0.5 ml/kg KG).

Unter Durchlicht wurden vier Venolen mit einem Durchmesser von circa 30-50 μm und eine Arteriole mit einem Durchmesser von circa 20-40 μm ausgewählt und deren Koordinaten notiert. Für die Durchmesser- und Geschwindigkeitsbestimmung wurden die Venolen und die Arteriole für jeweils 10 sec mit dem Doppelblitzverfahren auf ein Videoband aufgezeichnet. Um die Leukocyten-Endothel-Interaktionen zu erfassen, wurden die Venolen mit den fluoreszierenden Leukocyten unter Auflicht für jeweils 30 sec auf das Videoband aufgezeichnet. Bei den Fluoreszenzaufnahmen wurde zusätzlich durchfokussiert, um alle Zellen im Gesichtsfeld einmal scharf abgebildet zu erhalten. Anschliessend wurde der Blutfluss in dem Muskelgewebe unterbunden. Die Zeit des Ischämiebeginns wurde protokolliert.

Nach einer Ischämie von 105 min wurden je nach Versuchsgruppe entweder unfraktioniertes Heparin, niedermolekulares Heparin, Hirudin oder physiologische NaCl-Lösung verblindet

verabreicht. Das heisst, dass der Hauptuntersucher, der die intravitalmikroskopischen Aufnahmen und die spätere Auswertung durchgeführt hat, bei der Applikation nicht anwesend war. Ein zweiter Untersucher hat die Boli und die Infusionslösungen verabreicht. Die Konzentrationen waren so berechnet, dass alle Infusionslösungen mit 3ml/h verabreicht wurden, so dass der Hauptuntersucher auch daraus nicht auf die gerade verwendete Substanz schliessen konnte.

Die Dosierungen (jeweils pro kg KG) waren wie folgt (Bolus; Infusion über Perfusor):

-Kochsalz (NaCl 0.9 %, Delta-Pharma, Boehringer Ingelheim): 3 ml, 3 ml/h

-UFH ((Heparin-Natrium), Liquemin[®], Roche): 400 IE; 100 IE/h

-LMWH ((Enoxaparin), Clexane[®], Rhône-Poulenc Rorer) : 100 IE (anti-FXa IE); 3 ml/h NaCl

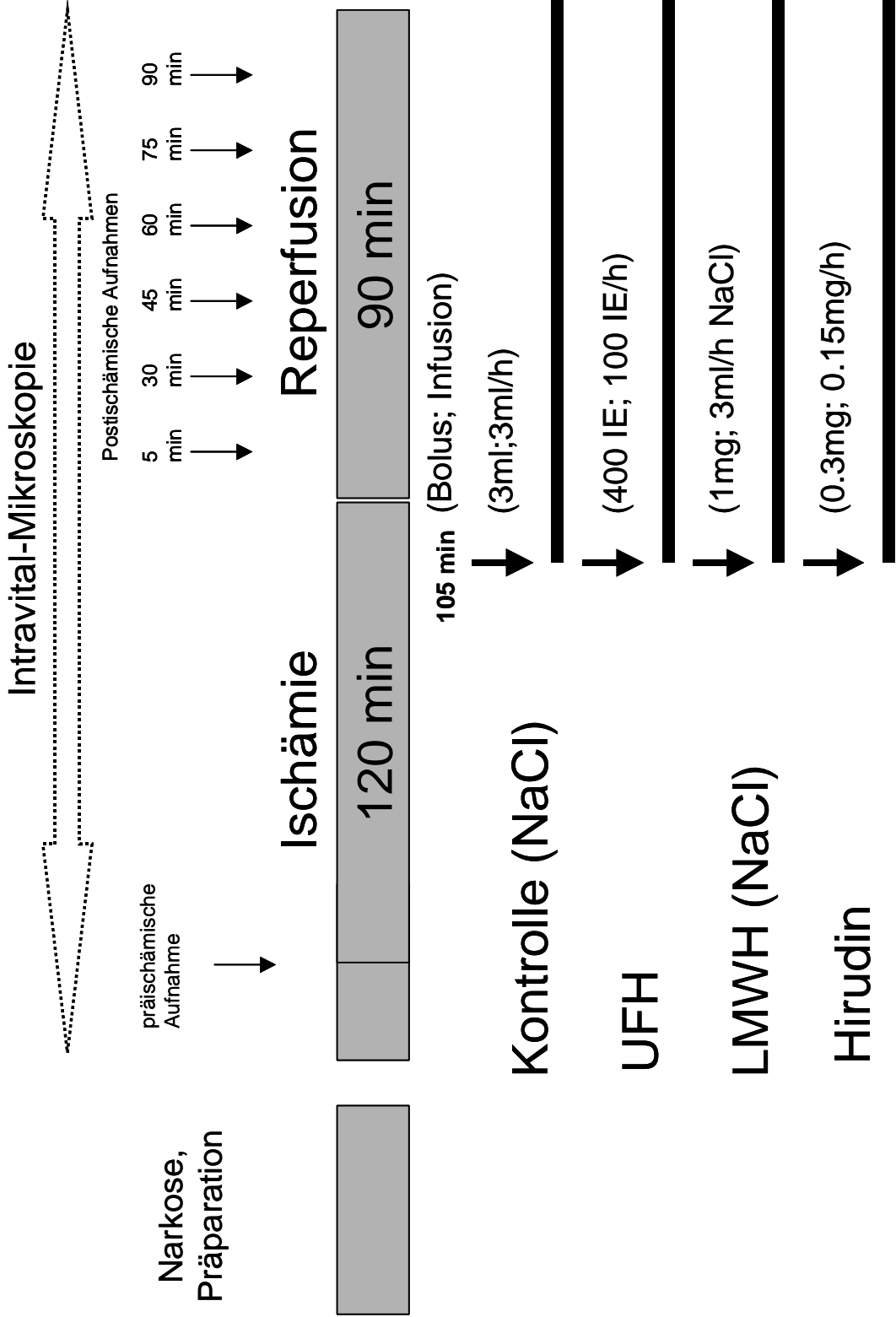
-Hirudin ((Lepirudin), Refludan[®], Hoechst Marion Roussel): 0.3 mg; 0.15 mg/h

Die Dosierung und Darreichung der drei Antikoagulanzen war so ausgewählt, dass von äquipotenten antikoagulatorischen Effekten ausgegangen werden konnte. Die Dosis für Hirudin entsprach derjenigen in klinischen Studien mit Hirudin bei ACS (183). Auch die Dosierungen für LMWH wurde in Anlehnung an klinische Studien, wo dieses als Antikoagulans bei ACS untersucht wurden, gewählt (99, 66, 91). Aufgrund der langen Halbwertszeit des LMWH (16) wurde dieses nur als Einmalbolus mit nachfolgender NaCl-Infusion verabreicht. Aus Gründen der äquipotenten antikoagulatorischen Potenz lag die gewählte Dosis für UFH bei 400 IE + 100 IE/h. Dieser Wert ergab sich aus den Erfahrungen mit Hirudin und UFH bei Kardio-Pulmonalen-Bypass-Operationen, wo bei den gewählten Dosierungen vergleichbare antikoagulatorische Effekte erzielt werden.

Nach 120 min Ischämie wurde die Perfusion wiederhergestellt, indem zuerst der Balken hochgeschraubt und dann die Klemme entfernt wurde. Fünf Minuten wurden zur Stabilisierung der Perfusion des Muskelgewebes bis zur ersten Aufnahme abgewartet. Dann erfolgten wieder Aufnahmen entsprechend der präischämischen Aufnahme zu den Zeitpunkten 5 min, 30 min, 45 min, 60 min, 75 min und 90 min Reperfusion.

Nach Beendigung eines Versuches wurde das Tier mit einer intravenösen Gabe von 0.5 ml Narcoren[®] (Pentobarbital-Natrium 16 g/100 ml, Rhone Merieux) getötet.

VERSUCHSABLAUF



5. Versuchsauswertung

5.1. Technische Grundlagen

Für die Auswertung der Aufzeichnungen wurde ein PC-gestütztes Videobildanalyzersystem verwendet (151, 152). Die Hardware-Bausteine bestanden aus einem Videorecorder (Panasonic AG-7355, Japan) mit angeschlossenem Bildschirm (PVM-146E, Sony, Japan), ein dazwischengeschalteter Kontrastverstärker sowie ein IBM-kompatibler Personalcomputer (PAC OMP), der mit einer Videobild-Prozessorkarte (FG 100 AT, Imaging Technology Inc., Woburn, MA, USA) bestückt war. Diese Prozessorkarte digitalisierte die Videobilder mit einer acht Bit Auflösung in 512x512 Bildelementpunkte (Pixel) und speicherte die Information in einen 512x512x12 Bit Bildspeicher. Der Ausgang des Digitalisierers war mit dem Monitor verbunden. Die Computermaus konnte dabei benutzt werden, um interaktiv Linien bzw. Areale auf dem Bildschirm festzulegen.

Die Softwareelemente wurden alle in Turbo Pascal (Borland Inc.) und Assembler entwickelt. Die Messweltergebnisse erschienen am Ende entweder numerisch oder graphisch auf dem Bildschirm und konnten für den späteren Gebrauch in ASCII Textdateien gespeichert werden. Um Durchmesser oder allgemein definierte Längenbereiche zu messen, konnte interaktiv mit Hilfe des Cursors eine Messlinie generiert werden. Diese einblendbare und in Lage und Länge interaktiv steuerbare Cursorlinie erschien auf dem aktuellen Videobild. Die Präzision und Genauigkeit der Längenmessung war abhängig von der benutzten Bildvergrößerung und war am unteren Ende begrenzt durch einen Wert entsprechend 1 Pixel.

Die Blutflussgeschwindigkeit wurde off-line mit Hilfe des Prinzips der räumlichen Korrelation ermittelt. Mittels dieser wurde die Wegverschiebung von Helligkeitsintensitätsmustern (entspricht den Erythrocyten) in einem Gefässabschnitt entlang einer interaktiv definierten Korrelationslinie innerhalb eines festgelegten Zeitintervalls bestimmt. Dabei wurden die Intensitätsmuster zweier aufeinanderfolgender Videohalbbilder miteinander korreliert, darüber die Wegstrecke s ermittelt und gemäss $v = \Delta s / \Delta t$ die Geschwindigkeit des Blutstroms ermittelt. Da bei kontinuierlicher Lichtquelle und einer 50 Hz Videoaufnahme (entspricht 20 msec Zeitdifferenz der aufeinanderfolgenden Halbbilder) lediglich Geschwindigkeitsbestimmungen bis maximal 1-2 mm/sec möglich waren, wurde das asynchrone Doppelblitzverfahren eingesetzt. Mit der damit erreichbaren minimalen Zeitdifferenz von 0.5

msec zwischen den aufeinanderfolgenden Halbbildern waren Geschwindigkeiten bis circa 50 mm/sec messbar und lagen somit in dem für die vorliegende Studie notwendigen Bereich.

5.2. Arterielle und venöse Gefäßdurchmesser

Für die Bestimmung der arteriellen und venösen Durchmesser wurden die im Doppelblitzverfahren gemachten Aufnahmen verwendet. Mit Hilfe des Cursors wurde interaktiv eine Linie vertikal zur Längsachse des Gefäßabschnittes gelegt. Beginn und Ende der gelegten Linie waren jeweils die Gefäßinnenwände. Die gemessenen Werte sind auf eine Stelle hinter dem Dezimalzeichen gerundet.

5.3. Venöse Blutflussgeschwindigkeiten

Venöse Blutflussgeschwindigkeiten wurden off-line mit Hilfe des oben genannten Programmes ermittelt. Die verwendeten Aufnahmen entsprachen denen, die für die Bestimmung der Gefäßdurchmesser benutzt wurden. Die Ergebnisse sind auf eine Stelle hinter dem Dezimalzeichen gerundet worden.

5.4. Leukocyten-Endothel-Interaktionen

Für die Bestimmung der Leukocytenzahlen kamen die Aufnahmen in der Fluoreszenzlichttechnik zur Anwendung. Für die rollenden und adhärenen Leukocyten wurde jeweils ein Gefäßabschnitt von 100 μm Länge betrachtet, welcher mittels der Cursorlinie (s.o.) bestimmt wurde.

Ein Leukocyt galt als rollend, wenn er sich ständig oder zeitweise deutlich langsamer als der Blutstrom bewegte. Adhärenent war ein Leukocyt, wenn er sich über den gesamten Beobachtungszeitraum in dem beobachteten Gefäßabschnitt nicht bewegte. Dabei wurden nur diejenigen rollenden und adhärenen Leukocyten berücksichtigt, welche sich scharf abbildeten, sich also im Fokus befanden. Gezählt wurde über einen Zeitraum von 30 sec und der erhaltene Wert für die rollenden Leukocyten wurde mit zwei multipliziert, um den gewünschten Minutenwert zu erhalten. Die Abspielgeschwindigkeit der Bänder wurde manuell geregelt, um somit eine hohe Präzision beim Zählen zu garantieren.

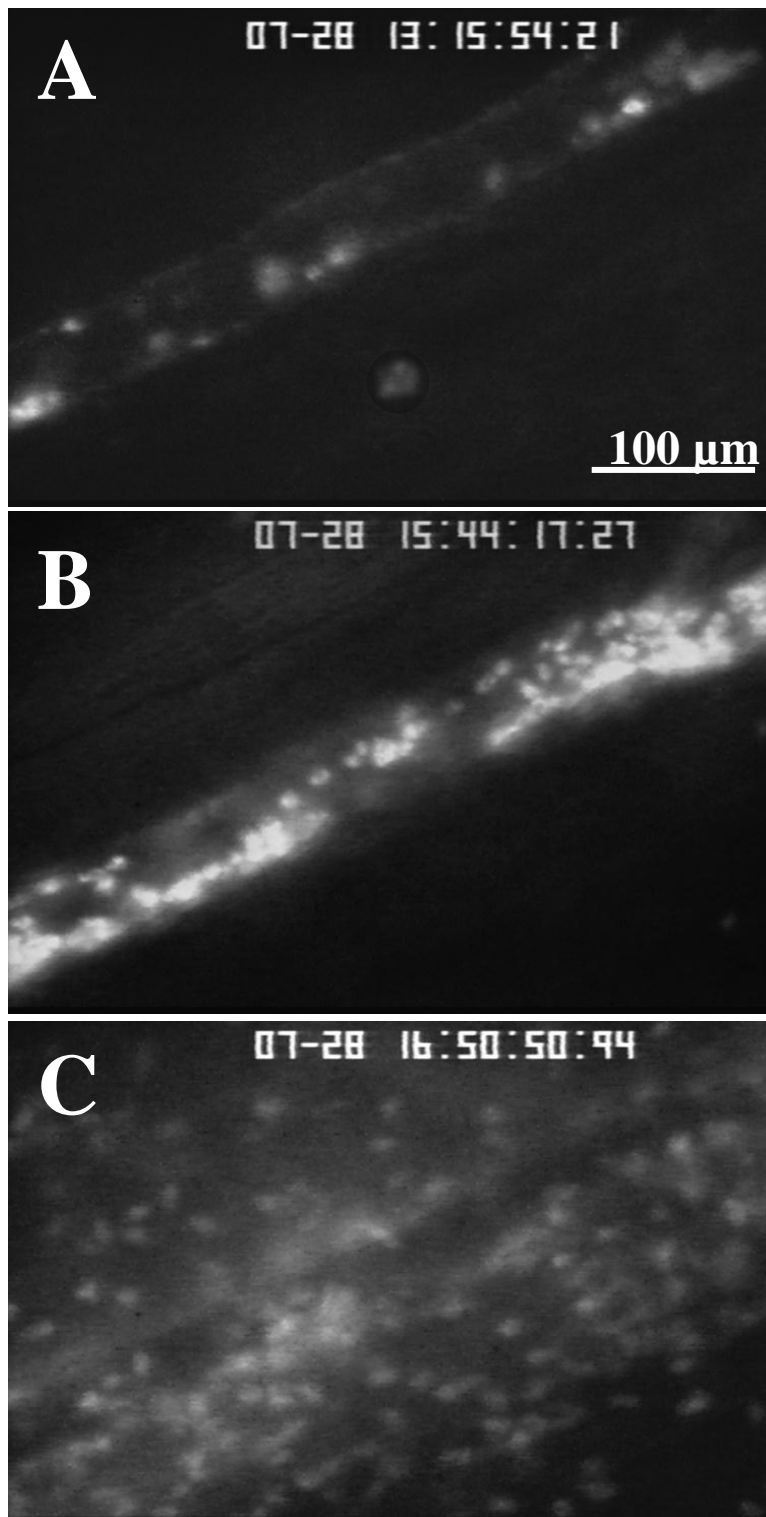


Abb. 4. Fluoreszenzaufnahmen einer postkapillären Venole vor Ischämiebeginn (A), in der frühen Reperfusionphase (B) und in der späten Reperfusionphase (90 min postischämisch) (C). Zu sehen ist das Gefäß und intravasale und extravasale Leukocyten (helle Punkte). Deutlich erkennbar ist die Zunahme an intravasal adhärenenten (B) und extravasierten Zellen (C) im zeitlichen Verlauf.

Bei der Bestimmung der extravasierten Leukocyten wurde ein Gebiet definiert, dessen Grenzen je 50 μm beidseitig der Gefässwände lag und welches eine Längenausbreitung von 150 μm aufwies. Aus Präzisionsgründen wurde dafür das Bild angehalten. Innerhalb dieses Gebietes wurden alle extravasalen Leukocyten gezählt und zwar sowohl diejenigen, die sich im Focus befanden als auch diejenigen, die beim Durchfokussieren zusätzlich sichtbar wurden.

6. Statistik

Die statistische Auswertung wurde unter Zuhilfenahme des Computerprogrammes SPSS für Windows 9.0 (Statistical Package for the Social Science (SPSS) Inc., Chicago, USA) durchgeführt.

Die erforderliche Fallzahl wurde für den Hauptzielparameter der adhärenenten Leukocyten für eine Power von 0.8 und einem α -Fehler von insgesamt 0.05 bei dreifacher Testwiederholung ($\alpha = 0.05/3$ im Einzeltest) berechnet.

Die systemischen Parameter, die Gefässdurchmesser und die venösen Blutflussgeschwindigkeiten sind jeweils als arithmetischer Mittelwert (MW) und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Das Leukocytenrollen ist als prozentualer Anteil der Ausgangswerte (= 100%) wiedergegeben. Die nicht normal verteilten Daten der Leukocytenadhäsion und -emigration sind als Boxplots mit Median und den 5%, 25%, 75% und 95% Perzentilen angegeben.

Für die systemischen Parameter Herzfrequenz und arterieller Blutdruck sowie für die Gefässdurchmesser wurde eine tabellarische Darstellung gewählt. Die Ergebnisse der venösen Blutflussgeschwindigkeit und der Leukocyten-Endohel-Interaktionen sind graphisch wiedergegeben.

Zur Überprüfung auf Signifikanzen wurden die Veränderungen im Zeitverlauf innerhalb einer Gruppe mit Hilfe des t-Tests bzw. Wilcoxon-Tests hin überprüft. Die Ergebnisse der drei behandelten Gruppen wurden im Vergleich zur Kontrollgruppe unter Verwendung des t-Tests bzw. des Mann-Whitney U-Tests auf Signifikanzen hin überprüft. Alle Testergebnisse wurden aufgrund der multiplen Vergleiche einer Korrektur nach Bonferroni-Holm unterzogen (80).

Die Abhängigkeiten der Emigration von einer vorausgegangenen Adhäsion wurden einer Korrelationsanalyse unterzogen und durch die Anwendung einer allgemeinen Schätzungs-

gleichung statistisch ausgewertet (112). Im Einzelnen wurden die Unterschiede in den Steigungen der Regressionsgeraden unter Zuhilfenahme dieses allgemeinen Modells auf Signifikanzen hin überprüft.

Als Signifikanzniveau ist immer $p < 0.05$ zugrunde gelegt.

III. Ergebnisse

1. Systemische Parameter

Herzfrequenz (HF) und mittlerer arterieller Druck (MAD) wurden bei jedem untersuchten Tier kontinuierlich über den arteriellen Katheter gemessen und zu den erwähnten Zeitpunkten protokolliert.

Zu Versuchsbeginn zeigten die Tiere in allen vier Gruppen vergleichbare Werte für die Herzfrequenz (Tab. 1). Weder zwischen den einzelnen Gruppen noch innerhalb einer Gruppe zeigten sich im weiteren zeitlichen Verlauf signifikante Unterschiede. Bei Ausgangswerten von 304 ± 11 Schläge pro Minute (SpM) erfolgte in allen Gruppen ein Anstieg der HF in der Reperfusionphase, der nach 30-45 Minuten ein Maximum erreichte und ungefähr auf diesem erhöhten Niveau bis zum Versuchsende blieb.

Der mittlere arterielle Druck blieb während des gesamten Versuchs relativ konstant (Tab. 1). Alle Gruppen zeigten lediglich geringe Ischämie/Reperfusion-bedingte Schwankungen im Zeitverlauf der Blutdruckkurven. Ausgangswerte und Werte nach 90 Minuten Reperfusion waren im Mittel 94 ± 13 mmHg und 91 ± 12 mmHg. Auch zwischen den Gruppen waren keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen.

Die Zahl sowie die Differenzierung der Leukocyten im arteriellen Blut lag bei allen Tieren zu Versuchsbeginn innerhalb der für Ratten üblichen Referenzbereiche. Eine zweite Blutuntersuchung nach 90 Minuten Reperfusion zeigte bei allen Tieren keine signifikanten Abweichungen.

2. Venöse und arterielle Gefäßdurchmesser

120 Minuten Ischämie sowie 90 Minuten Reperfusion hatten keinerlei signifikante Auswirkungen auf die Durchmesser der untersuchten postkapillären Venolen (Tab. 1). Die Werte der Kontrollgruppe wie auch der drei behandelten Gruppen wiesen einen sehr ähnlichen Verlauf auf, mit geringen Schwankungen zwischen den einzelnen Gruppen. Ausgangswerte lagen um die 37 ± 1 μm und im weiteren zeitlichen Verlauf kam es zu keinen wesentlichen Änderungen der Gefäßdurchmesser (90-Minuten Reperfusion: 36 ± 1 μm).

		präisch.	5min	30min	45min	60min	75min	90min
MAD [mmHg]	Kontrolle	95 ± 8	103 ± 8	105 ± 8	103 ± 9	99 ± 8	104 ± 6	100 ± 6
	LMWH	96 ± 5	89 ± 5	90 ± 6	92 ± 6	91 ± 5	90 ± 6	88 ± 6
	UFH	96 ± 4	95 ± 6	86 ± 3	95 ± 5	95 ± 5	95 ± 3	89 ± 3
	Hirudin	89 ± 4	84 ± 5	87 ± 4	87 ± 4	87 ± 2	82 ± 5	86 ± 4
HF [min ⁻¹]	Kontrolle	293 ± 30	310 ± 30	323 ± 31	320 ± 29	325 ± 24	333 ± 26	328 ± 25
	LMWH	295 ± 22	298 ± 28	317 ± 21	330 ± 22	315 ± 16	313 ± 26	308 ± 30
	UFH	328 ± 12	344 ± 10	350 ± 6	352 ± 17	346 ± 16	354 ± 11	348 ± 12
	Hirudin	294 ± 20	324 ± 16	336 ± 10	336 ± 16	340 ± 13	328 ± 19	330 ± 14
Diameter Arteriole [µm]	Kontrolle	35 ± 4	34 ± 5	34 ± 4	36 ± 3	37 ± 5	36 ± 5	36 ± 4
	LMWH	29 ± 4	26 ± 5	26 ± 4	25 ± 7	26 ± 6	22 ± 6	22 ± 6
	UFH	28 ± 8	29 ± 6	27 ± 5	28 ± 8	26 ± 8	28 ± 7	27 ± 7
	Hirudin	34 ± 5	32 ± 9	38 ± 5	32 ± 8	33 ± 7	34 ± 2	36 ± 3
Diameter Venole [µm]	Kontrolle	36 ± 1	35 ± 1	38 ± 4	40 ± 2	37 ± 1	36 ± 2	37 ± 2
	LMWH	35 ± 2	36 ± 2	35 ± 2	35 ± 2	34 ± 2	33 ± 2	32 ± 2
	UFH	40 ± 2	36 ± 3	38 ± 3	38 ± 3	38 ± 3	37 ± 2	37 ± 3
	Hirudin	36 ± 2	33 ± 2	34 ± 3	35 ± 3	35 ± 2	35 ± 3	35 ± 3

Tabelle 1. Veränderungen in den hämodynamischen Parametern mittlerer arterieller Druck (MAD), Herzfrequenz (HF) und arterieller sowie venöser Gefäßdurchmesser (Diameter) in Ischämie und Reperfusion. Wiedergegeben sind die Mittelwerte ± SEM der präischämischen Messung (präisch) sowie der Messungen in der Reperusionsphase zu den angegebenen Zeitpunkten in der Kontrollgruppe sowie in den behandelten Gruppen.

Auch auf der arteriellen Seite zeigten sich im ganzen Untersuchungszeitraum nur geringgradige Unterschiede, innerhalb, wie auch zwischen den Gruppen. Die Ausgangswerte der einzelnen Gruppen streuten ein wenig mehr als bei den venösen Durchmessern (28 ± 8 bis 35 ± 4). Im weiteren zeitlichen Verlauf veränderten sich die arteriellen Diameter innerhalb der vier Gruppen nur wenig. Auch zwischen den Gruppen waren die mittleren Gefäßdurchmesser nicht signifikant voneinander verschieden.

3. Venöse Blutflussgeschwindigkeiten

In der Kontrollgruppe war die venöse Blutflussgeschwindigkeit 5 min nach Beendigung der Ischämie in den untersuchten Venolen mit 0.7 ± 0.1 mm/sec geringer als vor der Ischämie (1.9 ± 0.5 mm/sec) (Abb. 5). Im weiteren zeitlichen Verlauf blieben die Geschwindigkeiten auf vermindertem Niveau. Der 90-Minutenwert der Kontrollgruppe betrug 0.5 ± 0.1 mm/sec. Die Blutflussgeschwindigkeiten in den Venolen der drei behandelten Gruppen zeigten bei Vergleich der präischämischen mit den postischämischen Werten sowie im weiteren postischämischen Verlauf sehr geringe Veränderungen. Die präischämischen Ausgangswerte lagen bei 1.18 ± 0.20 mm/sec (UFH), 1.18 ± 0.14 mm/sec (Hirudin) und 1.35 ± 0.30 mm/sec (LMWH). Beim letzten Messzeitpunkt lagen die Werte bei 1.2 ± 0.2 mm/sec (UFH), 1.4 ± 0.2 mm/sec (Hirudin) und 1.0 ± 0.3 mm/sec (LMWH). Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte beobachtet werden, dass es in allen drei behandelten Gruppen nicht zu dem postischämischen Abfall der venösen Blutflussgeschwindigkeit kam.

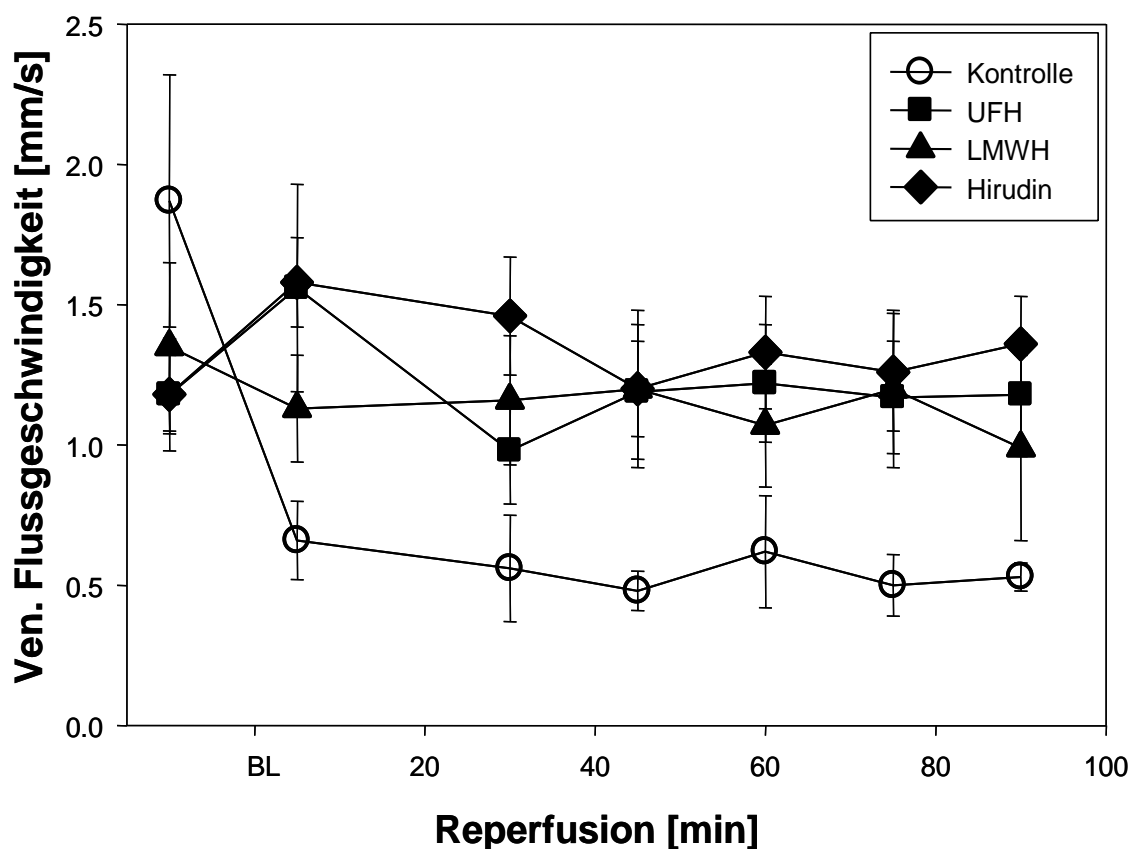


Abb. 5. Venöse Blutflussgeschwindigkeiten (in mm/sec) der vier Gruppen mit jeweils $n = 5$ zu den Aufzeichnungszeitpunkten. Aufgetragen sind jeweils Mittelwerte \pm SEM. Die Skalierung der x-Achse entspricht dem Zeitverlauf der Reperfusion in Minuten. BL = Baseline (präischämischer Ausgangswert)

4. Leukocyten-Endothel-Interaktionen

Als Leukocyten-Endothel-Interaktionen wurden in dieser Studie das Rollen der Leukocyten entlang der Gefässwand, die Adhäsion der Leukocyten an der Gefässwand und die Extravasation von Leukocyten in den perivasalen Raum angesehen. Die 120-minütige Ischämie stellte den dafür notwendigen Reiz dar. Venolen, in denen schon vor der Ischämie viele Leukocyten adhärirten (festgesetzt bei $n > 8$) oder wo schon viele Zellen ($n > 5$) emigriert waren, wurden aus der Auswertung herausgenommen.

Die drei behandelten Untersuchungsgruppen zeigten zum Teil signifikante Abweichungen von der Kontrollgruppe.

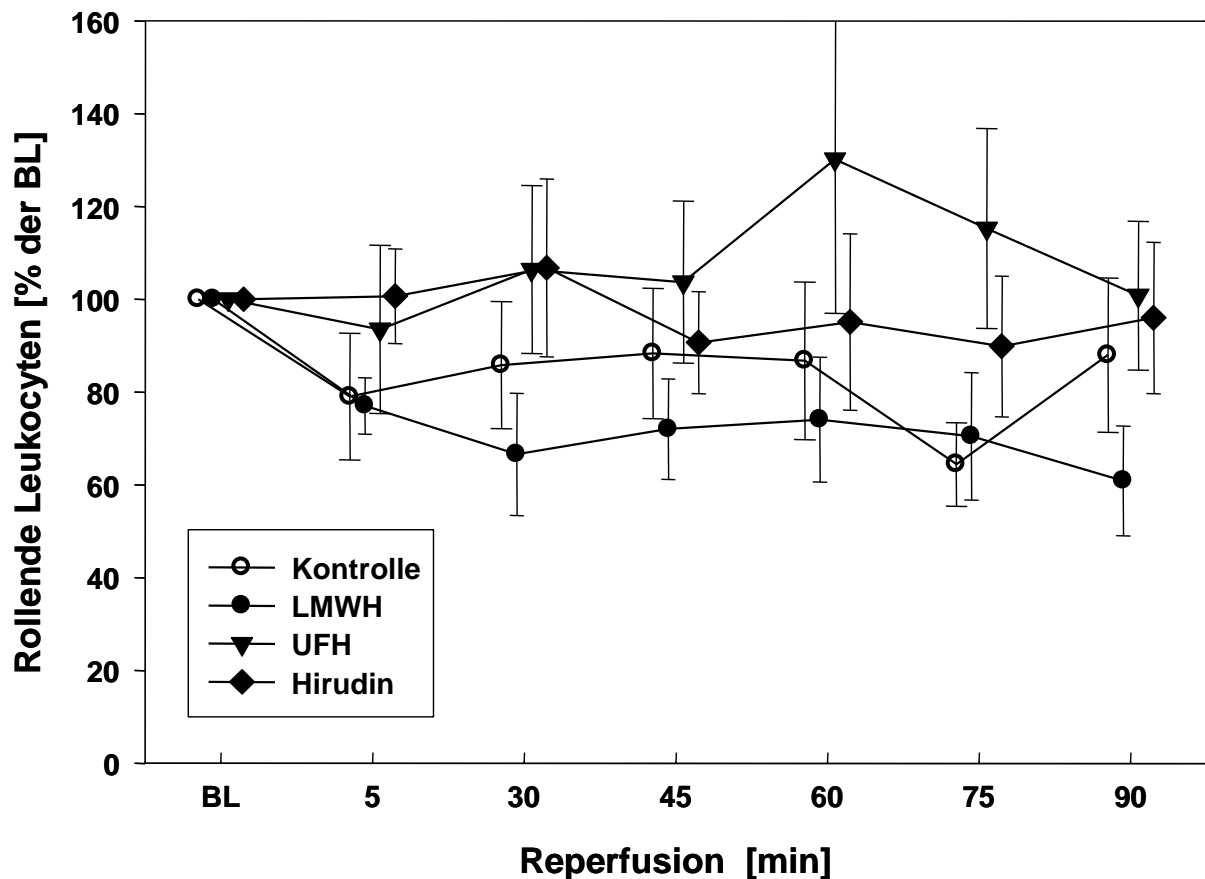


Abb. 6. Rollverhalten der Leukocyten in postkapillären Venolen (Länge des untersuchten Gefässabschnittes: 100 μm). Wiedergegeben sind die postschämischen Werte als prozentualer Anteil des jeweiligen präischämischen Ausgangswertes jeder Gruppe (Baseline (BL) = 100%). Die Ausgangswerte in absoluten Zahlen waren wie folgt: Kontrolle: 55.2 ± 31.5 Leukocyten (L), UFH: 36.4 ± 17.6 L, LMWH: 36.4 ± 17.6 L, Hirudin: 46.9 ± 15.9 L.

4.1. Leukocytenrollen

Untersuchter Parameter war die Anzahl der Leukocyten, die sich langsamer als der Blutstrom entlang der Endothelwand bewegten; dieses über einen Zeitraum von 1 min und innerhalb eines Gefässabschnitts von 100 μm Länge (Abb. 6).

In der Kontrollgruppe waren alle Werte für das postischämische Leukocytenrollen geringer als der präischämische Ausgangswert (= 100%). Beim ersten Messzeitpunkt 5 min nach Beendigung der Ischämie rollten $79.4 \pm 10\%$ Leukocyten und nach 90 min Reperfusion betrug die Anzahl rollender Leukocyten in der Kontrollgruppe $87.3 \pm 13.8\%$.

Alle drei getesteten Substanzen hatten keinen signifikanten Einfluss auf das Leukocytenrollen. In der mit UFH behandelten Gruppe betrug die Anzahl rollender Leukocyten beim ersten postischämischen Messzeitpunkt $95.5 \pm 9.8\%$. Im weiteren Verlauf konnte ein leichter Anstieg in der Zahl rollender Leukocyten beobachtet werden. Nach 90 min Reperfusion lag der Wert bei $103.6 \pm 9.6\%$. In der Hirudingruppe lag der Anteil rollender Leukocyten 5 min nach Beendigung der Ischämie bei $101.2 \pm 7.6\%$. Bei den folgenden Messwerten konnte ein minimaler Abwärtstrend festgestellt werden, zum letzten Messzeitpunkt betrug der Wert rollender Leukocyten $97.5 \pm 10.2\%$. In der Tiergruppe, die mit LMWH behandelt wurde, konnte ein milder, aber anhaltender Abwärtstrend im Leukocytenrollen während der Reperfusionsphase beobachtet werden, der aber nicht signifikant war. Hier lag der Wert zum ersten postischämischen Messzeitpunkt bei $74.3 \pm 5.6\%$ im Vergleich zum präischämischen Ausgangswert. Nach 90 min Reperfusion wurde ein Wert von $63.6 \pm 8.7\%$ rollender Leukocyten gemessen.

4.2. Leukocytenadhäsion

Untersuchte Zielgrösse war die Anzahl an Leukocyten, die innerhalb eines Gefässabschnittes von 100 μm Länge über einen Zeitraum von mindestens 30 sec fest an der Gefässwand hafteten.

Präischämisch waren in allen Gruppen nur wenige Zellen adhären. Postischämisch kam es in der Kontrollgruppe zu einem deutlichen Anstieg der Anzahl adhärenter Zellen (Abb. 7). Ein Spitzenwert von 13 (Median) wurde nach 60 Minuten Reperfusion erreicht und die Zellzahlen blieben bis zum Beobachtungsende erhöht (Median von 12 nach 90 Minuten Reperfusion).

Alle drei verabreichten Substanzen waren gleichermassen in der Lage, die Adhärenz der Leukocyten bis zum letzten Messzeitpunkt zu verringern.

In der frühen Reperfusion zeigten die applizierten Substanzen dabei zunächst noch keine sichtbaren Effekte. Wie in der Kontrollgruppe stieg die Anzahl der Zellen nach Beendigung der Ischämie an. Die mit Hirudin behandelte Gruppe erreichte einen Maximalwert an adhärenenten Zellen nach 5 min Reperfusion (Median von 9.5), in mit UFH bzw. LMWH behandelten Tieren nach 30 min (UFH: 9, LMWH: 9). Im weiteren Verlauf kam es dann in allen drei Gruppen zu einer deutlichen Verminderung der Anzahl adhärenenter Leukocyten (ab der 45. Minute signifikant gegenüber der mit NaCl behandelten Gruppe). Der stete Abfall setzte sich bis zur 90. Minute fort, wo die Werte aller drei Gruppen auf ähnlichem Niveau bei einem Median von 7 adhärenenter Zellen lagen (signifikant gegenüber Kontrollgruppe).

4.3. Leukocytenemigration

Untersuchter Parameter war die Anzahl der extravasierten Leukocyten jeweils 50 μm beidseitig perivaskulär der Venole, bei einer Länge des untersuchten Gefässabschnitts von 150 μm .

Ischämie und Reperfusion induzierten in der Kontrollgruppe einen deutlichen und steten Anstieg der Zahl emigrierter Leukocyten, von 1 (Median) Zellen zu Beginn auf 22 (Median) emigrierte Zellen nach 90 min Reperfusion (Abb. 8).

Auch in den drei behandelten Gruppen stieg die Zahl emigrierter Leukocyten innerhalb der ersten 30 Minuten in der Reperusionsphase zunächst an. Im weiteren zeitlichen Verlauf stieg die Zahl der Leukocyten, die das Gefäss verliessen, in der mit Hirudin behandelten Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe geringer an und lag nach 90 Minuten mit einem Median von 15 Zellen signifikant unter dem 90-min-Wert der Kontrollgruppe. Behandlung mit Heparin wirkte sich ähnlich aus. Auch in dieser Gruppe wurde ab der 30. Minute Reperfusion ein tendenziell schwächerer Anstieg der Anzahl emigrierter Zellen gegenüber der Kontrolle gemessen, der mit einem Median von 16 in der 90. Minute aber nicht signifikant war. Unter Behandlung mit LMWH kam es nicht zu einer Reduktion der Zahl extravasierter Leukocyten gegenüber der Kontrollgruppe. Die Anzahl emigrierter Zellen stieg in der Reperusionsphase deutlich an und erreichte in der 90. Minute einen Medianwert von 23.

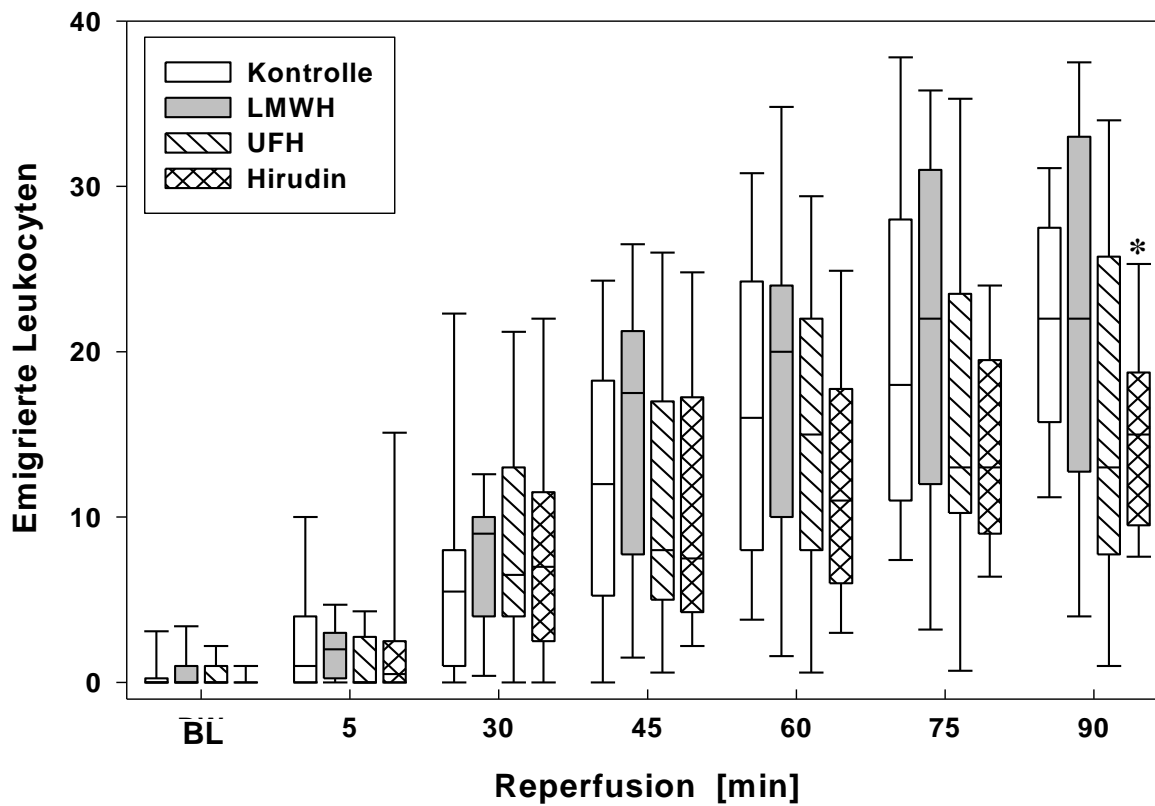
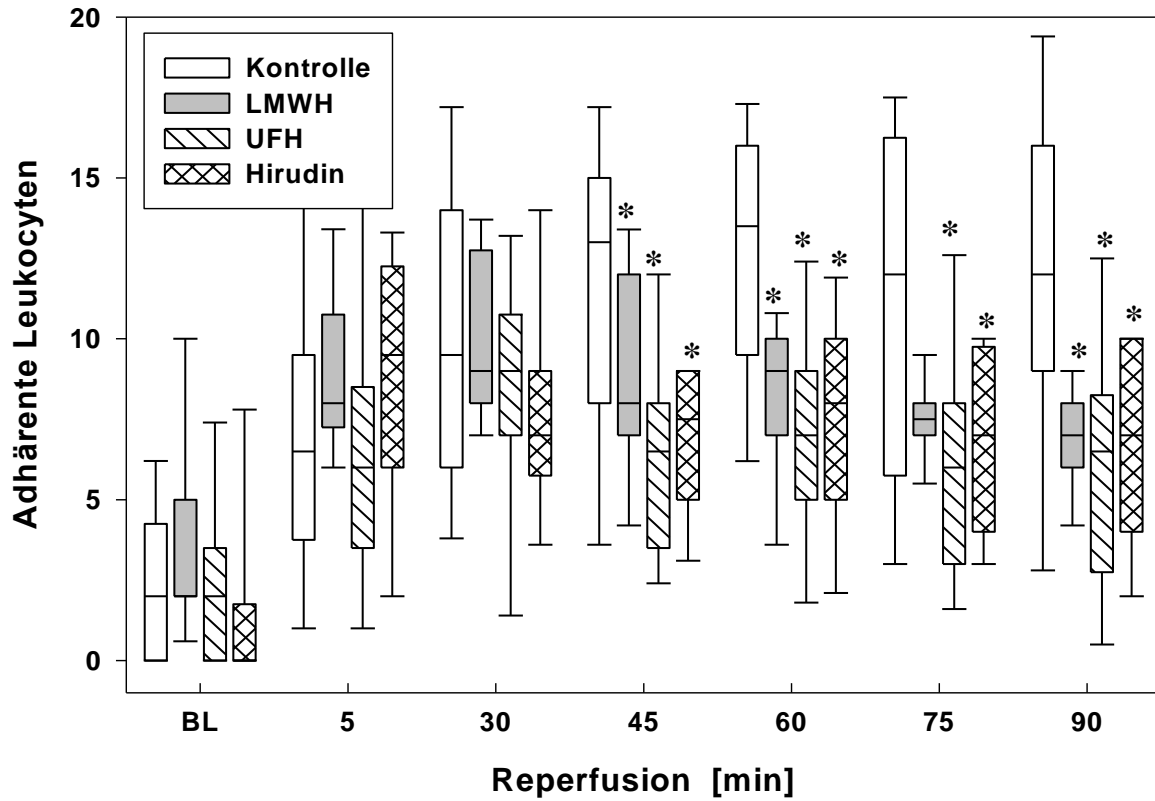


Abb. 7 + 8 Leukocytenadhäsion und Emigration. Die Zahl der adhärenen und emigrierten Leukocyten prä- und postschämisch, wiedergegeben als Boxplot mit Median und den 5., 25., 75. sowie 95. Perzentilen. BL = Baseline (präschämischer Ausgangswert), * = $P < 0.05$ versus Kontrollgruppe

4.4. Leukocytenemigrationseffizienz

Die Abhängigkeit der Leukocytenemigration von einer vorausgegangenen Adhäsion kann als Wahrscheinlichkeit oder Potenz angesehen werden, mit der ein adhärenter Leukocyt nachfolgend in das umliegende Gewebe emigriert. Dies wird als Emigrationseffizienz bezeichnet. Die Regressionsanalyse der adhärenenten gegenüber den emigrierten Leukocyt beruicksichtigt dabei den zeitlichen Abstand zwischen Adhäsion und Emigration, welcher für vorliegende Studie bei 30 min angesetzt wurde. Die Steigung der Regressionsgeraden repräsentiert dann die Effizienz von adhärenenten Zellen, nachfolgend ins Gewebe zu emigrieren.

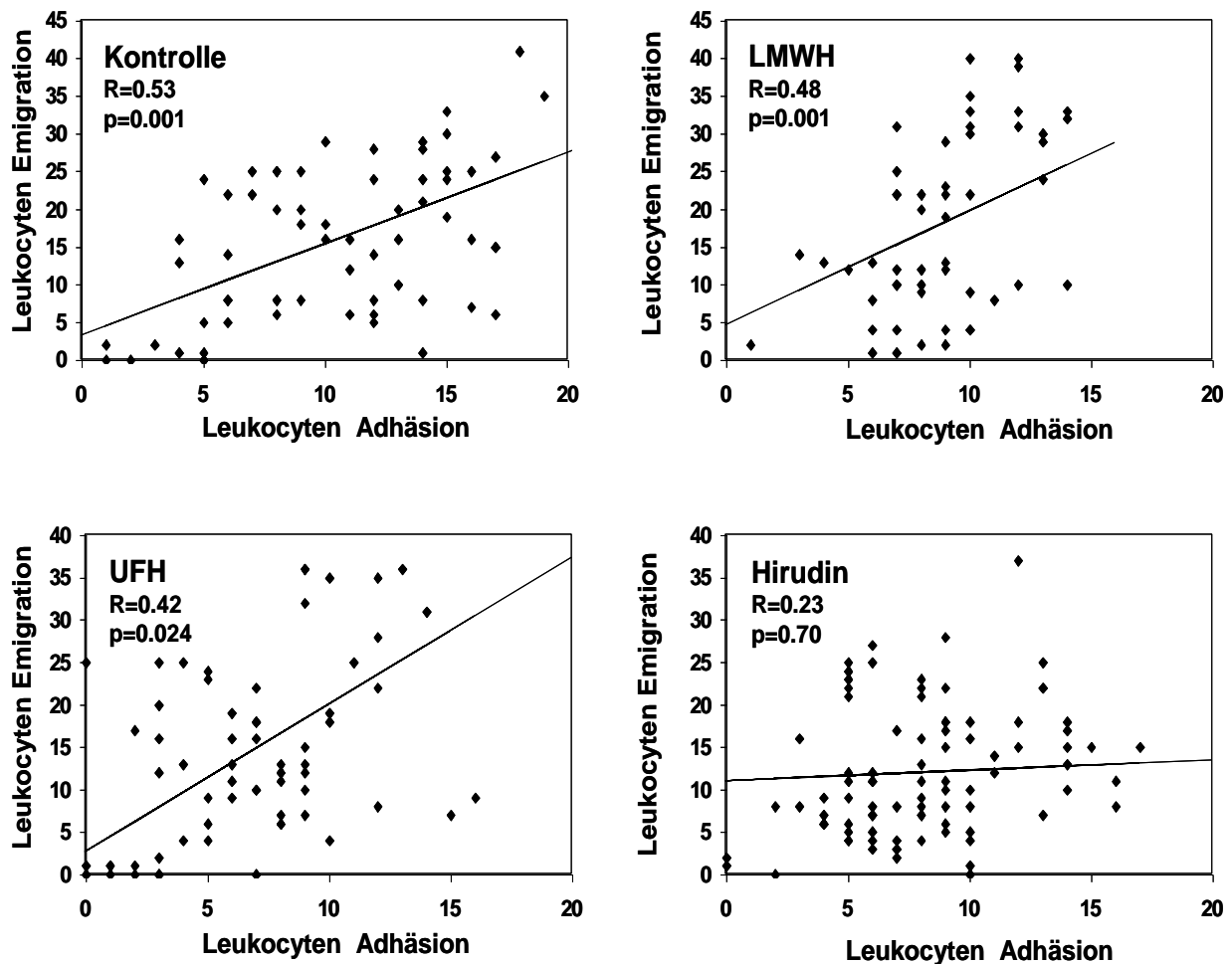


Abb. 9. Abhängigkeit der Leukocytenemigration von einer vorausgegangenen Leukocytenadhäsion (Emigrationseffizienz) Aufgetragen sind auf der x-Achse (numerische Skalierung) die Anzahl der adhärenenten Zellen in den verschiedenen Gruppen (Kontrolle, LMWH, UFH, Hirudin) und auf der y-Achse (numerische Skalierung) die Anzahl emigrierter Zellen mit einer zeitlichen Verzögerung von 30 min. Die Steigung der ermittelten Regressionsgeraden gibt die Emigrationseffizienz wieder.

In der Kontrollgruppe zeigt sich eine deutliche Abhängigkeit der Emigration von der vorausgegangenen Adhäsion ($R = 0.53$, $p < 0.001$) mit einer Steigung (entspricht der Emigrationseffizienz) der Regressionsgeraden von 1.21 (Abb. 8). In der mit LMWH ($R = 0.48$, $p < 0.001$) und in der mit UFH ($R = 0.42$, $p < 0.024$) behandelten Gruppe zeigten sich keine Unterschiede zur Kontrollgruppe. Die Werte für die Steigung der Regressionsgeraden betragen 1.51 für LMWH und 1.74 für UFH. In der mit Hirudin ($R = 0.23$, $p < 0.70$) behandelten Gruppe war die Steigung der Regressionsgeraden mit 0.12 signifikant geringer als in der Kontrollgruppe.

IV. Diskussion

Die hier vorliegende Studie kam zu folgenden Ergebnissen:

1. Ischämie und Reperfusion führen in einem Skelettmuskelmodell der Ratte zu einer Leukocytenaktivierung und nachfolgender Leukocyten-Endothel-Interaktion als sichtbares und quantifizierbares Korrelat eines I/R-Schadens.
2. Die drei getesteten Antikoagulanzen UFH, LMWH und Hirudin führen in den gegebenen Dosierungen zu einer Abschwächung der LEI und somit zu einer Verringerung des I/R-Schaden gegenüber der Kontrollgruppe.
3. Bei der Betrachtung der einzelnen Stufen der Leukocyten-Endothel-Interaktionen zeigen sich zum Teil deutliche Unterschiede bei den untersuchten Substanzen: Es konnte durch keine der getesteten Substanzen ein hemmender Effekt auf das Leukocytenrollen beobachtet werden. Trotzdem waren alle drei untersuchten Antikoagulanzen in der Lage, den postischämischen Anstieg der Leukocytenadhäsion signifikant und quantitativ in ähnlichem Umfang zu verringern. In ihrem Einfluss auf die Leukocytenemigration dagegen unterschieden sich die einzelnen Substanzen. Unter der LMWH-Therapie kam es zu keiner Verringerung der postischämischen Leukocytenemigration im Vergleich zur Kontrollgruppe. Unter der UFH-Therapie war eine leichte Verringerung der Leukocytenemigration zu beobachten, doch hatte UFH keinen Effekt auf die Emigrationseffizienz. Hirudin zeigte als einzige Substanz eine signifikante Senkung in der Leukocytenemigration gegenüber der Kontrollgruppe und wirkte sich auch inhibierend auf die Emigrationseffizienz adhärenter Leukocyten aus.

1. Diskussion der Methodik

Die vorliegende Studie wurde durchgeführt, um den Einfluss der Antikoagulanzen auf I/R-bedingte Veränderungen in einem Gesamtorganismus mit lokaler Ischämie und Reperfusion zu untersuchen. Dabei ging es um den quantitativen Vergleich der antiinflammatorischen Effekte der untersuchten Antikoagulanzen auf zellulärer Ebene. Die Resultate zeigen einen möglichen zusätzlichen Mechanismus für die in klinischen Studien beobachteten überlegenen

Effekte von Hirudin gegenüber den Heparin (183). Vorliegende Studie konnte beobachten, dass Hirudin im Vergleich zu UFH und LMWH spezifische inhibitorische Effekte auf die Emigration adhärenter Leukocyten ausübt, während Leukocytenrollen und die Adhäsion nicht unterschiedlich beeinflusst werden.

Durch den Einsatz der Intravitalmikroskopie war es möglich, die lokal auftretenden zellulären Effekte zu beobachten und zu quantifizieren. Solche lokalen Effekte sind in-vitro nicht nachzuweisen. Die möglichen zugrundeliegenden Mechanismen der in dieser Studie gemachten Beobachtungen auf einem subzellulärem oder molekularem Niveau sind in der Literatur bereits zahlreich beschrieben worden.

Die vorliegende Studie ist rein experimenteller Natur und hatte das Ziel zu untersuchen, ob Antikoagulanzen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen die inflammatorischen Reaktionen nach I/R unterschiedlich beeinflussen können. Dazu wurde ein Experimentalmodell mit sorgfältig kontrollierten Bedingungen von Ischämie und Reperfusion gewählt. Ob diese Effekte auch klinisch bei der Behandlung von Patienten mit ACS auftreten oder gar das Outcome dieser Patienten beeinflussen können, kann aus den Ergebnissen nicht abgeleitet werden. Dies gilt um so mehr, als die Antikoagulanzen in der Klinik mit Thrombocytenaggregationshemmern, wie ASS, Clopidrogel oder GP IIa/IIIb-Rezeptorblockern, kombiniert werden, welche ebenfalls antiinflammatorisch wirken können (25).

Die Dosierung für Hirudin wurde in Anlehnung an klinische Studien gewählt, bei denen Hirudin als Antithrombin bei Akuten Koronarsyndromen untersucht wurde und ein überlegener Effekt des Hirudins über UFH beobachtet werden konnte. Auch die verwendete Dosierung für LMWH (100 anti-FXa-IE/kg) stammt aus klinischen Studien über LMWH bei ACS mit Dosierungen von 100-120 IE (66, 91, 99). Von diesen Studien stammt auch das verwendete Dosierungsschema des LMWH, bei denen es als einmalige Bolusinjektion gegeben wurde und nicht, wie bei dem UFH und Hirudin mit anschließender Infusion.

Zielparameter der Studie war der Vergleich der antiinflammatorischen Effekte von Antikoagulanzen. Um diesen Zielparameter untersuchen zu können, mussten Dosierungen gewählt werden, bei denen von äquipotenten antikoagulatorischen Effekten ausgegangen

werden kann, so dass etwaige Unterschiede der getesteten Substanzen durch unterschiedlich ausgeprägte antithrombotische Effekte ausgeschlossen werden können.

Um eine äquipotente antithrombotische Wirkung zu erreichen, wurde UFH in einer Dosis verwendet, bei der es nach klinischer Erfahrung aus der Herzchirurgie mit Koronar-Pulmonalem-Bypass zu einer vergleichbaren antikoagulatorischen Wirkung im Vergleich zum Hirudin kommt. Dabei handelt es sich um Werte, die deutlich höher sind als bei den in klinischen Studien mit ACS verwendeten Dosierungen (183). Die Behandlung des ACS mit ST-Elevation besteht zur Zeit regelhaft aus einer Kombination von antihrombocytären und Antithrombin-Pharmaka. Wegen der höheren Blutungskomplikationsrate bei Kombination mit einem GP IIa/IIIb-Rezeptorhemmer in der klinischen Medizin musste die Dosierung von UFH immer weiter zurückgenommen werden und entspricht demnach auch nicht der in vorliegender Studie verwendeten Dosierung.

Für Dosierungen mit äquipotenten antithrombotischen Wirkungen der drei Substanzen mussten die Erfahrungswerte aus der Herzchirurgie genommen werden, weil der direkte Vergleich anhand von Messungen problematisch ist. In der Klinik erfolgt die Überwachung der antikoagulativen Effekte durch Bestimmung von Gerinnungsaktivitäten. Eine LMWH-Therapie kann durch die anti-Xa-Aktivität überwacht werden, während zur Kontrolle von UFH-Effekten die aPTT oder ACT (activated clotting time) benutzt wird. Für das Hirudin kommt die Ecarin Clotting Time zum Einsatz. Ein Vergleich der antikoagulativen Effekte der untersuchten Substanzen mit diesen Testverfahren ist aber nicht möglich, da sich die einzelnen Tests nicht miteinander vergleichen lassen. Selbst die ACT-Tests beim UFH sind nicht miteinander vergleichbar, da sich die Ergebnisse je nach verwendeter apparativer Ausrüstung unterscheiden. Das in vorliegender Studie verwendete Applikationsschema wurde aus klinischen Studien übernommen, bei denen LMWH und Hirudin auch nach einem fixen Schema appliziert werden, ohne die Effekte bei jedem einzelnen Patienten zu überwachen. Deshalb wurde die verwendete Applikationsmethode in vorliegender Studie als adäquat und ausreichend angesehen, um antikoagulativ gleiche Ausgangsbedingungen zu erreichen, so dass sich etwaige Unterschiede in den Ergebnissen auf zusätzliche, alternative Effekte zurückführen lassen.

Aus mehreren Gründen konzentrierten sich die Untersuchungen der vorliegenden Studie auf die Leukocyten-Endothel-Interaktionen. Zum einen sind sie ein gut quantifizierbarer Parameter von I/R-bedingtem Schaden. Das Leukocytenverhalten als Zielgrösse zu wählen erscheint angesichts der Bedeutung der Leukocyten für die inflammatorischen Reaktionen beim I/R-Schaden gerechtfertigt. Die zugrundeliegenden Mechanismen und beteiligten Moleküle der LEI bei Ratte (und anderen Säugetieren) und Mensch entsprechen sich (156), so dass Erkenntnisse aus Tieruntersuchungen grundsätzlich auf den Menschen übertragen werden können.

Die Intravitalmikroskopie des M. cremaster ist eine etablierte und geeignete Methode zur Darstellung der Mikrozirkulation und der Leukocyten-Endothel-Interaktionen, da der Muskel ohne grössere chirurgische Prozeduren zugänglich ist und wegen seiner geringen Schichtdicke ein geeignetes Gewebe für die Durchlichtmikroskopie darstellt (177).

Doch trotz der Vorteile eines M. cremaster-Modells weist es im Hinblick auf diese Studie auch Nachteile auf. Einer der Hauptgründe, den M. cremaster als Untersuchungsobjekt zu wählen, ist die Möglichkeit, in-vivo-Effekte von I/R in einem Skelettmuskel zu untersuchen. Ein entsprechendes Modell mit Herzmuskelgewebe ist bis dato noch nicht etabliert. Doch muss erwähnt werden, dass die Übertragbarkeit auf kardiale Problemstellungen Schwierigkeiten mit sich bringt. In beiden Fällen handelt es sich zwar um quergestreifte Muskulatur, so dass sich die Leukocyten-Endothel-Interaktionen in beiden Geweben entsprechen. Ausnahmen in den Mechanismen der Leukocytenrekrutierung stellen Organe mit besonderen Blutkreisläufen wie die Lunge oder die Leber dar (193, 167). Doch weist auch das Myokard Besonderheiten auf. Vor allem ist die Perfusion des Myokards nicht kontinuierlich wie im Skelettmuskel, sondern phasisch mit arteriell diastolischer Dominanz und venös systolischer Dominanz (77). Doch trotz der unterschiedlichen Blutflusscharakteristika von Skelettmuskel und Myokard konnten Studien zeigen, dass die zugrundeliegenden Mechanismen der Leukocyten-Endothel-Interaktionen dadurch nicht beeinflusst werden (64).

Die Veränderungen in der Hämodynamik als auch in der Leukocytenrekrutierung wurden im Anschluss an die Mikroskopie off-line durch Auswerten der aufgenommenen Videobänder ausgewertet. Diese Methode der Auswertung ist per se subjektiv und somit potentiell

stör anfällig in Hinblick auf Ergebnisverzerrungen. Deshalb wurden zur Reduktion systematischer Fehler die einzelnen Gruppen unter verblindeten Bedingungen in Kontroll- und Substanzgruppen eingeteilt und zusätzlich wurden die Videoaufzeichnungen von einem unabhängigen Untersucher ein zweites Mal ausgewertet, wobei es zu übereinstimmenden Ergebnissen kam.

Zur Visualisierung der Leukocyten wurden diese mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 6G angefärbt. Dieser Farbstoff kann zur Darstellung von LEI nachteilig sein. Unter anderem konnte gezeigt werden, dass Rhodamin 6G Leukocytenrollen und -adhäsion in postkapillären Venolen induzieren kann, wenn eine hochenergiereiche Lichtquelle verwendet wird (161). Aus diesem Grund wird gefordert, eine leistungsfähige Restlichtkamera zu benutzen, um die Intensität der Lichtquelle nicht die kritische Obergrenze übersteigen zu lassen (161). Mit der Wahl der in dieser Studie verwendeten Restlichtkamera SEM MXRi 5050 wurde dieser Forderung Rechnung getragen.

Daneben ist bekannt, dass Rhodamin 6G einen inhibitorischen Einfluss auf die Transmigration von Leukocyten ausüben kann (1). Dies wurde aber bisher nur für Monocyten beschrieben und nicht für die neutrophilen Granulocyten. In der vorliegenden Studie wurden vorwiegend PMNs beobachtet, da Monocyten im Gegensatz zu den PMNs nur einen geringen prozentualen Anteil der Blutleukocyten ausmachen und ausserdem in Studien gezeigt werden konnte, dass in postkapillären Venolen nach Aktivierung in der Frühphase die PMNs den Grossteil der rollenden Leukocyten ausmachen (180). Aus diesen Gründen erschien die Wahl des Fluoreszenzfarbstoffes gerechtfertigt.

2. Diskussion der Ergebnisse

2.1. Systemische Parameter

Der mittlere arterielle Druck und die Herzfrequenz jedes Versuchstieres wurden kontinuierlich registriert, wobei während der gesamten Versuchsdauer von 4.5 h keine wesentlichen Veränderungen der Vitalparameter zu beobachten waren. Hauptbeweggrund der Registrierung war die Möglichkeit, diese Parameter als Bezug für vergleichbare Ausgangsbedingungen für die Versuchsreihe heranzuziehen. Gleiche Ausgangsbedingungen sind eine Voraussetzung für

die Vergleichbarkeit aller gemessenen Daten. Daher kam es darauf an, signifikante Unterschiede zwischen den Vitalwerten der Tiere zu Versuchsbeginn als auch im Zeitverlauf ausschliessen zu können.

Daneben diente die Messung der Kontrolle der vitalen Funktionen des gerade untersuchten Tieres, um bei akuter Verschlechterung rasch Gegenmassnahmen einzuleiten zu können.

2.2. Hämodynamische Parameter

In vorliegender Studie wurde 5 Minuten nach Beginn der Reperfusion die erste postischämische Aufnahme gemacht. Diese Zeitspanne war aus technischen Gründen notwendig.

In den ersten Minuten herrschte eine ausgespochene Heterogenität im Blutfluss. In einigen Venolen und auch Arteriolen war postischämisch ein normaler Fluss zu beobachten, in anderen, zum Teil direkt angrenzenden, floss das Blut nur sehr stockend oder sistierte und der Fluss erholte sich erst nach ein paar Minuten. Obwohl in der Literatur eine postischämische, arterielle Vasokonstriktion in einem M. cremaster-Modell beschrieben wird (170), lassen sich die in vorliegender Studie beobachteten Perfusionsunterschiede in der frühen postischämischen Phase nicht auf eine I/R-bedingte Tonusveränderung zurückführen, da sich in der Reperfusionsphase die arteriellen als auch die venösen Durchmesser kaum veränderten, wie die Ergebnisse vorliegender als auch weiterer Studien zeigen (140, 155).

Eine weitere, beobachtete Veränderung in der Hämodynamik war ein Abfall der venösen Blutflussgeschwindigkeit in der Kontrollgruppe auf fast 30% des Ausgangswertes. Veränderungen der venösen oder arteriellen Durchmesser können aufgrund der vorliegenden Ergebnisse ausgeschlossen werden. Am wahrscheinlichsten ist die Reduktion der venösen Blutflussgeschwindigkeit auf Veränderungen im Kapillarsystem zurückzuführen. Ischämie und Reperfusion können eine endotheliale oder perivaskuläre Ödembildung in den Kapillaren mit resultierender Beeinträchtigung des Blutflusses induzieren (125). Zusätzlich zeigen durch I/R aktivierte PMNs eine Verringerung ihrer Verformbarkeit und können deshalb kapilläre Gefässe verstopfen, ein Phänomen, dass als „capillary plugging“ bezeichnet wird (71). Diese resultierenden Störungen im Blutfluss des Kapillarbettes wirken sich dann auch auf den Blutfluss in den nachgeschalteten Venolen aus, auch wenn diese morphologisch unverändert erscheinen. Vorliegende Studie hat das Kapillarsystem nicht untersucht, sodass die Überlegungen spekulativer Natur sind. Ebenso hypothetisch sind die Erklärungen, weshalb unter

Gabe der Antikoagulanzen keine postischämischen Veränderungen in der Blutflussgeschwindigkeit auftraten. Wahrscheinlich ist dies auf antithrombotische Effekte der Antikoagulanzen im Kapillarsystem zurückzuführen.

2.3. Leukocyten-Endothel-Interaktionen

Leukocyten sind die hauptsächlichen Mediatoren in I/R-induzierter Inflammation. Sie beinhalten ein ausgeprägtes zytotoxisches Potential durch synergistische Effekte von exocytosierten Granulabestandteilen und der Bildung von reaktiven Sauerstoffmetaboliten (69). Die intravaskuläre Aktivierung von Leukocyten und deren inflammatorischer Rekrutierung spielt daher eine grundlegende Rolle in der Initiierung und Entstehung von I/R-Schäden (30, 52, 67, 164). Darüberhinaus konnte in experimentellen Studien deutlich gezeigt werden, dass eine Inhibition der Leukocytenaktivierung und -rekrutierung zu einem verminderten I/R-Schaden beiträgt (27, 30, 69, 207).

2.3.1. Leukocytenrollen

Die Beobachtung des Rollverhaltens der Leukocyten in den postkapillären Venolen liess erstens erkennen, dass die präischämischen Ausgangswerte in allen Gruppen sehr hoch und sehr heterogen waren und dass Ischämie und Reperfusion keinen sichtbaren Anstieg der Rollzahl induzierten. Zweitens zeigte sich, dass keine der getesteten Substanzen eine signifikante Reduktion des postischämischen Leukocytenrollens im Vergleich zur Kontrollgruppe bewirkte (Abb. 6).

Der hohe Anteil an rollenden Leukocyten vor Beginn der Ischämie lässt sich am ehesten mit dem Studiendesign begründen. Das M. cremaster-Modell ist für eine Beobachtung von Leukocyten-Endothel-Interaktionen in I/R nicht optimal, da die Präparation und Auslagerung des Muskels, wie atraumatisch auch vorgegangen wird, per se einen, wenn auch milden Entzündungsreiz darstellt. Dieser ist in der Lage, einen gewissen Aktivierungsgrad des Endothels zu bewirken (im Sinne einer erhöhten Leukocytenrollrate), aber diese rollenden Zellen würden ohne Persistenz des Stimulus in den intravaskulären Pool zurückkehren, ohne

weiterfolgende Veränderungen am Endothel oder Gewebe zu bewirken. In der vorliegenden Studie war, bedingt durch die Präparation, eine hohe Anzahl rollender Zellen präischämisch zu beobachten, aber eine sehr geringe Anzahl an adhärenenten oder emigrierten Zellen. Dieses Phänomen des präparationsbedingten Leukocytenrollens zeigte sich u.a. auch in anderen Studien aus dem gleichen Labor, wo aber auch beobachtet werden konnte, dass es mit zunehmender Länge des Zeitraumes zwischen Präparationsende und Aufzeichnungsbeginn rückläufig war (155). Angesichts der langen Zeitspannen für die Ischämie und Reperfusion im vorliegenden Versuchsprotokoll musste die Stabilisierungsphase kurz gehalten werden (15 min), um nicht gegen Ende des Versuches eine Verschlechterung des Präparates hinnehmen zu müssen, sodass eine Auswertung nicht mehr in Frage gekommen wäre.

Eine weitere Beobachtung des Leukocytenrollens war, dass die Zahlenwerte in den untersuchten Venolen aller vier Gruppen stark streuten. Dieses Phänomen war präischämisch als auch postischämisch zu beobachten und ist verantwortlich für die hohen Standardabweichungen in den Ergebnissen. Diese Beobachtung findet sich auch in den Ergebnissen anderer Studien mit Leukocytenrollen in I/R. Zum Beispiel wird in einer experimentellen Studie eine ausgesprochene und nicht nach Gauss normalverteilte Heterogenität im Leukocytenrollen in einem Mesenterium-I/R-Modell mit präischämischen Werten von 12-188 rollenden Zellen/min beschrieben (180). Auch in einem I/R-Modell mit M. cremaster konnten solche Beobachtungen gemacht werden (170). Doch wenn man in vorliegender Studie jede Gruppe einzeln für sich nimmt, ist festzustellen, dass das Rollverhalten konsistente Einzelverläufe zeigte und in den einzelnen Untersuchungseinheiten in sich konsistent war.

In vorliegender Studie konnte beobachtet werden, dass I/R keinen Anstieg in der Zahl rollender Leukocyten in der Reperfusionsphase induzierte. In der Literatur finden sich zwar Studien, in denen auch beobachtet wurde, dass es postischämisch zu keinem Anstieg des Leukocytenrollens kam (170). Dennoch ist bekannt, dass I/R ein Leukocytenrollen induziert (155). Es ist anzunehmen, dass Ischämie und Reperfusion in vorliegender Studie keinen zusätzlichen Reiz für das Leukocytenrollen darstellten, aber dafür starke Induktoren der Leukocytenadhäsion und -emigration waren.

Interessanterweise war durch keine der getesteten Substanzen eine signifikante Verringerung des postischämischen Leukocytenrollens zu beobachten. In der Literatur ist jedoch vielfach beschrieben, dass unfraktioniertes Heparin ein Inhibitor von Leukocytenrollen ist (108, 180, 206). Verschiedene zugrundeliegende Wirkmechanismen werden dabei diskutiert: Leukocytenrollen ist selektinabhängig und UFH inhibiert die Bindung von P- und L-Selektin an ihre physiologischen Liganden (137, 95), woraus eine Inhibition des Rollens resultieren kann. Die erhöhte Expression von P-Selektin während längerandauernder I/R ist ein Resultat der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (205) und kürzlich wurde beschrieben, dass UFH auch spezifisch die Aktivierung dieses Faktors zu inhibieren vermag (185). Doch kommt zumindest als Ursache der Reduktion von Leukocytenrollen der Mechanismus über die Inhibition von NF- κ B bei kurzen Ischämien wie in vorliegender Studie nicht zum Tragen. Schliesslich ist neben den bereits diskutierten Induktoren FXa und Thrombin auch das Komplementsystem (132) am Zustandekommen von Leukocytenrollen beteiligt und auf alle Agonisten übt UFH einen inhibitorischen Einfluss aus.

Dass UFH in vorliegender Studie keinen Effekt auf das Leukocytenrollen hatte, kann verschiedene Ursachen haben: Zum einen kann der Grund in der Dosierung (400 IE/kg KG + 100 IE/kg KG/h) liegen. Es lässt sich nicht ausschließen, dass diese Dosierung des UFH in vorliegendem I/R-Modell des M. cremaster der Ratte keinen Effekt zeigt. Wie Xie und Kollegen zeigen konnten, ist der inhibitorische Effekt von UFH auf das Rollen nicht linear konzentrationsabhängig, sondern zumindest biphasisch (206). Sehr geringe Dosierungen (2 und 20 IE/ml) und sehr hohe Dosierungen (1000 IE/ml) inhibierten Rollen in mesenterialen Venolen von Ratten, während Dosierungen dazwischen weniger effektiv waren. Es ist eine Limitation dieser Studie, dass kein Monitoring der UFH-Aktivität durchgeführt worden ist und somit nicht bekannt ist, welche genaue Plasmakonzentration in dem jeweiligen Versuchstier vorgelegen hat. Die genaue Konzentration von UFH in einem Organismus ist aufgrund der vielseitigen Interaktionen dieses grossen Moleküls mit Plasmaproteinen und PF4 schwer nur aufgrund der anfänglichen Dosierung vorherzusagen. Es ist nicht bekannt, wie stark diese Interaktionen bei der Ratte ausgebildet sind, so dass der ausgebliebene Effekt auf das Leukocytenrollen auf eine dafür nicht optimale Konzentration des UFH zurückgeführt werden könnte. Weitere Hinweise für ein konzentrationsabhängiges Ausbleiben des UFH-Effektes liefern Studien, die gezeigt haben, dass UFH je nach Konzentration sogar

ambivalente Effekte aufweist (141, 94). Zum Beispiel wurde in einem in-vivo-Modell beobachtet, dass UFH in niedrigen Dosierungen, wie sie klinisch gebräuchlich sind, zu einer leichten PMN-Aktivierung führte, während höhere Dosierungen eine Verringerung bewirkten (94).

Neben einem konzentrationsbedingten Ausbleiben eines inhibitorischen Effektes auf das leukocytäre Rollen kann hypothetisch auch die Interaktion mit dem Antithrombin III als Erklärung herangezogen werden. Zahlreiche Studien belegen einen inhibitorischen Effekt von ATIII auf das Leukocytenrollen (144, 203). Dass in vorliegender Studie ein Bindungspartner des Antithrombin III wie das UFH keine Wirkung auf das Rollverhalten zeigt, lässt vermuten, dass kein dafür optimales Konzentrationsverhältnis zwischen den beiden Substanzen vorgelegen haben könnte oder der spezifische inhibitorische Effekt des ATIII durch Bindung von UFH an ATIII inhibiert wurde.

In der vorliegenden Studie zeigte LMWH als einzige Substanz einen anhaltend milden, nicht signifikanten inhibitorischen Effekt auf das postischämische Leukocytenrollen. Studien konnten zeigen, dass LMWH direkt an P- und L-Selektin binden kann und so eine Interaktion mit den natürlichen Liganden zu inhibieren vermag (95). Doch ist diese Bindung viel geringer als beispielsweise beim UFH ausgeprägt und da UFH das Rollen nicht beeinflusst, fällt es schwer, die direkte Bindung an P- und L-Selektin als Erklärung für den beobachteten Effekt heranzuziehen. Wahrscheinlicher ist die leichte Abschwächung der Leukocytenrollrate auf die anti-Xa-Aktivität, in der sich LMWH von den anderen beiden Substanzen unterscheidet, zurückzuführen. Eine PAR-2-Aktivierung ist unter anderem assoziiert mit einer Freisetzung des von-Willebrand-Faktors und einer Mobilisation von P-Selektin an die Zelloberfläche (73, 40), so dass eine Förderung des Leukocytenrollens durch eine PAR-2-Aktivierung als wahrscheinlich gilt. Auch eine weitere Studie konnte zeigen, dass PAR-2-Rezeptoren einen Einfluss auf das Leukocytenrollverhalten haben (191). Über seine anti-Xa-Aktivität kann nun LMWH zu einer verringerten PAR-2-Aktivierung beitragen und so die Anzahl rollender Leukocyten senken. Da auf der anderen Seite aber weitere potente Mediatoren das Rollen induzieren, ist LMWH nur fähig, eine milde Senkung der Rollrate zu bewirken.

Auch der direkte Thrombininhibitor Hirudin zeigte keinen Effekt auf das Leukocytenrollen. Obwohl durch Thrombin via P-Selektin-Expression ein Rollen in I/R induziert wird, scheint eine alleinige Blockade des Thrombins nicht auszureichen, das Rollen in-vivo effektiv zu unterdrücken. Das lässt vermuten, dass noch weitere Faktoren, die nicht durch die anti-Thrombin-Aktivität des Hirudins beeinflusst werden, am Zustandekommen des Rollens, zumindest in diesem Skelettmuskelmodell von I/R-Schaden, beteiligt sind, und dass trotz Blockade des Thrombins, auch wenn es der bedeutendste Induktor sein sollte, noch genügend andere Stimuli für das Rollen vorhanden sein müssen. Es ist bekannt, dass neben Thrombin auch reaktive Sauerstoffspezies, Histamin oder Leukotriene endotheliales P-Selektin hochregulieren und damit ein Leukocytenrollen induzieren können (203).

Eine zweite Erklärung dafür, dass das Rollen von Hirudin nicht beeinflusst wird, kann in dem Modell der vorliegenden Studie begründet sein. Wie beschrieben waren die präischämischen Werte für das Leukocytenrollen schon sehr hoch und wurden als inflammatorische Reaktion auf das Trauma der Präparation gedeutet. Der präparationsbedingte Reiz führte zu einer Endothelaktivierung mit P-Selektin-Expression und folglich zu einer Induktion von Leukocytenrollen. Hirudin interagiert nicht direkt mit den Selektinen, sondern verhindert, dass Thrombin eine P-Selektin-Expression und somit ein Rollen induzieren kann. Da Hirudin laut Protokoll 15 min vor Beendigung der Ischämie appliziert wurde, lässt sich schlussfolgern, dass das Hirudin als direkter Thrombininhibitor gar nicht mehr inhibitorisch auf das Rollen wirken konnte, da die Hochregulation des P-Selektins schon vor der Hirudingabe stattgefunden hat.

2.3.2. Leukocytenadhäsion

Die Anzahl adhärerender Leukocyten in der postischämischen Reperfusionphase stieg in allen vier Gruppen an. Diese adhärenen Zellen sind in der Lage, weitere inflammatorische Prozesse im Rahmen endothelialer Aktivierung zu vermitteln. Trotz unterschiedlicher Wirkmechanismen waren alle drei getesteten Antikoagulanzen in der Lage, die postischämische Leukocytenadhäsion zu reduzieren.

Verglichen mit der Kontrollgruppe verringerte LMWH trotz seiner geringeren anti-Thrombin-Aktivität die Zahl adhärenen Zellen in ähnlichem Umfang wie die Thrombininhibitoren UFH

und Hirudin. Offensichtlich wird die geringere anti-Thrombin-Aktivität des LMWH durch den inhibitorischen Effekt auf die FXa vermittelte Expression bzw. Aktivierung von Adhäsionsmolekülen ausgeglichen (166), so dass eine quantitativ vergleichbare antiadhäsive Aktivität wie die der Thrombininhibitoren UFH und Hirudin resultiert. Diese, die Adhäsion inhibierende Wirkung des LMWHs entspricht in-vitro-Versuchen, die gezeigt haben, dass LMWH in Konzentrationen, die derjenigen in der vorliegenden Studie entsprechen, die PMN-Adhäsion an aktivierte EC signifikant zu inhibieren vermag (106).

Die in dieser Studie gemachte Beobachtung des inhibitorischen Effektes auf die Adhäsion durch UFH zeigte sich auch in anderen Studien, wo eine antiadhäsive Wirkung des UFH in-vitro (106, 174) und in-vivo (185) beschrieben wurde. Vorliegendes in-vivo Modell war nicht dafür gedacht, den genauen molekularen Mechanismus zu beleuchten, wie genau UFH antiadhäsiv wirkt. Deshalb können die zugrundeliegenden möglichen Mechanismen nur spekulativ diskutiert werden:

Den bedeutendsten Beitrag zur antiadhäsiven Wirkung des UFH liefert nach derzeitigem Erkenntnisstand die Bindung von UFH an das β_2 -Integrin Mac-1. Mac-1 ist ein wichtiges Molekül für die Leukocytenadhäsion und es existieren Studien, die zeigen konnten, dass über die UFH-Mac-1-Interaktion eine Reduktion der Leukocytenadhäsion bewirkt werden kann (171, 163). Ein anderer möglicher Mechanismus einer antiadhäsiven UFH-Wirkung beinhaltet die reaktionsbeschleunigende Interaktion mit dem Antithrombin III, bei welchem adhäsionsreduzierende Effekte bekannt sind (144).

Dagegen scheint eine direkte Inhibition der Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle durch UFH keine Rolle zu spielen, da beschrieben worden ist, dass UFH direkt nur geringe Effekte auf die Expression dieser Moleküle hat (106). Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass die Bindung an Mac-1 sowie Inhibition von proadhäsiven Wirkungen von Thrombin, FXa (Antithrombin III-vermittelt) und des Komplementsystems die Hauptmechanismen der antiadhäsiven Aktivität des UFH in-vivo darstellen.

Auch unter der Behandlung mit Hirudin war bei der Beobachtung der Leukocytenadhäsion ein deutlicher Effekt zu erkennen. Unter Hirudin zeigte sich, wie bei den Heparinen, ein inhibitorischer Effekt ab der 30. Minute und war ab 45 min Reperfusion signifikant gegenüber der Kontrollgruppe. Da in I/R als wesentlicher endothelialer Rezeptor der

Leukocytenadhäsion das ICAM-1 anzusehen ist und Thrombin die ICAM-1-Expression in I/R induziert, ist anzunehmen, dass Hirudin durch direkte Thrombininhibition die ICAM-1 Hochregulation und somit die feste Adhäsion inhibiert. Untersuchungen in einem ähnlichen I/R-Modell mit Rattencremaster zeigten, dass eine Leukocytenadhäsion effektiv durch Blockade von ICAM-1 verringert werden konnte (62). Dies festigt die Hypothese, dass Hirudin als direkter Thrombininhibitor über ICAM-1-Inhibition antiadhäsiv wirkt. Für diese Theorie spricht auch die Beobachtung, dass der inhibitorische Effekt erst ab der 30. Minute auftrat. In den ersten 5-15 min nach Thrombinstimulierung wird die vorläufige PMN-Adhäsion vornehmlich durch P-Selektin-Expression vermittelt, während die endgültige Adhäsion durch ICAM-1-Mac-1 Wechselwirkungen bedingt wird. Nach in-vitro Ergebnissen steigt die ICAM-1-Aktivität erst ca. 30 min nach einer Thrombinstimulierung (179). In der frühen Phase der Adhäsion zeigte Hirudin keinen inhibitorischen Effekt. Da diese frühe Adhäsion weniger ICAM-1, sondern eher noch P-Selektin-abhängig ist, konnte Hirudin noch keinen Einfluss auf diese frühe, noch Selektin-abhängige Adhäsion haben (179).

Ein weiterer anti-Thrombin-Effekt des Hirudins bezüglich der Leukocytenadhäsion sollte in die Überlegungen mit einbezogen werden. In I/R induziert Thrombin die endotheliale PAF (Plättchen aktivierender Faktor)-Produktion. Dieses membranständige PAF kann neben anderen Mediatoren Leukocyten durch Mac-1-Aktivierung aktivieren und so einen Beitrag zur Adhäsion liefern (211). Man kann demnach argumentieren, dass Hirudin zusätzlich über eine Inhibition der thrombin-vermittelten PAF-Synthese antiadhäsiv wirkt. Dass Hirudin eine PAF-Synthese unterdrückt, zeigen u.a. die Ergebnisse von Prescott und Kollegen (149). Doch sollte dieser Effekt nicht überbewertet werden, da in-vitro-Studien, die direkt mit PAF-Antagonisten gearbeitet haben, gezeigt haben, dass diese eine thrombinvermittelte PMN-Adhäsion an EC nicht effektiv verringern konnten (186).

Gerinnungswirkende Pharmaka verändern immer auch die Fliesseigenschaften des Blutes und können dadurch auch Leukocyten-Endothel-Interaktionen modulieren. Doch konnten Studien zeigen, dass Leukocytenrollen und -adhäsion viel stärker durch Aktivierung und Expression von Adhäsionsmolekülen als durch Veränderungen der Fliesseigenschaften des Blutes zu beeinflussen sind (109), so dass dieser Aspekt vernachlässigt werden kann und der

beobachtete inhibitorische Effekt der Antikoagulanzen auf die Leukocytenadhäsion vielmehr als spezifische antiinflammatorische Eigenschaft der Substanzen zu interpretieren ist.

2.3.3. Leukocytenemigration

Der uniforme Effekt auf die Leukocytenadhäsion erlaubt Analysen von spezifischen Effekten der Antikoagulanzen auf den letzten Schritt der LEI, der Emigration von Leukocyten aus dem Gefäss in das umliegende Gewebe. Damit ist eine Freisetzung von zytotoxischen Granulabestandteilen und reaktiven Sauerstoffmetaboliten verbunden, die das postischämische Gewebe zusätzlich schädigen.

In den Kontrolltieren nahm die Zahl emigrierter Leukocyten in der Reperfusionphase bis zum letzten Messzeitpunkt zu. Die Zahl emigrierter Leukocyten korrelierte mit der Zahl der Leukocyten, welche 30 min vorher adhären waren und diese Beobachtung bestätigt das Paradigma, welches besagt, dass die feste Adhäsion von Leukocyten an die Gefässwand eine Voraussetzung für deren nachfolgende Emigration darstellt. Diese Emigrationseffizienz wurde durch die untersuchten Antikoagulanzen unterschiedlich beeinflusst.

Im Gegensatz zum Hirudin und tendenziell auch zum UFH zeigte LMWH keinen inhibitorischen Effekt auf die postischämische Emigration der Leukocyten. Da die Inhibition der Leukocytenemigration in einer Strategie zur Verringerung von I/R-Schäden als besonders bedeutend angesehen wird, muss das LMWH im Vergleich zu den anderen beiden Substanzen in seiner Potenz, PMN-vermittelte Gewebeschädigungen zu verhindern bzw. zu verringern, als unterlegen angesehen werden. Zum Einfluss des LMWH auf die leukocytäre Transmigration liegen nur wenige Studien mit zum Teil widersprüchlichen Ergebnissen vor. Einige in-vitro-Untersuchungen belegen einen inhibitorischen Einfluss des LMWH auf die Leukocytenemigration (122, 97, 78). Doch da in allen Studien nur der beobachtete inhibitorische Effekt des LMWH beschrieben wurde, ohne auf die genauen Mechanismen einzugehen, ist die Aussagekraft dieser Ergebnisse auf das jeweilige Modell beschränkt. Ausserdem sind in-vitro-Ergebnisse für eine Interpretation von Beobachtungen in-vivo aufgrund der vielfältigen Wechselwirkungen in einem Gesamtorganismus nur eingeschränkt möglich. Downing und Kollegen dagegen konnten auch in-vivo einen hemmenden Einfluss

des LMWH auf die Neutrophilen-Extravasation zeigen (44). Sie induzierten eine Thrombose in der Vena cava von Ratten und s.c.-LMWH reduzierte effektiv die Extravasation von Neutrophilen in die Venenwand. Somit zeigt sich, dass LMWH in einer Situation von venöser Thrombose einen spezifischen, inhibitorischen Effekt aufweist. Doch kann ein thrombotisches Milieu nicht mit einem Milieu von I/R gleichgesetzt werden, so dass sich schlussfolgern lässt, dass LMWH, wie vorliegende Ergebnisse zeigen, eine postischämische Transmigration nicht zu verringern vermag. Diese Tatsache, dass LMWH keinen Effekt auf die Transmigration hat, deckt sich auch mit Ergebnissen in einem Rattenmodell mit myokardialer I/R, wo eine LMWH-Gabe nicht zu einer Reduktion der Neutrophilen-Akkumulation in das geschädigte Myokardgewebe führte (72).

Auch UFH scheint keinen spezifischen Effekt auf die Leukocytenemigration auszuüben. Denn obwohl die Zahl der emigrierten Zellen in der mit UFH behandelten Gruppe tendenziell geringer ist als in der Kontrollgruppe, zeigen die Ergebnisse der Korrelationsanalysen, dass UFH nicht direkt inhibitorisch in den Prozess der Emigration einzugreifen scheint, sondern dass vielmehr die vorherige Adhäsionsinhibition zu der leichten Reduktion in der Zahl extravasierter Zellen geführt hat. Die meisten Studien, die einen inhibitorischen Effekt von UFH oder Antithrombin III auf die Emigration beschreiben, beschreiben auch eine Inhibition von leukocytärem Rollen oder Adhäsion (137, 144). Somit ist nicht klar, ob eine direkte Beeinflussung des UFH auf die Emigration stattgefunden hat. Zwar ist in der Literatur beschrieben, dass Heparin das in der Emigration involvierte PECAM-1 binden kann (196), doch fehlen Untersuchungen, die belegen, dass diese Bindung auch in-vivo stattfindet und dass daraus eine Verminderung der Emigration resultiert. Um eine PMN-Emigration aus dem Blutgefäß in das Gewebe zu ermöglichen, ist u.a. eine enzymatische Proteolyse der Basalmembran erforderlich. Untersuchungen mit Elastase-Inhibitoren zeigten eine Prävention von leukocytärer Extravasation in I/R (139). UFH inhibiert die neutrophilen Enzyme Elastase und Cathepsin G (57), doch ist die Relevanz dieser Enzyminhibition im Hinblick auf einen Einfluss von UFH auf die neutrophile Transmigration noch nicht erforscht.

Andererseits existieren Daten, die ebenfalls zeigen, dass UFH keinen Einfluss auf die leukocytäre Extravasation hat (172, 83) oder dass Transmigration-hemmende Effekte des Antithrombin III durch UFH blockiert werden (89).

Das ultimative Ziel einer antiinflammatorischen Therapie sollte auf eine Verhinderung oder Abschwächung der Leukocytenemigration hinzielen, da diese perivaskuläre Infiltration mit einer weiteren Gewebeschädigung verbunden ist. Angesichts der Beobachtung, dass nur Hirudin als direkter Thrombininhibitor in der Lage war, sowohl Adhärenz als auch Emigration signifikant zu senken, stellt sich die Frage, ob der anti-Thrombin-Effekt, der beim Hirudin am stärksten ausgeprägt ist, für eine antiinflammatorische Wirkung von Antikoagulanzen in I/R von besonderer Bedeutung ist. Wie die Ergebnisse der durchgeführten Korrelationsanalysen zeigen, inhibiert Hirudin die Emigration nicht nur über die Inhibition der vorangehenden Adhäsion. Vielmehr lässt die Reduktion der Emigrationseffizienz darauf schliessen, dass das Hirudin einen direkten, inhibitorischen Effekt auf die Emigration selbst ausübt. Da bisher nur bekannt ist, dass Hirudin als direkter Thrombininhibitor wirkt, liegt es nahe anzunehmen, dass Thrombin einen direkten Einfluss auf die Emigration von Leukocyten ausübt, auch wenn der exakte Mechanismus der Interaktion zwischen Hirudin und Leukocytenemigration noch nicht genau verstanden ist.

3. Klinische Relevanz der Ergebnisse

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen erkennen, dass der direkte Thrombininhibitor Hirudin dem UFH und LMWH überlegen ist, Leukocyten-abhängige Effekte in I/R zu reduzieren, da es als einzige der getesteten Substanzen in der Lage war, sowohl Adhäsion als auch Emigration direkt inhibitorisch zu beeinflussen. Da vor allem die Emigration von Leukocyten aus dem Gefässsystem in das umgebene Gewebe einen wesentlichen Bestandteil einer inflammatorischen Reaktion durch I/R darstellt, erlauben die hier dargestellten Ergebnisse die Schlussfolgerung, dass Hirudin effektivere antiinflammatorische Eigenschaften besitzt als die Heparine.

Thrombininhibitoren sind laut aktuellen Richtlinien der ACC/AHA neben antithrombocytären Pharmaka Teil der adjuvanten Begleittherapie beim ACS. Dabei ist UFH nach wie vor Mittel der Wahl beim STEMI und im Katheterlabor. Für die Akutbehandlung von ACS ohne ST-Elevation wird anhand von neuen Erkenntnissen aus Studien primär LMWH als Antikoagulans empfohlen (70). Klinische Untersuchungen, in denen LMWH mit UFH

verglichen wurden, machten deutlich, dass LMWH zumindest so wirkungsvoll in der adjuvanten Therapie bei ACS ist wie das UFH (198, 189, 25). Die Ergebnisse einer Meta-Analyse zeigen auch, dass LMWH in der Therapie von ACS ohne ST-Elevation plus Koronarangioplastie zumindest von vergleichbarem Nutzen ist wie das UFH (49).

Der Nachteil der Heparine, fibrin gebundenes Thrombin nicht inhibieren zu können, förderte die Weiterentwicklung der direkten Thrombininhibitoren wie Hirudin oder Bivalirudin. Der Prototyp Hirudin ist ein stärkeres Antikoagulans als die Heparine und man erhoffte sich überlegene Effekte dieses direkten Thrombininhibitors in der adjuvanten Behandlung von ACS und im Katheterlabor.

Die direkten Thrombininhibitoren Hirudin und Bivalirudin sind ausgiebig in klinischen Studien als Alternative zum UFH als Adjuvans in der Fibrinolysetherapie des STEMI und in der Perkutanen Koronaren Intervention untersucht worden und waren bis vor kurzem auch Untersuchungsobjekt bei der Evaluation bei Patienten mit ACS ohne ST-Elevation. Die initialen klinischen Outcome-Studien mit Hirudin versus UFH (GUSTO-IIa, TIMI-9a, HIT-3) mussten wegen erhöhter Inzidenzen cerebrovaskulärer Blutungen in der Hirudingruppe vorzeitig abgebrochen werden (65, 9, 138). Spätere Untersuchungen wurden mit veränderten und verringerten Dosierungen durchgeführt. Die Ergebnisse der OASIS-2-Studie z.B. zeigten, dass in Patienten mit non-ST-Elevation ACS plus Koronarangioplastie ein direkter Thrombininhibitor wie das Hirudin effektiver als UFH zu sein schien im Hinblick auf eine Reduktion von ischämischen Komplikationen, allerdings auch wieder auf Kosten von erhöhten Blutungskomplikationen. (129). In einer Meta-Analyse von Patienten mit und ohne ST-Elevation in der Direct Thrombin Inhibitor Trialists' Collaboration Group wurde ein überlegender Effekt der direkten Thrombininhibitoren im Vergleich zum UFH festgestellt (182, 183). Dabei schienen Patienten, die einer PTCA zugeführt wurden, insbesondere nach STEMI, einen besonderen Nutzen durch die DTIs zu haben (55). Auch beim Bivalirudin konnte in verschiedenen Studien ein überlegener Effekt bei Patienten mit ACS und bei Koronarangioplastien im Vergleich zum Heparin gezeigt werden (HERO-2: (201), Hirulog Angioplasty Study: (22)). Bivalirudin ist besonders interessant, da es im Gegensatz zum Hirudin in der Regel nicht zu erhöhten Blutungskomplikationen führt (201), ein Problem, welches die Anwendung von Hirudin trotz protektiver Eigenschaften als Adjuvans bei ACS stark einschränkt bzw. verbietet.

Die übereinstimmenden Ergebnisse der HERO-2-Studien (201), der Hirudin- (143) und Bivalirudin (96)-Meta-Analysen und der Direct Thrombin Inhibitor Trialists' Collaboration-Group-Meta-Analyse (183) zeigen eine Überlegenheit der direkten Thrombininhibitoren über Heparine in ACS mit und ohne ST-Elevation und im Katheterlabor (50).

Die in vorliegender Studie gezeigten Beobachtungen liefern eine mögliche zusätzliche Erklärung für die Ergebnisse der klinischen Studien über den Einsatz von Direkten Thrombininhibitoren bei ACS. Die festgestellte Überlegenheit der direkten über die indirekten Thrombininhibitoren hinsichtlich des klinischen Outcomes von Patienten mit ACS könnte sich somit zumindest zum Teil auch auf die Tatsache zurückführen lassen, dass direkte Thrombininhibitoren wie das Hirudin stärkere antiinflammatorische Effekte aufweisen.

V. Zusammenfassung

Inflammatorische Prozesse im Rahmen reperfundierender Behandlungen bei Patienten mit Akuten Koronarsyndromen (ACS) üben einen Einfluss auf das Outcome dieser Patienten aus. Die Reperfusion ischämischen Myokards durch die Perkutane Coronare Angioplastie (PTCA) oder eine Thrombolyse führt zu einer weiteren Schädigung des reperfundierten Gewebes und trägt zur postischämischen myokardialen Dysfunktion bei; ein Phänomen, welches als Ischämie-Reperfusionsschaden (I/R-Schaden) bezeichnet wird.

Ein I/R-Schaden entsteht aus dem komplexen Zusammenspiel zahlreicher humoraler und zellulärer Faktoren, doch vor allem greifen induzierte inflammatorische Prozesse das geschädigte Gewebe zusätzlich an. Während der Reperfusion werden neutrophile Granulocyten (PMNs) aktiviert, interagieren mit Hilfe von Adhäsionsmolekülen mit dem Gefässendothel und akkumulieren im interstitiellem Raum (Leukocyten-Endothel-Interaktionen, LEI). Induktoren dieser LEI sind proinflammatorische Mediatoren, die während I/R freigesetzt werden. Zu diesen gehören auch Gerinnungsfaktoren wie FXa oder Thrombin. Neben ihrer Rolle in der Hämostase triggern sie eine Vielzahl von proinflammatorischen Reaktionen.

In der klinischen Praxis werden FXa und Thrombin durch indirekte (Heparine) und direkte Thrombininhibitoren (z.B. Hirudin) gehemmt. Niedermolekulares Heparin (LMWH) inhibiert vornehmlich FXa und Unfraktioniertes Heparin (UFH) hemmt Thrombin über die Aktivierung von endogenem Antithrombin III. Direkte Thrombininhibitoren (DTI) blockieren Thrombin unabhängig vom AT III und schliessen auch fibrin gebundenes Thrombin mit ein.

Während sich UFH und LMWH in klinischen Studien als Adjuvans bei ACS als gleich effektiv gezeigt haben, mehren sich Hinweise, die auf einen überlegenden Effekt der DTIs über Heparine bei ACS mit und ohne ST-Elevation hindeuten. Die beobachteten klinischen Unterschiede im Outcome von Patienten mit ACS könnten auf eine wirkungsvollere Antikoagulation durch die DTIs zurückzuführen sein. Direkte Thrombininhibitoren sind bisher nicht systematisch in I/R in-vivo untersucht worden, und es ist daher nicht klar, ob womöglich auch stärkere antiinflammatorische Effekte der DTIs zu den Ergebnissen in klinischen Studien geführt haben.

Vorliegende Studie wurde durchgeführt, um die Effekte der Antikoagulanzen UFH, LMWH und des direkten Thrombininhibitors Hirudin auf die postischämischen LEI, als sichtbares und quantifizierbares Korrelat für eine I/R-bedingte Aktivierung inflammatorischer Prozesse, zu vergleichen.

Zur Untersuchung der Fragestellung wurde ein I/R-Modell des M. cremaster der Ratte verwendet. Der Muskel wurde für intravitalmikroskopische Untersuchungen vorbereitet. Um die Effekte der Antikoagulanzen auf die LEI zu erfassen, wurde das Gewebe einer Ischämie von 120 min, gefolgt von einer Reperfusionphase von 90 min, ausgesetzt. 15 min vor Beendigung der Ischämie wurden die Pharmaka in antikoagulatorisch äquipotenten Konzentrationen systemisch appliziert. Die mit einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbten Leukocyten wurden im zeitlichen Verlauf der Reperfusionphase auf Veränderungen hin beobachtet und die Effekte der Antikoagulanzen auf Leukocytenrollen, -adhäsion und -emigration quantifiziert.

Die wichtigsten Ergebnisse der vorliegenden Studie sind: (1) keine der getesteten Substanzen zeigte einen Einfluss auf das postischämische Leukocytenrollen, (2) aber alle 3 Antikoagulanzen verringerten quantitativ gleichermaßen die Leukocytenadhäsion an das Endothel in der Reperfusionphase. (3) Die Emigration der adhärenen Leukocyten wurde nicht durch UFH- oder LMWH-Gabe beeinflusst, sondern nur Hirudin bewirkte eine direkte Inhibition der Leukocytenemigration.

Das postischämische Leukocytenrollen wird durch endotheliale und neutrophile Selektine vermittelt und durch zahlreiche Mediatoren induziert. Daher ist es nicht verwunderlich, dass im komplexen Zusammenspiel eines Gesamtorganismus die untersuchten Substanzen keinen Einfluss auf das leukocytaire Rollen hatten, obwohl bekannt ist, dass zumindest die Heparine mit den Selektinen und mit proinflammatorischen Mediatoren interagieren können.

Trotz der unterschiedlichen Wirkmechanismen inhibierten alle 3 Substanzen die postischämische Leukocytenadhäsion. Verantwortlich für die Adhäsion sind Wechselwirkungen zwischen endothelialen ICAMs (Intercellular Adhesion Molecules) und neutrophilen β_2 -Integrinen, welche durch proinflammatorische Mediatoren aktiviert werden. UFH kann über eine Blockade dieser Integrin-Wechselwirkung eine Adhäsion inhibieren, der Haupt-

mechanismus des LMWH liegt in der FXa-Hemmung, während Hirudin vornehmlich über eine Thrombininhibition antiadhäsive Effekte aufweist.

Angesichts der Beobachtung, dass nur Hirudin auch die Leukocytenmigration direkt beeinflusst, und diese den entscheidenden Schritt in PMN-vermittelten Schäden darstellt, lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass der direkte Thrombininhibitor den Heparinen überlegen ist, I/R-induzierte inflammatorische Reaktionen zu verringern.

Der in dieser Studie gezeigte Effekt auf zellulärer Ebene liefert eine mögliche zusätzliche Erklärung für die in klinischen Studien beobachteten überlegenen Effekte der direkten Thrombininhibitoren bei Patienten mit ACS.

VI. Referenzen

1. **Abbitt KB, Rainger GE, Nash GB.** Effects of fluorescent dyes on selectin and integrin-mediated stages of adhesion and migration of flowing leukocytes. *J Immunol Methods* 2000;239:109-19
2. **Alfaro V, Palacios L.** Comparison of acid/base status in conscious and anaesthetized rats during acute hypothermia. *Pflugers Arch* 1993;424:416-22
3. **Altieri DC.** Proteases and protease receptors in modulation of leukocyte effector functions. *J Leukocyte Biol* 1995;58:120-127
4. **Ambrosini G, Altieri DC.** Molecular dissection of effector cell protease receptor-1 recognition of factor Xa. Assignment of critical residues implicated in antibody reactivity and ligand binding. *J Biol Chem* 1996;271:1243-1248
5. **Ambrosio G, Tritto I.** Reperfusion injury: experimental evidence and clinical implications. *Am Heart J* 1999;138:69-75
6. **Ambrosio G, Tritto I.** Clinical manifestations of myocardial stunning. *Coron Artery Dis* 2001;12:357-361
7. **Anand S.** Direct Thrombin Inhibitors. *Haemostasis* 1999;29:76-78
8. **Andersson LO, Barrowcliffe TW, Holmer E, Johnson EA, Sims GE.** Anticoagulant properties of heparin fractionated by affinity chromatography on matrix-bound antithrombin III and by gel-filtration. *Thromb Res* 1976;9:575-83
9. **Antman EM.** Hirudin in acute myocardial infarction: safety report from the Thrombolysis and Thrombin Inhibition in Myocardial Infarction (TIMI) 9A trial. *Circulation* 1994;90:1624-1630
10. **Arnaut MA.** Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. *Blood* 1990;75:1037-50
11. **Baez S.** An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by in vivo microscopy. *Microvasc Res* 1973;5:384-94
12. **Bar-Shavit R, Kahn A, Mudd MS, Wilner GD, Mann KG, Fenton JW 2nd.** Localization of a chemotactic domain in human thrombin. *Biochemistry* 1984;23:397-400
13. **Baskova IP, Zavalova LL.** Proteinase inhibitors from the medicinal leech *Hirudo medicinalis*. *Biochemistry (Mosc)* 2001;66:703-14
14. **Baumhueter S, Dybdal N, Kyle C, Lasky LA.** Global vascular expression of murine CD34, a sialomucin-like endothelial ligand for L-selectin. *Blood* 1994;84:2554-65
15. **Becker LC, Ambrosio G.** Myocardial consequences of reperfusion. *Prog Cardiovasc Dis* 1987;30:23-41
16. **Becker RC, Spencer FA, Gibson M, Rush JE, Sanderink G.** Influence of patient characteristics and renal function on factor Xa inhibition pharmacokinetics and pharmacodynamics after enoxaparin administration in non-ST-segment elevation acute coronary syndromes. *Am Heart J* 2002;143:753-759
17. **Bengtsson T, Fryden A, Zalavary S, Whiss PA, Orselius K, Grenegard M.** Platelets enhance neutrophil locomotion: evidence for a role of P-selectin. *Scand J Clin Lab Invest* 1999;59:439-49

- 18. Bergmann C, Dodt J, Kohler S, Fink E, Gassen HG.** Chemical synthesis and expression of a gene coding for hirudin, the thrombin-specific inhibitor from the leech *Hirudo medicinalis*. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1986;367:731-40
- 19. Bevilacqua MP, Gimbrone MA Jr.** Inducible endothelial functions in inflammation and coagulation. *Semin Thromb Hemost* 1987;13:425-33
- 20. Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone MA Jr, Seed B.** Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* 1989;243:1160-5
- 21. Black SC, Gralinski MR, Friedrichs GS, Kilgore KS, Driscoll EM, Lucchesi BR.** Cardioprotective effects of heparin or N-acetylheparin in an in vivo model of myocardial ischaemic and reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1995;29:629-36
- 22. Bittl JA, Strony J, Brinker JA.** Treatment with bivalirudin (hirulog) as compared with heparin during coronary angioplasty for unstable or postinfarcted angina. *Hirulog Angioplasty Study Investigators. N Engl J Med* 1995;333:764-769
- 23. Bizios R, Lai L, Fenton JW II, Malik AB.** Thrombin-induced chemotaxis and aggregation of neutrophils. *J Cell Physiol* 1986;128:485-490
- 24. Bono F, Schaeffer P, Herault JP, Michaux C, Nestor AL, Guillemot JC, Herbert JM.** Factor Xa activates endothelial cells by a receptor cascade between EPR-1 and PAR-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:E107-12
- 25. Brener SJ, Topol EJ.** Adjunctive therapy for percutaneous revascularisation in acute myocardial infarction. *Curr Pharm Des* 2004;10:399-405
- 26. Broderick TL, Currie RW, Paulson DJ.** Heat stress induces rapid recovery of mechanical function of ischemic fatty acid perfused hearts by stimulating glucose oxidation during reperfusion. *Can J Physiol Pharmacol* 1997;75:1273-9
- 27. Byrne JG, Smith WJ, Murphy MP, Couper GS, Appleyard RF, Cohn LH.** Complete prevention of myocardial stunning, contracture, low reflow, and edema after heart transplantation by blocking neutrophil adhesion molecules during reperfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992;104:1589-1596
- 28. Camerer E, Huang W, Coughlin SR.** Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:5255-60
- 29. Cannon RO 3rd.** Restenosis after angioplasty. *N Engl J Med* 2002;346:1182-3
- 30. Carden DL, Granger DN.** Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. *J Pathol* 2000;190:255-266
- 31. Carden DL, Smith JK, Korthuis RJ.** Neutrophil-mediated microvascular dysfunction in postischemic canine skeletal muscle. Role of granulocyte adherence. *Circ Res* 1990;66:1436-44
- 32. Carney DH, Redin W, McCroskey L.** Role of high-affinity thrombin receptors in postclotting cellular effects of thrombin. *Semin Thromb Hemost* 1992;18:91-103
- 33. Cicala C, Cirino G.** Linkage between inflammation and coagulation: an update on the molecular basis of the crosstalk. *Life Sci* 1998;62:1817-24
- 34. Cirino G, Cicala C, Bucci M, Sorrentino L, Ambrosini G, DeDominicis G, Altieri DC.** Factor Xa as an interface between coagulation and inflammation. Molecular mimicry of factor Xa association with effector cell protease receptor-1 induces acute inflammation in vivo. *J Clin Invest* 1997;99:2446-51

35. **Cirino G, Napoli C, Bucci M, Cicala C.** Inflammation-coagulation network: are serine protease receptors the knot? *TiPS* 2000;21:170-172
36. **Collard CD, Gelman S.** Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology* 2001;94:1133-8
37. **Colvin RB, Dvorak HF.** Role of the clotting system in cell-mediated hypersensitivity. II. Kinetics of fibrinogen/fibrin accumulation and vascular permeability changes in tuberculin and cutaneous basophil hypersensitivity reactions. *J Immunol* 1975;114:377
38. **Crinnion JN, Homer-Vanniasinkam S, Hatton R, Parkin SM, Gough MJ.** Role of neutrophil depletion and elastase inhibition in modifying skeletal muscle reperfusion injury. *Cardiovasc Surg* 1994;2:749-53
39. **De Lisser HM, Newman PJ, Albelda SM.** Molecular and functional aspects of PECAM-1/CD31. *Immunol Today* 1994;15:490-5
40. **Denis C, Methia N, Frenette PS, Rayburn H, Ullman-Cullere M, Hynes RO, Wagner DD.** A mouse model of severe von Willebrand disease: defects in hemostasis and thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:9524-9
41. **Diamond MS, Alon R, Parkos CA, Quinn MT, Springer TA.** Heparin is an adhesive ligand for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD1). *J Cell Biol* 1995;130:1473-82
42. **Dotd J, Seemuller U, Maschler R, Fritz H.** The complete covalent structure of hirudin. Localization of the disulfide bonds. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1985;366:379-85
43. **Dong J, Pratt JR, Smith RA, Dodd I, Sacks SH.** Strategies for targeting complement inhibitors in ischaemia/reperfusion injury. *Mol Immunol* 1999;36:957-63
44. **Downing LJ, Strieter RM, Kadell AM, Wilke CA, Greenfield LJ, Wakefield TW.** Low-dose low-molecular-weight heparin is anti-inflammatory during venous thrombosis. *J Vasc Surg* 1998;28:848-54
45. **Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA.** Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol* 1986;137:245-54
46. **Edens RE, Lindhardt RJ, Weiler JM.** Heparin is not just an anticoagulant any more: Six and one-half decades of studies on the ability of heparin to regulate complement activity. *Complement Profiles* 1993;1:96-120
47. **Edwards RL, Rickies FR.** Delayed hypersensitivity in man: effects of systemic anticoagulation. *Science* 1978;200:541
48. **Ehrlich JH, Boyle EM, Labriola J, Kovacich JC, Santucci RA, Fearn C, Morgan EN, Yun W, Luther T, Kojikawa O, Martin TR, Pohlman TH, Verrier ED, Mackman N.** Inhibition of the tissue factor-thrombin pathway limits infarct size after myocardial ischemia-reperfusion injury by reducing inflammation. *Am J Pathol* 2000;157:1849-62
49. **Eikelboom JW, Anand SS, Malmberg K, Weitz JI, Ginsberg JS, Yusuf S.** UFH and LMWH in acute coronary syndrome without ST elevation: a meta-analysis. *Lancet* 2000;355:1936-42
50. **Eikelboom J, White H, Yusuf S.** The Evolving Role of Direct Thrombin Inhibitors in acute Coronary Syndromes. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:70-78
51. **Elliott MJ, Finn AH.** Interaction between neutrophils and endothelium. *Ann Thorac Surg* 1993;56:1503-08
52. **Faes F, Sawa Y, Ichikawa A, Shimazaki Y, Ohashi T, Fukuda H.** Inhibition of Na/H exchanger attenuates neutrophil-mediated reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 1995;60:377-381

- 53. Ferrante RJ, Hobson RW 2nd, Miyasaka M, Granger DN, Duran WN.** Inhibition of white blood cell adhesion at reperfusion decreases tissue damage in postischemic striated muscle. *J Vasc Surg* 1996;24:187-93
- 54. Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML.** The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2002;53:31-47
- 55. French JK, Edmond JJ, Gao W, White HD, Eikelboom JW.** Adjunctive use of direct thrombin inhibitors in patients receiving fibrinolytic therapy for acute myocardial infarction. *Am J Cardiovasc Drugs* 2004;4:107-115
- 56. Friedrichs GS, Kilgore KS, Manley PJ, Gralinsky MR, Lucchesi BR.** Effects of heparin and N-Acetylheparin on ischemia/reperfusion-induced alterations in myocardial function in the rabbit isolated heart. *Circ Res* 1994;75:701-710
- 57. Fryer A, Huang YC, Rao G, Jacoby D, Mancilla E, Whorton R, Piantadosi CA, Kennedy T, Hoidal J.** Selective O-desulfation produces nonanticoagulant heparin that retains pharmacological activity in the lung. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;282:208-19
- 58. Galinanes M, Lawson CS, Ferrari R, Limb GA, Derias NW, Hearse DJ.** Early and late effects of leukopenic reperfusion on the recovery of cardiac contractile function. Studies in the transplanted and isolated blood-perfused rat heart. *Circulation* 1993;88:673-83
- 59. Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Koch W, Laugwitz KL, Adelsberger H, Langenbrink K, Page S, Neumeier D, Schomig A, Brand K.** Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation* 1998;98:1164-71
- 60. Glusa E, Paintz M, Bretschneider E.** Relaxant and contractile responses of porcine pulmonary arteries to thrombin and thrombin receptor activating peptides. *Semin Thromb Hemost* 1996;22:261-5
- 61. Goldenberg I, Matetzky S, Halkin A, Roth A, Di Segni E, Freimark D, Elian D, Agranat O, Har Zahav Y, Guetta V, Hod H.** Primary angioplasty with routine stenting compared with thrombolytic therapy in elderly patients with acute myocardial infarction. *Am Heart J* 2003;145:862-7
- 62. Gotoh K, Minamino T, Katoh O.** The role of intracoronary thrombus in unstable angina: angiographic assessment and thrombolytic therapy during ongoing anginal attacks. *Circulation* 1988;77:526-534
- 63. Grace PA.** Ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 1994;81:637-47
- 64. Habazettl H, Kupatt C, Zahler S, Becker BF, Messmer K.** Selectins and beta 2-integrins mediate post-ischaemic venular adhesion of polymorphonuclear leukocytes, but not capillary plugging, in isolated hearts. *Pflugers Arch* 1999;438:479-85
- 65. The Global Use of Strategies to Open Occluded Coronary Arteries (GUSTO) IIa Investigators.** Randomized trials of intravenous heparin versus recombinant hirudin for acute coronary syndromes. *Circulation* 1994;90:1631-37
- 66. Hila V, Martinez-Sales V, Reganon E, Peris E, Perez F, Ruano M, Aznar J.** Effects of unfractionated and low molecular weight heparins on plasma levels of hemostatic factors in patients with acute coronary syndromes. *Haematologica* 2001;86:729-34
- 67. Hafezi-Moghadam A, Leay K.** Relevance of L-selectin-shedding for leucocyte rolling in-vivo. *J Exp Med* 1999;189:939-948
- 68. Hale SL, Kloner RA.** Myocardial temperature reduction attenuates necrosis after prolonged ischemia in rabbits. *Cardiovasc Res* 1998;40:502-7

- 69. Hansen PR.** Role of neutrophils in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation* 1995;91:1872-85
- 70. Harrington RA, Becker RC, Ezekowitz M, Meade TW, O'Connor CM, Vorchheimer DA, Guyatt GH.** Antithrombotic therapy for coronary artery disease: the seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest* 2004;126:513-548
- 71. Harris AG, Skalak TC.** Leukocyte cytoskeletal structure determines capillary plugging and network resistance. *Am J Physiol* 1993;265:H1670-5
- 72. Hasdai D, Varda-Bloom N, Blumberg N, Ohad D, Kornowski R, Battler A.** The effect of low molecular weight heparin (fragmin) on myocardial neutrophil accumulation and infarct size in a rat model of myocardial infarction. *Angiology* 1996;47:491-9
- 73. Hattori R, Hamilton KK, Fugate RD, McEver RP, Sims PJ.** Stimulated secretion of endothelial von Willebrand factor is accompanied by rapid redistribution to the cell surface of the intracellular granule membrane protein GMP-140. *J Biol Chem* 1989;264:7768-71
- 74. Herold G, Eds.** *Innere Medizin. Vorlesungsorientierte Darstellung*, Köln, 2003:206
- 75. Herold G, Eds.** *Innere Medizin. Vorlesungsorientierte Darstellung*, Köln, 2003:196
- 76. Hill MA, Simpson BE, Meininger GA.** Altered cremaster muscle hemodynamics due to disruption of the deferential feed vessels. *Microvasc Res* 1990;39:349-63
- 77. Hiramatsu O, Kimura A, Yada T, Yamamoto T, Ogasawara Y, Goto M, Tsujioka K, Kajiya F.** Phasic characteristics of arterial inflow and venous outflow of right ventricular myocardium in dogs. *Am J Physiol* 1992;262:H1422-7
- 78. Hofbauer R, Gmeiner B, Kaye AD, Kapiotis S, Wagner O, Frass M.** Low-molecular-weight heparin inhibits neutrophil transmigration through endothelial cell monolayers. *Microvasc Res* 1999;58:190-2
- 79. Hoffman M, Monroe III DM.** A Cell-based Model of Hemostasis. *Thromb Haemost* 2001;85:958-65
- 80. Holm S.** A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand J Stat* 1979;6:65-70
- 81. Holmer E, Soderberg K, Bergqvist D, Lindahl U.** Heparin and its low molecular weight derivatives: anticoagulant and antithrombotic properties. *Haemostasis* 1986;16Suppl2:1-7
- 82. Ikeda H, Nakayama H, Oda T.** Neutrophil activation after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am Heart J* 1994;128:1091-1098
- 83. Issekutz AC, Rowter D, Springer TA.** Role of ICAM-1 and ICAM-2 and alternate CD11/CD18 ligands in neutrophil transendothelial migration. *J Leukoc Biol* 1999;65:117-26
- 84. Itoh K, Nakao A, Kishimoto W, Takagi H.** Heparin effects on superoxide production by neutrophils. *Eur Surg Res* 1995;27:184-8
- 85. Jaffe EA, Grulich J, Weksler BB, Hampel G, Watanabe K.** Correlation between thrombin-induced prostacyclin production and inositol trisphosphate and cytosolic free calcium levels in cultured human endothelial cells. *J Biol Chem* 1987;262:8557-8565
- 86. Jenkins AL, Howells GL, Scott E, Le Bonniec BF, Curtis MA, Stone SR.** The response to thrombin of human neutrophils: evidence for two novel receptors. *J Cell Sci* 1995;108:3059-66
- 87. Jordan JE, Zhao ZQ, Vinten-Johansen J.** The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1999;43:860-78

- 88. Kamler M, Chatterjee T, Stemberger A, Gebhard MM, Hagl S, Jakob H.** Hirudin protects from leucocyte/endothelial cell interaction induced by extracorporeal circulation. *Thorac Cardiovasc Surg* 2001; 49:157-61
- 89. Kaneider NC, Egger P, Dunzendorfer S, Wiedermann CJ.** Syndecan-4 as antithrombin receptor of human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;287:42-6
- 90. Kaur J, Woodman RC, Ostrovsky L, Kubes P.** Selective recruitment of neutrophils and lymphocytes by thrombin: a role for NF-kappaB. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281:784-95
- 91. Kereiakes DJ, Grines C, Fry E, Esente P, Hoppenstaedt D, Midei M, Barr L, Matthai W, Todd M, Broderick T, Rubinstein R et al.; NICE 1 and NICE 4 Investigators. National Investigators Collaborating on Enoxaparin.** Enoxaparin and abciximab adjunctive pharmacotherapy during percutaneous coronary intervention. *J Invasive Cardiol* 2001;13:272-278
- 92. Kitamura N, Yamaguchi M, Shimabukuro K, Miyasaka M, Nakano H, Kumada K.** Heparin-like glycosaminoglycans inhibit leukocyte adhesion to endotoxin-activated human vascular endothelial cells under nonstatic conditions. *Eur Surg Res* 1996;28:428-35
- 93. Klein W.** Low molecular weight heparin in the initial and prolonged treatment of unstable coronary artery disease – the fragmin in unstable coronary artery heart disease study (FRIC). *Eur Heart J* 1996;17:Suppl:306
- 94. Kloner RA, Arimie RB, Kay GL.** Evidence for stunned myocardium in humans: a 2001 update. *Coron Artery Dis* 2001;12:349-356
- 95. Koenig A, Norgard-Sumnicht K, Linhardt R, Varki A.** Differential interactions of heparin and heparan sulfate glycosaminoglycans with the selectins. Implications for the use of unfractionated and low molecular weight heparins as therapeutic agents. *J Clin Invest* 1998;101:877-89
- 96. Kong DF, Topol EJ, Bittl JA.** Clinical outcome of bivalirudin for ischemic heart disease. *Circulation* 1999;100:2049-53
- 97. Kruse-Elliott KT, Chaban K, Grossman JE, Tomasko S, Kamke C, Darien B.** Low molecular weight heparin alters porcine neutrophil responses to platelet-activating factor. *Shock* 1998;10:198-202
- 98. Kupatt C, Habazettl H, Becker BF, Boekstegers P.** Endothelial activation - a strategic event during postischemic myocardial inflammation. *Z Kardiol* 2000;89:IX96-IX100
- 99. Low-molecular-weight heparin during instability in coronary artery disease, Fragmin during Instability in Coronary Artery Disease (FRISC) study group.** *Lancet* 1996;347:561-8
- 100. Langer F, Morys-Wortmann C, Kusters B, Storck J.** Endothelial protease-activated receptor-2 induces tissue factor expression and von Willebrand factor release. *Br J Haematol* 1999;105:542-550
- 101. Laposta M, Dovnarsky DK, Shin HS.** Thrombin-induced gap formation in confluent endothelial cell monolayers in vitro. *Blood* 1983;62:549-556
- 102. Laskowski I, Pratschke J, Wilhelm MJ, Gasser M, Tilney NL.** Molecular and cellular events associated with ischemia/reperfusion injury. *Ann Transplant* 2000;5:29-35
- 103. Lefer AM, Campbell B, Scalia R, Lefer DJ.** Synergism between platelets and neutrophils in provoking cardiac dysfunction after ischemia and reperfusion: role of selectins. *Circulation* 1998;98:1322-8
- 104. Lefer DJ, Flynn DM, Buda AJ.** Effects of a monoclonal antibody directed against P-selectin after myocardial ischemia and reperfusion. *Am J Physiol* 1996;270:H88-98

- 105. Lefer DJ, Shandelya SM, Serrano CV Jr, Becker LC, Kuppusamy P, Zweier JL.** Cardioprotective actions of a monoclonal antibody against CD-18 in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 1993; 88:1779-87
- 106. Lever R, Hoult JR, Page CP.** The effects of heparin and related molecules upon the adhesion of human polymorphonuclear leucocytes to vascular endothelium in vitro. *Br J Pharmacol* 2000;129:533-40
- 107. Lewinsohn DM, Bargatze RF, Butcher EC.** Leucocyte-endothelial cell recognition: evidence of a common molecular mechanism shared by neutrophils, lymphocytes, and other leucocytes. *J Immunol* 1987; 138:4313-21
- 108. Ley K, Cerrito M, Arfors KE.** Sulfated polysaccharides inhibit leukocyte rolling in rabbit mesentery venules. *Am J Physiol* 1991;260:H1667-73
- 109. Ley K, Gaehtgens P.** Endothelial, not haemodynamic, differences are responsible for preferential leucocyte rolling in rat mesenteric venules. *Circ Res* 1991;69:1034-41
- 110. Ley K, Pries AR, Gaehtgens P.** A versatile intravital microscope design. *Int J Microcirc Clin Exp* 1987; 6:161-7
- 111. Ley K, Tedder TF, Kansas GS.** L-selectin can mediate leukocyte rolling in untreated mesenteric venules in vivo independent of E- or P-selectin. *Blood* 1993;82:1632-8
- 112. Liang KY, Zeger SL.** Longitudinal data analysis using generalized linear models. *Biometr* 1986;73:13-22
- 113. Lindahl B, Toss H, Siegbahn A, Venge P, Wallentin L.** Markers of myocardial damage and inflammation in relation to long-term mortality in unstable coronary artery disease. FRISC Study Group. Fragmin during Instability in Coronary Artery Disease. *N Engl J Med* 2000;343:1139-47
- 114. Litt MR, Jeremy RW, Weisman HF, Winkelstein JA, Becker LG.** Neutrophil depletion limited to reperfusion reduces myocardial infarct size after 90 minutes of ischemia. Evidence for neutrophil-mediated reperfusion injury. *Circulation* 1989;80:1816-27
- 115. Loike JD, Sodeik B, Cao L, Leucona S, Weitz JI, Detmers PA, Wright SD, Silverstein SC.** CD11c/CD18 on neutrophils recognizes a domain at the N terminus of the A alpha chain of fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:1044-8
- 116. Lorant DE, Patell KD, McIntyre TM, Prescott SM.** Fluid phase granule membrane protein-140 (GMP-140) inhibits neutrophil binding to activated endothelium. *Clin Res* 1991;39:285a
- 117. Lorant DE, Patell KD, McIntyre TM, McEver RP, Prescott SM, Zimmerman GA.** Coexpression of GMP-140 and PAF by endothelium stimulated by histamine or thrombin: a juxtacrine system for adhesion and activation of neutrophils. *J Cell Biol* 1991;115:223-34
- 118. Lüllmann H, Mohr K, Ziegler A. Eds.** Taschenatlas der Pharmakologie. G. Thieme Verlag Stuttgart New York, 1996;3.Auflage:148
- 119. Ma XL, Lefer DJ, Lefer AM, Rothlein R.** Coronary endothelial and cardiac protective effects of a monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule-1 in myocardial ischemia and reperfusion injury. *Circulation* 1992;86:937-946
- 120. Ma XL, Weyrich AS, Lefer DJ, Buerke M, Albertine KH, Kishimoto TK, Lefer AM.** Monoclonal antibody to L-selectin attenuates neutrophil accumulation and protects ischemic reperfused cat myocardium. *Circulation* 1993;88:649-58
- 121. Massberg S, Messmer K.** The nature of ischemia/reperfusion injury. *Transplant Proc* 1998;30:4217-23

- 122. Matzner Y, Marx G, Drexler R, Eldor A.** The inhibitory effect of heparin and related GAG on neutrophil chemotaxis. *Thromb Haemost* 1984;52:134-137
- 123. Maxwell SR, Lip GY.** Reperfusion injury. A review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. *Int J Cardiol* 1997;58:95-117
- 124. Mazzone A, De Servi S, Ricevuti G, Mazzucchelli I, Fossati G, Pasotti D, Bramucci E, Angoli L, Marsico F, Specchia G.** Increased expression of neutrophil and monocyte adhesion molecules in unstable coronary artery disease. *Circulation* 1993;88:358-63
- 125. Mazzone MC, Borgstrom P, Intaglietta M, Arfors KE.** Luminal narrowing and endothelial cell swelling in skeletal muscle capillaries during hemorrhagic shock. *Circ Shock* 1989;29:27-39
- 126. McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, Marshall-Carlson L, Bainton DF.** GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest* 1989;84:92-9
- 127. McLean J.** The discovery of heparin. *Circulation* 1959;19:75-78
- 128. Mehta J, Dirneman J, Mehta P, Saldeen TG, Lawson D, Donnelly WH, Wallin R.** Neutrophil function in ischemic heart disease. *Circulation* 1989;79:549-56
- 129. Mehta SR, Eikelboom JW, Rupprecht HJ, Lewis BS, Natarajan MK, Yi C, Pogue J, Yusuf S.** Efficacy of hirudin in reducing cardiovascular events in patients with acute coronary syndrome undergoing early percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J* 2002;23:117-23
- 130. Mickelson JK, Lakkis NM, Villarreal-Levy G, Hughes BJ, Smith CW.** Leucocyte activation with platelet adhesion after coronary angioplasty: A mechanism for recurrent disease? *J Am Coll Cardiol* 1996; 28:345-353
- 131. Miller MD, Krangel MS.** Biology and biochemistry of the chemokines: a family of chemotactic and inflammatory cytokines. *Crit Rev Immunol* 1992;12:17-46
- 132. Monsinjon T, Richard V, Fontaine M.** Complement and its implications in cardiac ischemia/reperfusion: strategies to inhibit complement. *Fundam Clin Pharmacol* 2001;15:293-306
- 133. Morin A, Arvier-Marchand M, Doutremepuich C, Vigneron C.** Effect of hirudin on the chemotactic properties of alpha-thrombin. *Haemostasis* 1991;21Suppl1:32-35
- 134. Moser R, Groscurth P, Fehr J.** Promotion of transendothelial neutrophil passage by human thrombin. *J Cell Sci* 1990;96:737-44
- 135. Muller WA.** Migration of leukocytes across endothelial junctions: some concepts and controversies. *Microcirculation* 2001;8:181-93
- 136. Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM.** PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med* 1993;178:449-60
- 137. Nelson R, Cecconi MO, Roberts WG, Arrufo A, Lindhardt RJ, Bevilacqua MP.** Heparin oligosaccharides bind P- and L-Selectin and inhibit acute inflammation. *Blood* 1993;82:3253-58
- 138. Neuhaus KL, von Essen R, Tebbe U.** Safety observation from the pilot phase of the randomized r-Hirudin for Improvement for Thrombolysis (HIT-III) study. *Circulation* 1994;90:1638-42
- 139. Nicolini FA, Mehta JL, Nichols WW, Donnelly WH, Luostarinen R, Saldeen TG.** Leukocyte elastase inhibition and t-PA-induced coronary artery thrombolysis in dogs: beneficial effects on myocardial histology. *Am Heart J* 1991;122:1245-51

- 140. Nolte D, Lehr HA, Messmer K.** Adenosine inhibits postischemic leukocyte-endothelium interaction in postcapillary venules of the hamster. *Am J Physiol* 1991;261:H651-5
- 141. Noris P, Bertolino G, Previtali M, Ferrario M, Balduini CL.** Heparin infusion facilitates ex vivo spontaneous platelet aggregation in patients with acute myocardial infarction who have undergone thrombolytic therapy. *Haemostasis* 1993;23:185-9
- 142. Okajima K.** Antithrombin prevents endotoxin-induced pulmonary vascular injury by inhibiting leukocyte activation. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1998;9Suppl2:25-37
- 143. Organisation to Assess Strategies for Ischemic Syndromes (OASIS-2) Investigators.** Effects of recombinant hirudin (lepirudin) compared with heparin on death, myocardial infarction, refractory angina, and revascularisation procedures in patients with acute myocardial ischaemia without ST elevation: a randomised trial. *Lancet* 1999;353:429-38
- 144. Ostrovsky L, Woodman RC, Payne D, Teoh D, Kubes P.** Antithrombin III prevents and rapidly reverses leukocyte recruitment in ischemia/reperfusion. *Circulation* 1997;96:2302-10
- 145. Panes J, Granger DN.** Leukocyte-endothelial cell interactions: molecular mechanisms and implications in gastrointestinal disease. *Gastroenterology* 1998;114:1066-90
- 146. Park JL, Lucchesi BR.** Mechanisms of myocardial reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 1999;68:1905-12
- 147. Parks DA, Granger DN.** Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol* 1986;250:G749-53
- 148. Peter K, Schwarz M, Conradt C, Nordt T, Moser M, Kubler W, Bode C.** Heparin inhibits ligand binding to the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *Circulation* 1999;100:1533-9
- 149. Prescott SM, Seeger AR, Zimmerman GA, McIntyre TM, Maraganore JM.** Hirudin-based peptides block the inflammatory effects of thrombin on endothelial cells. *J Biol Chem* 1990;265:9614-6
- 150. Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM.** Human endothelial cells in culture produce platelet-activating factor when stimulated by thrombin. *Proc Nat Acad Sci USA* 1984;81:3534-3538
- 151. Pries AR.** A versatile video image analysis system for microcirculatory research. *Int J Microcirc Clin Exp* 1988;7:327-45
- 152. Pries AR, Gaehtgens P.** Digital video image-shearing device for continuous microvessel diameter measurement. *Microvasc Res* 1987;34:260-7
- 153. Pschyrembel W, Eds.** *Klinisches Wörterbuch*. De Gruyter Verlag Berlin, 1994;257. Auflage:739
- 154. Redini F, Tixier JM, Petitou M, Choay J, Robert L, Hornebeck S.** Inhibition of leucocyte elastase by heparin and its derivatives. *Biochem J* 1988;252:515-519
- 155. Redlin M, Werner J, Habazettl H, Griethe W, Kuppe H, Pries AR.** Cariporide (HOE 642) attenuates leukocyte activation in ischemia and reperfusion. *Anesth Analg* 2001;93:1472-9
- 156. Repo H, Harlan JM.** Mechanisms and consequences of phagocyte adhesion to endothelium. *Ann Med* 1999;31:156-65
- 157. Riede UN, Schaefer HE, Eds.** *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart/New York, 1995;4. akt. Auflage:485

- 158. Rihn TL, Diez J; Heparin Consensus Group.** Unfractionated heparin in cardiology: redefining the standard of practise. *Pharmacotherapy* 2004;24:132-141
- 159. Romson JL, Hook BG, Kunkel SL, Abrams GD, Schork MA, Lucchesi BR.** Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. *Circulation* 1983;67:1016-23
- 160. Rowand JK, Marucha P, Berliner LJ.** Hirudin C-terminal fragments inhibit thrombin induced neutrophil chemotaxis. *Thromb Haem* 1992;67:289-291
- 161. Saetzler RK, Jallo J, Lehr HA, Philips CM, Vasthare U, Arfors KE, Tuma RF.** Intravital fluorescence microscopy: impact of light-induced phototoxicity on adhesion of fluorescently labeled leukocytes. *J Histochem Cytochem* 1997;45:505-13
- 162. Sako D, Chang XJ, Barone KM, Vachino G, White HM, Shaw G, Veldman GM, Bean KM, Ahern TJ, Furie B.** Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin. *Cell* 1993;75:1179-86
- 163. Salas A, Sans M, Soriano A, Reverter JC, Anderson DC, Pique JM, Panes J.** Heparin attenuates TNF-alpha induced inflammatory response through a CD11b dependent mechanism. *Gut* 2000;47:88-96
- 164. Sawa Y, Ichikawa A, Kagisaki K, Ohata T, Matsuda H.** Interleukin-6 derived from hypoxic myocytes promotes neutrophil-mediated reperfusion injury in myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998;116:511-517
- 165. Schmid-Schoenbein GW, Fung YC, Zweifach BW.** Vascular endothelium-leukocyte interaction; sticking shear force in venules. *Circ Res* 1975;36:173-84
- 166. Senden NH, Jeunhomme TM, Heemskerk JW, Wagenvoord R, van't Veer C, Hemker HC, Buurman WA.** Factor Xa induces cytokine production and expression of adhesion molecules by human umbilical vein endothelial cells. *J Immunol* 1998;161:4318-24
- 167. Serracino-Ingloft F, Habib NA, Mathie RT.** Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg* 2001; 181:160-6
- 168. Serrano CV Jr, Ramires JA, Venturinelli M, Arie S, D'Amico E, Zweier JL, Pileggi F, da Luz PL.** Coronary angioplasty results in leukocyte and platelet activation with adhesion molecule expression. Evidence of inflammatory responses in coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1997;29:1276-83
- 169. Sharma M, Ganguly NK, Chaturvedi G, Thingnam SK, Majumdar S, Suri RK.** Release of pro-inflammatory mediators during myocardial ischemia/reperfusion in coronary artery bypass graft surgery. *Molek Biochem* 2003;247:23-30
- 170. Siemionow M, Wang WZ, Anderson G, Firrell J.** Leukocyte-endothelial interaction and capillary perfusion in ischemia/reperfusion of the rat cremaster muscle. *Microcirc Endothelium Lymph* 1991;7:183-97
- 171. Silvestro L, Viano I, Macario M, Colangelo D, Montrucchio G, Panico S, Fantozzi R.** Effects of heparin and its desulfated derivatives on leucocyte-endothelial adhesion. *Sem Thromb Haemost* 1994;20:254-258
- 172. Simmons CA, Burdick MD, Schaub RG.** Heparin inhibits fibrin, but not leukocytes, in a model of deep-vein thrombosis. *J Surg Res* 1987;43:468-75
- 173. Skinner MP, Lucas CM, Burns GF, Chesterman CN, Berndt MC.** GMP-140 binding to neutrophils is inhibited by sulfated glycans. *J Biol Chem* 1991;266:5371-4
- 174. Smailbegovic A, Lever R, Page CP.** The effects of heparin on the adhesion of human peripheral blood mononuclear cells to human stimulated umbilical vein endothelial cells. *Br J Pharmacol* 2001;134:827-36
- 175. Smith CW.** Leukocyte-endothelial cell interactions. *Semin Hematol* 1993;30:45-53

- 176. Springer TS.** Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990;346:425-434
- 177. Stingl J, Hilbelink DR, Rhodin JA.** Differences in microcirculatory bed arrangement in some skeletal muscles of the rat and golden hamster. *Int J Microcirc Clin Exp* 1996;16:1-7
- 178. Strunk R, Colten HR.** Inhibition of the enzymatic activity of the first component of complement (C1) by heparin. *Clin Immunol Immunopathol* 1976;6:248-255
- 179. Sugama Y, Tiruppathi C, Offakidevi K, Andersen TT, Fenton II JW, Malik AB.** Thrombin induces expression of endothelial P-selectin and intercellular adhesion molecule-1: a mechanism for stabilizing neutrophil adhesion. *J Cell Biol* 1992;119:935-944
- 180. Tangelder GJ, Arfors KE.** Inhibition of leukocyte rolling in venules by protamine and sulfated polysaccharides. *Blood* 1991;77:1565-71
- 181. Tangelder GJ, Janssens CJ, Slaaf DW, oude Egbrink MG, Reneman RS.** In vivo differentiation of leukocytes rolling in mesenteric postcapillary venules. *Am J Physiol* 1995;268:H909-15
- 182. The Direct Thrombin Inhibitor Trialists' Collaborative Group.** Direct thrombin inhibitors in acute coronary syndromes and during percutaneous coronary intervention: design of a meta-analysis based on individual patients data. *Am Heart J* 2001;141:E2-6
- 183. The Direct Thrombin Inhibitor Trialists' Collaborative Group.** Direct thrombin inhibitors in acute coronary syndromes: principal results of a meta-analysis based on individual patients' data. *Lancet* 2002;359:294-302
- 184. Theroux P, Ouimet H, McCans J.** Aspirin, heparin, or both to treat acute unstable angina. *N Engl J Med* 1994;319:1105-1111
- 185. Thourani VH, Brar SS, Kennedy TP, Thornton LR, Watts JA, Ronson RS, Zhao ZQ, Sturrock AL, Hoidal JR, Vinten-Johansen J.** Nonanticoagulant heparin inhibits NF-kappaB activation and attenuates myocardial reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;278:H2084-93
- 186. Toothill VJ, Van Mourik JA, Niewenhuis HK, Metzelaar MJ, Pearson JD.** Characterization of the enhanced adhesion of neutrophil leukocytes to thrombin-stimulated endothelium. *J Immunol* 1990;145:283-291
- 187. Topol E.** Recent advances in anticoagulant therapy for acute coronary syndromes. *Am Heart J* 2001;142:22-29
- 188. Toyokuni S.** Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathol Int* 1999;49:91-102
- 189. Turpie AG, Antman EM.** Low-molecular-weight heparins in the treatment of acute coronary syndromes. *Arch Intern Med* 2001;161:1484-90
- 190. Vakeva AP, Agah A, Rollins SA, Matis LA, Li L, Stahl GL.** Myocardial infarction and apoptosis after myocardial ischemia and reperfusion: Role of the terminal complement components and inhibition by anti-C5 therapy. *Circulation* 1998;97:2259-67
- 191. Vergnolle N.** Proteinase-activated receptor-2-activating peptides induce leukocyte rolling, adhesion, and extravasation in vivo. *J Immunol* 1999;163:5064-9
- 192. Wachtfogel YT, Pixley RA, Kucich U, Abrams W, Weinbaum G, Schapira M, Colman RW.** Purified plasma factor XIIa aggregates human neutrophils and causes degranulation. *Blood* 1986;67:1731-7
- 193. Wagner JG, Roth RA.** Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. *Pharmacol Rev* 2000;52:349-74

- 194. Walsh RL, Dillon TJ, Scicchitano R, McLennan G.** Heparin and heparan sulphate are inhibitors of human leucocyte elastase. *Clin Sci (Lond)* 1991;81:341-6
- 195. Walz G, Aruffo A, Kolanus W, Bevilacqua M, Speed B.** Recognition by ELAM-1 of the sialyl-LeX determinant on myeloid and tumor cells. *Science* 1990;250:1132-1135
- 196. Watt SM, Williamson J, Genevier H, Fawcett J, Simmons DL, Hatzfield A, Nesbitt SA, Coombe DR.** The heparin binding PECAM-1 adhesion molecule is expressed by CD34+ hematopoietic precursor cells with early myeloid and B-lymphoid cell phenotypes. *Blood* 1993;82:2649-2663
- 197. Weisman HF, Bartow T, Leppo MK, Marsh HC Jr, Carson GR, Concino MF, Boyle MP, Roux KH, Weisfeldt ML, Fearon DT.** Soluble human complement receptor type 1: In vivo inhibitor of complement suppressing post-ischemic myocardial inflammation and necrosis. *Science* 1990;249:146-51
- 198. Weitz JI.** Low-Molecular-Weight Heparins. *N Engl J Med* 1997;337:688-98
- 199. Weitz JI, Leslie B, Hudoba M.** Thrombin binds to soluble fibrin degradation products where it is protected from inhibition by heparin-antithrombin but susceptible to inactivation by antithrombin-independent inhibitors. *Circulation* 1998;97:544-552
- 200. Weyrich AS, Ma XY, Lefer DJ, Albertine KH, Lefer AM.** In vivo neutralization of P-selectin protects feline heart and endothelium in myocardial ischemia and reperfusion injury. *J Clin Invest* 1993;91:2620-9
- 201. White HD, on behalf of the Hirulog and Early Reperfusion or Occlusion (HERO) Study Group.** Thrombin-specific anticoagulation with bivalirudin versus heparin in patients receiving fibrinolytic therapy for acute myocardial infarction: the HERO-2 randomised trial. *Lancet* 2001;358:1855-63
- 202. Wiseman EH, Chang YH.** The role of fibrin in the inflammatory response to carrageenin. *J Pharmacol Exp Ther* 1968;159:206-10
- 203. Woodman RC, Ostrovsky L, Teoh D, Payne D, Poon MC, Kubes P.** Antithrombin and ischemia/reperfusion. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1998;9Suppl2:7-15
- 204. Wright JG, Kerr JC, Valeri CR, Hobson RW 2nd.** Heparin decreases ischemia-reperfusion injury in isolated canine gracilis model. *Arch Surg* 1988;123:470-2
- 205. Wulczyn FG, Krappmann D, Scheidereit C.** The NF-kappa B/Rel and I kappa B gene families: mediators of immune response and inflammation. *J Mol Med* 1996;74:749-69
- 206. Xie X, Thorlacius H, Raud J, Hedqvist P, Linbom L.** Inhibitory effect of locally administered heparin on leucocyte rolling and chemoattractant-induced firm adhesion in rat mesenteric venules in vivo. *Br J Pharmacol* 1997;122:906-910
- 207. Xiaou Z, Theroux P, Frojmovic M.** Modulation of platelet-neutrophil interaction with pharmacological inhibition of fibrinogen binding to platelet GP IIa/IIIb receptor. *Thromb Haemost* 1999;81:21-285
- 208. Yellon DM, Baxter GF.** Protecting the ischemic and reperfused myocardium in acute myocardial infarction: distant dream or near reality? *Heart* 2000;83:381-387
- 209. Zeymer U, Schroder R, Machnig T, Neuhaus KL.** Primary percutaneous transluminal coronary angioplasty accelerates early myocardial reperfusion compared to thrombolytic therapy in patients with acute myocardial infarction. *Am Heart J* 2003;146:686-91
- 210. Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM.** Thrombin stimulates neutrophil adherence by an sell-dependent mechanism: characterization of the response and relationship to platelet-activating factor synthesis. *Ann N Y Acad Sci* 1986;485:349-68

211. Zimmerman GA, Prescott SM, McIntyre TM. Leukotrienes C4 and D4: inflammatory agonists that induce PAF synthesis and endothelial cell-dependent neutrophil adhesion. *Advances in Rheumatology and Inflammation* 1992; J. Fritsch und R. Muller-Peddinghaus Basel, 1. Auflage:49

VII. Publikationen

1. Lindert J, Koster A, Baeter S, Kuppe H, Habazettl H, Pries AR.
Unfractionated and low molecular weight heparin similarly attenuate adhesion, but not extravasation in ischemia/reperfusion.
Posterpräsentation Eacta 2000

2. Lindert J, Koster A, Baeter S, Kuppe H, Habazettl H, Pries AR.
Heparin and hirudin similarly attenuate leucocyte-endothelial cell interaction after ischemia/reperfusion in rats.
Posterpräsentation IARS 2001

3. Lindert J, Koster A, Baeter S, Kuppe H, Habazettl H, Pries AR.
Quantitative effects of Unfractionated Heparin versus Low Molecular Weight Heparin versus Hirudin on Leucocyte/Endothelial Interaction in-vivo.
Posterpräsentation ASA 2001

4. Habazettl H, Lindert J, Baeter S, Neumann K, Kuppe H, Kuebler WM, Pries AR, Koster A.
Effects of unfractionated heparin, low molecular weight heparin and r-hirudin on leucocyte adhesion in ischemia/reperfusion.
Blood Coagul Fibrinolysis 2004;15:375-381

VIII. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren anhängig sind, weder früher noch gleichzeitig ein Dissertationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde, die vorgelegte Dissertationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt und die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind und mir die geltende Promotionsordnung bekannt ist.

Für die Überlassung des Themas dieser Arbeit danke ich Dr. Andreas Koster und Prof. Dr. Helmut Habazettl.

Ein besonderer Dank für eine grossartige Betreuung gilt insbesondere Jens Lindert.

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."