

2. MATERIAL UND METHODEN

Die Wirkung der Selektin-Peptide auf das Rollverhalten von Leukozyten wurde durch Injektion dieser Substanzen in postkapilläre Venolen des ausgelagerten Mesenteriums anästhesierter Ratten untersucht. Die Venolen wurden währenddessen und danach intravitalmikroskopisch beobachtet; anhand von Videoaufzeichnungen wurde die Rate der entlang des Gefäßendothels rollenden Leukozyten unter Applikation der verschiedenen Peptide oder der Kontrollösung verglichen.

2.1 Versuchsvorbereitung

2.1.1 Versuchstiere

2.1.1.1 Vorbereitung der Versuchstiere

Die Versuche wurden an insgesamt 30 weiblichen Sprague-Dawley Ratten mit einem Gewicht zwischen 280 und 320g durchgeführt. Die Tiere wurden mindestens 5 Stunden vor Versuchsbeginn nüchtern gehalten, normalerweise am Abend vor dem Versuchstag.

2.1.1.2 Narkose

Eine halbe Stunde vor dem Versuch wurden die Versuchstiere mit Pentobarbital (Nembutal[®], Sanofi, Hannover; 20mg/kg KG intramuskulär [i.m.]) und Atropinsulfat (Atropinsulfat Braun, Braun Melsungen AG, Melsungen; 0,1mg/kg KG i.m.) prämediziert und zu Versuchsbeginn mit Ketaminhydrochlorid (Ketamin[®] 10%, Sanofi-Ceva GmbH, Düsseldorf; 75 mg/kg i.m.) narkotisiert. Die Narkose wurde durch die intravenöse Gabe einer Pentobarbitallösung (s.u.) aufrechterhalten.

Eine Heizmatte, die durch eine intrarektal platzierte Temperatursonde reguliert wurde, diente zur Stabilisierung der Körpertemperatur des Tieres auf 36,5-37,0°C (Homeothermic Control Unit, Harvard, Edenbridge, England).

2.1.1.3 Präparation

Die ventrale Halsseite wurde rasiert. Mit einem elektrischen Thermokauter, durch dessen Verwendung lokale Blutungen unterbunden wurden, wurde eine mediane Inzision der Haut des ventralen Halses durchgeführt. Diese wurde am distalen Ende um etwa einen Zentimeter

nach rechts lateral verlängert, so daß ein aufklappbarer Hautlappen entstand. Daraufhin wurden die rechte V.jugularis externa, die rechte A.carotis communis sowie die Trachea freipräpariert und mit vom Durchmesser passenden Polyethylenschläuchen kanüliert. Der arterielle Katheter wurde mit 0,5ml einer heparinisierten Kochsalzlösung (50 I.E. Heparin-Natrium/ml; Liquemin[®] 25000N, Hoffmann La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) gespült, um einer Thrombusbildung vorzubeugen. Durch den venösen Zugang erhielt die Ratte eine Dauerinfusion bestehend aus physiologischer Kochsalzlösung und Pentobarbital (0,2 mg/ml) mit 40 ml/kg KG/h zur Aufrechterhaltung der Narkose.

Der Bauch wurde rasiert. Darauf wurde die Bauchhöhle durch eine mediane Inzision im Bereich der Linea alba eröffnet. Dazu wurde auch der elektrische Thermokauter verwendet. Die offene Bauchhöhle wurde bis zur Auslagerung der Darmschlingen mit einer in 0.9 %iger Kochsalzlösung getränkten Kompresse abgedeckt.

2.1.2 Reagentien

2.1.2.1 Selektin-Peptide

Von George A. Heavner, Centocor Inc., Malvern, USA, wurden verschiedene Peptide synthetisiert (Heavner et al., 1993) und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Jedes dieser Peptide entspricht in seiner Aminosäuresequenz einem bestimmten Abschnitt der Lektin-Domäne von humanem E- oder P- oder L-Selektin. Die Numerierung der Peptide erfolgte in Übereinstimmung mit den veröffentlichten Sequenzen humaner Selektine (Bevilaqua et al., 1989; Johnston et al., 1989; Tedder et al., 1989), dabei entsprach Aminosäurenrest 1 immer dem ersten Aminosäurenrest vom N-terminalen Ende der Lektin-Domäne des reifen Proteins.

Untersucht wurden von uns die P-Selektin-Peptide P11-20, L,P23-30, P36-50, P54-63, P70-79, P109-118; die L-Selektin-Peptide L11-20, L,P23-30, L36-50, L54-63, L70-79, L109-118 sowie die E-Selektin-Peptide E23-30, E54-63, E70-79 und E109-118 (s. Abb.2). Das 23-30 L- und P-Selektin-Peptid sind in ihrer Aminosäuresequenz identisch. Von den Peptiden stand jeweils etwa 5mg in kristalliner Form zur Verfügung.

Für die Mikroinjektion wurden die Peptide in 0,9% NaCl-Lösung gelöst. Die Lösung enthielt 5mM Ca²⁺. Von jedem Peptid wurde eine Stammlösung von 1mg/ml hergestellt. Dazu wurden die Peptide mit einer Feinwaage (Modell 1801, Sartorius, Göttingen) abgewogen und in dem

numerisch entsprechenden Volumen in ml Kochsalz-Kalziumlösung gelöst. Das Leukozytenrollen wirksam hemmende Peptide wurden auch in niedrigeren Dosierungen untersucht. Dazu wurden von der Grundlösung 100µl entnommen mit 0,9ml Kochsalz-Kalziumlösung vermischt. Dieser Vorgang wurde bis zu einer Konzentration von 10-bzw. (je nach Wirksamkeit des Peptids) 1µg/ml wiederholt. P-Selektin-Peptid 70-79 wurde zudem in einer Konzentration von 500µg/ml untersucht. Die Lösungen hatten einen durchschnittlichen pH-Wert von 4,58 (PH-Meter: Knick, Berlin). Die durchschnittliche Osmolarität betrug 282,3mOsmol/l (Osmometer: Automatik, Roebing). Die Grundlösungen wurden sofort nach der Herstellung tiefgefroren, um Abbau durch Proteasen zu minimieren. Sie wurden erst kurz vor Versuchsbeginn wieder aufgetaut.

		5	10	15	20	25	30
P-SEL	W-T-Y-H-Y-S-T-K-A-Y-S-W-N-I-S-R-K-Y-C-O-N-R-Y-T-D-L-V-A-I-O-						
L-SEL	W-T-Y-H-Y-S-E-K-P-M-N-W-O-R-A-R-R-F-C-R-D-N-Y-T-D-L-V-A-I-O-						
E-SEL	W-S-Y-N-T-S-T-E-A-M-T-Y-D-E-A-S-A-Y-C-Q-Q-R-Y-T-H-L-V-A-I-O-						
		35	40	45	50	55	60
P-SEL	N-K-N-E-I-D-Y-L-N-K-V-L-P-Y-Y-S-S-Y-Y-W-I-G-I-R-K-N-N-K-T-W-						
L-SEL	N-K-A-E-I-E-Y-L-E-K-T-L-P-F-S-R-S-Y-Y-W-I-G-I-R-K-I-G-G-I-W-						
E-SEL	N-K-E-E-I-E-Y-L-N-S-I-L-S-I-S-P-S-Y-Y-W-I-G-I-R-K-V-N-N-V-W-						
		65	70	75	80	85	90
P-SEL	T-W-V-G-T-K-K-A-L-T-N-E-A-E-N-W-A-D-N-E-P-N-N-K-R-N-N-E-D-C-						
L-SEL	T-W-V-G-T-N-K-S-L-T-E-E-A-E-N-W-G-D-G-E-P-N-N-K-K-N-K-E-D-C-						
E-SEL	V-W-V-G-T-Q-K-P-L-T-E-E-A-K-N-W-A-P-G-E-P-N-N-R-Q-K-D-E-D-C-						
		95	100	105	110	115	120
P-SEL	V-E-I-Y-I-K-S-P-S-A-P-G-K-W-N-D-E-H-C-L-K-K-K-H-A-L-C-Y-T-A						
L-SEL	V-E-I-Y-I-K-R-N-K-D-A-G-K-W-N-D-D-A-C-H-K-L-K-A-A-L-C-Y-T-A						
E-SEL	V-E-I-Y-I-K-R-E-K-D-V-G-M-W-N-D-E-R-C-S-K-K-K-L-A-L-C-Y-T-A						

Abb. 2: Aminosäuresequenzen der Lektin-Domänen von Humanem P-, L- und E-Selektin unter Verwendung des internationalen Ein-Buchstaben-Codes (s. Anhang). Die Numerierung der Sequenzen erfolgte ausgehend vom N-Terminus des reifen Proteins. Die unterstrichenen Areale zeigen die Sequenzen der für die Versuche verwendeten Peptide und ihre Lokalisation in der Lektin-Domäne des jeweiligen Selektins.

2.1.2.2 Kontrollösung

Als Kontrollösung diente eine 0,9%ige Kochsalzlösung mit 5mM Ca²⁺ ohne Peptid, auf einen pH-Wert von ca. 4-5 angesäuert.

2.1.3 Mikroinjektionspipetten

Zur Herstellung der Injektionspipetten wurden Glaskapillaren aus Borosilikat-Glas (Wanddicke 0,09mm, Außendurchmesser 0,9mm, Hilgenberg, Malsfeld, Germany) verwendet. Dazu wurden sie in 15cm lange Einzelstücke geschnitten, deren Enden über einer Bunsenbrennerflamme abgerundet wurden. 100ml gefiltertes (Filter Typ RA 1,2mm, Millipore, Neu-Isenburg) destilliertes Wasser wurden mit einer Wasserstrahlpumpe durch jede Kapillare gesaugt. Daraufhin wurden die Glaskapillaren über Nacht in eine gefilterte Reinigungslösung (Edisonite[®], Merz, Frankfurt am Main; 1g/100ml Aqua dest.) eingelegt und am nächsten Tag nochmals mit je 100ml gefiltertem Aqua dest. gespült. Ein vertikales Kapillarziehgerät (Modell GA-01286-A/B, Getra, München, Germany) brachte durch einen Glühdraht die jeweilige Glaskapillare in der Mitte zum Schmelzen und zog währenddessen mit einer regulierbaren Kraft am unteren Ende. So entstanden zwei an der Spitze noch verschlossene Injektionspipetten. Die Spitzen dieser Pipetten wurden unter mikroskopischer Kontrolle (Carl Zeiss OpMi 1) in zwei um 30° gegeneinander geneigten Ebenen geschliffen (Kapillarschleifgerät 1300M Beveler, World Precision Instruments, New Haven, Connecticut, USA). Die Spitzen der solchermaßen geschliffenen Pipetten hatten einen nominalen Außendurchmesser von 7-10µm. Etwa 15-20µl der in Kochsalz- und Ca²⁺-Lösung gelösten Peptide wurden über ein Schlauchsystem mit Filter (HV 0,45mm, Millipore, Neu-Isenburg) luftblasenfrei in die Mikroinjektionspipetten eingefüllt.

2.1.4 Intravitalmikroskopie

Das verwendete Intravitalmikroskop (Leitz, Wetzlar; Objektiv SW 25/0.60; Okular 12,5) erlaubte eine Beleuchtung im Durchlicht durch einen Kondensator (Leitz, L20/0,45) und einen Rotlichtfilter (Schott, Mainz). Das Mikroskop war für teleskopische Projektion modifiziert (Ley et al.,1987). Der bildgebende Strahlengang wurde mit einem Projektionsokular (1.25×) parallelisiert und durch ein Biprisma (Dove) geleitet. Das Bild konnte durch Drehung des Biprismas um die Längsachse gedreht werden. Nach Passieren des Biprismas wurden die Strahlen durch ein System aus Sammellinsen (Gesamtbrennweite=300mm) fokussiert. Über diesen Linsen befand sich ein Strahlenteiler aus zwei aufeinandergeklebten Prismen, durch den das Bild sowohl zu einer Videokamera als auch zu einem Fotoapparat geleitet werden konnte.

2.1.5 Aufzeichnung

Zur Aufzeichnung der Versuche unter Durchlichtbeleuchtung wurde eine Multiodendevideokamera (Modell TC/HO1, RCA, Lancaster, USA) verwendet. In das Bild wurden durch eine Zeituhr (Video Timer VTG-10, Pieper, Schwerte/Düsseldorf, Germany) Datum und Uhrzeit eingeblendet. Es wurde von dort an den Videorecorder (Modell VO 5630, Sony U-matic, Japan; z.T. auch Blaupunkt ACT RTV-950 Hifi, Germany) und den Monitor (Audiotronics Corporation, North Hollywood, California, USA) weitergeleitet. Einzelne Videostandbilder wurden direkt von dem Monitor mit einer Spiegelreflexkamera (Minolta, Japan) abfotografiert.

2.2 Versuchsdurchführung

2.2.1 Rahmenbedingungen

Über den arteriellen Zugang in der A.carotis communis erfolgte eine kontinuierliche Registrierung und Aufzeichnung der Pulsfrequenz und des Druckes (Schreiber: Gould, St Sauveur, Ballainvilliers, Frankreich; Pulsfrequenzmessgerät: PFM2 Mino, H. Sachs Elektronik, March; Druckwandler: POCA 75 S/N2004 Druck Ltd.).

Nach Beendigung der Präparation und Anschluß an die Dauerinfusion sowie die Druckmessung wurde die Ratte in Seitenlage auf einer aus Plexiglas gefertigten Versuchsplattform („stage“) gelagert, so daß die Bauchhöhleninzision möglichst nahe des Mikroskopierfensters zu liegen kam. Dies ermöglichte die spätere spannungsfreie Lagerung des Rattenmesenteriums auf dem Mikroskopierfenster. Nach Umlagerung der Ratte mitsamt der Versuchsplattform vom Präpariertisch in den Aufbau des Intravitalmikroskops wurden zwei bis drei Darmschlingen proximal vom ileo-coecalen Übergang unter größtmöglicher Schonung des Gewebes ausgelagert und das Mesenterium eines möglichst gefäßreichen Darmsegments über dem Mikroskopierfenster ausgebreitet. Die ausgelagerten Darmschlingen wurden während des Versuches von einer bikarbonat-gepufferten Superfusionslösung überspült (Zusammensetzung in mmol/l: NaCl 132; KCl 4,7; CaCl₂ 2; MgCl₂ 1,2; NaHCO₃ 18; equilibriert mit 5% CO₂ in N₂ zur Stabilisierung des pH-Wertes auf 7,35). Diese wurde durch eine Thermostat-regulierte Heizung (Haake D8, Haake, Berlin/Karlsruhe) auf konstante 37°C erwärmt. Sie floß dabei am Objektiv entlang über das ausgelagerte Mesenterium in ein

Reservoir; dessen Flüssigkeitspegel regulierte eine an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossene Absaugvorrichtung.

Bei allen Versuchen wurden Blutproben (20µl) in Abständen von etwa 45min aus dem arteriellen Katheder in der A.carotis communis entnommen. Nach Verdünnung der Proben von 1:500 wurde mit ihnen die systemische Leukozytenkonzentration durch einen elektronischen Zellzähler (Coulter Counter, Model DN, Coulter Electronics, Herts, England) bestimmt. Darauf wurde der Katheder jeweils mit Heparinlösung (s. 2.3) gespült.. Durch die bereits erwähnte initiale Gabe von Atropinsulfat und die regelmäßige Absaugung der Trachea mit einem Polyethylenschlauch kleineren Durchmessers konnte die Verlegung derselben durch übermäßige Schleimproduktion verhindert werden. Im Falle des Aussetzens der Atemfunktion konnten die Versuchstiere kontrolliert beatmet werden (Small Animal Ventilator, Harvard, Edenbridge, England.).

Einem kritischen Blutdruckanstieg (>200mBar mittlerer arterieller Druck) wurde durch zusätzliche Gabe geringer Dosen Pentobarbital (5-10mg/kg KG und mehr nach Bedarf) begegnet; stark abfallendem Blutdruck (<90mBar mittlerer arterieller Druck) wurde versucht durch Volumengabe (0.9% NaCl-Lösung) oder durch Reduktion der Infusionsgeschwindigkeit der Pentobarbitallösung entgegenzuwirken. Nach Beendigung des Versuches wurden die Tiere durch eine Überdosis Pentobarbital (ca.150mg/kg KG i.v.) getötet.

2.2.2 Mikroinjektionsversuch

Im intravitalmikroskopisch beobachteten Mikrogefäßnetzwerk wurde eine geeignete Venole mit ausreichendem Durchmesser für die Mikroinjektion (etwa 15-20µm) aufgesucht. Unter mikroskopischer Kontrolle wurde nun die mit der Injektionslösung gefüllte Mikropipette unter Zuhilfenahme eines piezoelektrischen Mikromanipulators (Märzhäuser PM 10, Wetzlar, Germany) in die Venole eingeführt. Dazu ermöglichte der Mikromanipulator langsame und kontrollierte Bewegung in drei Ebenen, sowie kurze, piezogetriebene Ruckbewegungen in Richtung der Mikropipettenachse. Ein luftgefülltes Schlauchsystem, das an einem Ende an einen Dreiwegehahn und an eine 5- bzw. 10-ml Spritze, am anderen Ende an die Mikropipette angeschlossen war, erlaubte eine druckstabile Infusion der Substanzlösung. Die Wirkungen auf das Rollverhalten der Peptide wurde in einem Gefäßabschnitt etwa 1mm stromabwärts

beobachtet; zwischen diesem und dem Injektionsort lagen mehrere Gabelungen mit zuführenden Venolen, die für eine ausreichende Durchmischung des Blutes mit der Infusionslösung sorgten. Der Durchmesser der beobachteten Gefäßabschnitte lag zwischen 25 und 50 μm (s. Abb. 3).

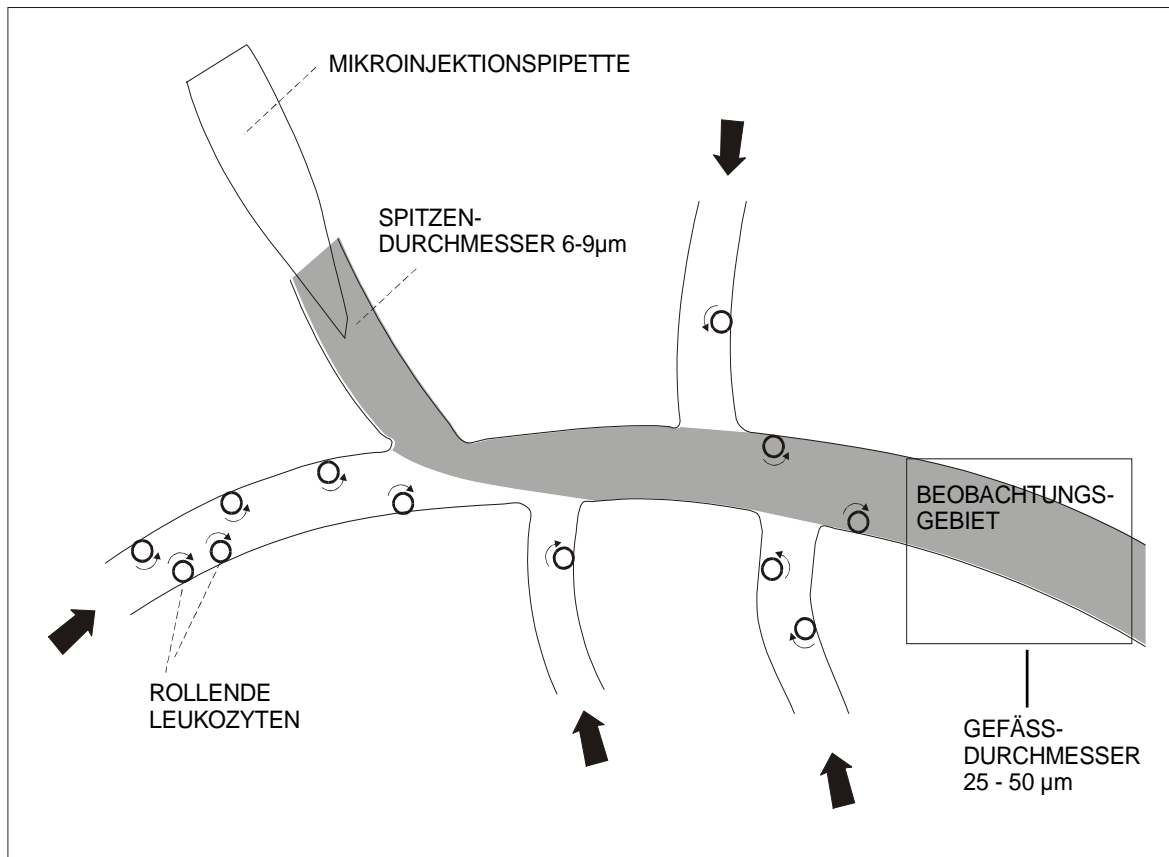


Abb. 3: Schematische Darstellung der Mikroinjektion und des untersuchten venolären Gefäßgebietes. In eine zuführende Venole wird die Peptidlösung so injiziert, daß sich die Erythrozytenflußgeschwindigkeit im Beobachtungsgebiet etwa verdoppelt. Es erfolgt eine Blutbeimischung aus mehreren Seitenästen. Das Beobachtungsgebiet liegt ca. 1mm stromabwärts von der Injektionsstelle (Abb. angelehnt an K. Ley et al., 1993).

Der Druck in dem Injektionssystem wurde so eingestellt, daß die Flußgeschwindigkeit der Erythrozyten im beobachteten Gefäßbereich während der Mikroinjektion etwa doppelt so hoch wie ohne Injektion war. Es wurden keine Mikrogefäße mit Flußgeschwindigkeiten von unter 0,5mm/s untersucht, da sich unter solchen Bedingungen frei fließende und rollende Leukozyten nur noch ungenügend unterscheiden lassen (Atherton et al., 1973; Firrel et al., 1989). Gemessen wurde die Flußgeschwindigkeit in der Gefäßachse (v_{max}) mithilfe eines dualen Phototransistors, der an einen automatischen Kreuzkorrelator (Model 102B,

Instrumentation for Physiology and Medicine Inc., San Diego, USA) angeschlossen war (Baker et al., 1974; Lipowski et al., 1978). Die Messungen wurden durch einen Schreiber registriert (Recorder 220, Schubart, Wiesbaden/Germany). Einer 60s dauernden Injektionsphase schloß sich, nach etwa 30s Wartezeit, eine ebenfalls 60s dauernde Kontrollphase ohne Injektion an. Beide Phasen wurden (wie oben beschrieben) auf Videoband aufgezeichnet.

Die einzelnen Peptide wurden in den jeweiligen Konzentrationen je nach Verfügbarkeit und während der Versuchsdurchführung abgeschätzter Streuung der Meßergebnisse zwischen 5- und 22mal appliziert.

2.3. Versuchsauswertung

2.3.1 Flux rollender Leukozyten

Unter den gewählten Abbildungsbedingungen erscheinen rollende Leukozyten als helle, lichtbrechende Ellipsoide, die sich deutlich langsamer als die frei fließenden Erythrozyten an dem Endothel der Venolen entlangbewegen (s. Abb. 4).

Die Anzahl am Endothel entlangrollender weißer Blutkörperchen pro Zeiteinheit wurde als "Flux rollender Leukozyten" (F_{rol}) bezeichnet. Nach Versuchsende wurde durch Analyse der Videoaufzeichnungen der Flux rollender Leukozyten während der Injektions- und der Kontrollperioden ermittelt. Um eine größtmögliche Zählgenauigkeit für die Fluxbestimmung zu erreichen, wurde das Videoband mit der halben oder noch geringerer Laufgeschwindigkeit gesichtet. Gezählt wurden die eine senkrecht in den Gefäßverlauf eingeblendete Linie passierenden rollenden Leukozyten über den genauen Zeitraum von 60s während der Injektions- bzw. der Kontrollphase. Zum Zwecke der Vergleichbarkeit der einzelnen Mikroinjektionen wurde als Ergebnis der Fluxwert als Prozentsatz des Leukozytenfluxes während der entsprechenden Kontrollperiode angegeben.

Aus sämtlichen Ergebnissen jedes Peptides bei jeder Konzentration wurden Mittelwerte berechnet, die unter Angabe des Standardfehlers ($SEM = \text{Standardabweichung} / \sqrt{(n-1)}$; Sachs, 1982) als Säulendiagramme dargestellt wurden. Die Mittelwerte der Peptidwirkungen in den Versuchsgruppen (P-, L- und E-Selektin-Peptide) wurden untereinander mit Hilfe des Bonferroni-Tests und des Student-Newman-Keuls-Tests für multiple Vergleiche auf die

Signifikanz der Unterschiede hin überprüft. Signifikante Abweichungen vom Kontrollwert wurden angenommen, wenn $p \leq 0,05$ (*) bzw. $p \leq 0,01$ (**) war.

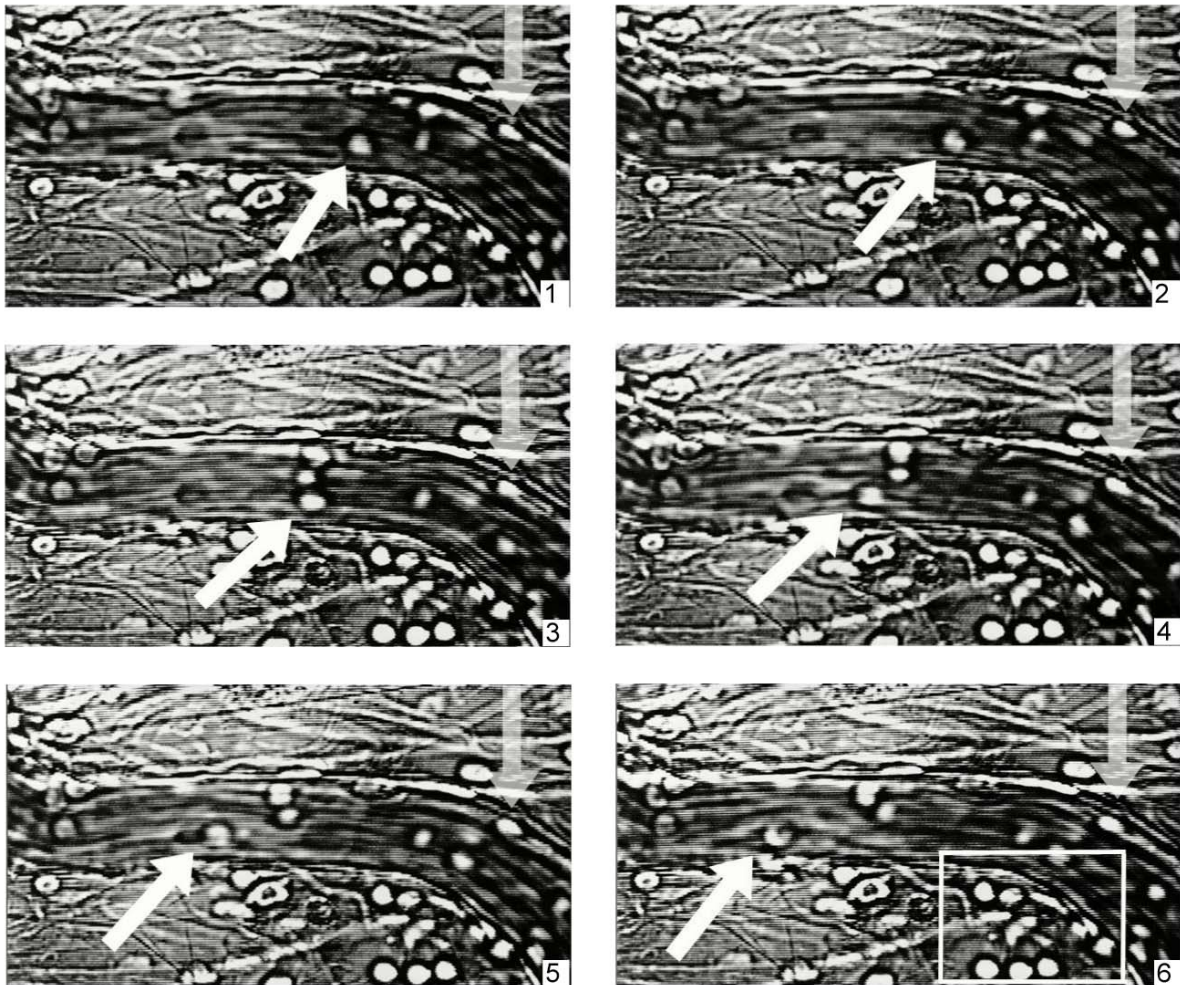


Abb. 4: Fotografische Sequenz einer postkapillären Venole des Rattenmesenteriums. Zeitdauer Bild 1-Bild 6: ca.2 Sekunden. Blutflußrichtung von rechts nach links. Weißer Pfeil: Rollender Leukozyt. Semitransparenter Pfeil: Fest adhärrierender Leukozyt. Weißes Rechteck: In das umliegende Gewebe transmigrierte Leukozyten.

2.3.2 Weitere Ergebnisse

Zusätzlich wurde mit einem Video-Positionsmeßgerät (Modell VPA 1000, For A LTD, Tokyo, Japan), das zwischen Videorecorder und Monitor geschaltet war, der jeweilige Gefäßdurchmesser ermittelt. Für jeden Versuch wurden des weiteren die Zeit nach Auslagerung des Mesenteriums und die Flußgeschwindigkeit der Erythrozyten (s.o.) festgehalten. Die Konzentration weißer Blutzellen zum Zeitpunkt der Messung wurde aus den 45-minütigen Ergebnissen der Blutentnahmen interpoliert. Diese Rohdaten wurden mit Hilfe

des Tabellenkalkulationsprogramms Lotus 123 (Lotus Development Corporation, Cambridge, England) weiterverarbeitet.

Es wurde die Durchblutung (Q) des jeweiligen Mikrogefäßes aus dem Gefäßdurchmesser (D) und der durchschnittlichen Flußgeschwindigkeit (\bar{v}) errechnet:

$$Q = D^2 \cdot \frac{p}{4} \cdot \frac{\bar{v}}{1,6}$$

Die durchschnittliche Flußgeschwindigkeit (\bar{v}) wurde unter Annahme eines parabolischen Geschwindigkeitsprofils in dem Gefäß aus der gemessenen Mittelliniengeschwindigkeit (v_{CL}) nach dem empirisch ermitteltem Verhältnis

$$\bar{v} = \frac{v_{CL}}{1,6}$$

ermittelt (Baker et al., 1974; Ley et al., 1991).

Aus dem Produkt der systemischen Leukozytenkonzentration [L] und der Durchblutung ergab sich der Leukozytenflux (F_{tot}) für jedes Gefäß.

$$F_{tot} = Q \cdot [L]$$

Der Schergrad (γ_w) ließ sich näherungsweise aus der Newton'schen Gleichung

$$\gamma_w = 8 \cdot \frac{\bar{v}}{D}$$

errechnen.

Der Anteil rollender Leukozyten am Gesamtleukozytenflux ergibt sich aus $\frac{F_{rol.}}{F_{tot}}$.

Außerdem wurde untersucht, wie der Flux rollender Leukozyten während der Kontrollperiode mit der Zeit nach Versuchsbeginn, dem Gefäßdurchmesser, bzw. dem Schergrad zusammenhing. Dazu wurde die Methode der Minimierung der Abweichungsquadrate benutzt

(Walter, 1988). Korrelationen wurden als signifikant angesehen, wenn die nach dem Student-t-Test ermittelte Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5% lag. Mit dem gleichen Verfahren wurde überprüft, ob der Gefäßdurchmesser bzw. die Flußgeschwindigkeit (v_{CL}) mit der Zeit nach Versuchsbeginn (d.h. Auslagerung des Rattenmesenteriums) zusammenhingen.

Zusätzlich sollte untersucht werden, inwiefern aktive Peptide ihre Wirksamkeit je nach Zeitdauer des Versuches veränderten und ob mögliche Veränderungen davon abhängig waren, ob es sich um P- oder L-Selektin-Peptide handelte. In die Untersuchung einbezogen wurden hierbei Peptide, die in der Lage waren, Leukozytenrollen um mehr als 50% zu inhibieren. Mögliche Korrelationen wurden dabei nach oben genannter Methode auf ihre Signifikanz überprüft.