

### 3. ERGEBNISSE

Die Untersuchung umfaßte insgesamt 228 Mikroinjektionen in 67 Venolen von 30 Versuchstieren. Blutdruck und Herzfrequenz der Tiere blieben während den Messungen stabil. Die Körpertemperatur der Versuchstiere wurde durch die Heizmatte während der Versuche zwischen 36,5 und 37,0°C gehalten.

Es wurden Venolen mit Durchmessern von 15,9 bis 60,3µm, im Mittel  $36,6 \pm 8,9 \mu\text{m}$  (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) untersucht.

Die Blutströmungsgeschwindigkeit in der Gefäßquerschnittsmitte ( $v_{CL}$ ) im beobachteten Gefäßareal während der Mikroinjektion lag mit  $6,47 \pm 2,72 \text{ mm/s}$  etwa doppelt so hoch wie die während der Kontrollperioden ( $3,18 \pm 1,48 \text{ mm/s}$ , s. Abb. 5). Die systemische

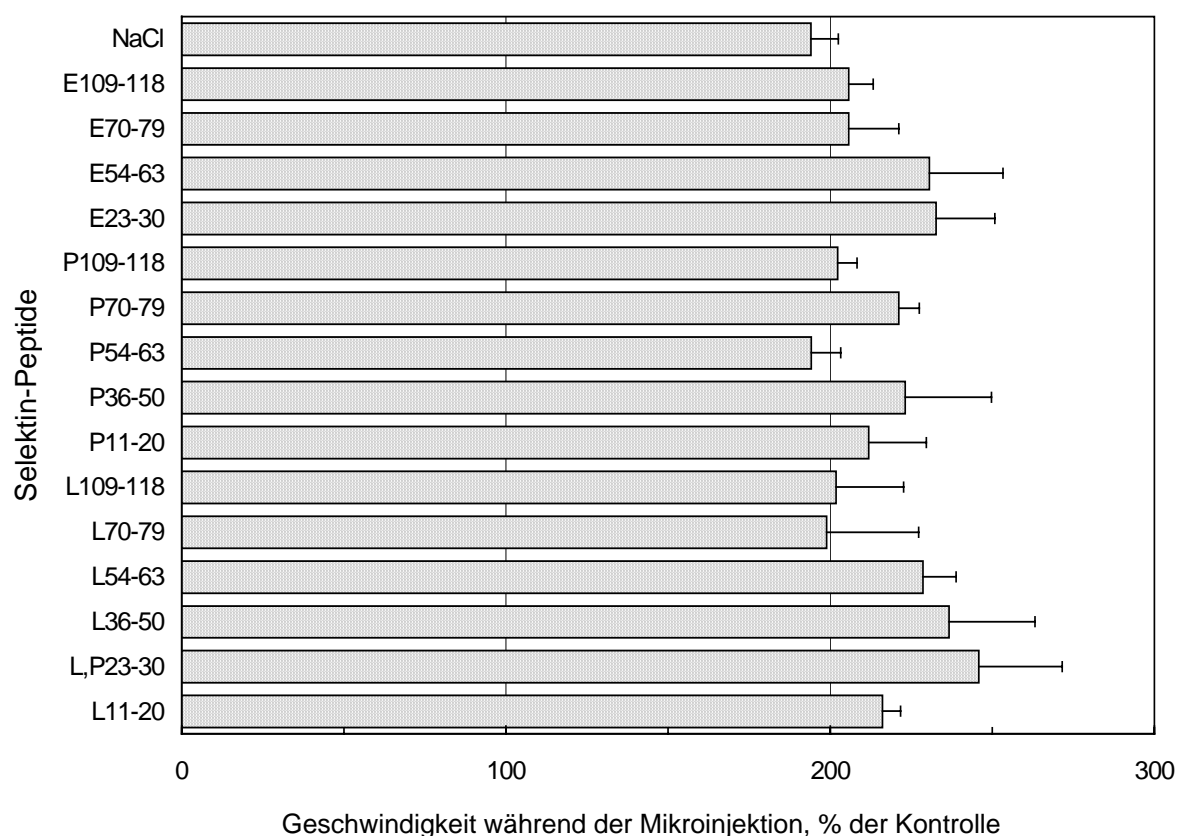
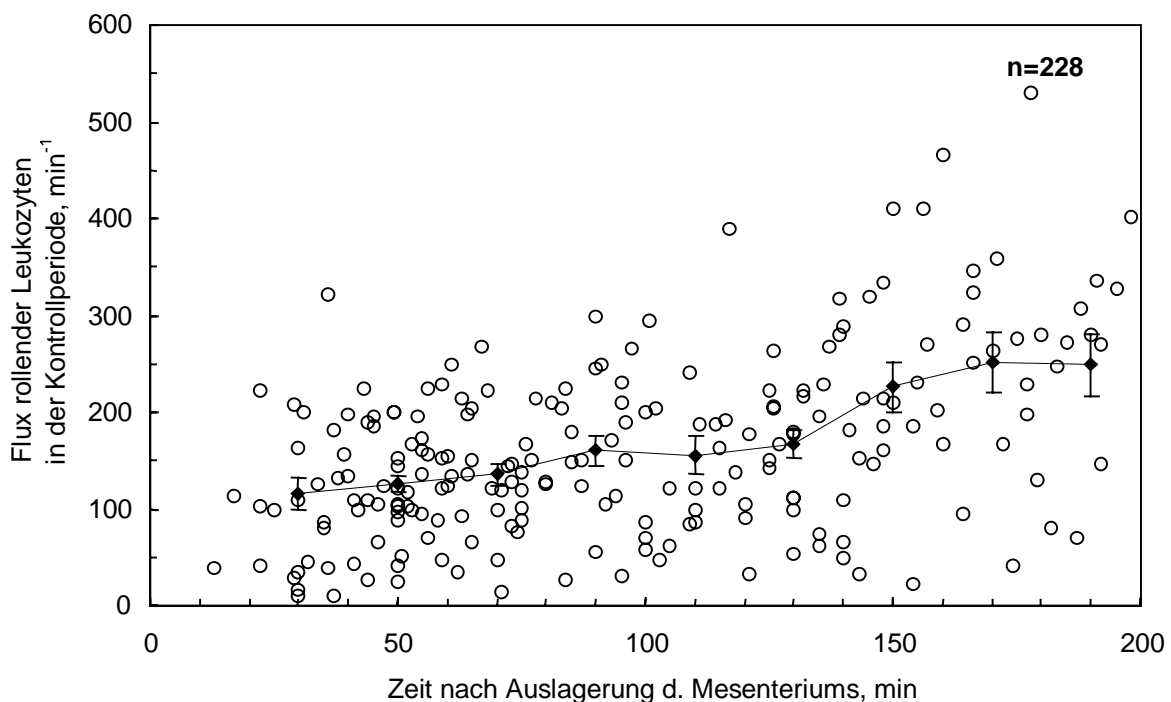


Abb. 5: Blutströmungsgeschwindigkeiten während der Mikroinjektion der einzelnen Peptide. Die Meßergebnisse wurden auf die Blutströmungsgeschwindigkeit während der Kontrollperioden (=100%) normiert. (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)

Leukozytenkonzentration lag 45min nach Versuchsbeginn bei  $5,2 \pm 0,4$  G/l (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler), blieb bis ca. 90min in diesem Bereich ( $5,2 \pm 0,3$  G/l) und stieg dann kontinuierlich auf  $6,7 \pm 0,4$  G/l nach 135min und bis auf  $9,5 \pm 0,8$  G/l nach 180min an.

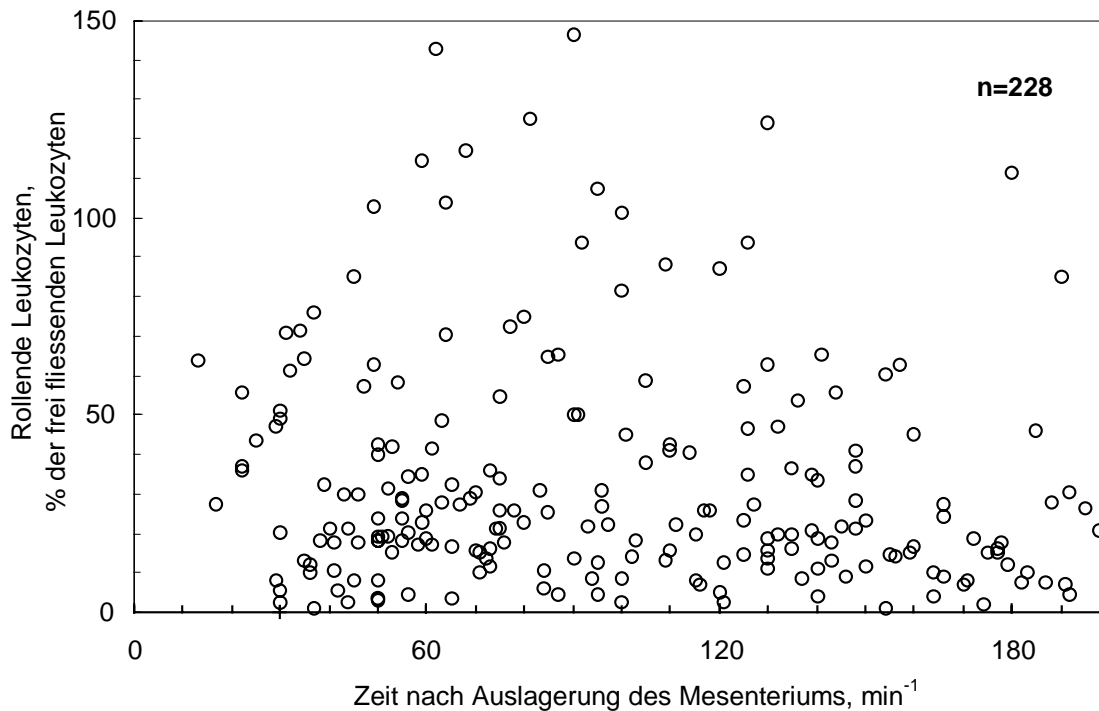
### 3.1 Zählung rollender Leukozyten im Durchlicht

Der Flux rollender Leukozyten während der Kontrollperioden betrug in 67 Venolen (Durchmesser 15-60 $\mu$ m) im Mittel  $165,14 \pm 6,25 \text{ min}^{-1}$ . Die Einzelwerte streuten dabei zwischen 10 und  $529 \text{ min}^{-1}$ . Der Flux rollender Leukozyten zeigte eine signifikante ( $p < 0,01$ ,  $R^2 = 0,234$ ) Abhängigkeit von der Zeit nach Auslagerung des Mesenteriums. Die mittlere Zahl rollender Leukozyten stieg bis etwa 90-100min nur langsam an, gegen Ende der Versuchszeiträume nahm sie dann deutlicher zu (s. Abb. 6).



**Abb. 6:** Flux der rollenden Leukozyten in den Kontrollperioden in Abhängigkeit der Zeitdauer nach Auslagerung des Mesenteriums. Jeder offene Punkt entspricht einer Kontrollperiode. Dreiecke: Klassenmittel  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (Klassenbreite=20min). n=Anzahl der Kontrollperioden.

Über die Versuchszeit hinweg blieb hingegen der prozentuale Anteil der rollenden Leukozyten ( $F_{rol}$ ) an der Gesamtzahl der im gleichen Gefäß insgesamt beobachteten Leukozyten ( $F_{tot}$ ) annähernd konstant (s. Abb. 7).



**Abb. 7:** Der prozentuale Anteil rollender Leukozyten an der Gesamtzahl der Leukozyten im beobachteten Gefäßabschnitt als Funktion der Zeit nach Auslagerung des Mesenteriums. Es kommt über den Versuchszeitraum zu keiner signifikanten Änderung. (Lineare Regression:  $p > 0,05$ ,  $R^2 = 0,01$ ).

Der Flux rollender Leukozyten zeigte keine signifikante Abhängigkeit ( $p > 0,05$ ,  $R^2 = 0,19$ ) von der Blutflußgeschwindigkeit innerhalb des beobachteten Flußgeschwindigkeitsspektrums während der Kontrollperioden (0,5-6mm/s) (s. Abb. 8). Auch während der Injektionsphasen des Peptides wurde der Flux rollender Leukozyten nicht signifikant von der Blutflußgeschwindigkeit beeinflusst ( $p > 0,05$ ,  $R^2 = 0,011$ ). So wiesen einzelne Messungen bei injektionsbedingt hohen Flußgeschwindigkeiten bis zu 16 mm/s im beobachteten Stromgebiet noch hohe Fluxraten rollender Leukozyten auf (s. Abb. 8).

Der Schergrad am venolären Endothel zeigt im Bereich von 200-800  $s^{-1}$  keine signifikante Korrelation zum Flux rollender Leukozyten ( $p > 0,05$ ,  $R^2 = 0,010$ ). Erst bei höheren Schergraden ( $> 800s^{-1}$ ) sinkt der Flux rollender Leukozyten ab (s. Abb. 9).

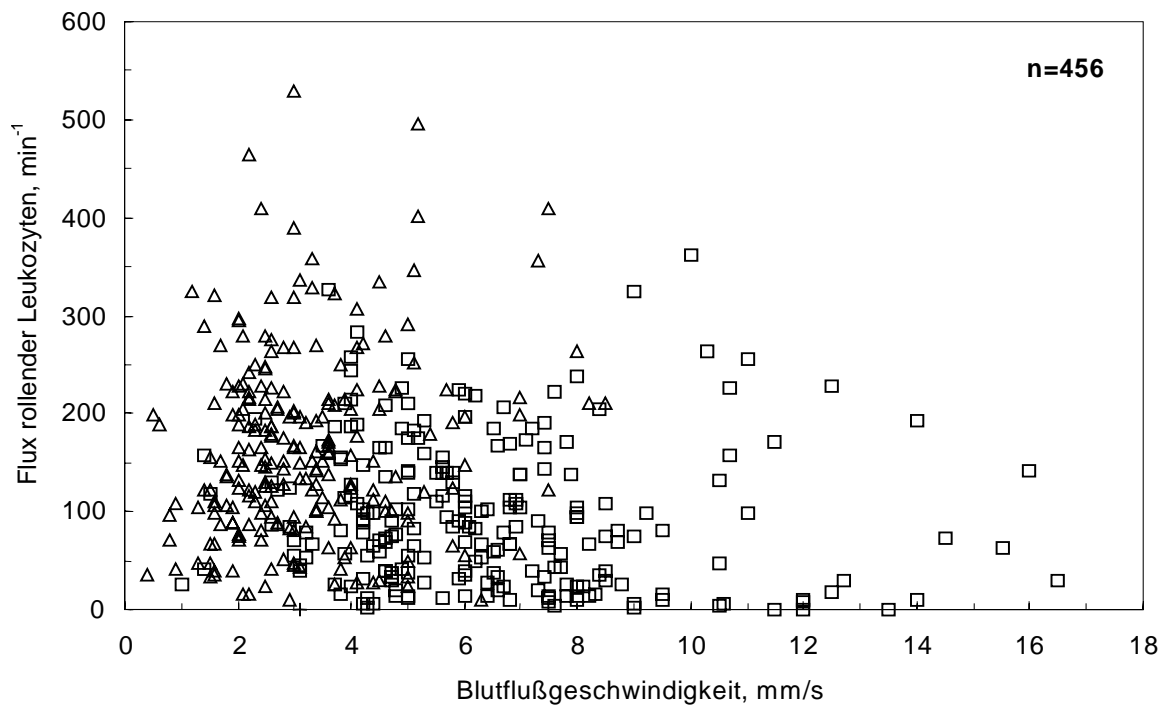


Abb. 8: Abhängigkeit des Fluxes rollender Leukozyten während der Mikroinjektion (Kästchen) und während der Kontrollperiode (Dreiecke) von der Blutflußgeschwindigkeit im beobachteten Gefäßareal. n=Anzahl der Beobachtungen.

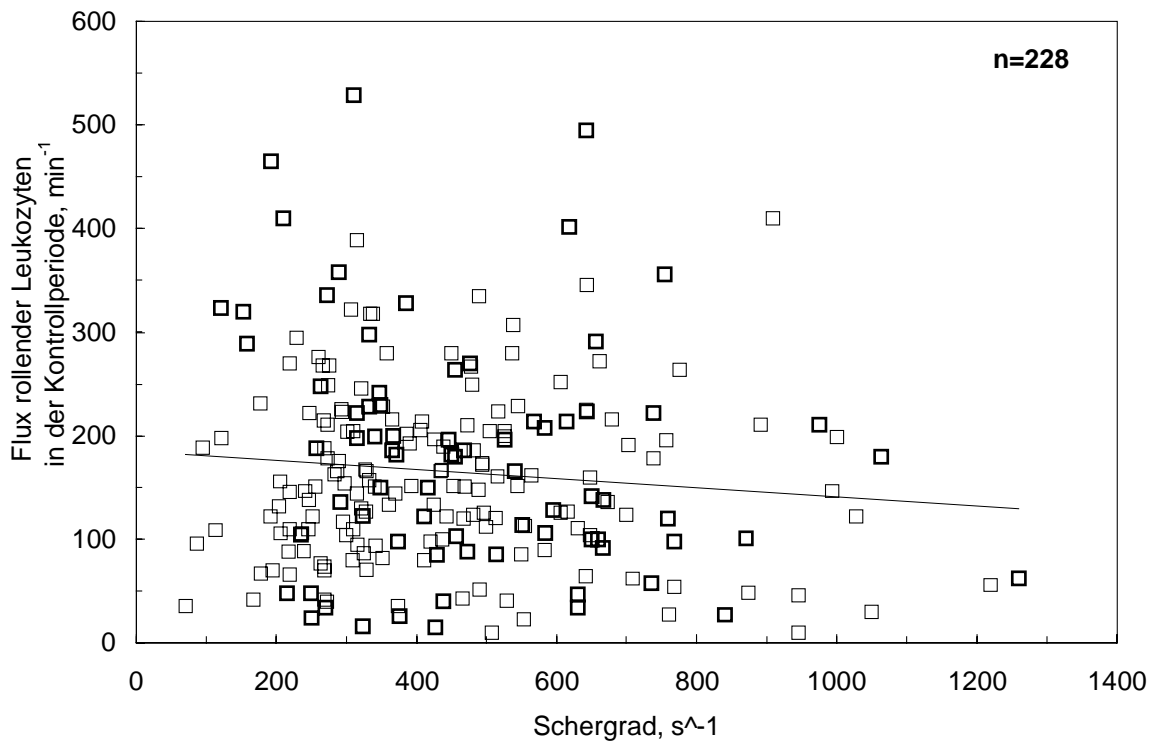


Abb. 9: Flux rollender Leukozyten in Abhängigkeit vom Schergrad an der Gefäßwand. Keine signifikante Korrelation ( $R=0,10$ ). n= Anzahl der Kontrollperioden. Linie: Lineare Regression.

Mit zunehmendem Gefäßdurchmesser stieg der Flux rollender Leukozyten signifikant an ( $p < 0,01$ ,  $R^2 = 0,179$ ) (s. Abb. 10). Die Zahl rollender Leukozyten pro Volumeneinheit

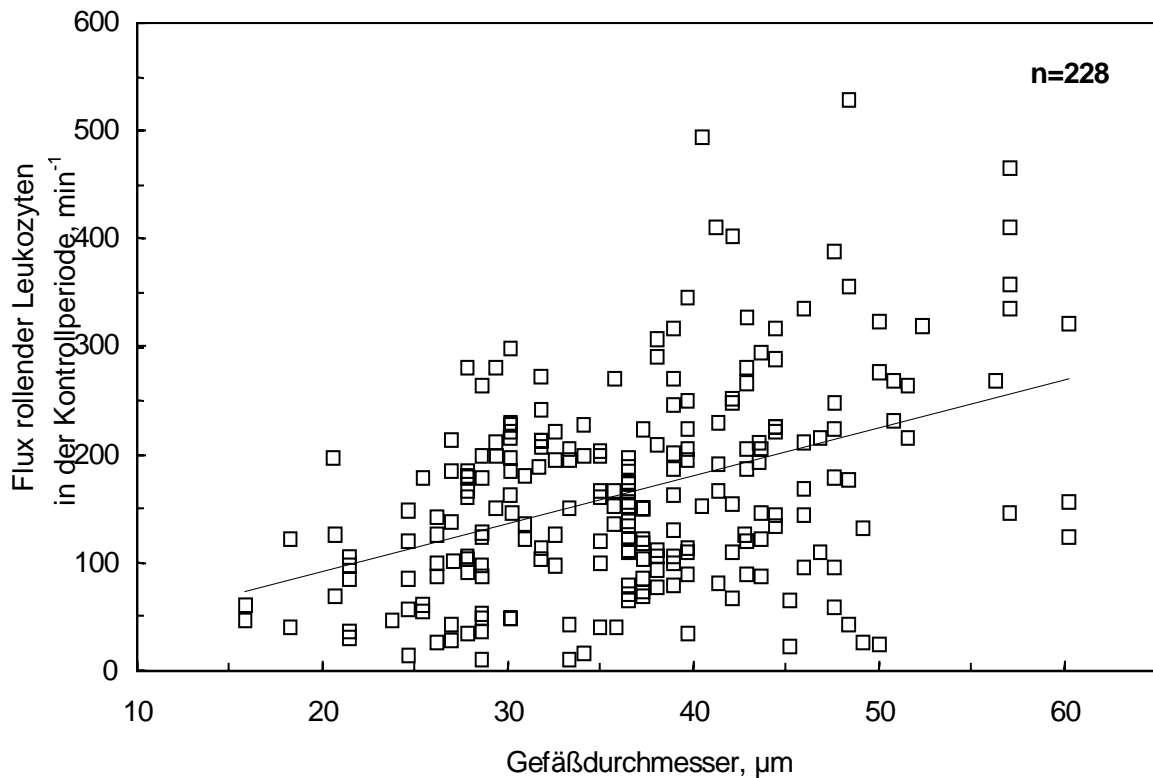


Abb. 10: Flux der rollenden Leukozyten in Abhängigkeit von dem Gefäßdurchmesser. Jedes Kästchen entspricht einer Kontrollperiode. Unterbrochene Linie: Lineare Regression ( $p \leq 0,01$ ,  $R^2 = 0,179$ ).

fließenden Blutes ebenso wie der daraus berechnete Anteil rollender an der Gesamtzahl der Leukozyten im beobachteten Gefäßabschnitt nahm hingegen bei zunehmendem Gefäßdurchmesser signifikant ab, wenn auch nur in geringem Umfang ( $p < 0,01$ ,  $R^2 = 0,154$ , s. Abb. 11).

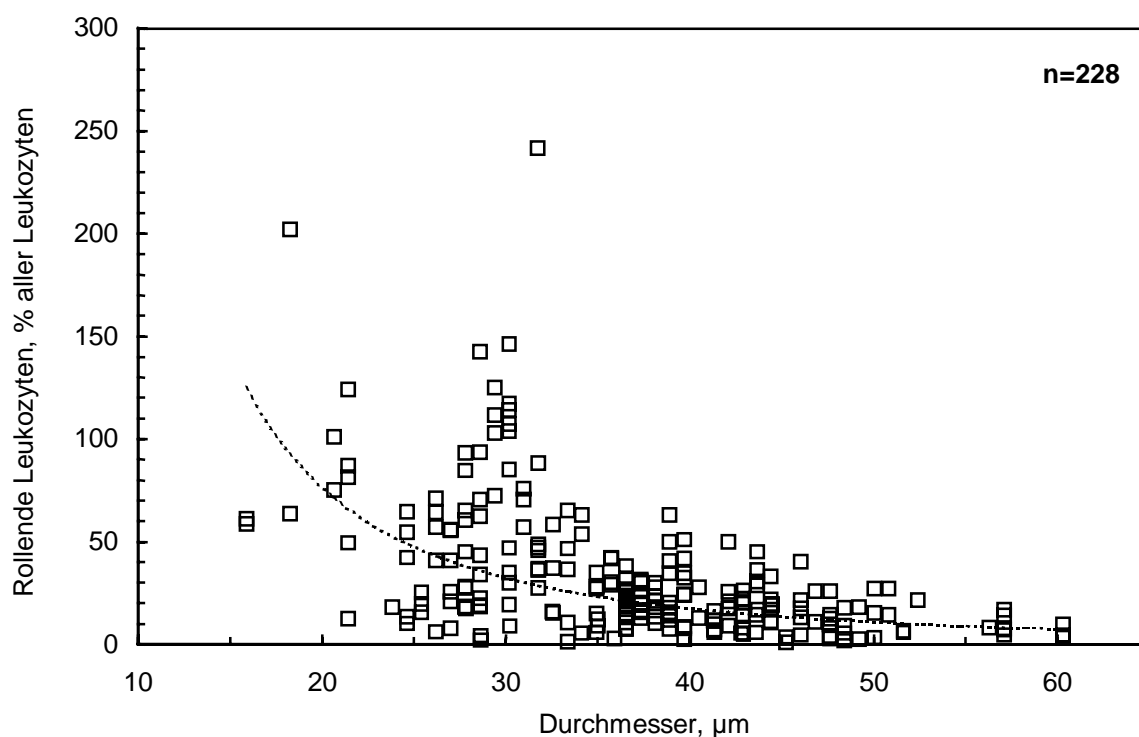


Abb. 11: Prozentualer Anteil der rollenden Leukozyten als Funktion des Gefäßdurchmessers. Unterbrochene Linie: exponentielle Regression ( $R^2=0,154$ ). n= Anzahl der Beobachtungen.

### 3.2 Selektinpeptide

Die Peptide wurden in ihrer Wirksamkeit mit der Trägerlösung (0,9% NaCl, auf den durchschnittlichen pH-Wert der Peptidlösungen angesäuert) verglichen. Diese zeigte in 14 Messungen an 8 verschiedenen Venolen eine Reduktion des Leukozytenfluxes unter der Injektion auf  $90 \pm 7\%$  des Kontrollfluxes (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, auf ganze Zahlen aufgerundet). Dieser Effekt war nicht signifikant ( $p=0,49$ ).

Angegebene Dosierungen entsprechen den Dosierungen in der Mikropipette, die an der Beobachtungsstelle wirksamen Konzentrationen sind etwa halb so groß. Diese Schätzung beruht auf der Verdoppelung der Strömungsgeschwindigkeit, die vermuten läßt, daß etwa die gleiche Volumenmenge pro Zeiteinheit infundiert wurde wie die bereits vorhandene Strömung.

Bei Selektin-Peptiden, die den Flux rollender Leukozyten reduzierten, ließ sich beobachten, daß deren Wirkung jeweils in weniger als 1s nach Beginn der Mikroinjektion einsetzte. Nach

Unterbrechung der Zufuhr der Peptide war nach kürzester Zeit ( $< 1s$ ) kein Effekt mehr festzustellen.

### 3.2.1 Peptide aus der Lektin-Domäne des P-Selektin

Sechs verschiedene P-Selektin-Peptide wurden in ihrer Wirksamkeit der Inhibition des Leukozytenrollens getestet. Bei einer Infusionskonzentration von  $1000\mu\text{g/ml}$  waren die Peptide P70-79 sowie P109-118 in der Lage, den Flux rollender Leukozyten im Vergleich zum Kontrollwert signifikant ( $p<0,01$ ) zu reduzieren. P70-79 zeigte dabei den ausgeprägtesten inhibitorischen Effekt mit einer Reduktion des Leukozytenrollens auf  $19\pm 5\%$  des Kontrollwertes. P109-118 hemmte das Leukozytenrollen auf  $37\pm 5\%$  des Ausgangswertes. P54-63 senkte den Flux rollender Leukozyten auf  $56\pm 13\%$  des Ausgangswertes, auch dieser Effekt war im Vergleich zur Trägerlösung signifikant ( $p<0,05$ ) (s. Abb. 12).

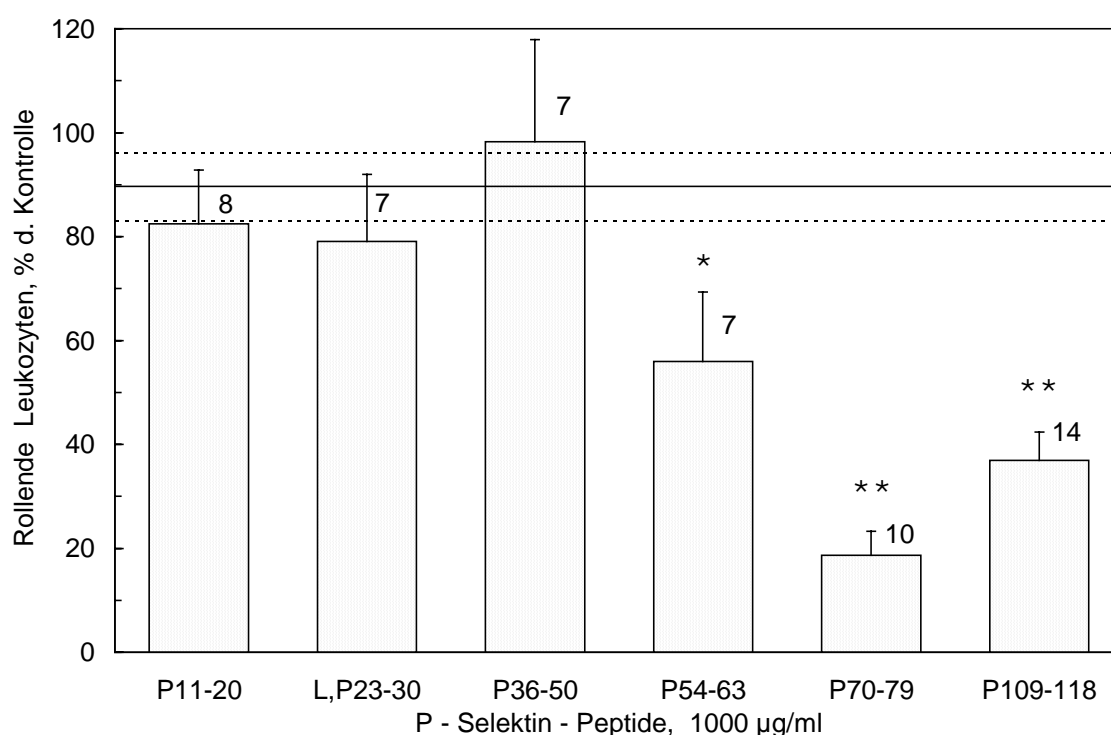


Abb. 12: Wirkung der untersuchten P-Selektin Peptide. Auf der Ordinate ist der Flux rollender Leukozyten während der Injektion der Peptide als Prozentsatz der Kontrolle aufgetragen. Die Ergebnisse sind als Mittelwert + Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Die Ziffern oberhalb der Säulen bezeichnen die Zahl durchgeführter Messungen. Die horizontalen Linien zeigen den Mittelwert $\pm$ Standardfehler des Effektes der Kontrolllösung (NaCl). Signifikante Unterschiede zur Kontrolllösung sind angegeben als \*:  $p\leq 0,05$  und \*\*:  $p\leq 0,01$ .

Die Peptide P11-20, L,P23-30 und P36-50 führten zu keiner signifikanten Erniedrigung des Flusses rollender Leukozyten pro Zeiteinheit (s. Abb. 12).

Die Wirkung von P70-79 und P 109-118 wurde auch bei geringeren Dosierungen untersucht (s. Abb. 13). Das Selektin-Peptid P70-79 führte bei einer Konzentration von 500 $\mu$ g/ml zu einer Reduktion des Leukozytenrollens auf 27 $\pm$ 8% ( $p < 0,01$ ), bei 100 $\mu$ g/ml wurde das Leukozytenrollen auf 54 $\pm$ 8% des Ausgangswertes reduziert ( $p < 0,01$ ). Bei 10 $\mu$ g/ml zeigte es keine sichere Wirkung mehr. Vergleich man die Mittelwerte der einzelnen Dosierungen mit dem Student-Newman-Keuls-Test, so zeigte sich, daß der Wirkungsunterschied von P70-79 bei 1000 $\mu$ g/ml und 500 $\mu$ g/ml nicht signifikant war, wohl aber der zwischen 1000 $\mu$ g/ml und 100 $\mu$ g/ml ( $p < 0,01$ ).

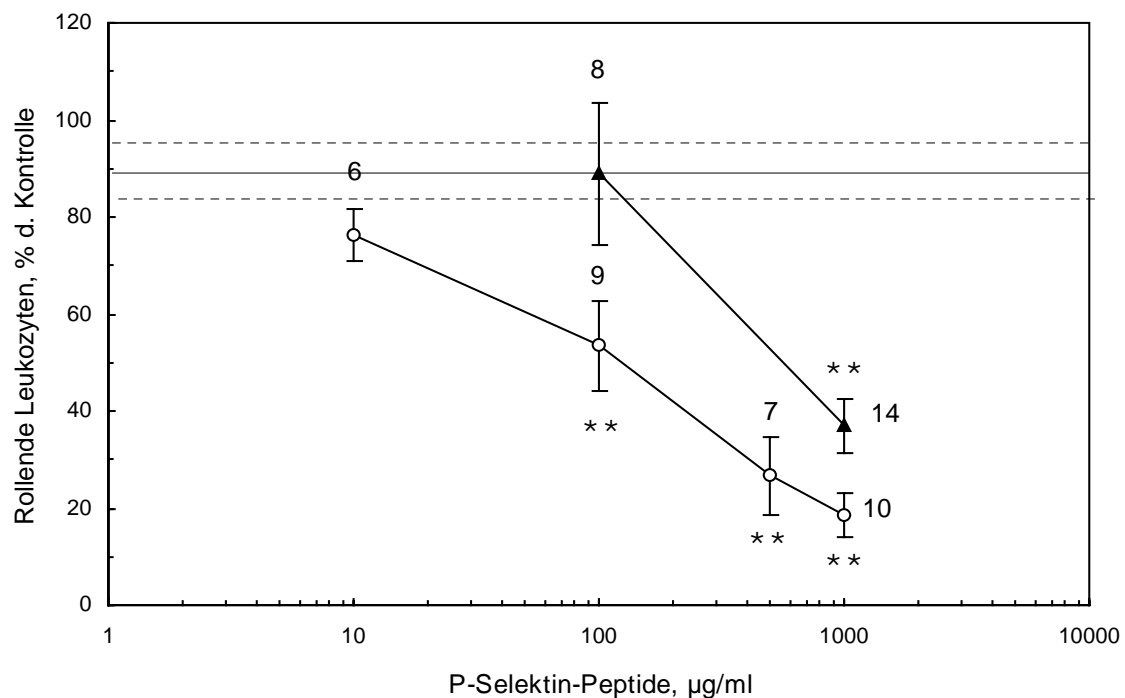


Abb. 13: Dosis-Wirkungsbeziehung der beiden P-Selektin-Peptide P70-79 (offene Kreise) und P109-118 (Dreiecke). Auf der Abszisse sind die verwendeten Konzentrationen in der Mikropipette logarithmisch aufgetragen, die Ordinate zeigt den Flux rollender Leukozyten in Prozent des Kontrollwertes. Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. Die Ziffern bezeichnen die jeweilige Anzahl der Mikroinjektionen. Horizontale Linien: Mittelwert  $\pm$  Standardfehler der Kontrolllösung.

Das Peptid P109-118 hatte in einer Konzentration von 100 $\mu$ g/ml keinerlei signifikanten Effekt mehr auf die Zahl rollender Leukozyten pro Zeiteinheit (s. Abb. 13).



### 3.2.2 Peptide aus der Lektin-Domäne des L-Selektin

Sechs L-Selektin-Peptide wurden untersucht. Die Peptide L11-20 sowie L54-63 zeigten eine signifikante Hemmung des Leukozytenrollens ( $p \leq 0,01$ ), während L,P23-30, L36-50, L70-79 und L109-118 keine derartige Wirkung aufwiesen. 1000 $\mu\text{g/ml}$  Injektionskonzentration des Peptides L11-20 führten zu einer  $72 \pm 6\%$ igen Reduktion des Fluxes rollender Leukozyten während der Injektion im Vergleich zur Kontrollperiode (s. Abb. 14).

100 $\mu\text{g/ml}$  dieses Peptides erniedrigten den Flux rollender Leukozyten auf  $22 \pm 6\%$  des Wertes der Kontrollperiode, 10 $\mu\text{g/ml}$  auf  $26 \pm 7\%$ . Bei 1 $\mu\text{g/ml}$  des Peptides wurde keine Hemmung des

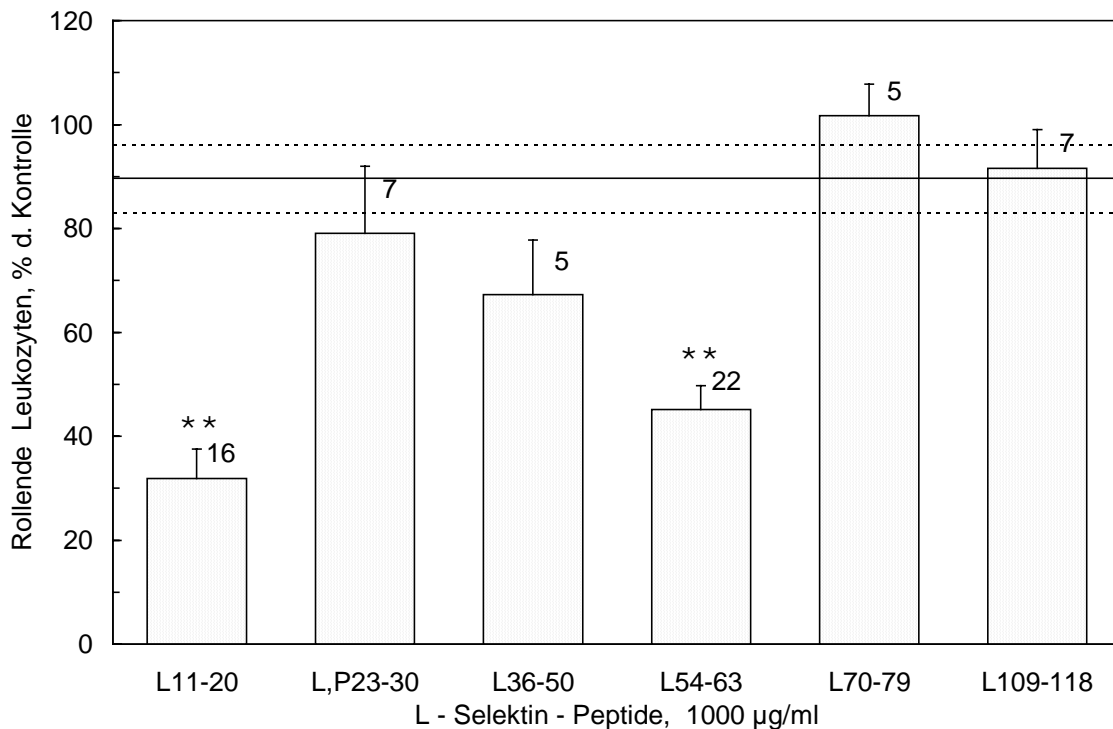


Abb. 14: Wirkung der getesteten L-Selektin-Peptide. Signifikante Reduktion des Leukozytenrollens (\*\*:  $p \leq 0,01$ ) bei den Peptiden L11-20 und L54-63. Ziffern: Zahl der Mikroinjektionen. Horizontale Linien: Mittelwert  $\pm$  Standardfehler der Kontrolllösung (0,9% NaCl).

Rollens unter der Injektion mehr beobachtet (s. Abb. 15). Ein Vergleich der Wirkungen von L11-20 in den Injektionsdosierungen 1000 $\mu\text{g/ml}$ , 100 $\mu\text{g/ml}$  und 10 $\mu\text{g/ml}$  mit Hilfe des Student-Newman-Keuls Tests zeigte keinen signifikanten Unterschied ( $p > 0,05$ ).

Mikroinjektion des L-Selektin-Peptides L54-63 führte zu einer signifikanten ( $p \leq 0,01$ ),  $45 \pm 5\%$ igen Senkung des Fluxes rollender Leukozyten im Vergleich zu der Kontrollperiode.  $100 \mu\text{g/ml}$  des selben Peptides zeigten keinen sicheren Effekt mehr (s. Abb. 15).

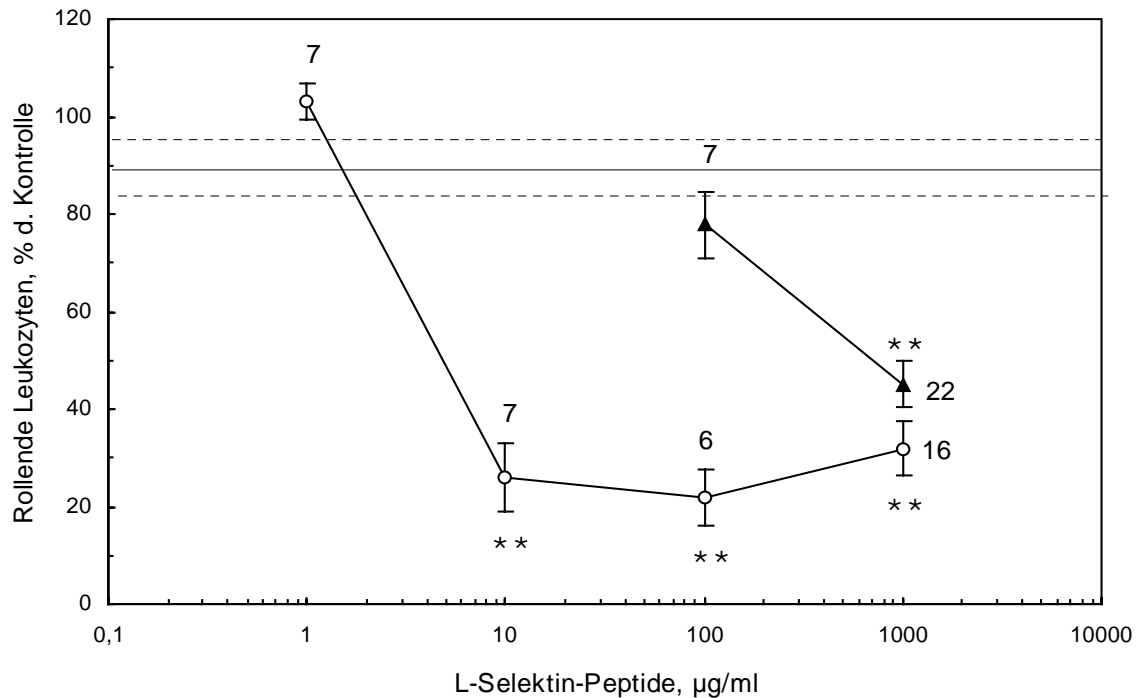


Abb. 15: Dosis-Wirkungsbeziehung der beiden L-Selektin-Peptide L11-20 (offene Kreise) und L54-63 (Dreiecke). Auf der Abszisse sind die verwendeten Konzentrationen in der Mikropipette logarithmisch aufgetragen, die Ordinate zeigt den Flux rollender Leukozyten in Prozent des Kontrollwertes. Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler.

### 3.2.3 Peptide aus der Lektin-Domäne des E-Selektin

Vier verschiedene E-Selektin-Peptide standen zur Verfügung. Eine signifikante ( $p \leq 0,05$ ) Hemmung des Fluxes rollender Leukozyten auf 43% des Kontrollwertes wurde durch das Peptid E23-30 in der Standardkonzentration  $1000 \mu\text{g/ml}$  erzielt. Sowohl E54-63 als auch E70-79 erzielten in dieser Dosierung keinen signifikanten Effekt (s. Abb. 16). Das Peptid E109-118 zeigte einen außergewöhnlichen Effekt, der unter 3.4 beschrieben wird.

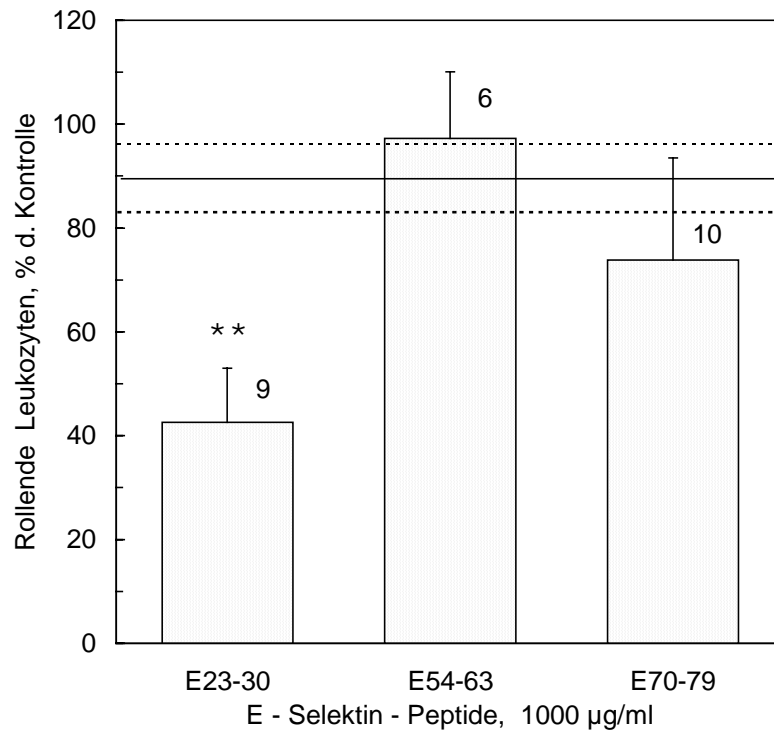


Abb. 16: Wirkung der getesteten E-Selektin-Peptide. Das Peptid E23-30 führt zu einer signifikanten Reduktion des Leukozytenrollens (\*\*;  $p \leq 0,01$ ). Ziffern: Zahl der Mikroinjektionen. Horizontale Linien: Mittelwert  $\pm$  Standardfehler der Kontrollösung (NaCl). Das Peptid E109-118 führte zu einer ungewöhnlichen Aggregation von festen Blutbestandteilen, das nicht als Hemmung des Leukozytenrollens in Prozent beschreibbar ist (s. Abschnitt 3.4).

### 3.3 Wirkungsveränderung aktiver Peptide über die Zeit

L-Selektin-Peptide L11-20 und L54-63 zeigten in ihrer Wirkung keinen signifikanten Unterschied abhängig von dem Applikationszeitpunkt nach Auslagerung des Mesenteriums. Bei den wirksamen P-Selektin-Peptiden, P70-79 und P109-118, nahm die durchschnittliche Hemmung des Leukozytenrollens im Versuchsverlauf geringfügig zu. Allerdings ist dieser Effekt statistisch nicht signifikant ( $p > 0,05$ ) (s. Abb. 17).

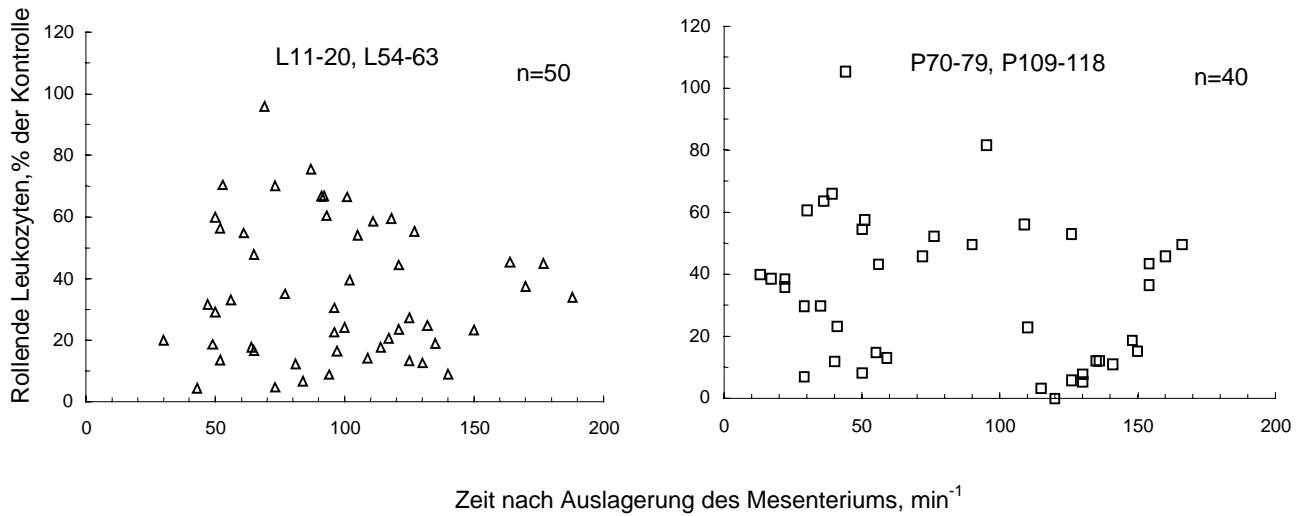


Abb. 17: Das Leukozytenrollen inhibierende Peptide und deren Effekt als Funktion der Zeit nach Auslagerung des Mesenteriums. Linkes Diagramm: L-Selektin-Peptide L11-20, L54-63 (Dreiecke). Rechtes Diagramm: P-Selektin-Peptide P70-79, P109-118 (Quadrate). n=Anzahl der Messungen.

### 3.4 Außergewöhnliche Peptideffekte

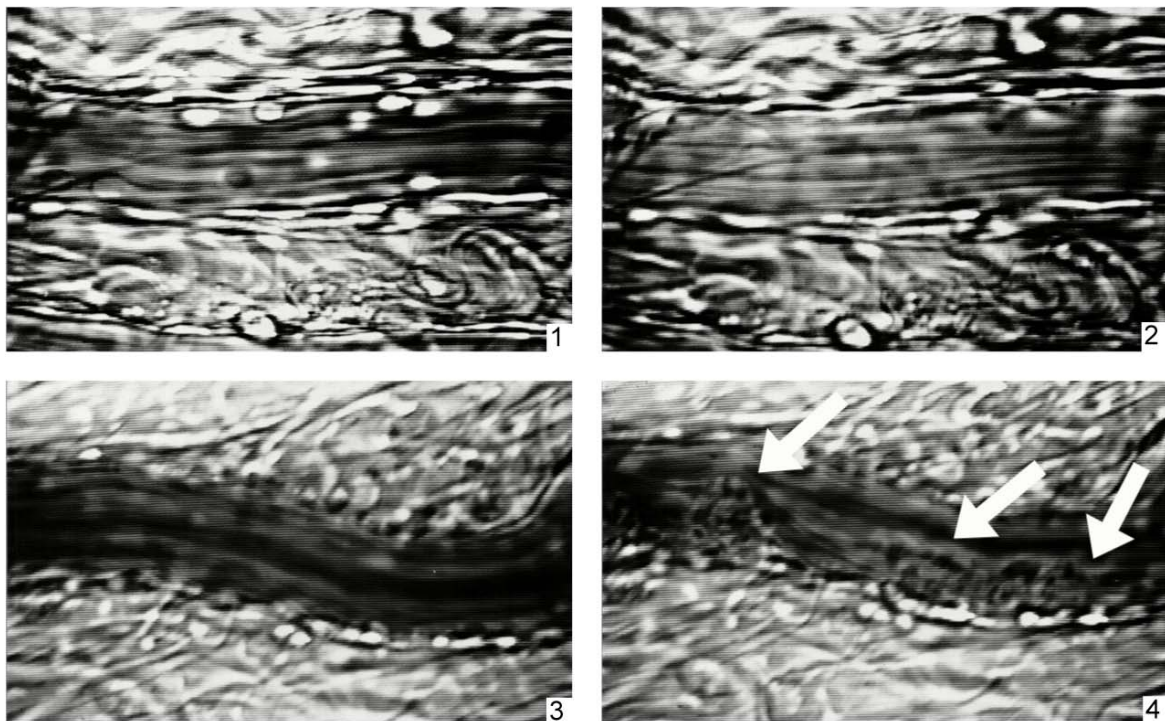


Abb. 18: Bild 1 zeigt rollende Leukozyten in einem postkapillären Gefäßbett (weiße Sphären). Unter Injektion des wirksamen Selektin-Peptides P70-79 finden sich im selben Gefäß keine rollenden Leukozyten mehr (Bild 2). Im Vergleich dazu der Effekt unter der Mikroinjektion von E109-118 (Bild 3: Kontrolle, Bild 4: Mikroinjektion). Unter der Mikroinjektion dieses Peptides bilden sich Aggregate, vermutlich aus adhärenen Plättchen und Leukozyten (Bild 4, weiße Pfeile).

Jede der 8 venolären Mikroinjektionen des E-Selektin-Peptides E109-118 führte zu einer ausgeprägten Aggregation von festen Blutbestandteilen in den stromabwärts gelegenen Venolen. Diese Aggregate hatten zumeist etwa 10-20µm Durchmesser und rollten das Gefäßbett hinab (s. Abb.18). Die Aggregation begann etwa 2-3s nach Beginn der Mikroinjektion des Peptides. Nach Beendigung der Injektion bildeten sich keine weiteren Aggregate. Die bereits vorhandenen rollten das Gefäßbett weiter hinab aus dem Sichtfeld des Mikroskops heraus. Bei keinem anderen Peptid trat ein vergleichbarer Effekt auf.