

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung der  
Universität München  
Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. U. Pohl

Inhalation von Stickstoffmonoxid:  
Einfluss auf die Thrombozytenkinetik  
in der pulmonalen Mikrozirkulation

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

vorgelegt von  
Andreas Bayer  
aus München  
2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

**1. Berichterstatter:** Prof. Dr.med. Dr. h. c. mult. K. Meßmer

**Mitberichterstatter:** Prof. Dr. H. Schad  
Priv. Doz. Dr. H. Adelsberger

**Mitbetreuung durch die  
promovierten Mitarbeiter:** Prof. Dr.med. A.E. Goetz  
Dr. med. L. Ney

**Dekan:** Prof. Dr. med. D. Reinhardt

**Tag der mündlichen Prüfung:** 30.03.2006

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>5</b>
1.1 Beteiligung von Thrombozyten an der Entstehung des akuten Lungenschadens .....	5
1.2 Beteiligung von Thrombozyten am pulmonalen Ischämie/Reperfusionsschaden .....	8
1.3 Zielsetzung und Fragestellung .....	9
<b>2. Methodik</b> .....	<b>10</b>
2.1 Versuchstiere .....	10
2.2 Experimentelles Modell .....	10
2.2.1 Anästhesie und Beatmung .....	10
2.2.2 Hämodynamisches Monitoring .....	12
2.2.3 Thorakales Fenster und Superfusion .....	14
2.2.4 In vitro Markierung von Erythrozyten .....	15
2.2.5 In vitro Markierung von Thrombozyten .....	15
2.2.6 In vitro Aktivierung von Thrombozyten .....	16
2.2.7 Videomikroskopie .....	16
2.2.8 Inhalation von Stickstoffmonoxid .....	19
2.2.9 Ischämie-Induktion .....	20
2.3 Experimentelles Protokoll .....	22
2.3.1 Studie I .....	22
2.3.2 Studie II .....	23
2.4 Dokumentation .....	24
2.5 Gemessene und errechnete Parameter .....	24
2.5.1 Blutgasanalyse und peripheres Blutbild .....	24
2.5.2 Makrohämodynamik .....	25
2.5.3 Intravitalmikroskopie .....	27
2.6 Einschlusskriterien .....	35
2.7 Datenverarbeitung und Statistik .....	36
2.7.1 Datenverarbeitung .....	36
2.7.2 Statistik .....	36
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>37</b>
3.1 Studie I: Thrombin-Stimulation .....	37
3.1.1 Makrohämodynamik, Blutgase und peripheres Blutbild .....	37
3.1.2 Mikrohämodynamik in Arteriolen und Venolen .....	40
3.1.3 Thrombozytenkinetik in Arteriolen und Venolen .....	41
3.1.4 Erythrozyten- und Thrombozytenkinetik in Alveolarkapillaren .....	43
3.2 Studie II: Ischämie-Reperfusion .....	46
3.2.1 Makrohämodynamik, Blutgase und peripheres Blutbild .....	46
3.2.2 Mikrohämodynamik in Venolen .....	48
3.2.3 Thrombozytenkinetik in Venolen .....	49
3.2.4 Erythrozyten- und Thrombozytenkinetik in Alveolarkapillaren .....	53
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>55</b>

4.1	Experimentelles Modell .....	55
4.1.1	Untersuchung zur Thrombozytenkinetik in der Lungenstrombahn .....	55
4.1.2	Intravitalmikroskopie der pulmonalen Mikrozirkulation .....	56
4.1.3	Separation und Fluoreszenzmarkierung autologer Blutzellen.....	57
4.1.4	Thrombinstimulation .....	59
4.1.5	Ischämie-Reperfusion.....	62
4.1.6	Inhalation von Stickstoffmonoxid.....	64
4.1.7	Konstanz der Rahmenbedingungen.....	66
4.2	Ergebnisse .....	67
4.2.1	Studie I: Thrombin-Stimulation .....	67
4.2.2	Studie II: Ischämie-Reperfusion.....	78
4.3	Klinische Implikationen der Ergebnisse .....	88
4.3.1	Inhaliertes Stickoxid zur Prävention des akuten Lungenversagens .....	88
4.3.2	Einsatz von iNO im Rahmen der Lungentransplantation.....	90
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>91</b>
<b>6.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>112</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>94</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>115</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>117</b>

## 1. Einleitung

### 1.1 Beteiligung von Thrombozyten an der Entstehung des akuten Lungenschadens

Thrombozyten sind anukleäre diskoide Zellen, deren Durchmesser etwa 2-3  $\mu\text{m}$  beträgt. Die primäre Aufgabe dieser Zellen, von denen etwa tausend Milliarden im Blut des Erwachsenen zirkulieren, ist die Hämostase: Ist die Integrität des Endothels beeinträchtigt, adhären Thrombozyten an subendotheliales Kollagen, bilden durch Aggregation einen Thrombus, der unter Beteiligung der plasmatischen Gerinnung stabilisiert wird und das Gefäßleck abdichtet.

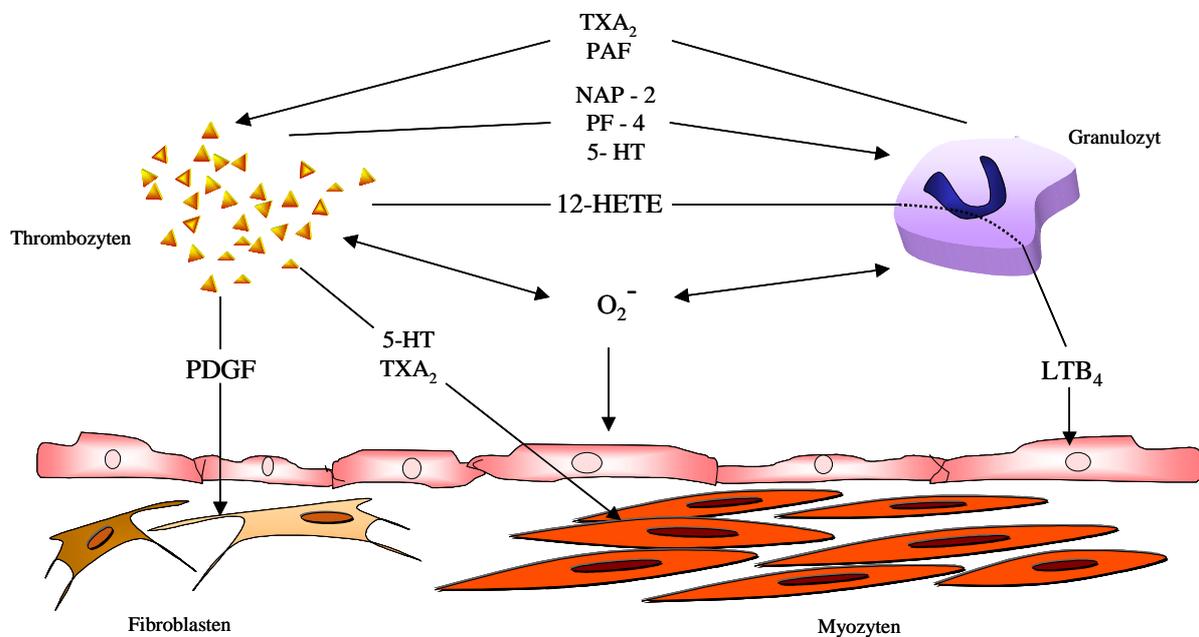
Neben diesen primär hämostatischen Eigenschaften sind Thrombozyten aber auch an der Initiation der Heilungsphase wesentlich beteiligt: Sie sind an den inflammatorischen Mechanismen beteiligt, die für die Reorganisation der Gefäßstruktur notwendig sind. Diese proinflammatorischen Eigenschaften der Thrombozyten können jedoch auch an überschiessenden Immunreaktionen beteiligt sein. Solche unzureichend regulierten Reaktionen sind wesentlich an der Auslösung eines *acute respiratory distress syndroms* (ARDS) beteiligt, das den betroffenen Patienten durch Hypoxämie, Hyperkapnie und pulmonalarterielle Hypertonie vital bedroht (116).

Ende der achtziger Jahre des vorigen Jahrhunderts wurde erstmals beobachtet, daß sich parallel zur Entwicklung der Hypoxämie bei Patienten mit ARDS eine Thrombozytopenie ausbildet (15;51;81). Sowohl klinische Untersuchungen dieses Phänomens (74;75), wie auch biopsische und autoptische Studien (80;81;159) konnten eine pulmonale Thrombozytensequestration zeigen.

Eine Vielzahl von sowohl *in vitro* als auch *in vivo* erhobener Befunde beschreibt die Interaktionen zwischen Thrombozyten und Leukozyten, aber auch die Beteiligung von Endothelzellen, Myozyten und Fibroblasten, an der Pathogenese eines akuten

Lungenschadens auf vaskulärer Ebene. Eine Synopsis dieser Erkenntnisse verdeutlicht die zentrale Rolle der Thrombozyten:

Aktivierte Granulozyten setzen Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) (65;183;184) und den *platelet activating factor* (PAF) (78) frei. Beide sind potente Aktivatoren der Thrombozytenaggregation. Diese aktivierten Thrombozyten wiederum sezernieren für neutrophile Granulozyten stimulierende und chemotaktische Faktoren wie das *neutrophile activating protein 2* (NAP-2) (206), *platelet factor 4* (PF-4) (37) und 5-Hydroxytryptamin (5-HT) (16).



**Abb. 1: Mögliche Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten im Rahmen des acute respiratory distress syndroms (Erläuterung im Text S. 7f)**

Sowohl Leukozyten als auch Thrombozyten können das Endothel schädigen: Thrombozyten, die selbst keinen vollständigen Lipoxigenasestoffwechsel aufweisen, können als intermediäre Metaboliten die Hydroxyeicosatetraensäure (12-HETE) freisetzen (128). Dieses wird in Leukozyten beispielsweise zu Leukotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) weiter verstoffwechselt (125;126). LTB<sub>4</sub> stellt wiederum einen wesentlichen chemotaktischen Stimulus für Granulozyten dar und trägt von allen Eikosanoiden am stärksten zur Erhöhung der Endothelpermeabilität bei (62).

Weitere Schäden am Endothel werden durch die von Neutrophilen und Thrombozyten gebildeten freie Sauerstoffradikale verursacht (23).

Thrombozyten modulieren auch den Tonus der Gefäßmuskulatur. Sie setzen Serotonin (5-HT) frei (136), einen potenten Vasokonstriktor in der pulmonalen Zirkulation. Neben Serotonin führt auch TXA<sub>2</sub> zur Kontraktion glatter Gefäßmuskelzellen und trägt somit zu einem Anstieg des pulmonalarteriellen Blutdruckes bei (18;71;209). Ein thrombozytärer Wachstumsfaktor, *platelet derived growth factor* (PDGF), stimuliert die Kollagensynthese von Fibroblasten und fördert hierdurch die Fibrosierung des Lungenparenchyms in der späten Phase des akuten Lungenversagens (36).

Diese wechselseitigen Beeinflussungen verschiedener Zellen können sich teilweise durch positive Rückkopplungen verstärken. Insbesondere an diesen rückgekoppelten Mechanismen sind Thrombozyten beteiligt.

Eine Hemmung der Thrombozytenadhärenz könnte somit möglicherweise günstig in die Entwicklung eines akuten Lungenschadens eingreifen. Eine systemische Hemmung der Thrombozytenfunktion führt jedoch zu erheblichen Nebenwirkungen. Ideal wäre daher eine *gezielt pulmonale* Hemmung der Thrombozytenadhärenz.

Als potentieller Kandidat für eine derartige pharmakologische Intervention kommt das Gas Stickstoffmonoxid (NO) in Frage: Endogenes Stickstoffmonoxid hemmt die Adhärenz von Thrombozyten am Endothel, und wird als wesentlicher antithrombogener Faktor *in vivo* betrachtet (164).

In der intensivmedizinischen Therapie von Patienten, die an einem ARDS erkrankt sind, wird NO derzeit wegen seiner vasodilatierenden Eigenschaften eingesetzt. Dieses Krankheitsbild ist unter anderem durch das gleichzeitige Vorliegen ventilierter Lungenbezirke neben atelektatischen Arealen gekennzeichnet. Während in den ventilerten Lungenabschnitten ein weitgehend intakter Gasaustausch stattfinden kann, wird das Blut, das durch die Atelektasen

fließt, nicht oxigeniert. Der nichtoxigenierte Anteil an der pulmonalen Durchblutung wird als Shuntanteil bezeichnet. Sein Ausmaß bestimmt wesentlich die arterielle Sauerstoffsättigung.

Setzt man nun dem Atemgas dieser Patienten NO zu, erreicht dieses nur die ventilerten Lungenareale und bewirkt selektiv dort eine Vasodilatation. Die Folge ist eine Umverteilung der Durchblutung in diese Bereiche. Dies reduziert den intrapulmonale Shunt und erhöht die Oxigenierung des arteriellen Blutes (167). Die Inhalation von NO zur Korrektur der Hypoxämie ist daher in der Therapie des schweren ARDS etabliert und findet an entsprechenden Therapiezentren regelmäßig Anwendung. Allerdings konnte eine Verbesserung des *outcomes* durch diese Therapie bisher nicht nachgewiesen werden.

Wenn inhaliertes Stickstoffmonoxid modulierende Eigenschaften für die pulmonale Thrombozytenkinetik besitzt, könnte sein frühzeitiger Einsatz bei Risikokonstellationen, die Patienten für die Entwicklung eines ARDS prädisponieren, als präventive Maßnahme zur Vermeidung der Entwicklung eines akuten Lungenversagens genutzt werden.

## **1.2 Beteiligung von Thrombozyten am pulmonalen Ischämie/Reperfusionsschaden**

In der Pathogenese des ARDS spielen Thrombozyten selbst als Aktivator zellulärer Interaktionen eine wesentliche Rolle. Bei Ischämie und Reperfusion (I/R) in der pulmonalen Zirkulation dagegen tritt wahrscheinlich die Rolle des postischämischen Endothels in den Vordergrund: Die endotheliale Freisetzung thrombozytenaktivierender Faktoren einerseits und andererseits eine gesteigerte Adhäsivität der Endothelzellen selbst führen in verschiedenen Organen nach Reperfusion zu einer proinflammatorischen Stimulation.

In der Folge können die gleichen para- und autokrinen Stimulationsmechanismen in den zellulären Interaktionen auftreten, wie sie oben beschrieben wurden. Damit deckt sich die klinische Beobachtung, daß zum Beispiel Patienten nach Lungentransplantation frühzeitig das Vollbild eines ARDS entwickeln können.

Während für die I/R-Situation beispielsweise in der Leber, dem Dünndarm oder dem Myokard eine gesteigerte Thrombozyten-Endothelzellinteraktion beobachtet werden konnte (98;131;176), liegen für die pulmonale Strombahn bisher keine Untersuchungen vor. Sollte auch während eines pulmonalen I/R-Schadens eine gesteigerte Thrombozytensequestration zu beobachten sein, könnte auch hier eine Hemmung der Thrombozytenadhärenz von therapeutischem Nutzen sein.

### **1.3 Zielsetzung und Fragestellung**

Die wenigen bisher zur pulmonalen Thrombozytensequestration im Rahmen akuter pathologischer Zustände durchgeführten Arbeiten betrachten die Lunge im Sinn einer *black box* mittels Differentialmessungen von Zellzahlen oder mit Radioisotopentechniken. Modelle, die den Einfluss von inhaliertem Stickstoffmonoxid auf das Adhärenzverhalten von Thrombozyten in der pulmonalen Mikrozirkulation untersuchen, wurden bisher nicht beschrieben.

Ziel einer ersten Studie war es daher, den Einfluss von inhaliertem Stickstoffoxid (iNO) auf die Kinetik aktivierter Thrombozyten in allen Abschnitten der pulmonalen Mikrozirkulation zu untersuchen. Hierbei sollte die Kinetik unter folgenden Bedingungen bestimmt werden:

1. Kinetik unstimulierter Thrombozyten
2. Kinetik aktivierter Thrombozyten
3. Kinetik aktivierter Thrombozyten unter iNO

In einer weiteren Untersuchung sollten das Adhärenzverhalten von Thrombozyten nach pulmonaler I/R untersucht, sowie der Einfluss von iNO auf die Thrombozytenkinetik während der Reperfusionphase quantifiziert werden. Diese Untersuchungen sollten an den folgenden drei Gruppen vorgenommen werden:

1. Kontrollgruppe
2. Gruppe nach Ischämie und Reperfusion
3. Gruppe nach Ischämie und Reperfusion unter iNO

## 2. Methodik

### 2.1 Versuchstiere

Alle Experimente und Messungen wurden am Institut für Chirurgische Forschung der Universität München durchgeführt. Die Versuche waren vor Studienbeginn durch die Tierschutzkommission der Regierung von Oberbayern genehmigt worden. Für die Versuche wurden insgesamt 49 Weiße Neuseeländer Kaninchen mit einem mittleren Körpergewicht von 2450 g verwendet (Charles River Deutschland GmbH, Kißleg). Vor Beginn des jeweiligen Versuchs wurden die Tiere 2-10 Tage einzeln im Tierstall des Instituts für Chirurgische Forschung in einem künstlichen 12stündigen Tag/Nacht-Rhythmus gehalten. Die Umgebungstemperatur lag bei 24°C mit circa 50 % relativer Luftfeuchte. Die Tiere hatten zu jedem Zeitpunkt freien Zugang zu Wasser und Trockenfutter. Die Tiere durchliefen alle Phasen der Präparation und der Versuche in Narkose. Nach Abschluss des Versuchsprotokolls wurden die Tiere durch intravenöse Injektion von Piritramid und Kaliumchlorid getötet.

### 2.2 Experimentelles Modell

#### 2.2.1 Anästhesie und Beatmung

##### Anästhesie

*Präparation:* Nach Rasur eines Ohres erfolgte die Kanülierung der seitlichen Ohrvene mit einem 22G Venenverweilkatheter (Insyte-W, Becket-Dickinson, Heidelberg). Über einen Drei-Wege-Hahn wurde die Narkose eingeleitet.

*Narkose:* Als Hypnotikum wurde initial Thiopental (Trapanal, Byk-Gulden, Konstanz) wirkungsabhängig in einer Dosis von 10 – 20 mg/kg KG injiziert. Als Analgetikum erhielten die Tiere 1,0 mg/kg KG Ketamin (Ketavet, Parke-Davis, Freiburg) intravenös verabreicht. Nach Intubation erfolgte ergänzend die Gabe von 0,5 mg/kg KG Piritramid (Dipidolor, Janssen, Neuss) als Bolusinjektion. Zur Aufrechterhaltung der Narkose erhielten die Tiere über den Zeitraum von 30 min 50 mg/kg KG Chloralose ( $\alpha$ D(+)-gluco-Chloralose, Merck, Darmstadt) als Kurzinfusion.

*Muskelrelaxation:* Nach Beginn der maschinellen Beatmung (s.u.) erfolgte die Injektion von 1 mg Pancuronium (Pancuronium, Organon, München). Für die Zeit des weiteren Versuchablaufs erfolgte die kontinuierliche Infusion von 5 ml/h physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9%, Braun, Melsungen) sowie 0,6 mg/h Pancuronium.

### Beatmung

*Präparation:* Nach Erlöschen des Bewusstseins im Verlauf der Narkoseeinleitung wurden die Tiere auf den Rücken gelagert und die Tracheotomie durchgeführt: Nach Rasur der Halsregion wurden zunächst zur Lokalanästhesie 0,5 ml Lidocain 1% (Lidocain 1%, Braun, Melsungen) injiziert. Danach erfolgte eine Hautinzision longitudinal in der Medianlinie auf Höhe des Krikoides. Unter Verdrängung der geraden Halsmuskulatur folgte die stumpfe zirkuläre Präparation der Trachea. Nach Anschlingen der Luftröhre (Leinenzwirn 1, Ethicon, Norderstedt) wurde infraglottisch über eine Querinzision ein 8 cm langer Tubus (Trachealtubus ID 4.5, Willy Rüscher AG, Kernen) eingeführt. Der Tubus wurde über die vorgelegten Ligaturen angeschlungen und in seiner Lage gesichert.

*Maschinelle Beatmung:* Die Beatmung erfolgte druckkontrolliert mit einem zeitgesteuerten neonatologischen Beatmungsgerät (Secrist Infant Ventilator, Kontron, Eching). Der inspiratorische Atemwegsdruck wurde auf 12 cmH<sub>2</sub>O eingestellt. Zur Minimierung eines möglichen alveolären Kollaps wurde ein positiver endexpiratorischer Druck (PEEP) von 2 cmH<sub>2</sub>O aufrecht erhalten. Die Beatmung wurde anhand des gemessenen arteriellen PaCO<sub>2</sub> und pH-Werts gesteuert. Ziel war hierbei ein PaCO<sub>2</sub> von 35 mmHg sowie ein pH von ca. 7,4. Das hierfür erforderliche Atemminutenvolumen wurde über die Variation der Atemfrequenz (30-35 Hübe min<sup>-1</sup>) reguliert. Während der Präparation betrug die inspiratorische Sauerstoffkonzentration (FiO<sub>2</sub>) 0,3. In Studie I wurde diese Konzentration während der Versuchsphase auf 0,4 erhöht. In Studie II wurde für diese Phase eine FiO<sub>2</sub> = 0,95 gewählt.

## 2.2.2 Hämodynamisches Monitoring

### 2.2.2.1 Druckmessung im großen Kreislauf

*Präparation:* Unmittelbar im Anschluss an die Tracheotomie wurde die A. carotis katheterisiert. Nach Verdrängen der Halsmuskulatur wurde unter Schonung des N. vagus das perivaskuläre Bindegewebe von der Arterie in stumpfer Präparationstechnik zirkulär entfernt. Nach distaler Ligatur des Gefäßes und Anlegen eines temporären Microclips (Aeskulap, Tuttlingen) auf den proximalen Gefäßabschnitt wurde das Gefäß mit einem V-Schnitt eröffnet. Nach Platzierung wurde der Katheter eingebunden (Leinenzwirn 3-0, Ethicon, Norderstedt) und der Gefäßclip entfernt.

*Druckmessung:* Der Katheter war über eine mit 0,9% NaCl-Lösung gefüllte Druckmessleitung (Braun, Melsungen) mit einem piezoelektrischen Druckwandler (DT-XX, Spectramed, Düsseldorf) verbunden. Über zwischengeschaltete Dreiwegehähne konnten aus dem Katheter jederzeit Blutproben entnommen werden. Der Druckaufnehmer war an einen Messverstärker (Plugsys 600-609, TAM-A ; Hugo Sachs Elektronik, March) angeschlossen. Über diesen Verstärker wurden die Signale unter Zwischenschaltung einer Schnittstellenkarte (TAM-A, Plugsys 603, Harvard Apparatus, Hugo Sachs Electronik, March) durch einen PC (P133, Siemens, München) in Echtzeit kontinuierlich registriert. Zur Visualisierung der Daten am PC-Monitor wurde eine individuell konfigurierte Software eingesetzt (DasyLab, DasyTec, Mönchengladbach).

### 2.2.2.2 Druckmessung im kleinen Kreislauf

*Präparation:* Nach Rasur des gesamten Thorax wurde in Studie I im 2. Interkostalraum links parasternal thorakotomiert. Nach Ligatur der linken A. thoracica interna wurde unter sorgfältiger Blutstillung schichtweise bis zum Perikard präpariert. Abweichend von diesem Zugangsweg wurde in Studie II eine mediane Sternotomie als Zugang zum Mediastinum gewählt (siehe 2.2.9).

Nach Einsetzen eines Thoraxspreizers wurde das Perikard inzidiert und die A. pulmonalis dargestellt. In die Wand des rechtsventrikulären Ausflusstrakts wurde eine U-Naht vorgelegt.

(Prolene 3-0, Ethicon, Norderstedt). Mit einer 20G-Kanüle wurde im Zentrum der Naht punktiert. Unmittelbar nach Entfernung der Kanüle wurde ein Katheter (Cavafix MT 134, Braun, Melsungen) unter visueller Kontrolle der abgeleiteten Druckkurve in die Pulmonalarterie vorgeschoben und nach Erreichen der korrekten Position mit der U-Naht fixiert. Freies thorakales Blut wurde mit Saugtupfern drainiert (Sugi, Fa. Kettenbach, Eschenburg) und der Thorax wieder mit wanddurchgreifender Naht verschlossen.

*Druckmessung:* Die Instrumentierung zur Druckmessung erfolgte wie bei der Messung im großen Kreislauf.

### 2.2.2.3 Messung des Herzzeitvolumens

Die Messung des Herzzeitvolumens erfolgte nach der Methode der transpulmonalen Thermodilution.

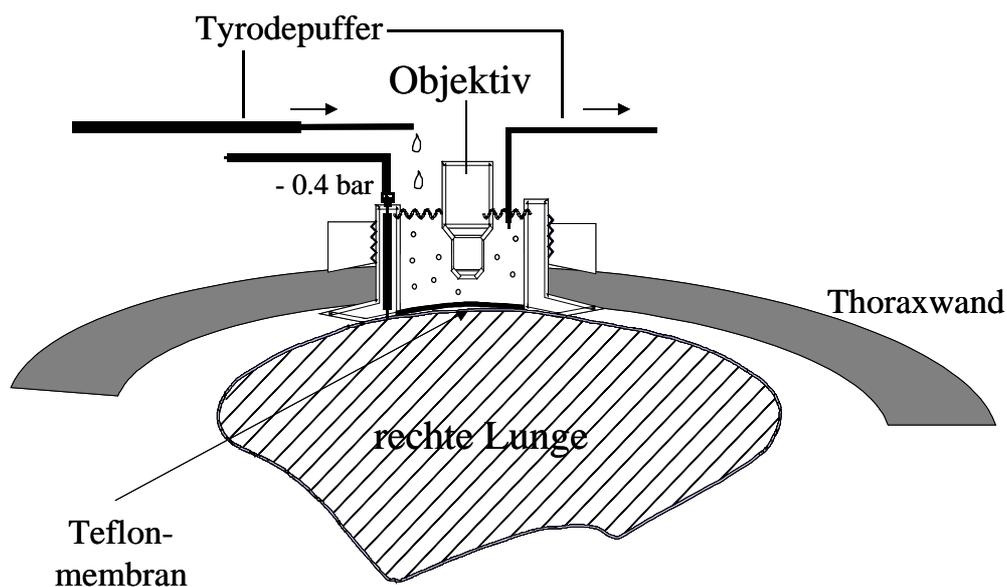
*Präparation:* Im Anschluss an die vorgehend beschriebene Katheterisierung der A. carotis wurde in gleicher Technik ein Katheter in die V. jugularis interna eingebracht. Die Haut wurde nach der Katheterisierung mit Einzelknopfnähten (Prolene 3-0, Ethicon, Norderstedt) verschlossen. Nach Rasur der linken Leistenregion wurde mit einem inguinalen Längsschnitt die Haut eröffnet und die A. femoralis stumpf freipräpariert. Nach distaler Ligatur der Arterie (Leinenzwirn 3-0, Ethicon, Norderstedt) wurde ein Thermistorkatheter (5F Thermistor, Fa. Arrow, Erding) ca. 15 -20 cm weit in die Aorta herznah vorgeschoben. Zum Einführen des Katheters wurde das Gefäß temporär mit einem Microclip abgeklemmt. Nach Fixieren des Katheters mit einer Ligatur (Leinenzwirn 3-0, Ethicon, Norderstedt) erfolgte der Hautverschluss mit Einzelknopfnähten.

*Messprinzip:* Die Messung des Herzzeitvolumens (HZV) erfolgt nach der erstmals von FEGLER et al. beschriebenen und von STEWART weiterentwickelten Methode der Thermodilution (44;187). Zur Messung des Herzzeitvolumens wurde über den in der V. jugularis liegenden Katheter ein definierter Bolus eiskalter physiologischer Kochsalzlösung injiziert. Die Injektion erfolgte über ein speziell für die HZV-Messung konzipiertes Infusionssystem. Die Temperatur des Injektats wurde über einen Thermistor im

Injektionssystem gemessen und an einen halbautomatischen digitalen HZV-Rechner (Injektionssystem und Rechner: REF-1, Baxter, Unterschleißheim) übermittelt. Simultan dazu wurde die Temperatur des aortalen Blutes mit dem femoral eingeführten Thermistorkatheter gemessen und an den Rechner übermittelt. Unter Berücksichtigung der spezifischen Katheterkonstanten berechnet der Computer aus dem Verlauf der Bluttemperatur über die Zeit nach der Injektion das am aortalen Katheter vorbeigeflossene Blutvolumen. Das HZV wurde dann durch Mittelung dreier in unmittelbarer Folge durchgeführter Messungen vom Computer berechnet.

### 2.2.3 Thorakales Fenster und Superfusion

Nach Etablierung des hämodynamischen Monitoring wurden die Tiere in Linksseitenlagerung gebracht. Es erfolgte nach teilweiser Resektion der 3. und 4. rechten Rippe die Implantation eines thorakalen Fensters in den rechten Thorax in der von KUHNLE et al. beschriebenen Technik (110). Dieses Fenster ermöglichte die Wasserimmersionsmikroskopie der rechten Lungenoberfläche.



**Abb. 2** Schematische Übersicht über den rechten Hemithorax nach Implantation des transparenten Fensters

Das Fenster besteht aus einem hohlen Metallzylinder mit einem Innendurchmesser von 3 cm. Der Boden des Zylinders ist der Konvexität der Lungenoberfläche angepasst. An seinem Boden ist eine transparente Teflonmembran (YSI Model 5793, Standard Membrane Kit, Yellow Springs Instruments Co., Ohio, USA) ausgespannt. An sechzehn vertikalen Bohrlöcher in der Zylinderwand kann geringer Unterdruck angelegt werden, dieser fixiert die Lungenoberfläche an das Fenster. Zum Schutz der freiliegenden Lungenoberfläche vor Austrocknung und Wärmeverlusten wurde die Teflonmembran kontinuierlich mit Tyrode-Pufferlösung superfundiert (108). Die Lösung wurde vor der Applikation auf arterielle Blutgaswerte äquilibriert und auf 37° C angewärmt. Nach der Implantation wurde der Thorax zirkulär mit einer Hautnaht dicht um das Fenster verschlossen.

#### 2.2.4 In vitro Markierung von Erythrozyten

Zur Darstellung der Gefäßwände und für die Quantifizierung der Mikrohämodynamik wurden fluoreszenzmarkierte Erythrozyten eingesetzt. Diese Blutzellen wurden in vitro mit Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) (Fluorescein Isothiocyanate Isomer 1 No. F7250, Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) angefärbt. Dazu erfolgte zu Versuchsbeginn die Abnahme von 5 ml Blut aus dem arteriellen Katheter. Nach Zusatz von Heparin (Heparin-Natrium Braun, B.Braun Melsungen AG, Melsungen) erfolgte die Separation der Erythrozyten aus dem Vollblut durch Differentialzentrifugation. Die Markierung dieser Zellen erfolgte nach dem von ZIMMERHACKL et al. beschriebenen und von BERGER et al und GOETZ modifizierten Verfahren (9;10;63;216). Zur Reinjektion wurden die FITC-markierten Erythrozyten mit physiologischer Kochsalzlösung auf einen Hämatokrit von 0,5 verdünnt. Die Injektion erfolgte nach Abschluss der chirurgischen Präparation.

#### 2.2.5 In vitro Markierung von Thrombozyten

Zur Quantifizierung der Thrombozytenkinetik in der Mikrozirkulation der Lunge wurden diese Zellen in vitro mit Rhodamin 6G nach einem Protokoll von MASSBERG (131) angefärbt: Es erfolgte die Abnahme von 10 ml Vollblut ohne Aspiration aus dem geöffneten Dreiwegehahn direkt in ein Polypropylenröhrchen (Nennvolumen 15 ml). Die Röhrchen wurden vor der Abnahme mit 3 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, Seromed, Berlin) befüllt. In 0,55 ml Aqua *ad injectione* gelöst wurden dieser Vorlage 15,2 µmol Citrat, 30 µmol Tri-Natriumcitrat, 40µmol Dextrose sowie 3 µg Prostaglandin E<sub>1</sub> (alle Sigma

Chemical Company, St. Louis, USA) zugesetzt. Es folgte die zehnmünütige Zentrifugation der Suspension bei 250 G. Das so gewonnene plättchenreiche Plasma wurde vorsichtig in ein weiteres Röhrchen überführt. Dieses Röhrchen enthielt als Vorlage 15,2  $\mu\text{mol}$  Citrat, 30  $\mu\text{mol}$  Tri-Natriumcitrat, 40  $\mu\text{mol}$  Dextrose sowie 3  $\mu\text{g}$  Prostaglandin  $E_1$  in 0,55 ml Aqua ad injectione. Es folgte der Zusatz des Fluorochroms Rhodamin 6G (Sigma Chemicals Company, St. Louis, USA) als 0,05% Lösung. Pro Milliliter plättchenreichen Plasmas wurden 15  $\mu\text{l}$  dieser Lösung zugesetzt. Die Thrombozytensuspension wurde dann für 10 min bei 2000g zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Sediment mit 2ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung resuspendiert. Die Reinheit der Suspension wurde mittels eines Coulter-Zytometers (Coulter A<sup>C</sup> T , Coulter Corp. Miami , FL, USA) überprüft. Die Reinjektion erfolgte unmittelbar vor der Durchführung der Intravitalmikroskopie.

#### 2.2.6 In vitro Aktivierung von Thrombozyten

In Studie I erfolgte entsprechend dem Studienprotokoll vor der Injektion die Aktivierung der markierten Thrombozyten. Dazu wurde die Thrombozytensuspension nach der Färbung mit 10 U Thrombin (Sigma Chemicals, Deisenhofen) pro Milliliter der Suspension bei 25°C über einen Zeitraum von 25 min in vitro inkubiert (40).

#### 2.2.7 Videomikroskopie

Nach Durchführung der vorgehend beschriebenen Präparationsschritte wurden die Tiere auf einen Kipptisch unter das Videomikroskop umgelagert. Dieser Tisch konnte über ein Kugelgelenk in allen Richtungen geneigt werden. So konnte das Fenster genau in einer horizontalen Ebene positioniert werden. Über eine an einem Mikromanipulator befestigte Gewindestange konnte das Fenster spannungsfrei über der Präparation ausgerichtet werden.

##### 2.2.7.1 Aufbau des Videomikroskops

Über ein Mikroskop (Orthoplan, Leitz GmbH, Wetzlar ) wurde die Passage fluoreszierender Zellen durch subpleural gelegene Lungenmikrogefäße beobachtet. Mit einer integrierten Restlichtvideokamera ( C2400-08, Fa. Hammamatsu, Herrsching) und einen entsprechenden Recorder ( AG-7350, Panasonic, München) konnten die Beobachtungen auf Videoband (KCA-60BRS, Sony, München ) aufgezeichnet werden. Als Lichtquelle diente ein

Fluoreszenz-Auflichtilluminator (Ploemopak, Leica GmbH, Wetzlar). Das Licht passiert nach Austritt aus dem Illuminator einen Hitzefilter, eine variable Irisblende sowie einen Anregungsfilter. Über einen mit einem Reflexionskurzpassfilter versehenen Teilerspiegel fällt das Licht durch das Objektiv (Salzwasser-Immersionsobjektiv 2517, n.A. 0.6, Leitz GmbH, Wetzlar) auf die Präparation. Das vom Objekt emittierte Fluoreszenzlicht gelangt durch das Objektiv zurück zum Teilerspiegel. Aufgrund seiner längeren Wellenlänge erfolgt die Ablenkung durch einen Sperrfilter zum Okular (Periplan 10x, Leitz GmbH, Wetzlar) bzw. zu der über einen C-Mount-Adapter angebrachten Videokamera. Über einen Videozeitgenerator (VTG 33, For-A-Company Ltd., Japan) wurden Datum (MM-TT) und Zeit (hh:mm:ss:s/100) simultan in das Videobild eingespielt. Mit einer Frequenz von 50 Halbbildern/Sekunde wurden die Bilder auf Videoband gespeichert. Die Überwachung der Aufnahmen erfolgte gleichzeitig in 930-facher Vergrößerung an einem Videomonitor (WV-5470 Panasonic, München). Das Mikroskop war über einen motorgetriebenen Spindeltrieb (Fa Leitz, Wetzlar) und einen manuellen Mikro/Makrotrieb in vertikaler Richtung beweglich. Die Ausrichtung in der Horizontalebene erfolgte über einen Kreuztisch (Sonderanfertigung, Fa. Leitz, Wetzlar), der von einem Schrittmotor (IXE.C, Phytron, Gröbenzell) bewegt wurde. Der Schrittmotor wurde über Koordinatenangabe elektronisch gesteuert. Zur Dämpfung von Erschütterungen war die gesamte Mikroskopeinheit schwingungsfrei auf einer 300 kg schweren Granitplatte montiert, die wiederum auf einem Metallunterbau pneumatisch gelagert war.

#### 2.2.7.2 Differenzierung der Zellen durch Wechsel der Anregungswellenlänge

Durch entsprechende Anordnung der Anregungsfilter, Teilerspiegel und Sperrfilter im Mikroskopaufbau ist eine getrennte Darstellung der fluoreszierenden Zellen möglich ((107). Die notwendigen Filterkombinationen waren in 3 Filterblöcken (L3, N2, I2/3, alle Fa. Leitz, Wetzlar) fest installiert. Unter Verwendung des I2/3-Blockes konnten sowohl Erythrozyten und Thrombozyten gleichzeitig beobachtet werden. Für die isolierte Darstellung der Erythrozyten wurde der L3-Filterblock verwendet, für die Thrombozyten die N2-Filterkombination. Die Anregungs- und Emissionswellenlängen der Fluorochrome gibt Tab. 1 (s. Seite 18) an. Eine ausführliche Übersicht über die verwendeten Filterkombinationen findet sich bei KÜBLER (106).

Farbstoff	markierter Zelltyp	Anregungsmaxima	Emissionsmaxima
FITC	Erythrozyten	490 nm	525 nm
Rhodamin 6G	Thrombozyten	540 nm	625 nm

**Tab. 1: Maxima der Anregungs- und Emissionswellenlängen von FITC und Rhodamin 6G**

### 2.2.7.3 Synchronisation mit dem Atemzyklus

Durch die in- und expiratorische Bewegung der Lunge ist die mikroskopische Untersuchung der pulmonalen Mikrozirkulation erschwert. Die während der Intravitalmikroskopie gewonnenen Videosequenzen wurden jeweils während einzelner, fünf Sekunden dauernder inspiratorischer Plateauphasen aufgezeichnet. Zwischen den Plateauphasen erfolgte die Beatmung wie vorgehend beschrieben. Dieses Vorgehen vermeidet sowohl respiratorische Bewegungsartefakte und schwächt fortgeleitete Herzbewegung durch das Lungenparenchym ab.

### 2.2.7.4 Mikroskopiertes Areal

Nach der Ausrichtung des Tieres unter dem Mikroskop wurde bei zehnfacher Vergrößerung (Objektiv: 10d, n.A. 0.22, Leica GmbH, Wetzlar) ein geeignetes Gefäßgebiet am Unterrand des rechten Lungenober- oder Mittellappens aufgesucht. Mit dem L3-Filter wurden zum jeweiligen Messzeitpunkt während mehrerer jeweils fünf Sekunden dauernder inspiratorischer Plateauphasen die Passage von Erythrozyten in subpleuralen Venolen und Arteriolen sowie einem alveolären Kapillargebiet dargestellt und auf Videoband aufgezeichnet. In der Versuchsdokumentation wurde eine Handskizze der Gefäßmorphologie angelegt, um während späterer Versuchsphasen eine eindeutige Identifikation des Gefäßes zu erleichtern. Die entsprechende Beobachtung der Thrombozytenpassage erfolgte mit dem N2-Filterblock. Zu den nachfolgenden Versuchszeitpunkten wurden die Gefäßabschnitte mittels der Koordinatensteuerung des Kreuztisches erneut aufgesucht. Dieses Vorgehen ermöglichte den direkten quantitativen Vergleich zwischen einzelnen Versuchszeitpunkten.

Zur Intravitalmikroskopie wurden nur Gefäßareale gewählt, die sich in ihrem gesamten Verlauf in der Focusebene abbildeten und die klare Gefäßgrenzen aufwiesen.

### 2.2.8 Inhalation von Stickstoffmonoxid

Die Inhalation von NO erfolgte über eine in unserer Arbeitsgruppe entwickelte Anordnung (Abb. 3) (149): NO lag in einem Gaszylinder in einer Konzentration von 200 ppm vor (Pulmomix, Messer Sondergaswerk, Duisburg), als Trägergas für NO diente Stickstoff. Das Gasgemisch konnte über ein Dosierventil (Linde AG, Pullach b. München) in das

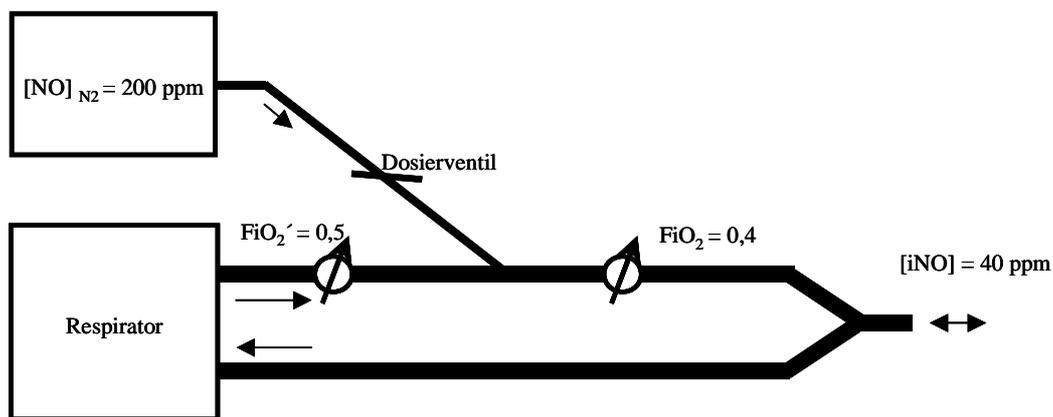


Abb. 3: Schematischer Aufbau der Dosiervorrichtung für iNO

Beatmungssystem eingeleitet werden. Im Inspirationsschenkel waren zwei Oximeter (Oxidig, Drägerwerk AG, Lübeck) zur Messung der  $FiO_2$  integriert. Ein Oximeter war distal der NO-Zuleitung angebracht, das andere proximal. Leitete man das NO/N<sub>2</sub>-Gemisch in das Beatmungssystem, so fiel die  $FiO_2$  im distalen Beatmungsschlauch ab. Das Verhältnis der Messwerte distal und proximal entsprach somit dem Anteil der NO-Stickstoffzumischung.

Die gezielte Dosierung erfolgte anhand folgender Gleichung:

$$FiO_2' = FiO_2 \times \left( 1 + \frac{[iNO]}{[NO]_{N_2} - [iNO]} \right)$$

Hierbei ist [iNO] die gewünschte Konzentration von Stickoxid im Atemgas und  $[NO]_{N_2}$  die Konzentration von NO im Trägergas. Aus der Gleichung errechnete sich die  $FiO_2'$ , die zu Beginn der NO-Anwendung am Beatmungsgerät eingestellt wurde. In Studie I zeigten das proximale und das distale Oximeter zunächst diese  $FiO_2'$  von 0,5 an. Der Zufluss von in  $N_2$  gelöstem NO wurde nun solange erhöht, bis am distalen Oximeter die  $FiO_2$  auf 0,4 abgefallen war. Für die Studie II mit einer Ziel- $FiO_2 = 0,95$  betrug die  $FiO_2'$  0,99. Die inspiratorische NO-Konzentration entsprach in beiden Fällen nun 40 ppm.

### 2.2.9 Ischämie-Induktion

In Studie II wurde in zwei Versuchsgruppen eine pulmonale Ischämie durch Okklusion der rechten A. pulmonalis, Vv. pulmonales sowie des rechten Hauptbronchus mittels eines Tourniquets induziert. Bei allen Tieren in Studie II wurde der Zugang zum rechten Ventrikel und Lungenhilus über eine mediane Sternotomie gewählt: Nach medianer Hautinzision mit dem Elektrokauter erfolgte nach schichtweisem Abtragen der Muskulatur die Darstellung des Sternums sowie die Verödung der das Sternum versorgenden Intercostalarterienäste mit der bipolaren Pinzette. Die in der Fossa jugularis am Sternum ansetzende Halsmuskulatur wurde durchtrennt und ein metallener Zungenspatel in den Retrosternalraum bis auf Höhe des Xiphoids eingeführt. Die Sternotomie wurde mit einem von einem Elektromotor mit flexibler Welle (Typ 810, KaVo Elektrotechnische Werke, Leutkirch im Allg.) angetrieben Kreissägeblatt (Durchmesser 20 mm, OBI, Martinsried) durchgeführt. Zur Blutstillung wurden die Schnittflächen mit Knochenwachs (Knochenwachs, Ethicon, Norderstedt) imprägniert. In der Folge wurde der Thorax mit einem Wundspreizer offen gehalten.

Für eine schnelle und atraumatische Anlage des Tourniquets war die eindeutige Identifikation der hilären Strukturen von großer Wichtigkeit. Besondere Bedeutung kam hierbei der Identifikation des rechten Hauptbronchus zu, der die am weitesten dorsal gelegene Leitungsbahn des Hilus darstellt und vom Tourniquet mit gefasst werden musste. Um diese Struktur in der Tiefe des Situs sicher identifizieren zu können wurde ein Glasfaserlichtleiter (Durchmesser 0,75 mm, Conrad, München) über einen Winkeladapter in den Trachealtubus eingeführt. Der von einer Kaltlichtquelle (Olympus CLE-3) illuminierte Lichtleiter diente nun bei abgedunkelter Umgebungsbeleuchtung als Orientierung, um mittels zweier gegenläufig eingeführter Overholt-Klemmen den als Tourniquet dienenden Katheter (Intramedic Polyethylen Tubing, Außendurchmesser 1,52 mm, Clay Adams Inc., New York, USA) vorzulegen. Es folgte der Verschluss des Thorax mittels zweier unter dem Sternum durchgreifenden Nähte (Prolene 3-0, Ethicon, Norderstedt). Zu Beginn der Ischämiephase wurde das Tourniquet gestrafft und mit einer Mosquito-Klemme in seiner Lage fixiert.

Der Perfusions- und Ventilationsstillstand wurden mikroskopisch kontrolliert und auf Videoband dokumentiert.

## 2.3 Experimentelles Protokoll

### 2.3.1 Studie I

In dieser Untersuchung wurde ein Protokoll verwendet, das die Tiere randomisiert zwei Gruppen zuordnete: In beiden Gruppen erfolgte nach der Präparation die Injektion markierter Erythrozyten. Nach einer Stabilisierungsphase wurden die Einschlusskriterien erfasst und die Tiere randomisiert zwei Gruppen zugeordnet. Beide Gruppen erhielten dann markierte Thrombozyten injiziert ( $t_0$ ), die für ca. 20 Minuten nach Injektion sichtbar waren.

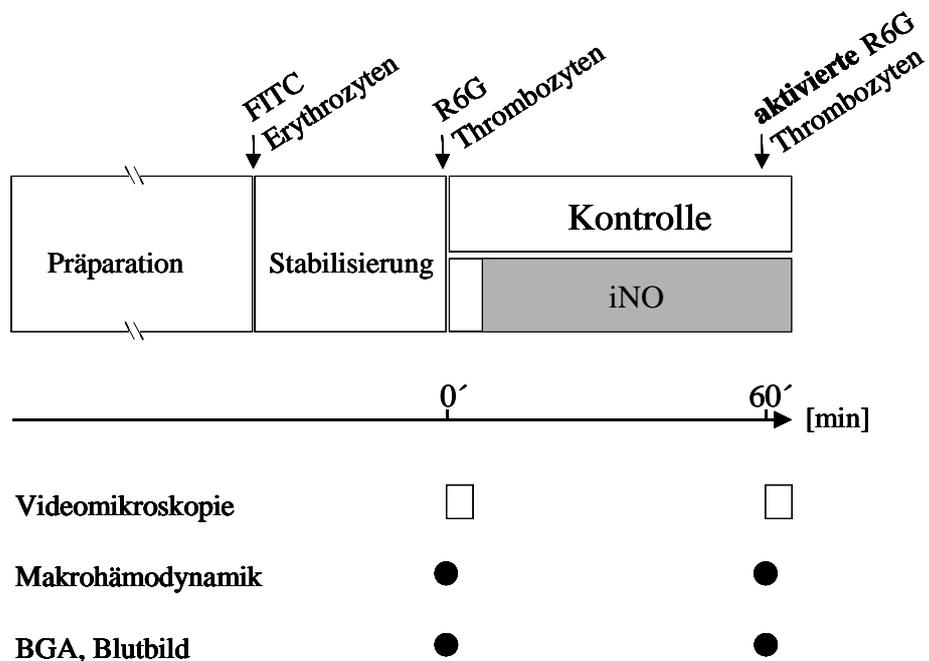


Abb. 4: Versuchsprotokoll Studie I

Daher wurde die Videomikroskopie unmittelbar im Anschluss an die Injektion der Thrombozyten durchgeführt. An diesem Zeitpunkt erfolgte darüber hinaus die Messung der makrohämodynamischen Parameter sowie die Entnahme von Blutproben für Blutbilduntersuchung und BGA. Die Bedingungen waren für beide Gruppen bis zu diesem Zeitpunkt identisch. Ab jetzt unterschieden sie sich: Die Therapiegruppe erhielt in der Folge kontinuierlich per Inhalation Stickoxid. Die Tiere der Kontrollgruppe wurden weiterhin ohne den Zusatz von NO beatmet. Nach 60 Minuten ( $t_{60}$ ) erfolgte die erneute Injektion von



## 2.4 Dokumentation

In einem Protokollbuch wurden unter dem jeweiligen Datum die fortlaufende Nummer des begonnenen Versuchs, das Gewicht des Versuchstiers, der Beginn der einzelnen Präparations- und Versuchsphasen sowie die entsprechende Gruppenzugehörigkeit nach Randomisierung dokumentiert. Die genauen Anfangs- und Endzeiten der Mikroskopie wurden für jedes Gefäßsegment dokumentiert. Die Zeitpunkte der Medikamenteninjektionen und Dosierungen sowie die der Injektion markierter Zellen wurden erfasst. Die makrohämodynamischen Parameter wurden zu den im Versuchsprotokoll festgelegten Zeitpunkten handschriftlich von den jeweiligen Anzeigegeräten in die Dokumentation übernommen. Die Ergebnissausdrucke der Blutgasanalysen sowie der Bestimmungen des peripheren Blutbildes wurden mit Versuchsnummer und Zeitpunkt versehen archiviert. Als Referenz diente bei allen Zeitangaben die vom Videozeitgenerator angezeigte Uhrzeit.

## 2.5 Gemessene und errechnete Parameter

### 2.5.1 Blutgasanalyse und peripheres Blutbild

Zu den jeweiligen Messzeitpunkten wurden aus dem arteriellen Katheter ca. 80µl Blut in eine heparinisierte Glaskapillare (Clinitubes, Fa. Radiometer, Kopenhagen) zur Blutgasanalyse und ca. 0,5 ml Blut in eine heparinisierte Spritze (Heparin, Fa. Ratiopharm GmbH & Co., Ulm) zur Analyse des peripheren Blutbildes entnommen. Mittels eines Blutgasanalysegerätes (Chiron Diagnostics, Fernwald, Deutschland) wurden die Partialdrucke von Sauerstoff ( $p\text{aO}_2$ ) und Kohlendioxid ( $p\text{aCO}_2$ ), der pH-Wert (pH) und die Bikarbonatkonzentration ( $\text{HCO}_3^-$ ) im arteriellen Blut bei 37 °C gemessen und der Basenüberschuss (BE) berechnet. Da die Körpertemperatur der Versuchstiere während des gesamten Versuches auf konstant  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$  gehalten wurde, erübrigt sich eine Temperaturkorrektur der Blutgaswerte.

In einem Coulter-Zytometer (Coulter A<sup>C</sup>T Counter, Coulter Corp., Miami, USA) wurden Erythrozyten-, Leukozyten- und Thrombozytenzahlen, Hämoglobingehalt und Hämatokrit im peripheren arteriellen Blut bestimmt.

## 2.5.2 Makrohämodynamik

Über die in die A. carotis dextra, und A. pulmonalis implantierten Katheter wurden kontinuierlich die systolischen und diastolischen Werte des arteriellen und pulmonalarteriellen Blutdruckes gemessen und in Echtzeit wie vorgehend beschrieben durch die Software DasyLab<sup>®</sup> auf einem Monitor als Pulsdruckkurve dargestellt. Die Berechnung des mittleren Druckes ( $p_m$ ) erfolgte dabei automatisch durch die Software aus den gemessenen systolischen ( $p_s$ ) und diastolischen ( $p_d$ ) Werten nach der folgenden Formel:

$$P_m = P_d + \frac{P_s - P_d}{3}$$

Aus der Anzahl der systolischen Druckmaxima pro Zeiteinheit wurde die Herzfrequenz berechnet.

Die computerunterstützte Berechnung des Herzzeitvolumens erfolgte anhand der modifizierten Stewart-Hamilton-Gleichung :

$$CO = \frac{V_I \times (T_B - T_I) \times C_I \times S_I \times 60 \times C_T}{S_B \times C_B \times \int_0^{\infty} \Delta T_B(t) dt}$$

CO	Herzzeitvolumen	[l min <sup>-1</sup> ]
V <sub>I</sub>	Volumen des Injektats	[ml]
T <sub>B/I</sub>	Temperatur Blut / Injektats	[°C]
S <sub>B/I</sub>	Dichte Blut / Injektats	[kg m <sup>-3</sup> ]
C <sub>B/I</sub>	spezifische Wärmekapazität Blut / Injektat	[J kg <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> ]
C <sub>T</sub>	Katheterkonstante	
$\int_0^{\infty} \Delta T_B(t) dt$	Integral der Thermodilutionskurve	[°C sec <sup>-1</sup> ]

Die Dichte von Blut und 0,9%iger Kochsalzlösung beträgt 1,045 bzw. 1,005 kg/m<sup>3</sup>, die spezifische Wärmekapazität 0,87 bzw. 0,997 J kg<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>. Die Katheterkonstante C<sub>T</sub> muss als Korrekturfaktor eingeführt werden, da die gemessene Injektattemperatur aufgrund von Flüssigkeitsresten im Katheterlumen und Erwärmung des Injektats während der Injektion nicht exakt mit der Temperatur des in die V. cava sup. gelangenden Bolus übereinstimmt. C<sub>T</sub> wurde für den in dieser Untersuchung verwendeten Katheter empirisch ermittelt und betrug 0,06.

### 2.5.3 Intravitalmikroskopie

#### 2.5.3.1 Computerunterstützte off-line Analyse am Monitor

Gefäßdurchmesser, Mikrohämodynamik und Thrombozytenkinetik in den untersuchten Abschnitten der pulmonalen Mikrozirkulation wurden nach Abschluss der Versuchsphasen durch Analyse der aufgezeichneten Videosequenzen am Bildschirm bei 930-facher Vergrößerung quantifiziert. Die Eichung des optischen Systems in der Horizontal- und Vertikalebene des Monitors erfolgte durch Ausmessung von unter Versuchsbedingungen aufgenommenen Mikrometerskalen (Leica GmbH, Wetzlar). Nach Untersuchungen von KÜBLER (106) beträgt die Messgenauigkeit des Bildverarbeitungssystems  $\pm 1\mu\text{m}$ . Die Analyse der Videosequenzen erfolgt computergestützt am Videomonitor mittels des Bildverarbeitungssystems Optimas (Bioscan, Edmonds, Washington, USA) und eines von KUHLE entwickelten Datenverarbeitungsprogramms. Die Software erlaubt die Einblendung von Markierungen in die videofluoreszenzmikroskopischen Bilder. Die Länge der einzelnen Markierungslinien bzw. die Größe markierter Flächen wurden automatisch in vorbereitete Datenblätter des Tabellenkalkulationsprogramms MS-Excel (MS-Excel, Microsoft GmbH, Unterschleißheim) eingelesen. Sehr kleine Gefäßdurchmesser, geringe Blutfließgeschwindigkeit bei niedrigem Zellflux (*i. e.* die Anzahl einen definierten Querschnitt pro Zeiteinheit passierender Zellen), sowie eine auf 5 Sekunden begrenzte inspiratorische Plateauphase limitierten die quantitative Analyse der Mikrohämodynamik in einzelnen Kapillarsegmenten. Deshalb wurden ganze, von Alveolarsepten begrenzte Kapillarareale analysiert. Die in den alveolären Kapillarnetzwerken quantifizierten Parameter unterscheiden sich, auch hinsichtlich des Auswerteverfahrens, von den in Arteriolen und Venolen erfassten und werden deshalb gesondert abgehandelt.

#### 2.5.3.2 Mikrohämodynamik in Arteriolen und Venolen

##### Gefäßdurchmesser

Die reinjizierte Erythrozytensuspension enthält trotz mehrfacher Waschvorgänge Reste von freiem FITC. Ebenso verlieren die FITC-markierten Erythrozyten Spuren dieses Fluorochromes. Hierdurch kommt es zu einer gering ausgeprägten, aber erkennbaren Anfärbung der Gefäßinnenwände. Der Durchmesser der untersuchten Arteriolen und Venolen

kann deshalb auf dem Videoschirm (Videomonitor WV5470, Fa. Panasonic, München) mit Hilfe des Bildverarbeitungssystems als Distanz  $D$  der gegenüberliegenden Gefäßinnenwände ermittelt werden.

### Mittlere Erythrozyten – Fliessgeschwindigkeit

In den untersuchten pulmonalen Arteriolen und Venolen wurde die Geschwindigkeit  $v_{\text{Ery}}$  einzelner passierender markierter Erythrozyten als Quotient der zurückgelegten Wegstrecke  $D_s$  und des dazu benötigten Zeitintervalls  $Dt$  berechnet. Die Messung der Wegstrecke erfolgte in axialer Gefäßrichtung durch Bild-zu-Bild Analyse mit Hilfe des Bildverarbeitungssystems, das Zeitintervalls  $Dt$  wurde anhand der in die Videobilder eingeblendeten Zeitanzeige ermittelt. Die mittlere Erythrozytenfließgeschwindigkeit  $\bar{v}_{\text{Ery}}$  wurde nach SARELIUS und MCKINLAY (172) und SACHS (169) als harmonisches Mittel der Fließgeschwindigkeiten  $v_{\text{Ery}}$  von  $n$  Einzelerythrozyten berechnet als

$$\bar{v}_{\text{Ery}} = \frac{n}{\sum 1/v_{\text{Ery}1}, v_{\text{Ery}2}, \dots, v_{\text{Ery}n}}$$

Nach SARELIUS und MCKINLAY ergibt sich für  $v_{\text{Ery}}$  ein Variationskoeffizient  $CV(v_{\text{Ery}})$  von:

$$CV(\bar{v}_{\text{Ery}}) = \sqrt{[S^2(\bar{v}_{\text{Ery}})/(n \times \bar{v}_{\text{Ery}}^2)]}$$

Dabei entspricht  $\sigma^2$  der Varianz der Einzelmesswerte  $v_{\text{Ery}}$ . Die Fließgeschwindigkeit einzelner Erythrozyten wurde solange gemessen, bis  $CV(v_{\text{Ery}})$  unter 10 % lag. Hierfür war meist die Geschwindigkeitsmessung von etwa 20 Einzelerythrozyten notwendig.

## Blutvolumenfluss und Wandscherrate

Der Blutvolumenfluß  $Q$  in einem Gefäß, d.h. das Blutvolumen, das pro Zeiteinheit einen imaginären Gefäßquerschnitt passiert, kann aus dem Gefäßdurchmesser  $D$  und der Blutfließgeschwindigkeit  $v_Q$  errechnet werden. Unter Berücksichtigung des Fahraeus-Effektes (43) lässt sich  $v_Q$  wiederum aus der mittleren Erythrozytenfließgeschwindigkeit  $v_{Ery}$  ableiten. Bei der Ableitung von  $v_Q$  aus  $v_{Ery}$  gilt, daß das Verhältnis zwischen dynamischem Mikrohämatokrit (Tubular Hematocrit,  $H_T$ ) im untersuchten Gefäß und Abflußhämatokrit (Discharge Hematocrit,  $H_D$ ) dem Verhältnis zwischen  $v_Q$  und  $v_{Ery}$  entspricht (162).

Für jede Arteriole und Venole wurde das jeweilige Verhältnis zwischen  $H_T / H_D$  nach der Methode von PRIES et al. (162) berechnet:

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

Dabei wurde angenommen, daß  $H_D$  annähernd dem im aortalen Blut gemessenen systemischem Hämatokrit  $H_k$  entspricht.  $v_Q$  wurde dann bestimmt als:

$$v_Q = \bar{v}_{Ery} \times H_T / H_D$$

Daraus folgend ergibt sich unter Annahme einer zylindrischen Gefäßgeometrie die Berechnung von  $Q$  [nl/min] als:

$$Q = v_Q \times (D/2)^2 \times \pi \times 60 / 10^6$$

Da an der intravasalen Gefäßwand auftretende Scherkräfte insbesondere bei der Interpretation der Thrombozyten-Endothelzellinteraktion berücksichtigt werden müssen, wurde die Wandscherrate  $\gamma$  unter Verwendung des Poiseuille'schen Gesetzes für Newton'sche Flüssigkeiten und Annahme einer zylindrischen Gefäßgeometrie berechnet als:

$$g = 8 \times v_o / D$$

### 2.5.3.3 Thrombozytenkinetik in Arteriolen und Venolen

Bei der Quantifizieren der Thrombozytenkinetik wurden zwischen fließenden, nur temporär mit den Endothelzellen interagierenden sowie Endothel-adhärenenten Thrombozyten unterschieden.

#### Thrombozytenfliessgeschwindigkeit

Die mittlere Fließgeschwindigkeit der fließenden Thrombozyten wurde entsprechend der der Erythrozyten als harmonisches Mittel aller Thrombozyten, die einen definierten Gefäßquerschnitt im Beobachtungszeitraum passierten, ermittelt.

Die Berechnung erfolgte in Analogie zu der von KÜBLER (106) beschriebenen Berechnung der Fließgeschwindigkeit von Leukozyten in diesen Gefäßabschnitten:

$$\bar{v}_{Thz} = \frac{n}{\sum (1/v_{Thz1}, 1/v_{Thz2}, 1/v_{Thz3}, \dots, 1/v_{Thzn})}$$

Die Fließgeschwindigkeit der Thrombozyten steht in direkter Abhängigkeit von der aktuellen Blutfließgeschwindigkeit. Daher wurde neben dem harmonischen Geschwindigkeitsmittel auch die relative Thrombozytenfließgeschwindigkeit  $v_{rel}$  nach der Beziehung

$$v_{rel} = \bar{v}_{Thz} / \bar{v}_{Ery}$$

berechnet.

### Endothel-adhärenente Thrombozyten

Als Endothel-adhärenente Thrombozyten wurden Blutplättchen definiert, die über einen Untersuchungszeitraum von 5 s ihre Lokalisation am vaskulären Endothel nicht veränderten. Unter Annahme einer zylindrischen Gefäßgeometrie kann die Anzahl ortständiger Thrombozyten bezogen auf die Gefäßwandoberfläche ( $Thz_{Ad}$ ) in  $[mm^2]$  bestimmt werden. Dabei ist  $n$  die Anzahl der in diesem Gefäßsegment identifizierten ortständigen Thrombozyten,  $D$  der Gefäßdurchmesser und  $L_{seg}$  die Länge des untersuchten Gefäßsegmentes:

$$Thz_{Ad \text{ gemessen}} = n / (D \times p \times L_{seg})$$

Die Anzahl der beobachteten adhärenenten Thrombozyten wird durch die Anzahl der injizierten, gefärbten TZ mitbeeinflusst. Dieser Einfluss wurde durch die Einführung eines Normierungsfaktors berücksichtigt: Das Volumen des Re-Injektats war mit zwei Millilitern in allen Versuchen gleich. Die Konzentration der gefärbten TZ im einzelnen Injektat wurde zytometrisch bestimmt. Die mittlere Konzentration bei allen Versuchen der jeweiligen Studie wurde berechnet. Für jeden Versuch wurde der Quotient aus der mittleren Konzentration ( $[Thz]_{Mittel}$ ) und der individuell gemessenen Thrombozyten-Konzentration ( $[Thz]_{Einzelversuch}$ ) gebildet. Nach der Auswertung wurde die Anzahl der adhärenenten Zellen pro  $mm^2$  mit diesem Faktor multipliziert, so dass das Adhärenzverhalten der Thrombozyten abschließend nach folgender Formel beschrieben wurde:

$$Ad = Thz_{Ad \text{ gemessen}} \times \frac{[Thz]_{Mittel}}{[Thz]_{Einzelversuch}}$$

#### 2.5.3.4 Morphologie von Alveolarkapillaren und Mikrohämodynamik in Kapillaren

##### Länge erythrozytenperfundierter Kapillaren

Die subpleurale Wandfläche einer untersuchten Alveole wurde am Bildschirm markiert und anschließend wurde durch das Bildverarbeitungssystem die Fläche des Kapillarareals ( $A_{Alv}$ ) berechnet. Ebenfalls mit Hilfe des Bildverarbeitungssystems wurde im selben alveolären Kapillarareal die Länge der erythrozytenperfundierten Kapillarstrecke ( $L_{Alv}$ ) erfasst. Hierbei dienten die FITC-markierten Erythrozyten als Indikatoren der perfundierten Kapillaren. Der Passageweg jedes FITC-markierten Erythrozyten wurde am Videobildschirm exakt markiert und die zurückgelegte Wegstrecke durch das Bildverarbeitungsprogramm berechnet. Die zurückgelegten Wegstrecken aller in diesem Zeitraum passierenden Erythrozyten wurden zu einer Gesamtlänge der Erythrozyten-perfundierten Kapillarstrecke addiert. Mehrfach perfundierte Kapillarstrecken gingen nur einmal in die Berechnung ein.

### Kapillarer Perfusions-Index (CPI)

Nach der Methode von WAGNER und LATHAM (203) wurde aus den Parametern  $A_{Alv}$  und  $L_{Alv}$  der funktionelle kapillare Perfusionsindex (CPI) bestimmt. Nur von Plasma perfundierte Kapillarsegmente gingen in diesem Modell nicht in die Berechnung des CPI ein. Der CPI diente somit als Maß für Dichte der von Erythrozyten perfundierten Kapillaren im Alveolarareal. Der CPI bezieht sich dabei auf eine mittlere Oberfläche der Einzelalveolen von  $10000 \mu\text{m}^2$ . Somit gilt:

$$CPI = \frac{L_{Alv}}{A_{Alv}} \times 10000 \text{mm}^2$$

### Mittlere Erythrozytenfließgeschwindigkeit

Analog zur Bestimmung der Fließgeschwindigkeit in Arteriolen und Venolen wurde auch in den Alveolarkapillaren die Geschwindigkeit jedes innerhalb der Beobachtungsphase von 5s passierenden FITC-markierten Erythrozyten anhand des Quotienten  $\Delta s/\Delta t$  bestimmt und die mittlere Erythrozytenfließgeschwindigkeit  $v_{Ery}$  als harmonisches Mittel der Einzelerthrozytenfließgeschwindigkeiten (s.o.) berechnet. Der Passageweg jedes einzelnen Erythrozyten durch das Kapillarareal wurde am Bildschirm in Einzelbildschritten rekonstruiert und die zurückgelegte Wegstrecke durch die Bildverarbeitungssoftware berechnet. Das Zeitintervall wurde aus den im Videobild eingeblendeten Zeitanzeigen ermittelt.

#### 2.5.3.5 Thrombozytenkinetik in Alveolarkapillaren

### Fliessgeschwindigkeit

Nach dem Prinzip der Bestimmung der mittleren Erythrozytenfließgeschwindigkeit wurde auch in den Alveolarkapillaren die mittlere Thrombozytenfließgeschwindigkeit ermittelt. Die Thrombozytenfließgeschwindigkeit setzt sich aus dem harmonischen Mittel aller

Thrombozyten zusammen, die während des Beobachtungszeitraumes nicht an der selben Stelle des Kapillarnetzwerkes statisch waren.

#### Permanent retinierte Thrombozyten

Die Anzahl über den Beobachtungszeitraum in Kapillargebieten ortsständiger Thrombozyten ( $n_{Thz\ Alv}$ ) wurde gezählt und gemäß der nachstehenden Formel bezogen auf die Oberfläche des untersuchten Kapillargebietes unter Berücksichtigung des vorgehend beschriebenen Korrekturfaktors als  $Ad\ [mm^{-2}]$  angegeben.

$$Ad[mm^{-2}] = \frac{n_{Thz\ Alv}}{A_{Alv}} \times 10^6 \times \frac{[Thz]_{Mittel}}{[Thz]_{Einzelversuch}}$$

## 2.6 Einschlusskriterien

Nach Abschluss der Präparation wurden für die weitere intravitalmikroskopische Untersuchung bei allen Versuchstieren folgende Einschlusskriterien gefordert:

- Arterieller Mitteldruck > 65 mmHg
- Herzzeitvolumen >150 ml/min
- Oxygenierungsindex >250 mmHg
- Fehlen von Mikro- und Makrohämorrhagien
- Fehlen von minderperfundierten Arealen auf der Lungenoberfläche im Beobachtungsareal

Die Ausfallsquote der Versuchstiere nach erfolgter Präparation betrug in Studie I 15%, in Studie II lag sie bei 21%.

## 2.7 Datenverarbeitung und Statistik

### 2.7.1 Datenverarbeitung

Die Parameter der Gefäßmorphologie, Mikrohämodynamik und Thrombozytenkinetik wurden mittels des computergestützten Bildverarbeitungssystems (Optimas, BioScan, Washington D.C., USA) quantifiziert und automatisch in Datenblätter des Tabellenkalkulationsprogramms MS-Excel (MS-Excel, Microsoft GmbH, Unterschleißheim) übertragen. Ebenso wurden die Ergebnisse der makrohämodynamischen Messungen, der Blutgasanalyse und des Blutbildes in Tabellen des Tabellenkalkulationsprogramms am Personalcomputer eingegeben. Mit Hilfe programmierter Formeln wurden unter Berücksichtigung von Korrekturfaktoren alle abgeleiteten Parameter berechnet. Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurden ebenfalls MS-Excel sowie MS-Powerpoint (Microsoft GmbH, München) eingesetzt. Die statistische Auswertung der gemessenen und berechneten Parameter erfolgte am Personalcomputer mit dem Statistikprogramm Sigmastat (Jandel Corp., San Rafael, CA, USA).

### 2.7.2 Statistik

Aufgrund der Fallzahlen pro Versuchsgruppe wurde auf die Annahme bzw. Überprüfung einer eventuell zugrundeliegenden Normalverteilung verzichtet und ausschließlich nichtparametrische Tests verwendet. In Studie I erfolgte die Testung der Parameter der beiden Versuchszeitpunkte innerhalb einer Versuchsgruppe (verbundene Paardifferenzen) auf signifikante Unterschiede mit dem Wilcoxon-Test. Die Testung zwischen den Versuchsgruppen zum jeweiligen Zeitpunkt erfolgte mittels Mann-Whitney-Rank-Sum-Test für unverbundene Paardifferenzen. In Studie II wurden die Messwerte mit der Rangvarianzanalyse nach KRUSKAL und WALLIS für unverbundene Stichproben sowie nachfolgendem Dunn`s-Test untersucht. Die Analyse von Korrelationen erfolgte nach der Methode von PEARSON. Bei der Betrachtung von Häufigkeitsverteilungen wurde der Test nach KOLMOGOROV-SMIRNOV eingesetzt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit  $< 5\%$  wurde als signifikant erachtet. Falls nicht anders angegeben, sind alle Werte als Median sowie erste und dritte Quartile angegeben.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Studie I: Thrombin-Stimulation

##### 3.1.1 Makrohämodynamik, Blutgase und peripheres Blutbild

Die zu den Versuchszeitpunkten  $t_0$  und  $t_{60}$  gemessenen Werte der Makrohämodynamik, die Ergebnisse der Blutgasanalysen sowie der Blutbildbestimmungen sind in den Tabellen 1-3 aufgeführt.

Makro- hämodynamik	Kontrolle (n=6)		iNO (n=9)	
	$t_0$	$t_{60}$	$t_0$	$t_{60}$
MAP	83	84	84	87
[mmHg]	(73/103)	(76/92)	(78/89)	(75/93)
PAP	13	15	14	14
[mmHg]	(12/18)	(14/18)	(13/16)	(13/17)
CO	305	310	325	325
[ml/min]	(240/340)	(175/322)	(270/345)	(280/370)

**Tab. 2: Makrohämodynamik**

Parameter: Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP); mittlerer pulmonalarterieller Blutdruck (PAP),  
Herzeitvolumen (CO)

Die Infusion thrombinaktivierter Thrombozyten zum Zeitpunkt  $t_{60}$  führte in keiner der beiden Gruppen zu einer Veränderung der hämodynamischen Parameter. Die Inhalation von Stickstoffmonoxid in der Gruppe iNO zum Zeitpunkt  $t_{60}$  hatte weder im Vergleich zum Zeitpunkt  $t_0$  noch zur Kontrollgruppe einen Einfluss auf den pulmonalarteriellen Mitteldruck.

Blutgasanalyse	Kontrolle (n=6)		iNO (n=9)	
	t <sub>0</sub>	t <sub>60</sub>	t <sub>0</sub>	t <sub>60</sub>
p <sub>a</sub> O <sub>2</sub>	125	118	122	118
[mmHg]	(104/140)	(101/130)	(103/145)	(105/123)
p <sub>a</sub> CO <sub>2</sub>	50	61	64	64
[mmHg]	(38/53)	(54/64)	(54/68)	(56/76)
pH	7,31	7,24	7,23	7,24
	(7,25/7,31)	(7,19/7,29)	(7,22/7,30)	(7,20/7,29)
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	23,7	26,9	26,3	27,1
[mmol/l]	(18,2/26,3)	(22,1/28,5)	(24,2/27,8)	(26,5/27,8)
BE	- 3,4	0,5	- 0,9	-0,2
[mmol/l]	(- 7,9/1,0)	(- 6,2/1,4)	(- 1,8/0,2)	(- 0,6/0,2)

**Tab. 3: Blutgasanalyse**

Parameter: arterieller Sauerstoff- (p<sub>a</sub>O<sub>2</sub>) und Kohlendioxidpartialdruck (p<sub>a</sub>CO<sub>2</sub>), pH-Wert (pH), Bikarbonatkonzentration (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), Basenüberschuss (BE)

Eine in der Blutgasanalyse erkennbare Kohlendioxidretention, die keinen erkennbaren Einfluss auf die Makrohämodynamik zeigt, ist als Folge der vorhergehenden verlängerten endinspiratorischen Plateauphasen im Rahmen der Intravitalmikroskopie zu interpretieren. Unter dem während der Messzeitpunkte eingesetzten Beatmungsregime waren die Tiere normoventiliert.

Die Werte der Leukozyten- und Erythrozytenkonzentration bleiben über den Messzeitraum innerhalb der für die Versuchstiere physiologischen Grenzen. Zum Zeitpunkt  $t_{60}$  ist kein Abfall der Thrombozytenkonzentration zu beobachten, der auf eine systemische Aktivierung und disseminierte Aggregation dieser Zellen hinweisen könnte.

peripheres Blutbild	Kontrolle (n=6)		iNO (n=9)	
	$t_0$	$t_{60}$	$t_0$	$t_{60}$
Ery	5,6	5,9	5,7	5,5
[ $10^6/\mu\text{l}$ ]	(5,3/5,7)	(5,7/6,0)	(5,4/6,1)	(5,3/6,1)
Leuk	4,4	4,4	5,8	4,3
[ $10^3/\mu\text{l}$ ]	(3,7/4,7)	(4,1/4,9)	(5,0/6,7)	(3,7/4,8)
Thz	113	136	91	178
[ $10^3/\mu\text{l}$ ]	(85/163)	(92/183)	(65/120)	(154/184)
Hb	12,1	12,4	12,4	12,0
[g/l]	(11,6/12,4)	(12,2/13,0)	(11,8/13,2)	(11,8/12,9)
Hk	37	38	38	36
[%]	(34/38)	(37/40)	(36/40)	(35/39)

**Tab. 4: peripheres Blutbild**

Parameter: Erythrozyten- (Ery), Leukozyten- (Leuk) u. Thrombozytenzahl (Thz), Hämoglobinkonzentration (Hb), Hämatokrit (Hkt) und Mittleres korpuskuläres Volumen (MCV)

### 3.1.2 Mikrohämodynamik in Arteriolen und Venolen

An 15 Versuchstieren konnten die Mikrohämodynamik und Thrombozytenkinetik in 11 Arteriolen und 15 Venolen untersucht werden. Die Parameter der Mikrohämodynamik sind in Tab. 5 zusammengefasst.

Mikro- hämody- namik	Arteriolen				Venolen			
	Kontrolle		iNO		Kontrolle		iNO	
	(n = 5)		(n = 6)		(n = 6)		(n = 9)	
	t <sub>0</sub>	t <sub>60</sub>						
D	28	28	26	28	25	27	24	23
[ $\mu\text{m}$ ]	(23/29)	(22/34)	(20/38)	(23/36)	(22/29)	(19/33)	(23/30)	(22/27)
v <sub>ery</sub>	1224	1097	1275	1076	1405	1312	1538	1520
[ $\mu\text{ms}^{-1}$ ]	(1144/1357)	(976/1224)	(1176/1384)	(952/1267)	(1289/1700)	(1242/1394)	(1285/2001)	(1281/1949)
Q	25,6	23,2	21,9	28,3	24,9	22,9	26,8	24,1
[ $\text{nl min}^{-1}$ ]	(14,4 /36,7)	(11,5/48,2)	(16,2/55,4)	(13,1/40,8)	(17,2/34,1)	(12,5/37,2)	(21,1/40,6)	(16,9/37,2)
$\gamma$	212	174	191	178	260	214	276	312
[ $\text{s}^{-1}$ ]	(190/246)	(159/190)	(162/217)	(148/213)	(235/280)	(192/300)	(232/339)	(185/354)

**Tab. 5 : Mikrohämodynamik in Arteriolen und Venolen**

Parameter: Gefäßdurchmesser (D), Erythrozytenfliessgeschwindigkeit (v<sub>ery</sub>), Blutvolumenfluss (Q), Wandscherrate ( $\gamma$ )

Die ermittelten mikrohämodynamischen Parameter, wie auch die Daten der Thrombozytenkinetik, sind aufgrund der Gefäßdimensionen zwischen Arteriolen und Venolen, wie auch zwischen den Zeitpunkten und Gruppen, unmittelbar vergleichbar. Die Erythrozytenfliessgeschwindigkeit in Venolen ist bis zu 30 % schneller als in Arteriolen zum selben Versuchszeitpunkt, daraus resultiert in diesen Gefäßen eine höhere Wandscherrate. Die Wandscherrate in den pulmonalen Arteriolen und Venolen zeigt zwischen beiden Gruppen keine Unterschiede.

### 3.1.3 Thrombozytenkinetik in Arteriolen und Venolen

Die vorgenannten mikrohämodynamischen Befunde müssen bei der Interpretation der in Tab. 6 zusammengefassten Daten, die die Thrombozytenkinetik beschreiben, berücksichtigt werden.

Thrombozytenkinetik	Arteriolen				Venolen			
	Kontrolle		iNO		Kontrolle		iNO	
	(n = 5)		(n = 6)		(n = 6)		(n = 9)	
	t <sub>0</sub>	t <sub>60</sub>						
V <sub>Thz</sub> [μms <sup>-1</sup> ]	1060 (931/1204)	1074 (669/1303)	1129 (1004/1581)	1198 (918/1331)	1328 (1098/1575)	964* (730/1099)	1581 (1157/1740)	1454 (1012/1751)
V <sub>rel</sub>	0,84 (0,72/0,85)	1,08 (0,61/1,16)	0,89 (0,82/1,09)	1,10 (1,01/1,20)	0,93 (0,88/0,95)	0,75 (0,60/0,83)	0,92 (0,89/0,93)	0,94 (0,83/1,05)
Ad [mm <sup>-2</sup> ]	0 (0/75)	0 (0/56)	0 (0/0)	0 (0/0)	0 (0/0)	318* (236/717)	0 (0/74)	102* # (0/118)

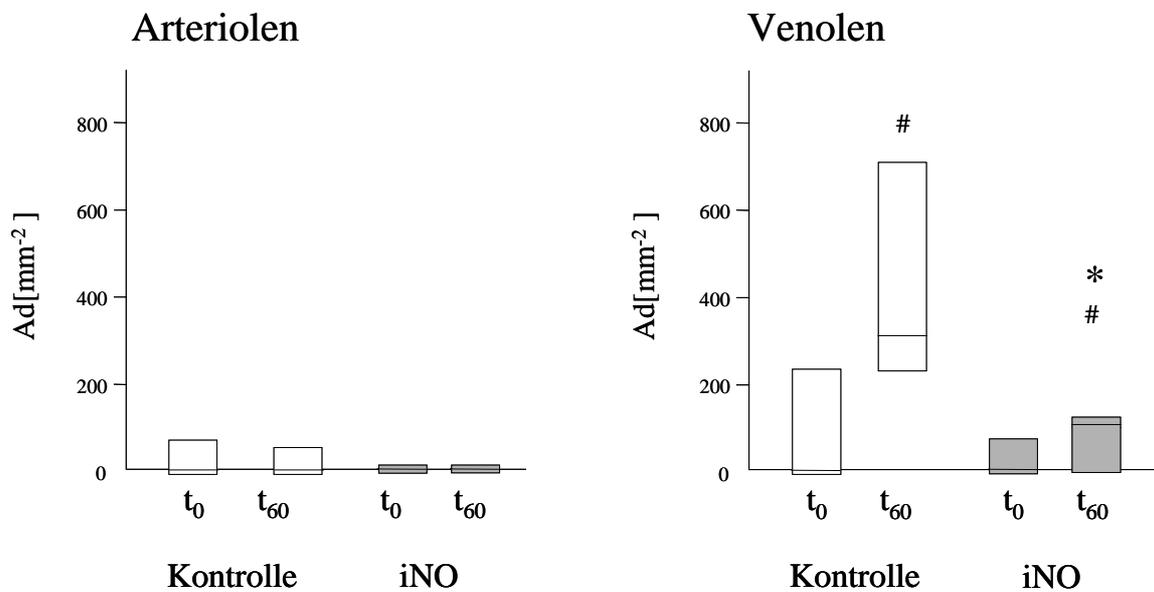
**Tab. 6: Thrombozytenkinetik in Arteriolen und Venolen**

Parameter: Thrombozytenfliessgeschwindigkeit (v<sub>Thz</sub>), relative Thrombozytenfliessgeschwindigkeit (v<sub>rel</sub>), Anzahl ortsständiger Thrombozyten (Ad<sub>[mm<sup>-2</sup>]</sub>)

\* p < 0,05 vs. t<sub>0</sub> (Wilcoxon-Paarvergleich)

# p < 0,05 vs. Kontrolle (Mann-Withney-U-Test)

In pulmonalen Arteriolen ist keine Adhärenz unstimulierter Thrombozyten an den Endothelzellen zu beobachten. Auch stimulierte Thrombozyten zeigen nach Infusion (t<sub>60</sub>) keine Abnahme ihrer absoluten oder relativen Geschwindigkeit im Vergleich zu unstimulierten Zellen (t<sub>0</sub>), eine Zunahme der Adhärenz tritt in Arteriolen nicht auf. Die Inhalation von NO führt dementsprechend ebenfalls nicht zu Änderungen der untersuchten Parameter.



**Abb. 6: Wandadhärente Thrombozyten in Arteriolen und Venolen:**

Parameter: Wandadhärente Thrombozyten (Ad [mm<sup>2</sup>])

\*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle (Mann-Whitney-U-Test)

#  $p < 0,05$  vs. t<sub>0</sub> (Wilcoxon-Paarvergleich)

Dagegen ist die Abnahme der Geschwindigkeit aktivierter Thrombozyten in Venolen der Kontrollgruppe ein Hinweis auf eine Interaktion der Thrombozyten mit den Endothelzellen, die sich in einer massiven Zunahme der Anzahl ortsständiger Thrombozyten ausdrückt: Nachdem unter Ausgangsbedingungen (t<sub>0</sub>) nur sehr wenige adhärenente Thrombozyten erkennbar waren, zeigt sich jetzt eine ausgeprägte Adhärenz aktivierter Thrombozyten. Die Inhalation von NO unterdrückt diese Adhärenz weitgehend, sie ist in dieser Gruppe signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe. Betrachtet man in diesem Zusammenhang die Wandscherrate als die der Adhäsion entgegenwirkende Kraft so zeigt sich kein Zusammenhang (Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman  $r_s = -0.077$ ,  $p = 0.673$ ) mit der Anzahl endotheladhärenter Zelle.

### 3.1.4 Erythrozyten- und Thrombozytenkinetik in Alveolarkapillaren

Die Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten in den 14 untersuchten alveolären Kapillargebieten liegt in beiden Gruppen zu beiden Zeitpunkten auf gleich hohem Niveau. Die Berechnung der Wandscherrate in Alveolarkapillaren hätte bei fehlender Möglichkeit zur Messung des Kapillardurchmessers mit einem konstanten Literaturwert erfolgen müssen. Hierauf wurde verzichtet und die Erythrozytengeschwindigkeit als unmittelbare Determinante der in Alveolarkapillaren wirkenden Scherkräfte interpretiert. Auch die Werte des kapillären Perfusionsindex weisen keine Unterschiede auf. Weder die Infusion aktivierter Thrombozyten noch die Inhalation von Stickstoffmonoxid hatten einen Einfluss auf die Dichte des erythrozytenperfundierten alveolären Kapillarnetzes.

Erythrozyten- und Thrombozytenkinetik in Alveolarkapillaren	Kontrolle (n=5)		iNO (n=9)	
	t <sub>0</sub>	t <sub>60</sub>	t <sub>0</sub>	t <sub>60</sub>
	V <sub>Ery</sub> [μms <sup>-1</sup> ]	292 (226/564)	479 (257/634)	467 (386/549)
CPI [μm]	509 (480/608)	605 (423/752)	559 (453/656)	567 (473/678)
v <sub>Thz</sub> [μms <sup>-1</sup> ]	329 (227/535)	201 (164/438)	414 (367/472)	339 (288/454)
v <sub>rel</sub>	1,03 (0,88/1,06)	0,67 (0,64/0,77)	0,90 (0,88/0,93)	0,95 (0,61/1,14)
Ad [Zellen/mm <sup>2</sup> ]	0 (0/19)	660 (511/776)	83 (0/108)	214 *# (111/285)

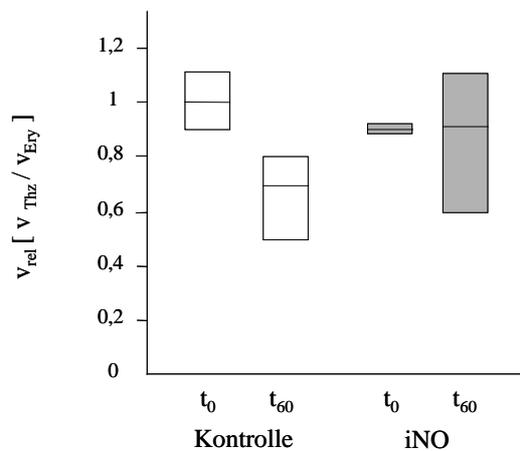
**Tab. 7: Erythrozyten- und Thrombozytenkinetik in Alveolarkapillaren**

Parameter: Erythrozytenfließgeschwindigkeit (v<sub>Ery</sub>), kapillärer Perfusionsindex (CPI),

Thrombozytenfließgeschwindigkeit (v<sub>Thz</sub>), relative Thrombozytenfließgeschwindigkeit (v<sub>rel</sub>), Anzahl retinierter Thrombozyten (Ad)

\* p < 0,05 vs. t<sub>0</sub> (Wilcoxon-Paarvergleich)

# p < 0,05 vs. Kontrolle (Mann-Whitney-U-Test)

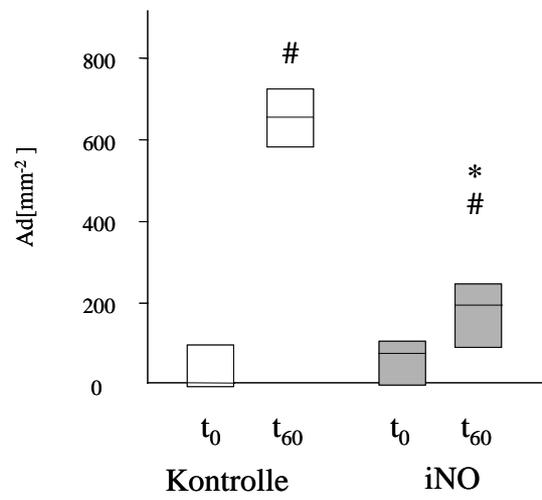


**Abb. 7: Relative Geschwindigkeit aktivierter Thrombozyten:**

Parameter: Relative Thrombozytenfliessgeschwindigkeit  $v_{rel} [ v_{Thz} / v_{Ery} ]$

Ähnlich wie in den venulären Segmenten kommt es in der Kontrollgruppe zu einer Abnahme der absoluten Fliessgeschwindigkeit aktivierter Thrombozyten um mehr als 30% im Vergleich zu nicht aktivierten Zellen. Die relative Fliessgeschwindigkeit in der Kontrollgruppe beträgt unter diesen Bedingungen 0,67; darüber hinaus ist eine ausgeprägte Retention von aktivierten Thrombozyten in Alveolarkapillaren zu beobachten.

Wiederum unterscheidet sich bei Inhalation von NO die relative Geschwindigkeit aktivierter Thrombozyten nicht zwischen den Zeitpunkten: Sie liegt für nicht aktivierte Thrombozyten im Median 0,9, nach Aktivierung beträgt sie 0,95. Trotz NO-Inhalation tritt eine Retention aktivierter Blutplättchen in den Alveolararealen auf, die jedoch mit im Median 214 Zellen/mm<sup>2</sup> signifikant geringer ausfällt als in der Kontrollgruppe, in der über 600 Zellen/mm<sup>2</sup> retiniert werden.



**Abb. 8: Retinierte Thrombozyten in Alveolarkapillaren**

Parameter: Wandadhärente Thrombozyten (Ad [mm<sup>2</sup>])

\* p < 0,05 vs. t<sub>0</sub> (Wilcoxon-Paarvergleich)

# p < 0,05 vs. Kontrolle (Mann-Whitney-U-Test)

### 3.2 Studie II: Ischämie-Reperfusion

#### 3.2.1 Makrohämodynamik, Blutgase und peripheres Blutbild

Die Werte der Makrohämodynamik zu Beginn des Versuchszeitraums, also unmittelbar vor Ischämieinduktion, sowie nach dreißigminütiger Reperfusion sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Zehn Minuten nach Okklusion der rechtseitigen Hilusgefäße ( $t_{50}$ ) lag die Veränderung des pulmonalarteriellen Mitteldruckes bei im Median +12,5 % (14 vs 17 mmHg), eine Änderung des arteriellen Mitteldrucks war nicht erkennbar. Zu diesem Zeitpunkt war das Herzzeitvolumen im Median um 15 % (290 vs. 270 ml/min) niedriger als unter Ausgangsbedingungen. Auch zum Zeitpunkt der Intravitalmikroskopie ( $t_{30}$ ) befanden sich die Werte weiterhin innerhalb der physiologischen Grenzen.

Makrohämodynamik	$t_{60}$			$t_{30}$		
	Kontrolle	I/R	I/R + iNO	Kontrolle	I/R	I/R + iNO
	(n = 6)	(n = 7)	(n = 7)	(n = 5)	(n = 7)	(n = 7)
MAP	84	87	88	77	78	85
[mmHg]	(79/87)	(77/97)	(84/90)	(75/80)	(75/80)	(83/89)
PAP	13	15	13	13	14	13
[mmHg]	(13/14)	(14/18)	(11/14)	(12/14)	(13/16)	(12/13)
CO	295	300	290	290	300	305
[ml/min]	(288/303)	(253/310)	(283/298)	(288/295)	(270/300)	(300/310)

**Tab. 8: Makrohämodynamik**

Parameter: Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP); mittlerer pulmonalarterieller Blutdruck (PAP), Herzzeitvolumen (CO)

Die Ergebnisse der Blutgasanalysen sowie die Werte des Blutbildes sind in Tab. 9 angegeben:

Blutgasanalyse und peripheres Blutbild	t-60			t30		
	Kontrolle	I/R	I/R + iNO	Kontrolle	I/R	I/R + iNO
	(n = 6)	(n = 7)	(n = 7)	(n = 5)	(n = 7)	(n = 7)
p <sub>a</sub> O <sub>2</sub>	452	460	509	466	409	450
[mmHg]	(302/581)	(360/515)	(505/516)	(291/575)	(335/418)	(422/493)
p <sub>a</sub> CO <sub>2</sub>	28	49	32	34	72	36
[mmHg]	(23/32)	(46/59)	(30/32)	(23/34)	(58/77)	(34/47)
pH	7,46	7,28	7,48	7,52	7,19	7,37
	(7,46/7,53)	(7,25/7,35)	(7,40/7,48)	(7,36/7,57)	(7,14/7,27)	(7,29/7,41)
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	24,8	22,5	24,2	23,9	22,5	22,0
[mmol/l]	(21,3/25,5)	(22,0/22,9)	(22,3/24,4)	(19,7/24,9)	(21,3/23,0)	(20,3/22,5)
BE	0,3	- 2,4	- 0,45	- 0,7	- 2,4	- 3,1
[mmol/l]	(- 3,8/1,1)	(- 2,9/-1,8)	(- 2,7/-0,2)	(- 5,8/0,4)	(- 3,9/-1,9)	(- 5,1/-2,4)
Ery	4,75	5,04	5,47	4,79	4,73	5,02
[10 <sup>6</sup> /μl]	(4,66/4,8)	(4,11/5,77)	(5,16/6,38)	(4,65/5,21)	(4,33/5,28)	(4,76/5,97)
Leuk	3,4	2,4	4,2	3,9	3,28	2,45
[10 <sup>3</sup> /μl]	(2,85/3,9)	(1,9/2,4)	(3,05/5,3)	(3,02/5,35)	(2,61/3,41)	(2,32/3,4)
Thz	52	88	36	20	50	18
[10 <sup>3</sup> /μl]	(39/73)	(60/137)	(29/70)	(17/51)	(30/56)	(16/75)
Hb	10,6	11,0	12	10,8	10,1	10,6
[g/l]	(10,2/11,0)	(10,9/11,3)	(11,2/13,4)	(10,3/12,9)	(9,3/11,2)	(10,5/12,3)
Hk	31	34	35	32	30	31
[%]	(30,9/32,0)	(32,6/35,9)	(33,1/41,2)	(31,0/39,1)	(28,5/33,8)	(30,8/38,3)

**Tab. 9: Blutgasanalyse und peripheres Blutbild**

Parameter: arterieller Sauerstoff- (p<sub>a</sub>O<sub>2</sub>) und Kohlendioxidpartialdruck (p<sub>a</sub>CO<sub>2</sub>), pH-Wert (pH), Bikarbonatkonzentration (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), Basenüberschuss (BE), Erythrozyten- (Ery), Leukozyten- (Leuk) und Thrombozytenzahl (Thz), Hämoglobinkonzentration (Hb), Hämatokrit (Hkt)

### 3.2.2 Mikrohämodynamik in Venolen

<b>Mikrohämodynamik in Venolen</b>	Kontrolle (n = 6)	I/R (n = 7)	I/R+iNO (n = 7)
D	25	20	24
[ $\mu\text{m}$ ]	(20/27)	(18/26)	(20/26)
$v_{\text{Ery}}$	904	1583	1350
[ $\mu\text{ms}^{-1}$ ]	(671/1220)	(1028/1948)	(939/1565)
Q	17,0	16,0	16
[ $\text{nl min}^{-1}$ ]	(10,0/20,0)	(7,5/29,8)	(10/35)
$\gamma$	143	333	224
[ $\text{s}^{-1}$ ]	(131/226)	(191/391)	(195/289)

**Tab. 10: Mikrohämodynamik in Venolen:**

Parameter: Gefäßdurchmesser (D), Erythrozytenfliessgeschwindigkeit ( $v_{\text{ery}}$ ),  
Blutvolumenfluss (Q), Wandscherrate ( $\gamma$ )

Die Durchmesser der untersuchten venulären Segmente liegen zum Zeitpunkt  $t_{30}$  in dieser Studie vorrangig zwischen 18 und 26  $\mu\text{m}$  Durchmesser. Die Inhalation von Stickoxid in der Reperfusionphase induziert keine signifikante venuläre Vasodilatation im Vergleich zur Schadensgruppe oder Kontrollgruppe ohne iNO-Beatmung. Die aus dem Gefäßdurchmesser und der Fliessgeschwindigkeiten der Erythrozyten resultierende Wandscherrate weist ebenfalls keine Unterschiede zwischen den drei Gruppen auf.

### 3.2.3 Thrombozytenkinetik in Venolen

Die Parameter der Thrombozytenkinetik sind in Tab. 11 zusammengefasst. Die absolute Fließgeschwindigkeit der Thrombozyten in der Kontrollgruppe ist mit  $845 \mu\text{m s}^{-1}$  langsamer als die in den Gruppen nach Ischämie/Reperfusion (I/R:  $971 \mu\text{m s}^{-1}$ , IR+ iNO:  $1402 \mu\text{m s}^{-1}$ ). Bei Betrachtung der relativen Geschwindigkeit jedoch wird der Einfluss der unterschiedlichen Erythrozytengeschwindigkeiten eliminiert:

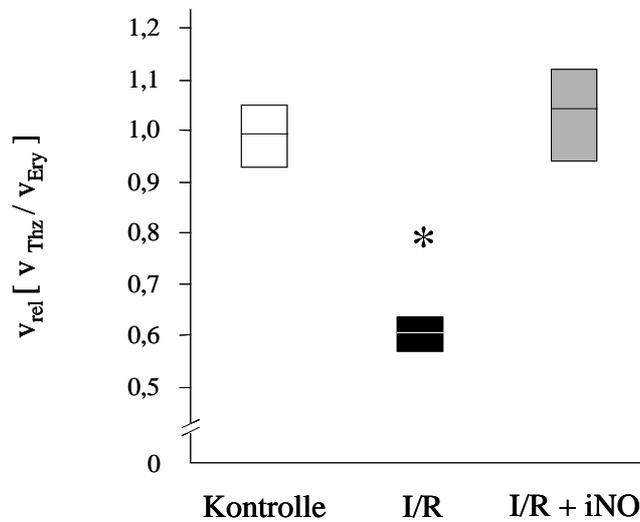
Thrombozytenkinetik in Venolen	Kontrolle (n = 6)	I/R (n = 7)	I/R + iNO (n = 7)
$v_{\text{Thz}}$	845	971	1402
$[\mu\text{m s}^{-1}]$	(677/1197)	(592/1134)	(1039/1481)
$v_{\text{rel}}$	0,989	0,606	1,039
$v_{\text{rel}} [v_{\text{Thz}} / v_{\text{Ery}}]$	(0,923/1,045)	(0,567/ 0,631) *	(0,936/1,121)
Ad	0	336	75
$[\text{Zellen mm}^{-2}]$	(0/67)	(178/691)*	(0/180)

**Tab. 11: Thrombozytenkinetik in Venolen**

Parameter: Thrombozytenfließgeschwindigkeit ( $v_{\text{Thz}}$ ), relative Thrombozytenfließgeschwindigkeit ( $v_{\text{rel}}$ ), Anzahl ortsständiger Thrombozyten (Ad).

\* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (Kruskal-Wallis-Rangvarianzanalyse)

Nach Ischämie/Reperfusion ist die mittlere relative Thrombozytengeschwindigkeit um ca. 40 % niedriger als in der Kontrolle. Unter NO-Beatmung zeigt sich dieser Unterschied zur Kontrolle jedoch nicht.



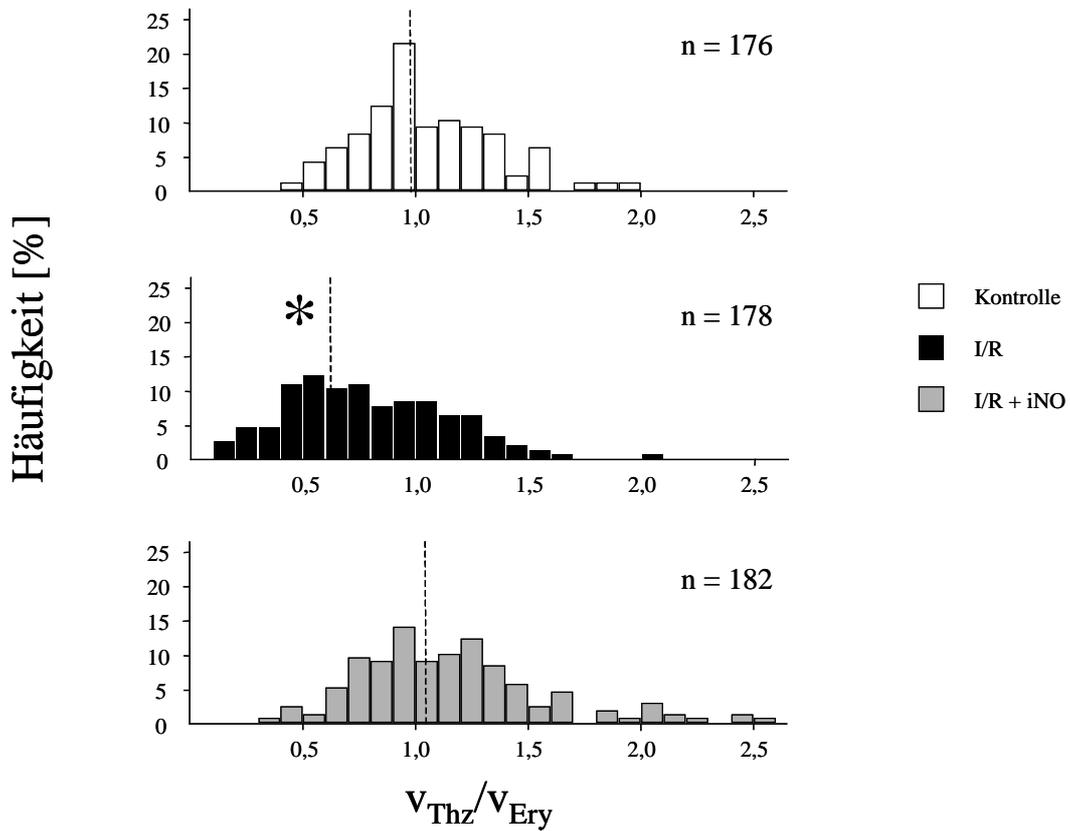
**Abb. 9: Relative Thrombozytengeschwindigkeit in Venolen:**

Parameter: relative Thrombozytenfliessgeschwindigkeit ( $v_{rel}$ )

$p < 0,01$  vs. Kontrolle u. I/R+iNO (Kruskal-Wallis-Rangvarianzanalyse)

Die Interpretation dieser Unterschiede wird durch die Betrachtung der Häufigkeitsverteilung der Relativgeschwindigkeiten unterstützt. In den folgenden Histogrammen (Abb. 10) ist die relative Geschwindigkeit der einzelnen Thrombozyten dargestellt: Auf der X-Achse werden die Thrombozyten zu Klassen mit einer Bandbreite von 0,1 zusammengefasst. Die Y-Achse gibt die Häufigkeit der Zellen einer Klasse wieder. Zusätzlich ist der Median der Einzelwerte eingezeichnet.

In der Kontrollgruppe fließen nur 2 % der Thrombozyten mit einer relativen Geschwindigkeit kleiner als 0,5 der Erythrozytengeschwindigkeit. In der Schadensgruppe ist eine Veränderung des Profils mit einem Häufigkeitszunahme in den Klassen kleiner 0,5 auf etwa 35 % zu erkennen. Unter NO-Inhalation bleibt diese Zunahme aus, das Geschwindigkeitsprofil entspricht dem der Kontrollgruppe.



**Abb. 10: Verteilung der relativen Thrombozytengeschwindigkeit**

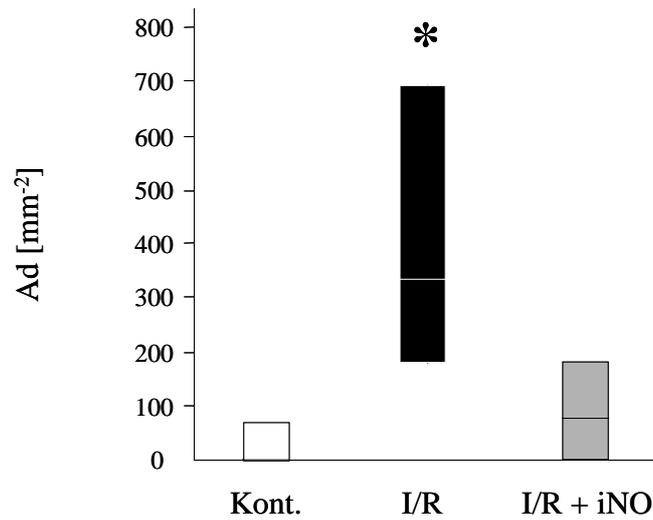
Erläuterung im Text S. 51

\*  $p < 0,05$  (Kolmogorov-Smirnov-Test)

Langsame Fließgeschwindigkeiten sind ein Zeichen der Margination von Thrombozyten in den langsamen Randstrom. Sie können der Adhärenz an Endothelzellen vorausgehen.

Diese Adhärenz bezogen auf die Gefäßoberfläche ist in Abb. 11 dargestellt.

In der Kontrollgruppe sind nur wenige Thrombozyten ortständig. Nach Ischämie ist eine deutlich ausgeprägte Adhärenz von über 300 Zellen/mm<sup>2</sup> zu beobachten. Unter Zusatz von NO ist die Adhärenz nur geringfügig höher als in der Kontrollgruppe.



**Abb. 11: Thrombozytenadhärenz in Venolen**

Parameter: Anzahl ortsständiger Thrombozyten (Ad)

\*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle (Kruskal-Wallis-Rangvarianzanalyse)

### 3.2.4 Erythrozyten- und Thrombozytenkinetik in Alveolarkapillaren

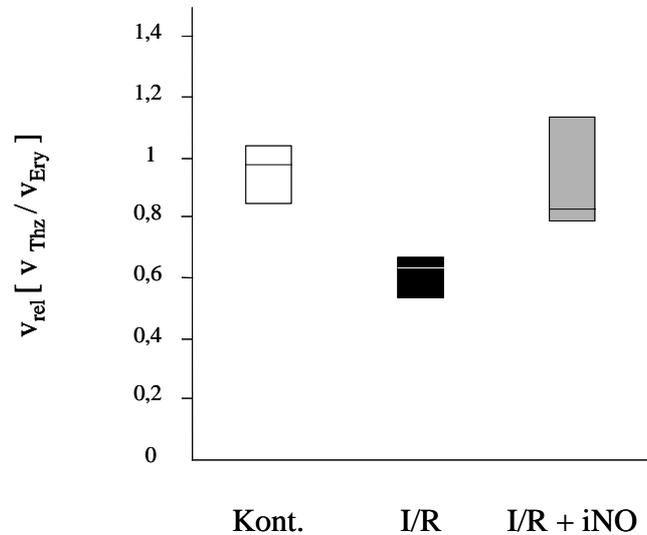
Die Fliessgeschwindigkeit der Erythrozyten in alveolären Kapillaren zeigt zwischen den Gruppen keine Unterschiede. Die Perfusion der Kapillarareale wird im Vergleich zur Kontrollgruppe weder durch die Ischämie/Reperusionsphase noch durch den Zusatz von Stickoxid zum Atemgas während der Reperfusion verändert.

<b>Erythrozyten- und Thrombozytenkinetik in Alveolarkapillaren</b>	Kontrolle (n = 6)	I/R (n = 7)	I/R + iNO (n = 7)
$V_{Ery}$	315	389	313
$[\mu\text{ms}^{-1}]$	(289/449)	(134/595)	(310/432)
CPI	367	316	378
$[\mu\text{m}]$	(236/819)	(191/392)	(332/581)
$V_{Thz}$	308	244	346
$[\mu\text{ms}^{-1}]$	(288/331)	(88/298)	(254/432)
$V_{rel}$	0,97	0,63	0,82
$[V_{Thz}/V_{Ery}]$	(0,85/1,03)	(0,53/0,66)	(0,79/1,04)
Ad	68	373	64
$[\text{Zellen}/\text{mm}^2]$	(0/185)	(125/427)	(0/250)

**Tab. 12: Erythrozyten- und Thrombozytenkinetik in Alveolarkapillaren**

Parameter: Parameter: Erythrozytenfliessgeschwindigkeit ( $V_{Ery}$ ), kapillärer Perfusionsindex (CPI), Thrombozytenfliessgeschwindigkeit ( $v_{Thz}$ ), relative Thrombozytenfliessgeschwindigkeit ( $v_{rel}$ ), Anzahl retinierter Thrombozyten (Ad)

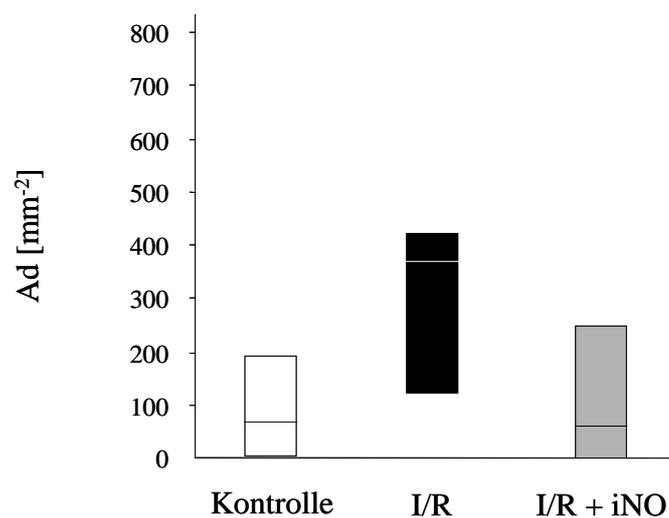
Die Thrombozytenfliessgeschwindigkeit ist mit  $244 \mu\text{m s}^{-1}$  in der Schadensgruppe um mehr als ein Fünftel niedriger als in den Vergleichsgruppen. Auch die relative Geschwindigkeit ist mit etwa 60% der Erythrozytengeschwindigkeit langsamer als in der Gruppe mit NO-Beatmung, in der sie über 80% beträgt.



**Abb. 12: Relative Thrombozytengeschwindigkeit in Alveolarkapillaren**

Parameter: Relative Thrombozytenfliessgeschwindigkeit  $v_{rel}$  [ $v_{Thz}/v_{Ery}$ ]

Wie in Venolen lässt sich in den Alveolarkapillaren der I/R-Gruppe nicht nur eine niedrigere Thrombozytengeschwindigkeit beobachten, auch die Anzahl der ortständigen Zellen ist höher als in den beiden anderen Gruppen. Während in der Kontrollgruppe und der NO-Gruppe im Median weniger als 100 Zellen/ $m^2$  retiniert werden, ist dieser Wert in der Schadensgruppe mit 373 Zellen/ $m^2$  um etwa das sechsfache höher.



**Abb. 13: Retinierte Thrombozyten in Alveolarkapillaren**

Parameter: Retinierte Thrombozyten bezogen auf die Alveolaroberfläche (Ad[ $mm^2$ ])

## 4. Diskussion

### 4.1 Experimentelles Modell

#### 4.1.1 Untersuchung zur Thrombozytenkinetik in der Lungenstrombahn

Unter der Annahme einer Beteiligung der Thrombozyten an physiologischen Regulationsmechanismen wie auch einer potentiellen Rolle dieser Zellen in der Pathophysiologie unterschiedlichster Krankheitsbilder wurde das Verhalten dieser Zellen in der pulmonalen Strombahn mit unterschiedlichsten Mitteln untersucht: Von MASSOUDY et al wurde im Rahmen herzchirurgischer Operationen die Methode der sequenziellen Blutabnahme aus dem rechten und linken Vorhof eingesetzt. Die beobachtete Differenz der Thrombozytenzahlen im so gewonnenen Blut wurde als Hinweis auf eine Retention der Zellen in der Lunge gewertet (133). Aus der nach der pulmonalen Passage veränderten Präsentation von Adhäsionsmolekülen auf den Thrombozyten schlossen die Autoren auf proinflammatorische Interaktionen, die während des pulmonalen Transits stattgefunden haben sollen.

Eine Vielzahl von experimentellen Untersuchungen bedienten sich nuklearmedizinischer Nachweisverfahren. Beispielsweise wurden zur Differenzierung der Kinetik unterschiedlicher Blutzellen in der pulmonalen Zirkulation diese mit unterschiedlichen Radioisotopen markiert und deren Aktivität über der Lunge zeitbezogen gemessen (38). SOSTMAN konnte im Rahmen einer Endotoxinämie eine passagere Anreicherung von Indium-markierten Thrombozyten in der Lunge zeigen. Mit ebenfalls radioaktiv markierten Zellen wurde der Einfluss von NO auf die Adhäsivität von Thrombozyten im Rahmen der Hämodialyse untersucht (127). In einem Modell des hämorrhagischen Schocks am Hund zeigten MARTIN und DAHLBY eine Verlängerung der mittleren Transitzeit von radioaktiv markierten Thrombozyten durch die Lungenstrombahn sowie eine Aktivitätszunahme über der Lunge. Unter Berücksichtigung des in diesen Untersuchungsphasen erniedrigten Herzzeitvolumens schlossen die Autoren auf eine hämodynamisch bedingte Anreicherung der Zellen (69;129). Ähnliche Beobachtungen machte GUTMANN während Endotoxinämie, hier wurde ein Zusammenhang von Hypotension und Plättchenakkumulation hervorgehoben.

Diese beiden Arbeiten zeigen die Grenzen der bisher angewandten Methoden auf: Sie ermöglichen aufgrund ihrer geringen räumlichen Auflösung keine Zuordnung der beobachteten Sequestrationsphänomene zu einzelnen Abschnitten der pulmonalen Strombahn. Eine homogene Verteilung der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion darf aber nicht vorausgesetzt werden.

Elektronenmikroskopische morphometrische Untersuchungen wie die von HELSET et al. (76) wiederum, die eine sehr hohe räumliche Auflösung bieten, erlauben keine Analyse dynamischer Vorgänge auf der Ebene der Mikrozirkulation.

Im Gegensatz zu diesen Methoden ermöglicht die Intravitalmikroskopie die differenzierte Beobachtung dynamischer Prozesse in allen Abschnitten der pulmonalen Mikrozirkulation. Durch Fluoreszenzmarkierung erlaubt sie die Beschreibung und Quantifizierung nicht nur der Kinetik von Thrombozyten, sondern auch von Erythrozyten. Die hieraus gewonnenen mikrohämodynamischen Parameter stellen die notwendige Grundlage zur Interpretation der Thrombozytenkinetik dar.

#### 4.1.2 Intravitalmikroskopie der pulmonalen Mikrozirkulation

Die ersten intravitalmikroskopischen Untersuchungen erfolgten bereits im Jahre 1661 durch MARCELLO MALPIGHI mit einfachsten Hilfsmitteln. Aus Untersuchungen am offenen Thorax wurde die Methode des intrathorakalen Fensters am Grosstier entwickelt (203), deren Nachteile zur Etablierung eines Modells an der Ratte durch GOETZ und BERGER führte (9). Die vorliegende Arbeit wurde am von KUHNLE et al. daraus entwickelten Modell zur intravitalen Untersuchung der pulmonalen Mikrozirkulation an der *in situ* beatmeten Lunge von Kaninchen durchgeführt (109;110). Auf technische Aspekte dieses Modells geht KÜBLER ausführlich ein (106). Es ermöglicht die Untersuchung von Alveolarkapillaren wie auch subpleuraler pulmonaler Arteriolen und Venolen mit Durchmessern bis 150 µm. Die Zugehörigkeit dieser Gefäße zur pulmonalen Zirkulation wurden von MCLAUGHLIN und DEFOUW gezeigt (35;137). Die subpleuralen alveolären Kapillarnetzwerke sind, bei im Mittel größerem Kapillardurchmesser, weniger dicht als in tiefer gelegenen Lungenbezirken (24;144). Die mikrovaskulären Drucke unterscheiden sich dagegen nicht zwischen diesen

Regionen (156). Diese Beobachtungen legen die Übertragbarkeit der intravitalmikroskopischen Daten auf die gesamte pulmonale Mikrozirkulation nahe.

#### 4.1.3 Separation und Fluoreszenzmarkierung autologer Blutzellen

Zur Differenzierung von Thrombozyten und Erythrozyten in der Auflichtmikroskopie wurden diese mit den Fluorochromen Rhodamin6G bzw. Fluoresceinisothiocyanat (FITC) *in vitro* angefärbt. Die Reinfusion dieser Zellen in den Organismus führt unvermeidbar zum Vorhandensein freier Fluorochrome im Blut. Die Aufnahme dieser Fluorochrome in die Endothelzellen und die folgende Exposition dieser Zellen gegenüber Licht der in dieser Untersuchung eingesetzten Wellenlängen und Intensität zeigten bei LEHR und NOLTE keinen Einfluss auf die Integrität des vaskulären Endothels (115;150). HARRIS et al. konnten keinen Einfluss einer Kombination der Farbstoffe FITC-Dextran und Rhodamin6G auf die Durchmesser präkapillarer Arteriolen und postkapillarer Venolen, wie auch auf das Adhärenzverhalten von Leukozyten zeigen (72). Die hierbei eingesetzten Lichtintensitäten wie auch die Expositionszeit sind den in dieser Studie angewandten vergleichbar. Diese Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen von KÜBLER, der bei intermittierender Exposition über 60 min keine phototoxischen oder photodynamischen Effekte im in dieser Arbeit eingesetzten Modell beobachten konnte (106). HERRMANN et al. dagegen konnten durch Exzitation von FITC intravasale Thrombenbildung induzieren (79). Die zur Induktion dieser Phänomene notwendigen Plasmakonzentrationen von FITC wie auch die benötigte Lichtenergie überstiegen die in der vorliegenden Arbeit erreichten Werte um ein Vielfaches. Insbesondere der Einsatz der SIT-Videokamera ließ bei uns eine Limitierung der Beleuchtungsintensitäten unter 2500 J/cm<sup>2</sup> zu. Die Quantität des mit dem resuspendierten Thrombozytenpellet injizierten und aus diesen passiv freigewordenem Rhodamin 6 G war nicht ausreichend, um zu einer nachweisbaren Akkumulation in den Leukozyten zu führen. Somit darf angenommen werden, dass seine Konzentration sicher unter der von BAATZ et al. für Ratte, Maus und Hamster empfohlenen lag (7).

ZIMMERHACKEL et al. konnten zeigen, dass die Färbung autologer Erythrozyten die Verformbarkeit eines Teiles dieser Zellen verändert. Diese Zellen werden jedoch nach Reinjektion durch Sequestration in der Milz rasch aus der Zirkulation eliminiert (67). Dreißig Minuten nach Injektion bleibt die Quote der zirkulierenden Zellen dann für mehrere Stunden

konstant (9;171). Die Durchführung der mikrohämodynamischen Messungen erfolgte daher in diesem Modell nach einer mindestens dreißigminütigen Rezirkulationsphase.

Für Thrombozyten beschreiben TANGELDER et al. eine Methode der in vivo-Markierung mittels Injektion von Acridin-Rot zur Untersuchung des rheologischen Verhaltens dieser Zellen. Die repetitive Injektion des Farbstoffes führt jedoch dosisabhängig zu einer Beeinflussung der Thrombozytenfunktion die sich in einer Verlängerung der Blutungszeit auswirkt (192). Somit sind funktionelle Untersuchungen mit dieser Methode nicht möglich. Darüber hinaus ist bei Injektion eines Farbstoffes mit hoher Färbewirkung auf Thrombozyten eine Anfärbung aller dieser Zellen zu erwarten. Durch die in großer Dichte zirkulierenden Thrombozyten wäre auf Grund von Überstrahlungseffekten eine Differenzierung einzelner Zellen nicht mehr möglich.

Da keine geeigneten Verfahren der Markierung in vivo verfügbar sind mussten die Thrombozyten nach Separation durch Differentialzentrifugation in vitro angefärbt werden. VOLLMAR et al. berichten allerdings eine gesteigerte P-Selectin- (CD62-) Präsentation auf Thrombozyten, die mittels Zentrifugation separiert wurden. Diese Zellen interagierten bereits ohne zusätzliche Stimulation mit dem Endothel. Die Antwort dieser Zellen auf Stimulation mit *thrombin receptor activating protein* (TRAP) hingegen war abgeschwächt (200). KARADOGAN et al zeigten, dass auch die als geringer alterierend erachtete Gewinnung von Thrombozytenkonzentraten nach dem Prinzip der Thrombozytenapherese zu einer reduzierten Präsentation von P-Selektin führt. Darüber hinaus konnten sie eine reduzierte Reaktion dieser Zellen nach Stimulation mit sowohl ADP, Ristocetin oder Kollagen mittels Impedanzaggregometrie nachweisen (95).

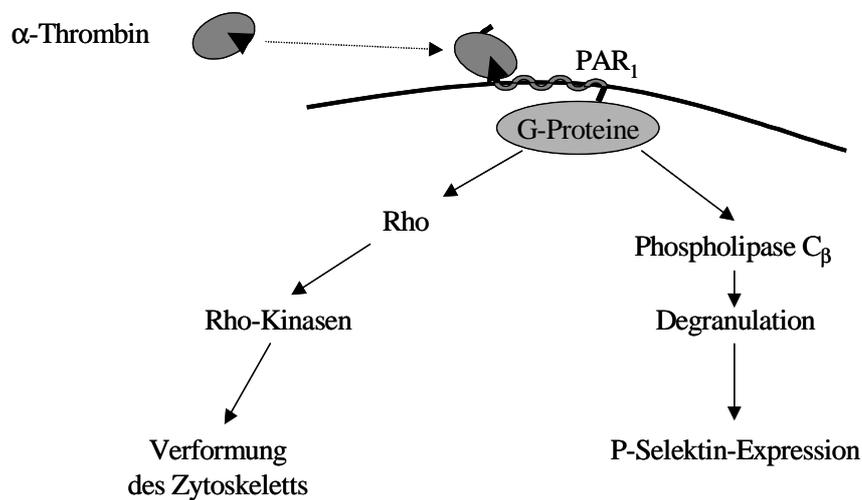
Somit ist die Gewinnung von Thrombozyten für funktionelle Untersuchungen durch Zentrifugation kritisch zu betrachten. Für unsere Studien erfolgte die Separation der Thrombozyten nach einem Protokoll von MASSBERG et al., die nach der Zentrifugation *keine* vermehrte P-Selektin-Präsentation nachweisen konnten. Dieser wesentlich von den vorhergehend zitierten Arbeiten abweichende Befund könnte durch die Inaktivierung der Zellen durch den Zusatz von Prostaglandin E<sub>1</sub> bereits während der Blutabnahme erklärbar sein. Die Fähigkeit der so gewonnenen Thrombozyten zur Präsentation von P-Selectin nach

zusätzlicher Stimulation war jedoch erhalten: So zeigten diese Zellen nach Inkubation mit Thrombin eine um das Zehnfache gesteigerte Expression dieses Adhäsionsmoleküls im Vergleich zur Kontrollgruppe. Mehr als 99% aller separierten Zellen können bei Anwendung dieses Verfahrens nachweisbar mit Rhodamin6G angefärbt werden. (130). Der Anteil anderer Zellreihen in der so gewonnenen Thrombozytensuspension ist minimal. Die lichtmikroskopische Untersuchung der Suspension zeigte Thrombozyten normaler Form ohne Bildung von Aggregaten (40). Weder die Entnahme des für die Separation notwendigen Blutes noch die Reinjektion hatten im Modell zur Intravitalmikroskopie an der Kaninchenlunge Auswirkungen auf Gasaustausch oder Makrohämodynamik (40).

#### 4.1.4 Thrombinstimulation

Thrombin, das Schlüsselenzym der plasmatischen Gerinnungskaskade, wird durch den Faktor VIIa unter Mitwirkung des *tissue factors* aktiviert. Dieser Kofaktor wird unter anderem von zirkulierenden Monozyten (153;154) und leukozytären Membranfragmenten (sog. *ghosts*) (61), wie auch auf von proinflammatorischen Zytokinen stimulierten Endothelzellen intravaskulär präsentiert (12), so dass im Rahmen inflammatorischer Prozesse eine prokoagulatorische Gerinnungssituation entstehen kann. Bei diesen Prozessen kann Thrombin im Sinne eines positiven Feedback die Präsentation von Adhäsionsmolekülen oder die Produktion von Autocoiden vom Prostaglandintyp und *platelet activating factor* (PAF) induzieren (217).

Neben seiner Rolle in der plasmatischen Gerinnung ist Thrombin, eine Serinprotease, ein potenter Aktivator der Thrombozytenaggregation. Als Rezeptor für Thrombin besitzen Blutplättchen ein transmembranäres Polypeptid, den *protease-activated-receptor 1*. Thrombin trennt am n-terminalen Ende des PAR ein Aminosäuresequenz ab. Dies demaskiert einen neu konformierten N-Terminus der mit dem transmembranären Anteil des Rezeptors interagiert (201). Hierdurch wird eine Strukturänderung des intrazellulären C-terminalen Endes des PAR induziert. Intrazellulär an den PAR gekoppelte G-Proteine, wie G<sub>12/13</sub>, G<sub>q</sub> und G<sub>i</sub> werden



**Abb. 13: Mechanismen der Thrombin-induzierten Thrombozytenaktivierung**  
(Erläuterung im Text S. 60)

durch diese Änderung aktiviert (8;91;151). Die Aktivierung von *Rho*, ein weiteres G-Protein, führt über *Rho*-abhängige Kinasen zur Verformung des Zytoskeletts; eine aggregationsbegünstigende Formänderung ist die Folge (101). Die ebenfalls aktivierte Phospholipase C $\beta$  vermittelt den Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration (194). Die folgende calciumabhängige Degranulation von Speichervesikeln wie den  $\alpha$ -Granula führt zur Präsentation von Adhäsionsmolekülen, unter anderem des P-Selektins (152) sowie zur Freisetzung von Fibrinogen, vWF, Faktor V und Fibronectin (14). Darüber hinaus erfolgt die Präsentation des Liganden für CD40 (77) wie auch die Aktivierung des Integrins GPIIb/IIIa, dem Liganden für Fibrinogen und vWF (90).

Bemerkenswert ist die hohe Spezifität dieses *protease-activated-receptor* : So können die auf murinen Thrombozyten exprimierten Rezeptoren nicht durch Agonisten humaner Rezeptoren aktiviert werden (29). Daher darf man die für Aktivierung von Thrombozyten des Kaninchens durch humanes alpha-Thrombin nicht *a priori* einen PAR-vermittelten Aktivierungsweg voraussetzen. Allerdings zeigten VICKERS et al. bereits 1984, also weit vor der Identifizierung des PAR, für thrombinaktivierte leporine Thrombozyten Mechanismen der intrazellulären Signaltransduktion, die heute den PAR zugeordnet werden können (199).

Thrombin besitzt dosisabhängige Wirkungen auf die Makrohämodynamik. Die Injektion der mit Thrombinlösung inkubierten Thrombozyten könnte daher zu Veränderungen der systemischen und pulmonalen Zirkulation führen. So zeigten SICKER et al. bei kontinuierlicher Infusion von Thrombin in Dosierungen von 3 – 100 U/kg KG einen reversiblen Abfall des mittleren arteriellen Blutdruckes (177). HORGAN et al. beobachteten nach Thrombininjektion einen Anstieg sowohl des pulmonalarteriellen wie auch des pulmonalkapillaren Druckes und schlossen hieraus auf eine Vasokonstriktion postkapillärer Gefäße (84).

Nach der Injektion von 10 U Thrombin waren im Rahmen dieser Studien, wie auch in den Untersuchungen von EICHHORN et al., keine Änderungen des systemischen oder pulmonalarteriellen Blutdruck oder des Herzzeitvolumens zu beobachten (40).

Die Inkubation separierter Thrombozyten mit humanem  $\alpha$ -Thrombin, sowie die nachfolgende Reinjektion dieser Zellen bewirkt keine Veränderung makrohämodynamischer Parameter und stellt somit eine geeignete Methode zur intravitalmikroskopisch Untersuchung von thrombozytären Interaktionen mit dem pulmonalen Endothel dar.

#### 4.1.5 Ischämie-Reperfusion

Ischämie/Reperfusion der Lunge kann in unterschiedlichen klinischen Situationen der Auslöser eines akuten Lungenschadens sein. So wurde die Entstehung eines akuten nichtkardialen Lungenödems in der Reperusionsphase nach pulmonaler Thrombendarterektomie oder nach Lyse eines pulmonalarteriellen Embolus beschrieben (114;185). Auch bei der Entstehung eines Lungenödems nach Wiedereröffnung großer Atelektasen wurde ein Einfluss des Ischämie/Reperfusion diskutiert. MASSOUDY et al. fanden Hinweise auf einen I/R-Schaden der Lunge nach aortokoronarer Bypassanlage unter extrakorporaler Zirkulation (133;134).

Evident ist der Stellenwert der Ischämie/Reperfusionssituation am frühen Transplantatversagen nach Lungentransplantation. So konnte die Dauer der ischämischen Phase als Prädiktor einer frühen Funktionseinschränkung des Organs (20), im weiteren Verlauf auftretender Komplikationen wie der Bronchiolitis obliterans (48) und schließlich der Mortalität identifiziert werden (195). Daher erfolgte die Untersuchung von pulmonalen Ischämie/Reperusionsphänomenen somit meist in eng an die klinische Situation der Lungentransplantation angelehnten experimentellen Modellen. Der Grossteil dieser tierexperimentellen Arbeiten befasste sich mit der Wirksamkeit therapeutischer Interventionen zur Vermeidung eines Ischämie/Reperfusionsschadens. Die meisten Autoren dieser Arbeiten entwickelten therapeutische Strategien aus den pathophysiologischen Vorstellungen eines I/R-Schadens anderer Organe, ohne dass bisher für pulmonale I/R der zeitliche Verlauf pathologischer Veränderungen konkret beschrieben wurde.

Studien, die das funktionelle Outcome nach I/R der Lunge in Abhängigkeit von therapeutischen Strategien untersuchen, orientieren sich bei der Modellentwicklung an den in der klinischen Praxis auftretenden „kalten“ Ischämiezeiten. Wenige Arbeiten untersuchten darüber hinaus den Einfluss einer prolongierten „warmen“ Ischämie (d.h. keine Anwendung kühlender organprotektiver Verfahren) im Rahmen der allogenen Transplantation. Die hier untersuchten Zeiten normoxischer warmer Ischämie betragen 90-180 Minuten (146;147;189). So konnten LU et al. zeigen, dass eine Dauer der warmen Ischämie von 90 Minuten neben hämodynamischen Veränderungen auch histologisch nachweisbare Organschäden induziert (124). Die nach diesem Zeitraum beschriebenen Veränderungen sind so ausgeprägt, dass nach

eineinhalbstündiger Ischämie die Voraussetzungen für eine interpretierbare Intravitalmikroskopie nicht mehr gegeben scheinen. KUHNLE et al. untersuchten intravitalmikroskopisch die Leukozyten-Endothel-Interaktion nach einstündiger warmer *in situ* - Ischämie an der Kaninchenlunge. Ihre Arbeit zeigte, dass nach diesem Zeitraum die Einschlussbedingungen zur Durchführung der Intravitalmikroskopie, wie wir sie in der vorliegenden Studie fordern, noch erfüllt werden. Dennoch ließ sich an Hand der gegenüber Ausgangsbedingungen gesteigerten Leukozytensequestration auf eine stattgehabte ischämische Schädigung schließen (111).

Ein Ischämie/Reperfusionsschaden ist kein Phänomen, das unmittelbar nach Reperfusionbeginn in seinem Vollbild auftritt. Abhängig vom zeitlichen Abstand zum Reperfusionbeginn liegen einzelne pathophysiologische Prinzipien unterschiedlich ausgeprägt vor. Somit ist die Wahl des Beobachtungszeitpunktes abhängig vom Gegenstand der Untersuchung. Soll, wie in dieser Arbeit, das Adhärenzverhalten von Thrombozyten am postischämischen Endothel studiert werden, so muss eine möglicherweise adhärenzbegünstigende Schädigung der Endothelzellen oder eine Aktivierung der Thrombozyten bereits stattgehabt haben. Obwohl das für die Leukozytenadhärenz wichtige Adhäsionsmolekül ICAM-1 in der frühen Reperusionsphase vermindert ist (123) konnte die vermehrte Sequestration von Leukozyten, die mit Thrombozyten interagieren können, bereits nach zehnminütiger Reperfusion *in vivo* beobachtet werden (111). Das Adhäsionsmolekül P-Selektin, ein potentieller Ligand thrombozytärer Rezeptoren, konnte nach 30 min Reperfusion auf pulmonalen Endothelien vermehrt nachgewiesen werden (143). Eine Differenz der Thrombozytenkonzentration im pulmonalvenösen gegenüber dem rechtsatrialen Blut konnte innerhalb der ersten 20 Minuten nach pulmonaler Reperfusion beobachtet werden (134), so dass bereits in der frühen Reperusionsphase Thrombozyten-Endothelinteraktionen möglich erscheinen.

In der klinischen Situation der Lungentransplantation wird die pulmonale Strombahn des Spenderorgans nach Sistieren der Zirkulation mit einer Konservierungslösung gespült. Somit kann, aufgrund des Fehlens plasmatischer Gerinnungsfaktoren, keine lokale oder generalisierte Thrombosierung entstehen. In der experimentellen Situation dieser Arbeit (Ischämie *in situ*) kann eine solche Spülung nicht oder nur mit hohem operationstechnischem Aufwand erfolgen. Alternativ hierzu könnte die Hemmung der plasmatischen Gerinnung mit

Heparinsulfat erfolgen. Heparin beeinflusst aber dosisabhängig die thrombozytäre Expression von P-Selektin und GPIIb/IIIa (105) sowie die Interaktion mit Fibronectin auf den Endothelzellen (11). Heparin kann eine Aktivierung der Thrombozyten durch Hemmung der Thrombin-GP Ib-Interaktion wie auch die Aggregation an Fibrinthromben inhibieren (34;58). Daneben besitzt Heparin eine potentielle Rolle in der Modulation der postischämischen Endotheldysfunktion wie auch in der Aktivierung des Komplementsystems (94;186).

Sowohl eigene Beobachtungen während der Modellentwicklung als auch die Ergebnisse einer anderen Arbeitsgruppe zeigen, dass ein Verzicht auf die systemische Heparinisierung bei einer Ischämiedauer von 60 Minuten möglich ist, da das hämostatische Gleichgewicht in der Lungenstrombahn von einer hohen spontanen fibrinolytischen Aktivität geprägt ist (212). Aufgrund dieser Beobachtungen einerseits und der potentiell verfälschenden Einflüsse von Heparin auf die untersuchten Parameter andererseits erfolgte in der vorliegenden Untersuchung vor Ausklemmen der pulmonalen Strombahn keine systemische oder lokale Antikoagulation.

#### 4.1.6 Inhalation von Stickstoffmonoxid

##### Dosierung inhalierten Stickstoffmonoxides

Untersuchungen der Effekte von inhaliertem Stickoxid haben bisher unter Verwendung von Dosiervorrichtungen, die für den Patienteneinsatz konzipiert wurden, zumeist an Grosstiermodellen stattgefunden. Für eine genaue Dosierung des inhalierten NO bei hoher Atemfrequenz und kleinen Tidalvolumina, wie sie die Beatmung von Kleintieren erforderlich macht, sind diese Geräte nicht geeignet.

Eine Dosierung des NO-Trägergases und somit der inspiratorischen NO-Konzentration an Hand der gemessenen  $FiO_2$  wurde im Prinzip von TIBBALS et al. erstmals beschrieben (196). Die Autoren validierten ihre Methode allerdings nicht gegenüber bereits etablierten Verfahren, so dass dieses Vorgehen keine Anwendung auf breiter experimenteller oder klinischer Basis fand.

Aus diesem Grund erfolgte in unseren Studien die Dosierung nach der von NEY et al. aus der Methode von TIBBALS weiterentwickelten und validierten Methode der Dosierung von NO anhand der inspiratorischen Sauerstoffkonzentration (149). Bei der hier eingesetzten Anordnung erfolgt die NO-Beimischung bereits in der Frischgaszufuhr des Beatmungsgerätes. Gegenüber der Zumischung im Inspirationsschenkel hat sich dieses Vorgehen am geeignetsten erwiesen, um konstante inspiratorische Konzentrationen zu erreichen (92;180;181). Die in dieser Arbeit gezeigte Genauigkeit, ausgedrückt durch die Differenz zwischen Zielkonzentration und tatsächlich gemessener Konzentration, ist gleichwertig der Genauigkeit, mit der die Konzentration von NO mittels Chemilumineszenz oder elektrochemischen Messzellen bestimmt werden kann (121).

### Toxizität inhalierten Stickstoffmonoxides

Stickstoffmonoxid ist ein labiles Molekül, das in Abhängigkeit von seiner Konzentration und der Sauerstoffkonzentration des Trägergases nach einer Kinetik zweiter Ordnung zu Stickstoffdioxid umgewandelt wird (182).

N<sub>2</sub>O ist ein wesentlicher Bestandteil im Sommersmog und Mitursache der Atemwegsreizung durch dieses Luftschadstoffgemisch (25). N<sub>2</sub>O zeigt darüber hinaus das Potential Zusammensetzung und Metabolismus des Surfactant zu verändern (145). Darüber hinaus kann es zytologische Veränderungen in terminalen Bronchiolen und Alveolen induzieren, einen hyperoxischen Lungenschaden aggravieren und ein toxisches Lungenödem auslösen (41,59;25). Unter Berücksichtigung dieser biologischen Effekt stellt sich die Frage, ob die in dieser Untersuchung administrierten 40 ppm NO zur relevanten Bildung von Stickstoffdioxid geführt haben. So wurden auch in den Vorversuchen, die der technischen Modellentwicklung dienten, mittels Chemilumineszenz die N<sub>2</sub>O-Konzentrationen bestimmt. Die gemessenen Werte überstiegen nie den Grenzwert von 5 ppm (25). Unter Berücksichtigung einer gewissen Trägheit bei der Messung mittels Chemilumineszenz könnten dennoch kurz dauernde Schwankungen der Konzentration nicht erfasst worden sein.

Die Bildung von N<sub>2</sub>O im Beatmungssystem nimmt mit ansteigender FiO<sub>2</sub>, steigender Konzentration von NO, abnehmendem Tidalvolumen und verlängerter Verweildauer des

Frischgases im Schlauchsystem des Respirators (120) zu. Die in großen klinischen Studien an Erwachsenen nicht nachweisbare Bildung von N<sub>2</sub>O in relevanten Konzentrationen darf also aufgrund der unterschiedlichen Größenordnungen der Beatmungsparameter im Kleintiermodell nicht vorausgesetzt werden. In Untersuchungen an Früh- und Neugeborenen mit pulmonaler Hypertension jedoch, deren Beatmungsparameter sich an die in dieser Arbeit vorliegenden stark annähern, konnte von mehreren Arbeitsgruppen keine Toxizität von NO nachgewiesen werden (33;46;207). TOTAPALLY et al. konnten schließlich für den ungünstigsten Fall, die *high frequency jet ventilation*, zeigen, dass N<sub>2</sub>O-Konzentrationen über dem Grenzwert von 5 ppm erst bei NO-Konzentrationen von 70 – 80 ppm erreicht werden (198). Somit ist in dieser Untersuchung unter Inhalation von 40 ppm NO tatsächlich keine relevante Toxizität durch Bildung von N<sub>2</sub>O zu erwarten.

Daneben kann die Bildung von Methämoglobin eine klinisch relevante Nebenwirkung der NO-Inhalation darstellen. Die Entwicklung erhöhter MetHb-Konzentrationen wurde jedoch überwiegend bei mehrstündiger Inhalation hoher Dosen von NO beobachtet, so dass sich aus der Literatur keine Hinweise auf eine Methämoglobinämie bei Inhalation von 40 ppm NO über dreißig Minuten ergibt. Für ein Kaninchenmodell wurde die Applikation von 80 ppm über mehr als dreißig Minuten ebenfalls als unproblematisch beschrieben (119).

#### 4.1.7 Konstanz der Rahmenbedingungen

Wesentliche Voraussetzung experimenteller Untersuchungen ist die Konstanz der Messwerte über den Untersuchungszeitraum unter gleichbleibenden Bedingungen. Zahlreiche am vorliegenden Modell durchgeführte Studien konnten die Konstanz sowohl der makrohämodynamischen als auch mikrozirkulatorischen Parameter im unstimulierten Modell über einen Zeitraum von 60 Minuten zeigen (107-109;111). Auch für die vorliegende Studie darf somit eine Konstanz der Messgrößen über den Untersuchungszeitraum bei konstanten Rahmenbedingungen, d.h. ohne weitere Stimulation, angenommen werden.

## 4.2 Ergebnisse

### 4.2.1 Studie I: Thrombin-Stimulation

#### 4.2.1.1 Makrohämodynamik, Blutgase und peripheres Blutbild

Eine der klinischen Indikationen für die Inhalation von NO stellt die pulmonalarterielle Hypertonie dar. Sowohl für Neugeborene wie auch für Erwachsene mit pulmonalarterieller Hypertonie und konsekutiver Rechtsherzbelastung konnte eine Senkung des pulmonalen Widerstandes gezeigt werden (46;157). In dieser Studie zeigte sich jedoch kein Einfluss der Inhalation von NO auf den pulmonalarteriellen Blutdruck. Bei konstantem Herzzeitvolumen wird der pulmonalarterielle Mitteldruck von dem pulmonalkapillaren Verschlussdruck, der den linksventrikulären enddiastolischen Druck reflektiert, und dem pulmonalvaskulären Widerstand bestimmt. Für den linksatrialen Druck, der durch den linksventrikulären enddiastolischen Druck determiniert ist (beim Fehlen eines höhergradigen Mitralklappenitiums), konnte in den vorhergehenden Untersuchungen an diesem Modell für den Untersuchungszeitraum Konstanz gezeigt werden. Negativ inotrope Effekte inhalierten Stickoxids oder aber eine systemische Vasodilatation wiederum könnten hier Einfluss haben. Eine Abnahme des systemischen Gefäßwiderstandes ist jedoch bei unverändertem arteriellem Mitteldruck und konstantem HZV in unserer Arbeit nicht zu erkennen, eine Beobachtung die durch die klinischen Studien von ROSSAINT et al., PUIBASSET et al. und anderen für eine große Dosisbreite (13;163;167;218) bestätigt wird. Hinweise auf eine direkt negativ inotrope Wirkung inhalierten Stickstoffmonoxides finden sich in der Literatur nicht (64;73).

Erklärt werden kann der trotz Inhalation von NO konstante pulmonalarterielle Mitteldruck jedoch durch eine Besonderheit der pulmonalen Zirkulation: Um die Arbeit des muskelschwachen rechten Ventrikels auch bei unterschiedlich hohen Herzzeitvolumina zu begrenzen, besitzt die pulmonale Zirkulation unter Spontanatmung eine hohe Compliance. So beschreibt FISHMAN die pulmonalen Gefäße bereits unter Normbedingungen als weitgehend dilatiert (50). Eine zusätzliche Vasodilatation kann im pulmonalen Gefäßbett durch die Anwendung supranormaler inspiratorischer Sauerstoffkonzentrationen erreicht werden (158). Somit ist in unserer Untersuchung unter Inhalation eines vasodilatierenden Pharmakons keine Veränderung des pulmonalarteriellen Mitteldruckes zu erwarten.

#### 4.2.1.2 Thrombozytenkinetik in Arteriolen und Venolen

In dieser Arbeit konnte erstmals der Einfluss von inhaliertem Stickstoffmonoxid auf die Thrombozytenkinetik in den einzelnen Abschnitten der pulmonalen Mikrozirkulation gezeigt werden.

##### Retention unstimulierter Thrombozyten

Entsprechend dem experimentellen Protokoll wurde zur Erhebung der Ausgangsbedingungen nach Randomisierung die Kinetik unstimulierter Thrombozyten analysiert. Unter diesen Bedingungen war sowohl in Venolen wie auch in Arteriolen eine äußerst geringe Anzahl ortständiger Thrombozyten zu beobachten. DOERSCHUK et al. zeigten nach zentralvenöser Injektion radioaktiv markierter Thrombozyten, daß nach zehnminütiger Rezirkulation nur etwa drei Prozent der reinjezierten Zellen in der Lungenstrombahn nachweisbar sind (38). COATES et al. konnten in einer Untersuchung zur hypobaren Hypoxie unter Ausgangsbedingungen dagegen gar keine Anreicherung injizierter radiomarkierter autologer Thrombozyten unter Ausgangsbedingungen nachweisen (27). Die Übereinstimmung mit den Ergebnissen unserer Arbeit, wie auch die Beobachtungen von EICHORN et al. am selben Modell (40), lassen hiermit schließen, dass in der Lungenstrombahn eine allenfalls geringe Retention unstimulierter Thrombozyten erfolgt.

##### Relative Fliessgeschwindigkeit der Thrombozyten

Unter Ausgangsbedingungen beträgt die relative Fliessgeschwindigkeit der Thrombozyten bezogen auf die Erythrozyten in beiden Gruppen in Arteriolen im Median 0,84 bzw. 0,89; für Venolen liegen die Werte bei 0,92 bzw. 0,93 (s. Tab. 6). Dies bedeutet, daß die mittlere absolute Fliessgeschwindigkeit der Thrombozyten langsamer als die der Erythrozyten ist. Unter Annahme eines parabolischen Geschwindigkeitsprofils der Erythrozyten (d. h. höchste Einzelgeschwindigkeiten im Zentralstrom, nach lateral abnehmende Geschwindigkeiten mit einem Minimum nahe der Gefäßwand) in diesen Arteriolen sollte also im Randstrom eine höhere Thrombozytenkonzentration als im Zentralstrom anzutreffen sein. Diese Annahme stimmt mit der von TANGELDER gezeigten nicht uniformen Verteilung der Thrombozyten

im Gefäßquerschnitt von mesenterialen Arteriolen überein. In dieser Untersuchung fanden sich die höchsten Volumenkonzentrationen der Thrombozyten nahe der Gefäßwand (193). In einer ergänzenden Untersuchung zeigten WOLDHUIS et al., daß sich für die Verteilung in Arteriolen und Venolen ebenfalls Unterschiede ergeben. In Venolen nimmt die Konzentration der Thrombozyten zum Zentralstrom hin zu (210), eine Beobachtung, die mit der in Venolen höheren Relativgeschwindigkeit in unserer Arbeit kongruent ist.

### Thrombozytenadhärenz

In pulmonalen Arteriolen findet sich nach Injektion thrombinaktivierter Thrombozyten in dieser Untersuchung, wie auch in der von EICHHORN et al. (40), in der Kontroll- wie auch in der Therapiegruppe keine über das Ausgangsniveau hinaus erhöhte Adhärenz. In Venolen jedoch zeigt sich in der Kontrollgruppe eine ausgeprägte Zunahme der ortständigen Zellen. Der fehlende Anstieg der Anzahl ortständiger Zellen in der arteriellen Mikrozirkulation kann durch unterschiedliche Mechanismen bedingt sein.

Eine Interaktion der Thrombozyten mit dem Endothel setzt ihre Margination in den Randstrom voraus. ECKSTEIN et al. postulieren für diese Margination ein „*random walk*“ - Modell (39): Abhängig von den im Gefäß herrschenden Scherraten kommt es zur Zunahme zufälliger Kollisionen zwischen Erythrozyten und Thrombozyten, die zu einer Lateralisation der Thrombozyten führt. Sie beschreiben eine ausgeprägte Umverteilung von Thrombozyten in den Randstrom bei Scherraten größer  $400 \text{ s}^{-1}$ , also bei Werten die in unserer Arbeit nicht erreicht wurden. Wie vorgehend bereits besprochen finden wir jedoch unabhängig von der Höhe der Scherrate in Arteriolen eine niedrige relative Thrombozytenfliessgeschwindigkeit, die bereits auf eine wandnahe Verteilung der Zellen hinweist. Mit rheologischen Mechanismen, die die Interaktionswahrscheinlichkeit erhöhen, kann die erhöhte Adhärenz also nicht erklärt werden. Somit müssen die möglichen Interaktionspartner der Thrombozyten genauer betrachtet werden.

Aktivierete Thrombozyten können mit Leukozyten stabile Aggregate bilden (205). Somit hat der pulmonal marginierete Leukozytenpool einen nicht zu vernachlässigenden potentiellen Einfluss auf die Sequestration aktivierter Blutplättchen. So konnte KÜBLER für die

pulmonale Mikrozirkulation zeigen, dass in den venulären Abschnitten die Anzahl ortständiger Leukozyten um den Faktor 3 höher als im arteriellen Schenkel ist (107). Diese Leukozyten könnten sowohl über temporäre Interaktion mit thrombozytären Liganden, vor allem unter Beteiligung von P-Selektin und PSGL-1 (56) deren Geschwindigkeit reduzieren und hierdurch die Entwicklung einer festen Adhärenz am Endothel begünstigen. Darüber hinaus können neutrophile Granulozyten über bisher wenig definierte Signalwege Einfluss auf die Konzentration der adhäsionsmodulierenden *second messenger* cGMP und cAMP nehmen (82).

Eine feste thrombozytäre Adhärenz an Endothelzellen setzt das Vorhandensein von Liganden voraus, die sowohl quantitativ als auch unter den herrschenden mikrohämodynamischen Bedingungen qualitativ von Bedeutung sind. Die in unserer Arbeit beobachteten Unterschiede in der Ausprägung der Adhärenz zwischen Arteriolen und Venolen könnten somit durch ein unterschiedliches Expressionsmuster dieser Liganden in den Gefäßen erklärt sein. FEUERHAKE et al. untersuchten die Verteilung von ICAM-1, VECAM-1, E- und P-Selektin in der pulmonalen Zirkulation: Sie zeigten eine vermehrte Expression auf dem Endothel venöser Gefäße gegenüber Arterien. Über ein Verteilungsmuster auf arteriolärer und venulärer Ebene trifft diese Arbeit jedoch keine Aussage (45). MÜLLER et al. untersuchten an einer kleinen Anzahl von Patienten, die an einem ARDS erkrankt waren, ebenfalls die Verteilungsmuster verschiedener Adhäsionsmoleküle. Auch diese Arbeit differenziert bei kleinen pulmonalen Gefäßen nicht, somit liegen derzeit keine eindeutigen immunhistochemischen Hinweise auf eine höhere Adhäsivität des venulären Endothels vor. Setzt man aber eine potentielle Rolle von P-Selektin voraus könnte indirekt dennoch darauf zurückgeschlossen werden: P-Selektin wird gemeinsam mit vonWillebrand-Faktor (vWF) in den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen gespeichert (135). Für die pulmonale Mikrozirkulation wurde ebenfalls vWF bevorzugt in venulären Endothelien nachgewiesen, ein Hinweis auf eine vorrangig venuläre P-Selektin-Präsentation (45).

Die pulmonalarterielle Strombahn ist gleichsam ein Filter, der kontinuierlich den Übertritt von Mikrothromben in den systemischen Kreislauf verhindert. Unter der Annahme dieses andauernden „thrombembolischen Stresses“ könnte den wenig proadhäsiven Oberflächeneigenschaften des arteriellen und arteriolären Endothels durchaus biologischer Sinn zukommen: Mikroembolien und proaggregatorisch aktivierten Thrombozyten wird somit

ein Milieu angeboten, in dem die spontane fibrinolytische Aktivität der Lunge überwiegt und die Entstehung größerer, hämodynamisch wirksamer pulmonalarterieller Thrombosen verhindert.

Für die von uns in Venolen beobachtete Adhärenz können neben der bereits vorgehend besprochenen Interaktion von aktivierten Thrombozyten mit den in Venolen marginierten Thrombozyten Mechanismen der direkten Interaktion mit dem Endothel diskutiert werden. In den untersuchten postkapillaren Venolen liegen im Median Scherraten zwischen 300 bzw. 350  $s^{-1}$ , eine Scherbelastung, die als hoher Scherstress angesehen wird. Während bei niedrigen Scherbelastungen eine Adhärenz vor allem über das thrombozytäre Glykoprotein GP 1b $\alpha$  vermittelt wird, erfolgt eine Adhärenz bei hohen Scherbelastungen vor allem über GP IIb/IIIa (synonym auch  $\alpha$ Ib $\beta$ 3 oder CD41/CD61) unter Beteiligung von vWF und ICAM-1 (197) (132). Für den thrombozytären P-Selektin-Glykoproteinliganden PSGL-1 wird ebenfalls eine Beteiligung an der Adhärenz unter diesen hämodynamischen Bedingungen postuliert (6;53). Für die entgegengesetzte Interaktion thrombozytären P-Selektins mit endothelialen Liganden konnten MASSBERG et al. unter nicht-statischen Bedingungen eine allenfalls geringe Ausprägung zeigen, so dass dieser Mechanismus in unserer Untersuchung möglicherweise nur eine untergeordnete Rolle zukommt (131).

Die gewählte Methodik dieser Arbeit ermöglicht keine Aussage über den Mechanismus der ausgeprägten Sequestration aktivierter Thrombozyten in pulmonalen Venolen. Sie zeigt jedoch eindeutig, dass inhaliertes Stickstoffmonoxid dieses Phänomen unterdrückt und die Fließgeschwindigkeit wie auch die Anzahl ortsständiger Thrombozyten unter NO-Inhalation auf dem Niveau unstimulierter Zellen liegt. Nachfolgend werden daher Aspekte einer antiadhäsiven Wirkung von NO besprochen.

#### Einfluss von Stickstoffmonoxid auf die Thrombozytenadhärenz

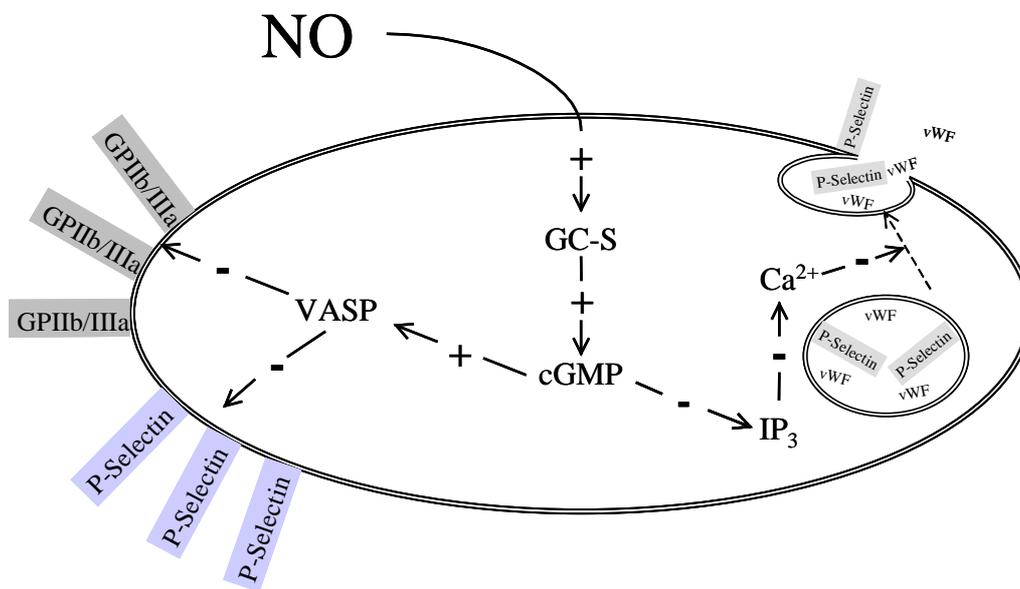
Wie bereits besprochen, besitzt die in den beobachteten Gefäßen herrschende Wandscherrate Einfluss auf die Ausbildung stabiler Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen. Stickstoffmonoxid ist ein potenter pulmonaler Vasodilatator, der über Steigerung der mikrovaskulären Flüsse eine Erhöhung der Scherrate bewirken kann. Allerdings muss man

bei der pulmonalen Zirkulation von einer physiologisch weitgehend kompletten Vasodilatation ausgehen, solange kein vasokonstriktorischer Stimulus wirkt (50). Die Thrombinstimulation der reinfundierten Thrombozyten in unseren Untersuchungen bewirkte, wie oben diskutiert, keine pulmonale Vasokonstriktion. Entsprechend unterschieden sich weder das HZV noch der PAP zwischen der Kontrollgruppe und der iNO-Gruppe nach der Applikation der stimulierten Thrombozyten. Auch bei den mikrohämodynamischen Parametern  $D$ ,  $v_{ery}$ , und  $Q$  sowie konsekutiv der Scherrate  $\gamma$  waren keine Unterschiede nachweisbar. Mikrohämodynamische Differenzen können die antiadhäsive Wirkung von iNO daher nicht erklären, somit muss der Einfluss von NO auf thrombozytärer Ebene betrachtet werden.

Bereits 1987 konnten RADOMSKI et al. zeigen, dass endogenes NO die Adhärenz thrombinstimulierter Thrombozyten inhibiert (164). Endogenes NO kann durch die endotheliale NO-Synthetase (eNOS) durch schrittweise Hydroxilierung und Oxidation aus L-Arginin gebildet werden (142). Die adhäsionshemmende Wirkung von NO wird im wesentlichen über seine Wirkungen auf die lösliche Guanylatcyclase (GC-S) im thrombozytären Cytoplasma vermittelt (55). Durch NO aktiviert produziert dieses Enzym cGMP. Über die Aktivierung cGMP-abhängiger Proteinkinasen wird die Phosphorylierung verschiedenster Proteine eingeleitet (204). Eines dieser Zielproteine ist das *vasodilator-stimulated-phosphoprotein* (VASP) (70). Das aktivierte VASP ist wesentlich an der Regulation der Präsentation von P-Selectin wie auch des GPIIb/IIIa-Rezeptors beteiligt (86;170). Darüber hinaus hemmt cGMP die durch Inositoltriphosphat vermittelte Calciummobilisation nach Thrombinstimulation (148). Die cytosolische Calciumkonzentration wiederum ist eine der Determinanten der Kinetik exozytischer Prozesse, die an der Freisetzung adhäsionsbegünstigender Faktoren mitwirken, so dass ein Anstieg der cytosolischen cGMP-Konzentration die Präsentation von P-Selektin und GP IIb-IIIa reduziert (139).

Die basale endotheliale Produktion von NO wird durch die Stimulation der Thrombozyten, zumal in vitro vorgenommen, nicht beeinflusst. Somit entsteht ein Ungleichgewicht zu Gunsten der adhärenzbegünstigenden Faktoren. Dies kommt in dieser Untersuchung durch die in der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt  $t_{60}$  beobachtete vermehrte Adhärenz zum Ausdruck. Die Stimulation der proteasenaktivierten Rezeptoren durch Thrombin löst (siehe auch S. 60) eine

intrazelluläre Signalkaskade aus, deren Effekte der NO-vermittelten Inhibition der Adhärenz entgegengesetzt sind. Exogenes, *per inhalationem* zugeführtes NO kann in der Lunge offensichtlich diese Imbalance ausgleichen, was zu der von uns beobachteten Inhibition der Adhärenz der thrombinstimulierten Thrombozyten in der iNO-Gruppe führt.



**Abb. 14: NO-induzierte Hemmung der Thrombozytenadhärenz: Intrazelluläre Signaltransduktion (Erläuterung im Text S. 73)**

- + : stimuliert, - : inhibiert
- GC-S: lösliche Guanylatcyclase
- cGMP: cyclisches GMP
- IP<sub>3</sub> : Inositoltriphosphat
- vWF: von Willebrand-Faktor
- VASP: vasoaktives Polypeptid

Auch RAMAMURTI et al. konnten zeigen, daß NO bereits in Konzentrationen von 0,1 ppm unabhängig vom auslösenden Stimulus die Adhärenz von Thrombozyten (165) *in vitro* inhibiert. MELLGREN et al. wiesen *in vivo* eine reduzierte Präsentation thrombozytärer Integrine durch Inhalation von 40 ppm NO nach (138), ein Befund der auch von der unter NO-Inhalation durch GRIES et al. beobachteten reduzierten Fibrinogenbindung durch Thrombozyten gestützt wird (66).

Einer biologischen Wirkung von iNO auf intravasal befindliche Blutzellen steht primär seine rasche Inaktivierung durch Hämoglobin unter Bildung von s-Nitrosohämoglobin entgegen (139). Eine bevorzugte Anordnung von Thrombozyten im Randstrom kann jedoch eine Diffusion von NO in diese Zellen noch vor der Inaktivierung des Gases begünstigen. Darüber hinaus existieren Hinweise auf die Bildung von NO-Donatoren, beispielsweise Nitrosoalbumin, aus Albumin und iNO. Diese können auch in entfernten Strombahnen eine antiadhäsive Wirkung von iNO, beispielsweise auf Leukozyten, vermitteln (1;52).

Bei der Interpretation unserer Befunde sind die widersprüchlichen Ergebnisse von Studien, die den Einfluss von iNO auf die Blutungszeit untersuchten, mit Vorsicht zu betrachten, stellt doch die Blutungszeit per se keinen Parameter dar, der isoliert die thrombozytäre Funktion widerspiegelt (5;60;83). Vielmehr reflektiert sie die komplexe Interaktion von vaskulären hämostatischen Mechanismen, Thrombozytenadhärenz- und aggregation an endothelialen und subendothelialen Strukturen sowie der plasmatischen Gerinnung.

#### 4.2.1.3 Thrombozytenkinetik in Alveolarkapillaren

##### Retention unstimulierter Thrombozyten

Im Gegensatz zu Arteriolen und Venolen können in alveolären kapillaren Netzwerken in dieser Untersuchung bereits unter Ausgangsbedingungen retinierte Thrombozyten beobachtet werden, ein Befund der sich mit den Ergebnissen von EICHHORN et al. deckt (40). Eine basale Sequestration von Thrombozyten wurde ebenfalls von DOERSCHUCK et al. gezeigt, die mittels Radioisotopenmarkierung eine Retention unstimulierter Thrombozyten in der pulmonalen Zirkulation nachweisen konnten (38). In dieser Arbeit, die das Passageverhalten von Thrombozyten und Leukozyten vergleicht, postulieren die Autoren, dass die Sequestration von Zellen in der pulmonalen Zirkulation durch den Durchmesser der Zellen bedingt ist. Leukozyten können bereits unter unstimulierten Bedingungen aufgrund der Diskrepanz ihres Durchmessers zu dem der Alveolarkapillaren in diesen zurückgehalten werden. Für Thrombozyten verbietet sich die Annahme eines rein mechanischen Retentionsprozesses: Es handelt sich um kleine, diskoide Zellen mit einem mittleren Durchmesser von 2-3µm. Der mittlere Durchmesser der Alveolarkapillaren wird jedoch mit etwa 6 µm angenommen (68), so dass eine Retention in einer erythrozytenperfundierten

Kapillare nicht möglich ist. Die von uns unter Ausgangsbedingungen beobachteten ortständigen Thrombozyten fanden sich ausnahmslos in solchen Gefäßen.

Eine Adhäsionsmolekül-vermittelte Interaktion der Thrombozyten mit dem Endothel kann aus zwei grundsätzlich Überlegungen heraus derzeit nicht angenommen werden: Charakteristisch für die in anderen Gefäßen zu beobachtende feste Adhärenz am Endothel ist ein der Adhärenz vorausgehendes sogenanntes *rolling* einzelner Zellen am Endothel. Da diese Zellen deutlich langsamer fließen als frei im Blutstrom schwimmende Zellen, kann die Berücksichtigung ihrer Fließgeschwindigkeit bei der Berechnung zu einer Reduktion der Relativgeschwindigkeit der gesamten Zellreihe führen. Dies lässt sich in der vorliegenden Untersuchung nicht beobachten, die Relativgeschwindigkeit in Kapillaren ist der in Arteriolen und Venolen, in denen keine Adhärenz beobachtet wird, gleich. Aufschlussreich könnte auch eine direkte Quantifizierung des Prozentsatzes rollender Thrombozyten sein. Eine Definition der kritischen Thrombozytengeschwindigkeit, deren Unterschreitung ein Rollen in Alveolarkapillaren definiert, kann in Analogie zu der kritischen Geschwindigkeit von Leukozyten in prä- und postkapillaren Gefäßen nicht berechnet werden. Denn bei der Definition dieser Geschwindigkeit findet die Annahme eines parabolischen Geschwindigkeitsprofils der Erythrozyten Anwendung (117;118). In Kapillaren ist jedoch ein deutlich abgeflachtes Profil vorherrschend (179). Über diese intravitalmikroskopischen Beobachtungen hinaus erscheint eine thrombozytäre Interaktion mit dem Endothel unwahrscheinlich, da für Alveolarkapillaren das Fehlen von P- und E-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1, also potentiellen Liganden, gezeigt wurde (45).

Als potentieller Kandidat für die Erklärung der Sequestration von Thrombozyten in den alveolären Netzwerken kann jedoch die Ausbildung von Leukozyten-Thrombozytenaggregaten dienen. Bereits nicht aktivierte Thrombozyten können mit Leukozyten aggregieren (205). Es kann also eine Sequestration von Leukozyten-Thrombozyten-Aggregaten in Kapillaren vorliegen. Darüber hinaus kann die in Alveolarkapillaren herrschende Scherbelastung zu einer intrinsischen Aktivierung der Thrombozyten mit Ausbildung von Aggregaten mit retinierten Leukozyten führen. Diese Aggregate können über thrombozytäres P-Selektin stabilisiert werden (87).

## Einfluss von iNO auf die Retention von Thrombozyten

Auch in Alveolarkapillaren fand sich in unserer Arbeit eine massive Retention aktivierter Thrombozyten. Die Aktivierung mit Thrombin führt, wie oben bereits besprochen, zu einer vermehrten Präsentation von P-Selektin und GPIIb/IIIa auf der Zellmembran. KLINKHARDT et al. zeigten, dass die Anzahl der im Vollblut nachweisbaren Leukozyten-Thrombozytenaggregate von der Dichte dieser Moleküle auf der Thrombozytenoberfläche abhängig ist. In Ergänzung dieser Ergebnisse konnte der Einfluss eines funktionsfähigen GPIIb/IIIa-Rezeptors für die Anzahl der an den einzelnen Aggregaten beteiligten Thrombozyten gezeigt werden (211).

Auch in Alveolarkapillaren unterdrückt iNO die Sequestration aktivierter Thrombozyten. Dennoch ist auch in der NO-Gruppe eine Zunahme der Anzahl retinierter Zellen zu beobachten. Dies könnte durch eine Einschwemmung von Leukozyten-Thrombozyten-Aggregaten erklärt werden, die sich bereits vor der pulmonalen Passage stabilisiert hatten, da ein antiaggregatorischer Effekt von iNO auf Grund der angenommen selektiv pulmonalen Wirkung in der systemischen Zirkulation nicht eintreten konnte.

Die deutlich geringere Anzahl retinierter Blutplättchen kann sowohl mit einem Effekt von NO auf Thrombozyten als auch Leukozyten erklärt werden: Es reduziert, wie im Kapitel 4.2.1.2 bereits beschrieben, die Dichte der für die Ausbildung von Aggregaten notwendigen Adhäsionsmoleküle auf der Thrombozytenoberfläche und kann hierdurch der Entstehung von Aggregaten entgegenwirken. Wird die Anwesenheit in Alveolarkapillaren retinierter Leukozyten als Voraussetzung für eine Sequestration von Thrombozyten angesehen, so kann auch eine reduzierte Anzahl dieser Zellen die geringere Anzahl ortständiger Thrombozyten erklären. Inhaliertes Stickstoffmonoxid erhöht über eine Hemmung der Synthese von F-Aktin, das eine stabilisierende Funktion für das Zytoskelett besitzt, die Verformbarkeit von Leukozyten. Die Expression des Adhäsionsmoleküls CD 18 wird ebenfalls reduziert. SATO et al. konnten über diese in vitro Befunde hinaus zeigen, dass 40 ppm iNO, die von uns ebenfalls eingesetzte Dosierung, die Sequestration von Leukozyten in der Kaninchenlunge reduziert (174).

Die Sequestration aktivierter Thrombozyten in Alveolarkapillaren könnte auch über eine direkte Interaktion mit endothelialen Liganden bedingt sein. Wie bereits erwähnt konnten weder FEUERHAKE et al. noch COLOMBAT et al. potentielle Liganden der Leukozyten-Endothel-Interaktion in humanen pulmonalkapillären Endothelien nachweisen (28;45). KÜBLER postuliert jedoch aus den Ergebnissen seiner Untersuchungen zum Einfluss von Fucoidin auf die Leukozytenkinetik in Kapillararealen eine ligandenvermittelte Leukozyten-Endothel-Interaktion (106). Derartige, wie oben erwähnt, allerdings bislang nicht identifizierte, Liganden könnten einen potentiellen Interaktionspartner für Thrombozyten darstellen. Stickstoffmonoxid kann die Präsentation endothelialer Adhäsionsmoleküle anderer Gefäßprovinzen beeinflussen (siehe Seite 84). Die unter Inhalation von NO reduzierte Retention von aktivierten Thrombozyten könnte also auch durch eine verringerte Adhäsivität des Endothels bedingt sein.

## 4.2.2 Studie II: Ischämie-Reperfusion

### 4.2.2.1 Makrohämodynamik, Blutgase und peripheres Blutbild

Im Vergleich zu Ausgangsbedingungen vor Ischämieinduktion ist während der Reperfusion in keiner Versuchsgruppe ein Anstieg des pulmonalarteriellen Mitteldruckes zu beobachten. In der Therapiegruppe kann dies Ausdruck der pulmonal vasodilatierenden Wirkung von iNO sein, in der Schadensgruppe wäre ein Anstieg des PAP nicht unerwartet: Ischämie/Reperfusion führt zu einer erniedrigten Aktivität der NO-Synthetase 2 (NOS-2) mit einem konsekutiven Abfall der Konzentration von cGMP in der pulmonale Zirkulation (122). Der *second messenger* cGMP ist wesentlich an der Relaxation glatter Muskelzellen beteiligt, so daß der Konzentrationsabfall in der Reperfusionsphase zu einem Anstieg des pulmonalarteriellen Blutdrucks führt (202). Folge dieser plötzlichen Widerstandserhöhung im kleinen Kreislauf kann, insbesondere bei einem an hohe Nachlast nicht adaptiertem rechten Ventrikel, ein akutes Rechtsherzversagen sein.

Inspiratorische Sauerstoffkonzentrationen nahe einer  $FiO_2 = 1$  können den pulmonalarteriellen Mitteldruck effektiv senken. Während in der klinischen Situation die Indikation zur Beatmung mit hohen inspiratorischen Sauerstoffkonzentrationen nur zurückhaltend gestellt wird, wurde in unserem experimentellen Ansatz gezielt mit annähernd 100% Sauerstoff beatmet, um ein maximales Substratangebot für die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies zu schaffen. Diese hohen Sauerstoffkonzentrationen können über ihre vasodilatierende Wirkung den fehlenden Anstieg des PAP in der Schadensgruppe erklären.

Im Gegensatz zur Kontrollgruppe wie auch der Therapiegruppe zeigten die Tiere der Schadensgruppe zum Zeitpunkt  $t_{60}$  eine ausgeprägte Hyperkapnie. Bei diesen Tieren war eine Anpassung der Ventilation mit dem Ziel der Normokapnie nicht möglich. Die Normalisierung des Gasaustausches hätte die Anwendung eines sehr invasiven Beatmungsregimes erfordert, weshalb eine Intravitalmikroskopie nicht durchführbar gewesen wäre. Die resultierende respiratorische Azidose muss somit bei der Interpretation unserer Ergebnisse berücksichtigt werden, könnte sie doch isoliert in der Schadensgruppe einen I/R-Schaden aggravieren oder direkten Einfluss auf das Adhärenzverhalten von Thrombozyten nehmen. Bemerkenswert ist jedoch, dass Hyperkapnie organprotektive Effekte zu besitzen scheint. So konnten LAFFEY

et al. zeigen, dass therapeutische Hyperkapnie den I/R-induzierten Schaden an Kaninchenlungen, quantifiziert über die *wet-dry-ratio* des Lungengewebes, abschwächt (112). Diese Befunde könnten über eine Hemmung der endogenen Xanthinoxidase erklärt werden (113;175). Darüber hinaus inhibiert eine Hyperkapnie prolongiert die Aggregation von Thrombozyten (57;155), so daß unter normokapnischen Bedingungen ein noch deutlich gesteigertes Adhärenzverhalten zu erwarten wäre.

In allen Versuchsgruppen dieser Studie konnte zum Zeitpunkt  $t_{30}$  eine Thrombopenie beobachtet werden. In Studie I zeigte sich demgegenüber kein ausgeprägter Abfall der systemischen Thrombozytenkonzentration. Erklärt werden könnte dieser Unterschied durch die in Studie II zusätzlich zur Präparation des thorakalen Fensters durchgeführte mediane Sternotomie und die hierdurch entstandene ausgedehnte Wundfläche mit dem für die Hämostase erforderlichen Thrombozytenverbrauch.

#### 4.2.2.2 Mikrohämodynamik in Venolen

KUHNLE et al. zeigten in ihrer Arbeit zur pulmonalen Leukozytenkinetik im Model der Intravitalmikroskopie der Kaninchenlunge eine sehr hohe interindividuelle Variation der mittleren Erythrozytenfließgeschwindigkeit mit einem Variationskoeffizienten dieses Werte von 50% für die Tiere der Ischämiegruppe (111). Demgegenüber findet sich in unserer Arbeit ein Variationskoeffizient der Erythrozytenfließgeschwindigkeit von 12,6 % für alle Versuchstiere. Wir dürfen also von einer wesentlich homogeneren Verteilung der mikrohämodynamischen Messwerte zwischen den einzelnen Versuchstieren ausgehen. Die Ursache dieser geringeren Variation ist unklar. Möglicherweise gelang in unserer Studie die Ischämieinduktion Dank des Zugangs über die mediane Sternotomie atraumatischer. Zudem verzichteten wir auf das „Verpacken“ des ischämischen Lungenflügels in Folie, wie es von KUHNLE et al. durchgeführt wurde. Für ein geringeres Präparationstrauma spricht auch, dass wir auf eine Heparinisierung der Tiere verzichten konnten. Die Heparinisierung war in den Versuchen von KUHNLE et al. jedoch notwendig, um überhaupt postischämisch zuverlässig mikroskopische Befunde erheben zu können. Während in der oben genannten Arbeit die nach Ischämie beobachteten niedrigen Fließgeschwindigkeiten zu deutlich reduzierten mikrovaskulären Blutflüssen beitragen, sehen wir für diesen Parameter keine Differenzen zwischen den Versuchsgruppen. Auch die Scherbelastung an der Gefäßwand ist in allen drei

Gruppen auf gleichem Niveau. So können mikrohämodynamische Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wiederum nicht zur Erklärung unserer Befunde herangezogen werden.

Die in der Schadensgruppe gemessenen Gefäßdurchmesser waren, bei Fehlen statistischer Signifikanz, um etwa 20% geringer als in den Vergleichsgruppen (Kontrolle bzw. iNO). JANICEK et al. konnten eine durch Plättchenadhärenz induzierte Vasokonstriktion durch simultane Freisetzung vasoaktiver Substanzen nachweisen (93). Damit könnte die ausgeprägte thrombozytäre Adhärenz in dieser Gruppe Ursache dieses Befundes sein.

#### 4.2.2.3 Thrombozytenkinetik in Venolen

Erstmals konnten wir mit diesem Modell nachweisen, daß pulmonale Ischämie/Reperfusion zu einer gesteigerten Interaktion der Thrombozyten mit dem pulmonalvenösen Endothel führt. Dies drückt sich durch die Abnahme der relativen Thrombozytenfliessgeschwindigkeit aus. Die genauere Betrachtung zeigt eine Zunahme der langsamen Geschwindigkeitsklassen im nach Geschwindigkeitsklassen eingeteilten Histogramm, die Ausdruck einer gesteigerten temporären Interaktion mit den Endothelzellen ist (Abb. 15: Verteilung der relativen Thrombozytengeschwindigkeit S. 51). Diese losen Bindungen können in eine stabile Bindung übergehen, wie die Zunahme der Anzahl ortständiger Thrombozyten beweist.

Während anderen Untersuchern bei der Beurteilung einer postischämisch gesteigerten pulmonalen Thrombozytensequestration die Möglichkeit der Beurteilung mikrohämodynamischer Einflussgrößen fehlte (129;134), ist mit unserer Methodik ein Interpretation der Thrombozytenkinetik auch unter diesem Gesichtspunkt möglich. Da, wie vorgehend bereits ausgeführt, mikrohämodynamische Unterschiede zwischen den Gruppen nicht nachzuweisen waren, müssen Mechanismen einer postischämischen Steigerung der Adhäsivität von Thrombozyten und Endothel als Erklärung dieser Befunde diskutiert werden. Grundsätzlich kann die von uns beobachtete reduzierte relative Thrombozytengeschwindigkeit wie auch die erhöhte Anzahl ortständiger Zellen aus einem Ungleichgewicht pro- und antiadhäsiver Faktoren resultieren. Dieses Ungleichgewicht ist Ausdruck des sich in der pulmonalen Strombahn entwickelnden Ischämie-Reperfusionsschadens.

## Pathophysiologie des pulmonalen Ischämie/Reperfusionsschadens

Einer der führenden Pathomechanismen des I/R-Schaden ist die exzessive Bildung freier Sauerstoffradikale. Während der Phase des Substratmangels im zellulären Energiestoffwechsel tritt eine intrazelluläre Verarmung an ATP mit Akkumulation des Degradationsproduktes ADP ein. Der Abbau von ADP über Inosin zu Hypoxanthin liefert das Substrat der Xanthinoxidase. Postischämisch lässt sich eine erhöhte Aktivität dieses Enzym nachweisen, so daß in der Phase der Reoxigenierung beim oxidativen Abbau von Hypoxanthin vermehrt reaktive Sauerstoffspezies anfallen (97). Dieser Mechanismus der Produktion freier Radikale wurden insbesondere in Modellen nachgewiesen, die auf einem Anoxie/Reoxigenierungs-Schaden basieren. FISHER und DODIA zeigten, daß ein markanter Abfall der intrazellulären ATP-Konzentration erfolgt, wenn der pulmonale parenchymatöse  $pO_2$  unter 7 mmHg absinkt (49). In unserem Modell erfolgt die kontinuierliche Superfusion der visceralen Pleura mit einer oxigenierten Lösung. Berücksichtigt man die Diffusionseigenschaften der visceralen Pleura, erscheint unwahrscheinlich, dass im unmittelbar subpleural gelegenen Parenchym der  $pO_2$  unter diesen niedrigen Wert abfällt (31;42;96;160). Unter diesen Bedingungen kann nicht von einer durch Anoxie/Reoxigenierung induzierten vermehrten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies ausgegangen werden.

Ischämie ist aber nicht gleichbedeutend einer Hypoxie oder Anoxie des Gewebes, sondern als Verminderung oder Unterbrechung der Durchblutung eines Organs, Organteils oder Gewebes definiert. Das Fehlen der physikalischen Stimulation der mechanosensitiven pulmonalen Endothelzelle beim Sistieren des Blutflusses führt zur Membrandepolarisation und nachfolgender Aktivierung der NADPH-Oxidase (3;4). Dieses Enzym kann, unabhängig vom Anfall von ATP-Abbauprodukten, über die Bildung von  $O_2^-$  und  $H_2O_2$  einen oxidativen Stress bereits während der ischämischen Phase auslösen (215). Wird in der sich anschließenden Reperfusionsphase zusätzlich Sauerstoff über das Blut zugeführt, steigt die Produktion von Radikalen weiter an (140). Radikale Sauerstoffverbindungen können eine Thrombozytenadhärenz auslösen (26) und die weitere Bildung von Sauerstoffradikalen durch Thrombozyten im Sinne eines positiven Feedbacks herbeiführen (215).

Oxidative Schädigung der Mitochondrien durch Sauerstoffradikale induziert über den *intrinsic pathway* der Apoptose bereits in der frühen Reperfusionphase den programmierten Tod von Endothelzellen, so dass durch Auflockerung des Endothelzellverbandes subendotheliale Strukturen als Interaktionspartner der Thrombozyten freigelegt werden können (47).

Apoptose, Azidose, Proteolyse und oxidativer Stress können aus Cytochrom P450 und Ferritin Eisen freisetzen (22;88;214). Freies Eisen kann mittels der FENTON-Reaktion (wiederholter Wechsel zwischen oxidiertem und reduziertem Zustand) weitere Sauerstoffradikale bilden und zur Lipidperoxidation beitragen. Darüber hinaus löst freies Eisen die Aggregation von Thrombozyten aus (88;161).

### Proinflammatorische Mediatoren

Neben der oxidativen Schädigung kann auch die Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren eine gesteigerte Thrombozytenadhärenz vermitteln. Insbesondere die Aktivierung der Phospholipase A2 kann hierzu wesentlich beitragen: Begünstigt durch veränderte Membranbeschaffenheit der postischämischen Endothelzellen kann dieses Enzym, dessen Aktivität nach Ischämie/Reperfusion erhöht ist, Arachidonsäure als Substrat für die Cyclooxygenase bereitstellen (103). Diese bildet aus Arachidonsäure neben anderen Eicosanoiden das Thromboxan A2, einen potenten Vasokonstriktor und Aktivator der Thrombozytenaggregation. Die Produktion des *platelet activating factors* (PAF) wird ebenfalls von Phospholipase A2 induziert. Unabhängig von seiner proaggregatorischen Wirkung auf Thrombozyten kann PAF auch die Expression von endothelialelem P-Selektin steigern (104).

### Postischämische Präsentation von Adhäsionsmolekülen

Neben der Aktivierung durch PAF bestehen weitere intrazelluläre Signalwege die in der I/R-Situation die Präsentation von Adhäsionsmolekülen anregen. Die Expression und nachfolgende Präsentation dieser Moleküle verläuft biphasisch. In der späten Phase der Reperfusion (> 4h) erfolgt über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB vor allem

die Präsentation von E-Selektin, ICAM-1 und P-Selektins (104). In der frühen Phase (~ 30 min) ist im wesentlichen P-Selektin auf den Endothelien nachweisbar, während für das konstitutiv vorhandene ICAM-1 zu diesem Zeitpunkt eine reduzierte Präsentation zu beobachten ist (215);(123). Dementsprechend konnten MASSBERG et al. zeigen, dass Adhärenz von Thrombozyten am postischämischen Endothel des murinen Mesenteriums von der Präsenz von P-Selektin auf den Endothelzellen abhängig ist (131).

Die Präsentation von P-Selektin wie auch die Exozytose von Speichervesikeln, die vWF enthalten, erfolgt in Abhängigkeit von der intrazellulären Calciumkonzentration(139). Deren Regulation ist von der Aktivität der cNOS während I/R abhängig (122;139).

### Postischämisches NO-Defizit

Das Sistieren der Durchblutung steigert die endogene Produktion von NO mit dem Ziel einer kompensatorischen Vasodilatation. Nach prolongierter Ischämie kann dann auf Grund des eingetretenen Substratmangels das kurzlebige NO nicht ausreichend neu synthetisiert werden (2).

In der Phase der Reperfusion ist die Aktivität der konstitutiven NO-Synthetase (cNOS) reduziert, der Mangel an Stickstoffmonoxid wird aber auch durch die jetzt erhöhte Aktivität der induzierbaren NO-Synthetase nicht kompensiert (122). Der resultierende intrazelluläre Mangel an NO verringert die cytosolische cGMP-Konzentration. Die Folge ist eine reduzierte Phosphorylierung und damit fehlende Aktivierung sowohl von transmembranären Calciumkanälen wie auch Ionenpumpen des sarkoplasmatischen Retikulums, der Calciumspiegel steigt an und induziert die Degranulation von Speichervesikeln.

Das aus Aktivierung der Thrombozyten und vermehrter Ligandenpräsentation entstandene proadäsvive Ungleichgewicht in der postischämischen Mikrozirkulation wird durch einen Mangel an antiadhäsivem NO noch verstärkt. Neben den im vorgehenden Absatz bereits erläuterten Mechanismen der Verarmung an NO (verringerte Aktivität der cNOS und Substratmangel) bestehen weitere NO-verbrauchende Prozesse. Da es sich bei NO selbst um ein reaktives freies Radikal handelt, kann es an einer Vielzahl von Redoxreaktionen

teilnehmen. Insbesondere die Reaktion mit Superoxid, Wasserstoffperoxid, Lipidperoxidradikalen und Prostanoiden führt zur Inaktivierung von NO (141).

Zusammenfassend kann die von uns beobachtete ausgeprägte thrombozytäre Adhärenz in pulmonalen Venolen nach I/R mit einer verstärkten Präsentation von Adhäsionsmolekülen bei einem relativen Mangel an endogenem NO erklärt werden. Gegenüber diesem Befund in der Schadensgruppe zeigt sich in der Therapiegruppe unter NO-Inhalation eine der Kontrollgruppe vergleichbare Thrombozytenkinetik.

#### Antiadhäsive Effekte von NO in der Reperfusionphase

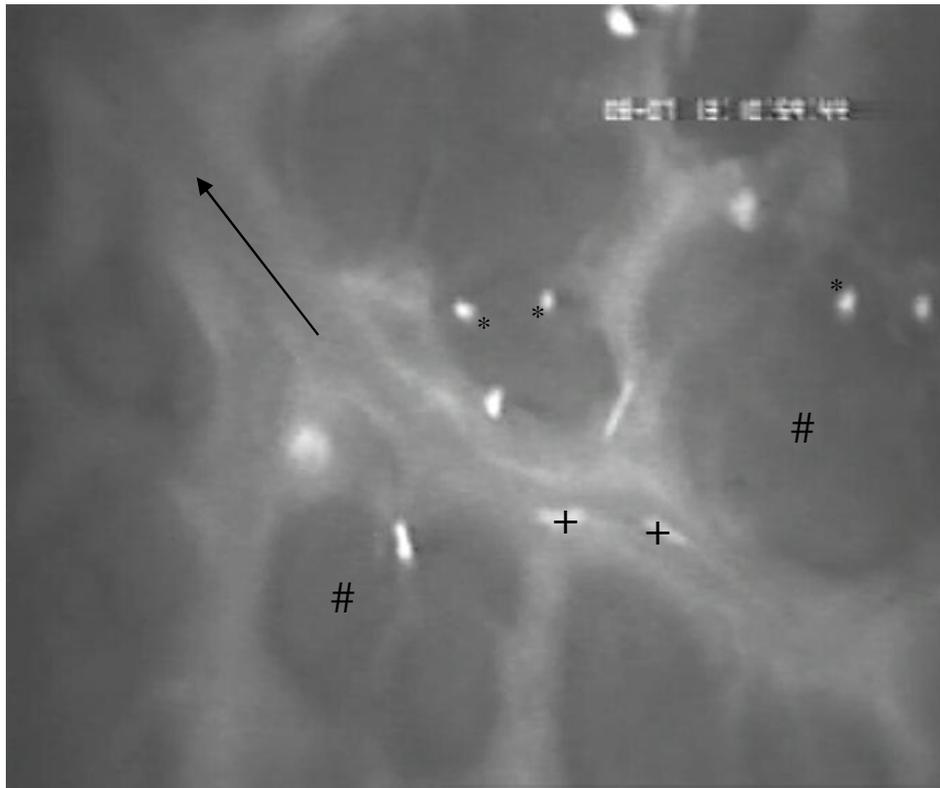
Neben dem Ausgleich eines postischämischen Mangels kann die Inhalation von NO auch additiv einer gesteigerten Adhäsivität von Endothel und Thrombozyten entgegenwirken.

So reduziert therapeutisch angewandtes Stickstoffmonoxid die postischämische endotheliale P-Selektin-Expression sowohl in intestinalen, hepatischen und pulmonalen Gefäßen und blockiert damit den wesentlichen Mechanismus der Interaktion von Thrombozyten mit dem postischämischen Endothel (85;131). Dieser Effekt wird durch die erniedrigte Bindung von Fibrinogen an thrombozytäre Integrine (66) sowie die verringerte Präsentation dieser Adhäsionsmoleküle unter NO-Inhalation verstärkt (139). Durch Blockade der thrombozytären 12-Lipoxygenase und der Cyclooxygenase durch NO wird schließlich die weitere Rekrutierung von Thrombozyten durch intrinsische Aktivierung unterdrückt (54).

#### 4.2.2.4 Erythrozyten- und Thrombozytenkinetik in Alveolarkapillaren

Gegenüber der Kontrollgruppe beobachteten wir nach Ischämie-Reperfusion in der Schadensgruppe eine ausgeprägte Retention von Thrombozyten in den alveolarkapillären Netzwerken. Die alveolären Kapillaren repräsentieren in ihrer Summe die größte Endothelfläche in der pulmonalen Strombahn, sie übertrifft die Gesamtoberfläche der Arteriolen und Venolen sogar um das etwa 45-fache (178). Die dort sequestrierten Thrombozyten stellen also den quantitativ größten Anteil dieser in der Lunge retinierten Zellen dar.

Auf den Endothelzellen der Alveolarkapillaren sind weder ICAM-1 noch P-Selektin als konstitutive Adhäsionsmoleküle nachweisbar (45). Untersuchungen über eine Präsentation dieser Liganden im Rahmen pathologischer Prozesse liegen derzeit nicht vor. Die Erklärung unserer Befunde mit einer postischämischen Expression dieser Moleküle wäre daher spekulativ. Diskussionswürdig ist hingegen sowohl eine mechanische Retention von Thrombozyten wie auch deren Interaktion mit sequestrierten Leukozyten.



**Abb. 16: Adhärente Thrombozyten in Alveolarkapillaren**

# Alveolus, → Fließrichtung in Venolen, + Thrombozyten in Venolen,  
\* Thrombozyten in Alveolarkapillaren

Ein intrazellulärer Mangel an energiereichen Phosphaten im Rahmen hypoxischer Ereignisse beeinträchtigt die Funktionsfähigkeit der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase und induziert ein zelluläres Ödem. Wenngleich wir in unserem Modell für die beobachteten Lungenbezirke nicht vom Vorliegen eines hypoxischen Milieus ausgehen können, ist dennoch ein postischämisches Ödem der Endothelzellen möglich. So beobachteten KIM et al., daß pulmonale Ischämie ohne Hypoxie zu einem ausgeprägten endotheliale Ödem führt (99). Insbesondere in Alveolarkapillaren kann ein Ödem auf Grund des geringen Durchmessers eine Lumeneinengung verursachen, die ihrerseits zu einer vermehrten Retention zellulärer Blutbestandteile führt. Der Durchmesser der Alveolarkapillaren beträgt etwa  $6\ \mu\text{m}$ , der der Thrombozyten ca.  $2\text{-}3\ \mu\text{m}$ . Eine Abnahme

des Kapillarquerschnittes auf die Größenordnung dieses Wertes könnte also die freie Passage von Thrombozyten durch Kapillaren behindern. Eine derartig hochgradige Veränderung der Kapillarmorphologie jedoch müsste jedoch auch die Passage von Erythrozyten beeinträchtigen. Obwohl diese Zellen auf Grund ihrer hohen Verformbarkeit auch Kapillaren mit einem geringeren Querschnitt als dem eigenen Durchmesser grundsätzlich passieren können, nimmt unter diesen Bedingungen ihre Fliessgeschwindigkeit ab. In unserer Untersuchung zeigen sich jedoch im Vergleich von Kontroll- und Schadensgruppe keine Unterschiede in der Fliessgeschwindigkeit in Alveolarkapillaren. Höhergradige Lumeneinengung könnte auch eine Derekrutierung erythrozytenperfundierter Kapillaren bedingen. Der in beiden Gruppen auf gleichem Niveau liegende kapillare Perfusionsindex CPI belegt jedoch, dass keine ischämieinduzierte Veränderungen der Dichte der erythrozytenperfundierten Kapillaren vorliegt. Eine rein mechanische Retention der Thrombozyten als Ursache der in Alveolarkapillaren ortständig beobachteten Zellen ist daher unwahrscheinlich.

KUHNLE et al. beschreiben nach I/R eine gesteigerte Retention von Leukozyten in Alveolarkapillaren. Die Autoren dieser Arbeit postulieren eine mechanische Retention dieser Zellen auf Grund postischämisch reduzierter Kapillardurchmesser und einer verringerten Deformabilität der aktivierten Leukozyten. Möglicher Mediator dieses *stiffening* der Leukozyten könnte die Freisetzung von Endothelinen sein. Im Rahmen postischämischer Endothelzellschädigung, etwa durch reaktive Sauerstoffspezies können Endotheline vermehrt freigesetzt werden (17). Aktivierte Thrombozyten ihrerseits induzieren eine Freisetzung von Endothelinen auch aus unstimuliertem Endothel (21). Diese vasoaktiven Polypeptide besitzen eine leukozytenaktivierende Wirkung. Insbesondere das bevorzugt pulmonal exprimierte Endothelin-1 (ET-1) aktiviert Leukozyten und verringert deren Verformbarkeit (173). So konnten HELSET und LINDAL zeigen, dass die Infusion von ET-1 in die Lungenstrombahn sowohl zur Sequestration von Leukozyten als auch von Thrombozyten führt (76). Die Präsenz einer gesteigerten Anzahl von Leukozyten in den Alveolarkapillaren bietet demnach den aktivierten Thrombozyten durch Interaktion mit den Leukozyten unabhängig von den Oberflächeneigenschaften der Endothelzellen die Möglichkeit, ortständig zu werden. Da bereits ein einzelner aktivierter Thrombozyt für die Aktivierung und Rekrutierung weiterer Leukozyten ausreichend ist, kann sich dieser Prozess selbst perpetuieren (166).

Auch in Alveolarkapillaren konnte die nach I/R gesteigerte Thrombozytenretention durch Inhalation von Stickstoffmonoxid wirkungsvoll unterdrückt werden. Dabei hat iNO keinen Einfluss auf mikrohämodynamische Parameter wie die Erythrozytenfließgeschwindigkeit oder die kapilläre Perfusion. Seine Wirkung stellt also keinesfalls einen hämodynamischen Effekt dar, sondern ist in der Modulation adhäsiver und rheologischer Eigenschaften von Thrombozyten und Leukozyten zu suchen.

Auf den Einfluss von NO auf die Adhäsivität von Thrombozyten wurde bereits eingegangen. Darüber hinaus besitzt Stickstoffmonoxid, auch *per inhalationem* zugeführt, antiadhäsive Wirkung auf Leukozyten nach I/R und moduliert deren Interaktion mit Thrombozyten. So konnte gezeigt werden, dass inhaliertes NO selbst in Gefäßprovinzen distal der Lunge die postischämische Leukozyten-Endothelzell-Interaktion unterdrückt (52). Als Mechanismus wird hier eine Inhibition der endothelialen Synthese von *platelet activating factor*, einem starken Leukozytenstimulus, durch NO angeführt. Stickstoffmonoxid greift darüber hinaus auch in die leukozytenaktivierende Wirkung von Endothelinen ein. Von mehreren Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, daß die Gabe von FK 409, einem NO-Donator, die Konzentration von ET-1 reduziert, ein Effekt, der von einer verringerten Leukozytenadhärenz begleitet wurde (188;190;191).

Unabhängig vom exakten Mechanismus der alveolären Retention von Thrombozyten und der potenten inhibitorischen Wirkung von iNO kommt dieser Beobachtung unter therapeutischen Gesichtspunkten große Bedeutung zu. Da die hier sequestrierten Zelle die in Venolen adhären Zellen in ihrer Anzahl um ein Vielfaches übertreffen, tragen sie auch quantitativ zur Hauptlast an freien Radikalen sowie zur Freisetzung von proinflammatorischen, vasokonstringierenden und fibrosierenden Mediatoren bei. Dass gerade dieser Zellpool durch iNO drastisch reduziert werden kann, zeigt die potentielle therapeutische Bedeutung dieses Pharmakons.

### 4.3 Klinische Implikationen der Ergebnisse

Die Inhalation von Stickstoffmonoxid kann die Adhärenz aktivierter Thrombozyten wie auch die Adhärenz von Thrombozyten am postischämischen Endothel wirksam unterdrücken. Unter Berücksichtigung der potentiellen Rolle von Thrombozyten an der Entstehung und Aggravierung eines akuten Lungenschadens könnte die Inhibition dieser Interaktion mit dem Endothel positiv in den Krankheitsverlauf bei Patienten mit bestimmten Risikokonstellationen eingreifen.

#### 4.3.1 Inhaliertes Stickoxid zur Prävention des akuten Lungenversagens

Die Entstehung eines *acute respiratory distress syndrom* (ARDS) verläuft typischerweise in drei Phasen: Dem *Initialstadium*, dem durch Ödementwicklung gekennzeichneten *exsudativen Stadium* und dem durch progredienten fibrotischen Umbau gekennzeichnetem *proliferativen Stadium*. Gerade im ersten Stadium kommt es zur Initiierung und Verstärkung inflammatorischer zellulärer Interaktionen in der pulmonalen Mikrozirkulation. Während die vital bedrohliche Störung des Gasaustausches in den späteren ARDS-Phasen eine invasive Beatmung erfordert (die ihrerseits im Sinne eines beatmungsassoziierten Lungenschadens die Inflammation verstärken und unterhalten kann), könnte die gezielte Inhibition der proinflammatorischen zellulären Interaktionen in der Initialphase die Progression zu den folgenden Stadien verhindern oder zumindest attenuieren.

Die Modulation der pulmonalen Thrombozytenkinetik hätte somit im Sinn unserer Studie ihren Stellenwert nicht als Therapieoption des bereits manifesten Lungenschadens, sondern als frühzeitig einzusetzende prophylaktische Maßnahme, um die Entstehung eines manifesten Lungenversagens noch im Initialstadium zu verhindern. Essentiell ist hierfür die Identifikation von Situationen, in deren Folge sich ein akuter Lungenschaden oder ein ARDS entwickeln können.

## Risikofaktoren für die Entstehung eines akuten Lungenversagens

Mehr als ein Drittel aller an einem ARDS erkrankten Patienten weisen ein septisches Krankheitsbild als prädisponierende Grunderkrankung auf. In diesem Kollektiv war eine akute Pneumonie die häufigste Ätiologie des ARDS (102). Eine hohe Inzidenz des ARDS findet sich darüber hinaus bei Patienten nach Massivtransfusion und Polytrauma. (89). Eine Übersicht über weitere Faktoren gibt die Tab. 13 .

<b>Primär pulmonale Auslöser</b>	<b>Primär extrapulmonale Auslöser</b>
Pneumonie	Sepsis
Inhalationstrauma	Massivtransfusion
Lungenkontusion	Schock
Aspiration	Polytrauma
	Pankreatitis
	Leberzirrhose

**Tab. 13: Risikofaktoren für die Entstehung eines ARDS (nach (19;89;102))**

Der Stellenwert und die Notwendigkeit einer präventiven Therapie im Rahmen von Risikokonstellationen für ein ARDS werden bei Betrachtung der Mortalität des ARDS evident. In einer Studie von HUDSON et al. beträgt die Mortalität von traumatisierten Patienten in der Gruppe ohne Entwicklung eines ARDS 13 %. Die Gruppe dagegen, die ein ARDS entwickelt, zeigt dagegen eine Sterblichkeit von 59 %. Für septische Patienten können die Autoren ebenfalls einen ausgeprägten Anstieg der Mortalität zeigen, der jedoch trotz der *a priori* hohen Mortalität einer Sepsis immer noch 20% (49% vs. 69%) beträgt (89).

Derzeit steht kein sicheres prädiktives Instrument zur Verfügung, das es ermöglicht, die Progression eines akuten Lungenschadens ( $p_aO_2/FiO_2$  200-300 mmHg) in ein akutes Lungenversagen ( $p_aO_2/FiO_2 < 200$  mmHg) vorherzusagen (19;168). Fraglich ist jedoch, ob die Anwendung einer Therapie, die auf die Modulation proinflammatorischer Interaktionen abzielt, selbst zu diesem frühen Zeitpunkt noch den inflammatorischen *circulus vitiosus* der pulmonalen Schädigung unterbrechen kann. Idealerweise könnte die Applikation von

inhalierem Stickstoffmonoxid also noch vor der Notwendigkeit der invasiven Beatmung – mit dem Ziel, sie gar nicht erforderlich werden zu lassen – erfolgen. So kann Stickstoffmonoxid sowohl über nasale Kanülen wie auch im Rahmen der nichtinvasiven Beatmung sicher appliziert werden (100;208). Zur Überprüfung der Wirksamkeit dieses Therapieansatzes sind künftige kontrollierte klinische Studien erforderlich.

#### 4.3.2 Einsatz von iNO im Rahmen der Lungentransplantation

Die Beatmung unter Zusatz von NO zum Atemgas erfolgt während operativer Versorgung und anschließender Intensivtherapie im Rahmen der Lungentransplantation zur Reduktion der pulmonalarteriellen Hypertonie, der damit verbundenen Rechtsherzbelastung sowie zur Korrektur einer Hypoxämie aufgrund gestörter Ventilations-Perfusions-Anpassung. Besondere Bedeutung kann der Inhalation von NO darüber hinaus im Zusammenhang mit der Prävention eines Reperfusionsschadens zukommen, da dieser kritische Bedeutung für die Funktion des Transplantates auch im Langzeitverlauf besitzt: FISER et al. konnten zeigen, dass ein Reperfusionsschaden für die Entstehung der Bronchiolitis obliterans prädisponiert (48). Berücksichtigt man den Beitrag der Thrombozyten zum *oxidative burst* und proinflammatorischen Mechanismen in der Reperusionsphase, sowie die von uns gezeigte Inhibition der thrombozytären Adhärenz in der pulmonalen Zirkulation, so kann dies den positiven Einfluss von inhalierem NO sowohl für die verbesserte frühe und auch späte Transplantatfunktion mit erklären (30;32;213)

## 5. Zusammenfassung

Thrombozyten sind an proinflammatorischen zellulären Interaktionen im Rahmen eines akuten Lungenversagens (ARDS) beteiligt. Über die Interaktion mit Leukozyten, Endothelzellen sowie mit Fibroblasten und Myozyten können sie dieses Krankheitsbild wesentlich aggravieren. Die Inhibition der Adhärenz von Thrombozyten am pulmonalen Endothel könnte daher möglicherweise günstig in den Verlauf eines ARDS eingreifen. Als Kandidat für eine gezielt pulmonale Hemmung der Thrombozytenadhärenz kommt das Gas Stickstoffmonoxid (NO) in Betracht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss inhalierten Stickstoffmonoxids (iNO) auf die Kinetik von Thrombozyten in der pulmonalen Mikrozirkulation zu zeigen. *Weißer Neuseeländer Kaninchen* erhielten in Narkose ein thorakales Fenster implantiert. Arterieller und pulmonalarterieller Blutdruck wurden kontinuierlich, Herzzeitvolumen, Blutgase und peripheres Blutbild diskontinuierlich gemessen. Nach Reinjektion autologer, fluoreszierender Erythrozyten und Thrombozyten konnten diese Zellen in der Mikrozirkulation mittels Aufricht-Videomikroskopie visualisiert werden. Nach Versuche wurden aus den Videoaufzeichnungen die Parameter der Mikrohämodynamik und der Thrombozytenkinetik ermittelt.

In einer separaten Studie wurde der Einfluss von iNO auf die Kinetik *in vitro* thrombinaktivierter Thrombozyten untersucht.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung ergeben folgende Aussagen:

1. Unstimulierte Thrombozyten interagieren nur gering mit dem pulmonalen Endothel.
2. Die *in vitro* Stimulation von Thrombozyten induziert eine ausgeprägte Adhärenz am venulären Endothel sowie eine ausgeprägte Retention von Thrombozyten in Alveolarkapillaren ohne makro- und mikrohämodynamische Veränderungen zu bewirken.
3. Die Inhalation von Stickstoffmonoxid unterdrückt diese Adhärenz aktivierter Thrombozyten, dabei zeigen sich keine Unterschiede der mikrohämodynamischen Parameter zwischen den Versuchsgruppen.

In einer weiteren Studie wurden sowohl der Einfluss pulmonaler Ischämie/Reperfusion (I/R), wie auch der Einfluss von iNO nach pulmonaler I/R, auf die Adhärenz von Thrombozyten untersucht.

Hierbei ergaben sich folgende wesentliche Ergebnisse:

1. Pulmonale I/R induziert eine ausgeprägte Retention von Thrombozyten in Alveolarkapillaren.
2. Die Beatmung unter Zusatz von NO zum Atemgas während der Reperfusionsphase konnte die Retention von Thrombozyten wirkungsvoll unterdrücken.
3. Die mikrohämodynamischen Parameter unterschieden sich nicht zwischen den Versuchsgruppen.

Mit dieser Studie konnte erstmals *in vivo* gezeigt werden, das I/R der Lunge eine massive Retention von Thrombozyten in der pulmonalen Mikrozirkulation auslöst.

Aus den Ergebnissen dieser beiden Studien ergeben sich somit folgende Schlussfolgerungen:

Inhaliertes Stickstoffmonoxid unterdrückt in der pulmonalen Mikrozirkulation die Adhärenz aktivierter Thrombozyten und auch die Adhärenz von Thrombozyten am postischämischen alveolären und venulären Endothel. Da diese Befunde nicht durch mikrohämodynamische Veränderungen bedingt sind, muss ein direkter Einfluss von iNO auf die Adhärenzeigenschaften sowohl des Endothels wie auch der Thrombozyten angenommen werden.

Weiterführende, experimentelle wie klinische Untersuchungen sollten darauf abzielen, die exakten Mechanismen unserer Beobachtungen zu klären und den Stellenwert von Stickstoffmonoxid in der Prävention des Akuten Lungenversagens festlegen zu können.



## 6. Literatur

- (1) Adrie C, Bloch KD, Moreno PR et al. Inhaled nitric oxide increases coronary artery patency after thrombolysis. *Circulation* 1996; 94(8):1919-1926.
- (2) Al Mehdi AB, Song C, Tozawa K, Fisher AB. Ca<sup>2+</sup>- and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent nitric oxide generation in lung endothelial cells in situ with ischemia. *J Biol Chem* 2000; 275(51):39807-39810.
- (3) Al Mehdi AB, Zhao G, Dodia C et al. Endothelial NADPH oxidase as the source of oxidants in lungs exposed to ischemia or high K<sup>+</sup>. *Circ Res* 1998; 83(7):730-737.
- (4) Al Mehdi AB, Zhao G, Fisher AB. ATP-independent membrane depolarization with ischemia in the oxygen-ventilated isolated rat lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 18(5):653-661.
- (5) Albert J, Norman M, Wallen NH, Frostell C, Hjemdahl P. Inhaled nitric oxide does not influence bleeding time or platelet function in healthy volunteers. *Eur J Clin Invest* 1999; 29(11):953-959.
- (6) Andre P, Denis CV, Ware J et al. Platelets adhere to and translocate on von Willebrand factor presented by endothelium in stimulated veins. *Blood* 2000; 96(10):3322-3328.
- (7) Baatz H, Steinbauer M, Harris AG, Krombach F. Kinetics of white blood cell staining by intravascular administration of rhodamine 6G. *Int J Microcirc Clin Exp* 1995; 15(2):85-91.
- (8) Barr AJ, Brass LF, Manning DR. Reconstitution of receptors and GTP-binding regulatory proteins (G proteins) in Sf9 cells. A direct evaluation of selectivity in receptor G protein coupling. *J Biol Chem* 1997; 272(4):2223-2229.
- (9) Berger R. Quantitative Videomikroskopie der Lungenmikrozirkulation unter positiver Druckbeatmung und alveolärer Hypoxie. Med.Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München 1989 .
- (10) Berger R, Goetz AE, Conzen PF, Brendel W. FITC-Markierte Erythrozyten: Verformbarkeit in-vitro und Rezirkulation in vivo. 9.Jahrestagung der Gesellschaft für Mikrozirkulation e.V., Kurzmanuskripte 173-179 . 1985.
- (11) Beumer S, IJsseldijk MJ, de Groot PG, Sixma JJ. Platelet adhesion to fibronectin in flow: dependence on surface concentration and shear rate, role of platelet membrane glycoproteins GP IIb/IIIa and VLA-5, and inhibition by heparin. *Blood* 1994; 84(11):3724-3733.

- (12) Bevilacqua MP, Gimbrone MA, Jr. Inducible endothelial functions in inflammation and coagulation. *Semin Thromb Hemost* 1987; 13(4):425-433.
- (13) Blanch L, Joseph D, Fernandez R et al. Hemodynamic and gas exchange responses to inhalation of nitric oxide in patients with the acute respiratory distress syndrome and in hypoxemic patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Intensive Care Med* 1997; 23(1):51-57.
- (14) Body SC. Platelet activation and interactions with the microvasculature. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996; 27 Suppl 1:S13-S25.
- (15) Bone RC, Francis PB, Pierce AK. Intravascular coagulation associated with the adult respiratory distress syndrome. *Am J Med* 1976; 61(5):585-589.
- (16) Boogaerts MA, Yamada O, Jacob HS, Moldow CF. Enhancement of granulocyte-endothelial cell adherence and granulocyte-induced cytotoxicity by platelet release products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982; 79(22):7019-7023.
- (17) Bouthillier L, Vincent R, Goegan P et al. Acute effects of inhaled urban particles and ozone: lung morphology, macrophage activity, and plasma endothelin-1. *Am J Pathol* 1998; 153(6):1873-1884.
- (18) Bowers RE, Ellis EF, Brigham KL, Oates JA. Effects of prostaglandin cyclic endoperoxides on the lung circulation of unanesthetized sheep. *J Clin Invest* 1979; 63(1):131-137.
- (19) Brun-Buisson C, Minelli C, Bertolini G et al. Epidemiology and outcome of acute lung injury in European intensive care units. Results from the ALIVE study. *Intensive Care Med* 2004; 30(1):51-61.
- (20) Bund M, Struber M, Heine J et al. Effect of lung allograft ischaemia duration on postreperfusion graft function and postoperative course. *Thorac Cardiovasc Surg* 1998; 46(2):93-96.
- (21) Bustos M, Saadi S, Platt JL. Platelet-mediated activation of endothelial cells: implications for the pathogenesis of transplant rejection. *Transplantation* 2001; 72(3):509-515.
- (22) Bysani GK, Kennedy TP, Ky N, Rao NV, Blaze CA, Hoidal JR. Role of cytochrome P-450 in reperfusion injury of the rabbit lung. *J Clin Invest* 1990; 86(5):1434-1441.
- (23) Caccese D, Pratico D, Ghiselli A et al. Superoxide anion and hydroxyl radical release by collagen-induced platelet aggregation--role of arachidonic acid metabolism. *Thromb Haemost* 2000; 83(3):485-490.
- (24) Capen RL, Graham RL, Godbey PS et al. Comparison of subpleural and interior pulmonary capillary diameters in dog. *FASEB J* 1993;(1):A541.

- (25) Centers for Disease Control. Recommendations for occupational safety and health standards. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 1988; 37(Suppl. 7).
- (26) Cerwinka WH, Cooper D, Kriegelstein CF, Ross CR, McCord JM, Granger DN. Superoxide mediates endotoxin-induced platelet-endothelial cell adhesion in intestinal venules. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 284(2):H535-H541.
- (27) Coates G, Nahmias C, Thind A. Platelets and leukocytes in the lungs after acute hypobaric hypoxia. *J Appl Physiol* 1983; 55(5):1536-1541.
- (28) Colombat M, Castier Y, Leseche G et al. Early expression of adhesion molecules after lung transplantation: Evidence for a role of aggregated P-selectin-positive platelets in human primary graft failure. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 2004; 23(9):1087-1092.
- (29) Connolly TM, Condra C, Feng DM et al. Species variability in platelet and other cellular responsiveness to thrombin receptor-derived peptides. *Thromb Haemost* 1994; 72(4):627-633.
- (30) Cornfield DN, Milla CE, Haddad IY, Barbato JE, Park SJ. Safety of inhaled nitric oxide after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2003; 22(8):903-907.
- (31) D'Angelo E, Heisler N, Agostoni E. Acid-base balance of pleural liquid in dogs. *Respir Physiol* 1979; 37(2):137-149.
- (32) Date H, Triantafyllou AN, Trulock EP, Pohl MS, Cooper JD, Patterson GA. Inhaled nitric oxide reduces human lung allograft dysfunction. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996; 111(5):913-919.
- (33) Davidson D, Barefield ES, Kattwinkel J et al. Inhaled nitric oxide for the early treatment of persistent pulmonary hypertension of the term newborn: a randomized, double-masked, placebo-controlled, dose-response, multicenter study. The I-NO/PPHN Study Group. *Pediatrics* 1998; 101(3 Pt 1):325-334.
- (34) De Candia E, De Cristofaro R, Landolfi R. Thrombin-induced platelet activation is inhibited by high- and low-molecular-weight heparin. *Circulation* 1999; 99(25):3308-3314.
- (35) DeFouw DO, Shumko JZ. Pulmonary microcirculation: Differences in endothelia of subpleura and alveolar capillaries. *Microvasc Res* 1986; 32:348-358.
- (36) Deuel TF, Huang JS. Platelet-derived growth factor. Structure, function, and roles in normal and transformed cells. *J Clin Invest* 1984; 74(3):669-676.
- (37) Deuel TF, Senior RM, Chang D, Griffin GL, Heinrikson RL, Kaiser ET. Platelet factor 4 is chemotactic for neutrophils and monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78(7):4584-4587.

- (38) Doerschuk CM, Downey GP, Doherty DE et al. Leukocyte and platelet margination within microvasculature of rabbit lungs. *J Appl Physiol* 1990; 68(5):1956-1961.
- (39) Eckstein EC, Bilsker DL, Waters CM, Kippenhan JS, Tilles AW. Transport of platelets in flowing blood. *Ann N Y Acad Sci* 1987; 516:442-452.
- (40) Eichhorn ME, Ney L, Massberg S, Goetz AE. Platelet Kinetics in the Pulmonary Microcirculation in vivo Assessed by Intravital Microscopy. *J Vasc Res* 2002; 39(4):330-339.
- (41) Evans MJ, Stephens RJ, Cabral LJ, Freeman G. Cell renewal in the lungs of rats exposed to low levels of NO<sub>2</sub>. *Arch Environ Health* 1972; 24(3):180-188.
- (42) Fabel H, Wettengel R, Tollner D. [Readsorption of nitrogen, oxygen and carbon dioxide in pleural tissue]. *Respiration* 1972; 29(3):229-233.
- (43) Fähraeus R. Die Strömungsverhältnisse und die Verteilung der Blutzellen im Gefäßsystem. *Klin Wschr* 7, 100-106. 1928.
- (44) Fegler G. Measurement of cardiac output in anesthetized animals by a thermo-dilution method. *Q.J.Exp.Physiol* 39, 153-164. 1954.
- (45) Feuerhake F, Fuchsl G, Bals R, Welsch U. Expression of inducible cell adhesion molecules in the normal human lung: immunohistochemical study of their distribution in pulmonary blood vessels. *Histochem Cell Biol* 1998; 110(4):387-394.
- (46) Finer NN, Barrington KJ. Nitric oxide therapy for the newborn infant. *Semin Perinatol* 2000; 24(1):59-65.
- (47) Fischer S, Cassivi SD, Xavier AM et al. Cell death in human lung transplantation: apoptosis induction in human lungs during ischemia and after transplantation. *Ann Surg* 2000; 231(3):424-431.
- (48) Fiser SM, Tribble CG, Long SM et al. Ischemia-reperfusion injury after lung transplantation increases risk of late bronchiolitis obliterans syndrome. *Ann Thorac Surg* 2002; 73(4):1041-1047.
- (49) Fisher AB, Dodia C. Lung as a model for evaluation of critical intracellular PO<sub>2</sub> and PCO<sub>2</sub>. *Am J Physiol* 1981; 241(1):E47-E50.
- (50) Fishman AP, Fisher AB, Geiger SR. Pulmonary circulation. *Handbook of Physiology*. Bethesda: American Physiological Society, 2003: 93-165.

- (51) Fowler AA, Hamman RF, Zerbe GO, Benson KN, Hyers TM. Adult respiratory distress syndrome. Prognosis after onset. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132(3):472-478.
- (52) Fox-Robichaud A, Payne D, Kubes P. Inhaled NO reaches distal vasculatures to inhibit endothelium-but not leukocyte-dependent cell adhesion. *Am J Physiol* 1999; 277(6):L1224-L1231.
- (53) Frenette PS, Denis CV, Weiss L et al. P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *J Exp Med* 2000; 191(8):1413-1422.
- (54) Fujimoto Y., Tagano S., Ogawa K., Sakuma S., Fujita T. Comparison of the effects of nitric oxide and peroxynitrite on the 12-lipoxygenase and cyclo-oxygenase metabolism of arachidonic acid in rabbit platelets. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids* 59, 95-100. 1998.
- (55) Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J* 1989; 3(9):2007-2018.
- (56) Furie B, Furie BC. The molecular basis of platelet and endothelial cell interaction with neutrophils and monocytes: Role of P-Selectin and the P-Selectin ligand, PSGL-1. *Thromb.Haemost.* 74, 224-228. 1995.
- (57) Gabrielian ES, Amroian EA. [Effect of CO<sub>2</sub> on thrombocyte aggregation in the cat]. *Biull Eksp Biol Med* 1984; 97(4):391-393.
- (58) Gandossi E, Lunven C, Gauffeny C, Roome NO, Berry CN. Platelet aggregation induced in vitro by rabbit plasma clot-associated thrombin, and its inhibition by thrombin inhibitors. *Thromb Haemost* 1998; 80(5):840-844.
- (59) Garat C, Jayr C, Eddahibi S, Laffon M, Meignan M, Adnot S. Effects of inhaled nitric oxide or inhibition of endogenous nitric oxide formation on hyperoxic lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155(6):1957-1964.
- (60) George TN, Johnson KJ, Bates JN, Segar JL. The effect of inhaled nitric oxide therapy on bleeding time and platelet aggregation in neonates. *J Pediatr* 1998; 132(4):731-734.
- (61) Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B et al. Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(5):2311-2315.
- (62) Gimbrone MA, Jr., Brock AF, Schafer AI. Leukotriene B<sub>4</sub> stimulates polymorphonuclear leukocyte adhesion to cultured vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1984; 74(4):1552-1555.

- (63) Goetz AE. Quantitative Mikrozirkulationsanalyse im amelanotischen Hamstermelanom A-Mel-3. Med.Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, 1987 .
- (64) Goldstein DJ, Dean DA, Smerling A, Oz MC, Burkhoff D, Dickstein ML. Inhaled nitric oxide is not a negative inotropic agent in a porcine model of pulmonary hypertension. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997; 114(3):461-466.
- (65) Goldstein IM, Malmsten CL, Kindahl H et al. Thromboxane generation by human peripheral blood polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med* 1978; 148(3):787-792.
- (66) Gries A, Bode C, Peter K, Herr A, Böhler H, Motsch J et al. Inhaled nitric oxide inhibits human platelet aggregation, P-selectin expression, and fibrinogen binding in vitro and in vivo. *Circulation* 1998; 97(15):1481-1487.
- (67) Groom AC. Microvascular transit of normal, immature and altered red blood cells in spleen versus skeletal muscle. In: *Erythrocyte mechanics and blood flow*. Hrsg.: Cokelet GR, Meiselman HJ, Brooks DE, New York: A.R.Liss, Inc., 1980: 229-259.
- (68) Guntheroth WG, Luchtel DL, Kawabori I. Pulmonary microcirculation: tubules rather than sheet and post. *J Appl Physiol* 53, 510-515. 1982.
- (69) Gutmann FD, Murthy VS, Wojciechowski MT, Wurm RM, Edzards RA. Transient pulmonary platelet sequestration during endotoxemia in dogs. *Circ Shock* 1987; 21(3):185-195.
- (70) Halbrugge M, Walter U. Purification of a vasodilator-regulated phosphoprotein from human platelets. *Eur J Biochem* 1989; 185(1):41-50.
- (71) Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B. Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975; 72(8):2994-2998.
- (72) Harris AG, Sinitsina I, Messmer K. Intravital fluorescence microscopy and phototoxicity: effects on leukocytes. *Eur J Med Res* 2002; 7(3):117-124.
- (73) Hayward CS, Kalnins WV, Rogers P, Feneley MP, Macdonald PS, Kelly RP. Effect of inhaled nitric oxide on normal human left ventricular function. *J Am Coll Cardiol* 1997; 30(1):49-56.
- (74) Hechtman HB, Lonergan EA, Shepro D. Platelet and leukocyte lung interactions in patients with respiratory failure. *Surgery* 1978; 83(2):155-163.
- (75) Hechtman HB, Lonergan EA, Staunton HP, Dennis RC, Shepro D. Pulmonary entrapment of platelets during acute respiratory failure. *Surgery* 1978; 83(3):277-283.

- (76) Helset E, Lindal S, Olsen R, Myklebust R, Jorgensen L. Endothelin-1 causes sequential trapping of platelets and neutrophils in pulmonary microcirculation in rats. *Am J Physiol* 1996; 271(4 Pt 1):L538-L546.
- (77) Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Müller-Berghaus G et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998; 391(6667):591-594.
- (78) Herrmann KS. Lipoxygenase products: leukotrienes C4, D4, A4's breakdown products and 12-HPETE influence platelet aggregation in vivo. *Prostaglandins* 1985; 29(3):459-465.
- (79) Herrmann KS, Seuter F. Platelet aggregation in arterioles of the hamster cheek pouch and in heart transplants: its tissue-dependent influencibility by acetylsalicylic acid and nafazatrom. *Haemostasis* 1984; 14(3):281-287.
- (80) Hill JD, Ratliff JL, Parrott JC et al. Pulmonary pathology in acute respiratory insufficiency: lung biopsy as a diagnostic tool. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1976; 71(1):64-71.
- (81) Hill RN, Shibel EM, Spragg RG, Moser KM. Adult respiratory distress syndrome: early predictors of mortality. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 1975; 21:199-205.
- (82) Hirafuji M, Nezu A, Shinoda H, Minami M. Involvement of platelet cyclic GMP but not cyclic AMP suppression in leukocyte-dependent platelet adhesion to endothelial cells induced by platelet-activating factor in vitro. *Br J Pharmacol* 1996; 117(2):299-304.
- (83) Hogman M, Frostell C, Arnberg H, Sandhagen B, Hedenstierna G. Prolonged bleeding time during nitric oxide inhalation in the rabbit. *Acta Physiol Scand* 1994; 151(1):125-129.
- (84) Horgan MJ, Fenton JW, Malik AB. Alpha-thrombin-induced pulmonary vasoconstriction. *J Appl Physiol* 1987; 63(5):1993-2000.
- (85) Horie Y, Wolf R, Anderson DC, Granger DN. Nitric oxide modulates gut ischemia-reperfusion-induced P-selectin expression in murine liver. *Am J Physiol* 1998; 275(2 Pt 2):H520-H526.
- (86) Horstrup K, Jablonka B, Honig-Liedl P, Just M, Kochsiek K, Walter U. Phosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at Ser157 in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition. *Eur J Biochem* 1994; 225(1):21-27.
- (87) Hu H, Varon D, Hjendahl P, Savion N, Schulman S, Li N. Platelet-leukocyte aggregation under shear stress: differential involvement of selectins and integrins. *Thromb Haemost* 2003; 90(4):679-687.

- (88) Huang YT, Ghio AJ, Nozik-Grayck E, Piantadosi CA. Vascular release of nonheme iron in perfused rabbit lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 280(3):L474-L481.
- (89) Hudson LD, Milberg JA, Anardi D, Maunder RJ. Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151(2 Pt 1):293-301.
- (90) Hughes PE, Pfaff M. Integrin affinity modulation. *Trends Cell Biol* 1998; 8(9):359-364.
- (91) Hung DT, Wong YH, Vu TK, Coughlin SR. The cloned platelet thrombin receptor couples to at least two distinct effectors to stimulate phosphoinositide hydrolysis and inhibit adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 1992; 267(29):20831-20834.
- (92) Imanaka H, Hess D, Kirmse M et al. Inaccuracies of nitric oxide delivery systems during adult mechanical ventilation. *Anesthesiology* 1997; 86(3):676-688.
- (93) Janicek MJ, Van den Abbeele AD, Hollenberg NK, Kassis AI, Holman BL, Tumeh SS. Platelet activation and aggregation after endothelial injury. Assessment with indium-111-labeled platelets and angiography. *Invest Radiol* 1990; 25(9):988-993.
- (94) Kaplan AP, Joseph K, Silverberg M. Pathways for bradykinin formation and inflammatory disease. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109(2):195-209.
- (95) Karadogan I, Undar L. Automated plateletpheresis does not cause an increase in platelet activation in volunteer donors. *Ther Apher* 1997; 1(2):174-177.
- (96) Kaur S, Cortiella J, Vacanti CA. Diffusion of nitrous oxide into the pleural cavity. *Br J Anaesth* 2001; 87(6):894-896.
- (97) Kelly RF. Current strategies in lung preservation. *J Lab Clin Med* 2000; 136(6):427-440.
- (98) Khandoga A, Biberthaler P, Enders G et al. P-selectin mediates platelet-endothelial cell interactions and reperfusion injury in the mouse liver in vivo. *Shock* 2002; 18(6):529-535.
- (99) Kim WG, Lee BH, Seo JW. Light and electron microscopic analyses for ischaemia-reperfusion lung injury in an ovine cardiopulmonary bypass model. *Perfusion* 2001; 16(3):207-214.
- (100) Kinsella JP, Parker TA, Ivy DD, Abman SH. Noninvasive delivery of inhaled nitric oxide therapy for late pulmonary hypertension in newborn infants with congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr* 2003; 142(4):397-401.

- (101) Klages B, Brandt U, Simon MI, Schultz G, Offermanns S. Activation of G12/G13 results in shape change and Rho/Rho-kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in mouse platelets. *J Cell Biol* 1999; 144(4):745-754.
- (102) Knaus WA, Sun X, Hakim RB, Wagner DP. Evaluation of definitions for adult respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150(2):311-317.
- (103) Koike K, Yamamoto Y, Hori Y, Ono T. Group IIA phospholipase A2 mediates lung injury in intestinal ischemia-reperfusion. *Ann Surg* 2000; 232(1):90-97.
- (104) Kokura S, Yoshida N, Yoshikawa T. Anoxia/reoxygenation-induced leukocyte-endothelial cell interactions1, 2. *Free Radical Biology and Medicine* 2002; 33(4):427-432.
- (105) Kozek-Langenecker SA, Mohammad SF, Masaki T, Kamerath C, Cheung AK. The effects of heparin, protamine, and heparinase 1 on platelets in vitro using whole blood flow cytometry. *Anesth Analg* 2000; 90(4):808-812.
- (106) Kuebler WM. In-vivo Analyse der Leukozyten-Kinetik in der pulmonalen Mikrozirkulation. *Med.Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München* 1997 .
- (107) Kuebler WM, Kuhnle GE, Groh J, Goetz AE. Leukocyte kinetics in pulmonary microcirculation: intravital fluorescence microscopic study. *J Appl Physiol* 1994; 76(1):65-71.
- (108) Kuhnle GE. Das Mikrogefäßsystem der Lunge: Netzwerkarchitektur und Mikrohemodynamik arteriöler Netzwerke der Kaninchenlunge unter verschiedenen alveolären Drucken. *Med.Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München* 1993 .
- (109) Kuhnle GE, Groh J, Leipfinger FH, Kuebler WM, Goetz AE. Quantitative analysis of network architecture, and microhemodynamics in arteriolar vessel trees of the ventilated rabbit lung. *Int J Microcirc Clin Exp* 1993; 12(3):313-324.
- (110) Kuhnle GE, Leipfinger FH, Goetz AE. Measurement of microhemodynamics in the ventilated rabbit lung by intravital fluorescence microscopy. *J Appl Physiol* 1993; 74(3):1462-1471.
- (111) Kuhnle GE, Reichenspurner H, Lange T et al. Microhemodynamics and leukocyte sequestration after pulmonary ischemia and reperfusion in rabbits. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998; 115(4):937-944.
- (112) Laffey JG, Engelberts D, Kavanagh BP. Buffering hypercapnic acidosis worsens acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161(1):141-146.
- (113) Laffey JG, Kavanagh BP. Biological effects of hypercapnia. *Intensive Care Med* 2000; 26(1):133-138.

- (114) Lee KC, Cho YL, Lee SY. Reperfusion pulmonary edema after pulmonary endarterectomy. *Acta Anaesthesiol Sin* 2001; 39(2):97-101.
- (115) Lehr HA, Leunig M, Menger MD, Nolte D, Messmer K. Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. *Am J Pathol* 1993; 143(4):1055-1062.
- (116) Leo R, Pratico D, Iuliano L et al. Platelet activation by superoxide anion and hydroxyl radicals intrinsically generated by platelets that had undergone anoxia and then reoxygenated. *Circulation* 1997; 95(4):885-891.
- (117) Ley K, Gaehtgens P. Endothelial, not hemodynamic, differences are responsible for preferential leukocyte rolling in rat mesenteric venules. *Circ Res* 1991; 69(4):1034-1041.
- (118) Ley K, Pries AR, Gaehtgens P. Preferential distribution of leukocytes in rat mesentery microvessel networks. *Pflügers Arch* 1988; 412(1-2):93-100.
- (119) Liao J, Li H, Qi H. [Effect of inhaled nitric oxide on endotoxin induced acute lung injury in rabbit]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 1996; 19(4):202-205.
- (120) Lindberg L, Rydgren G. Production of nitrogen dioxide during nitric oxide therapy using the Servo Ventilator 300 during volume-controlled ventilation. *Acta Anaesthesiol Scand* 1999; 43(3):289-294.
- (121) Lindberg L, Rydgren G, Larsson A, Olsson SG, Nordstrom L. A delivery system for inhalation of nitric oxide evaluated with chemiluminescence, electrochemical fuel cells, and capnography. *Crit Care Med* 1997; 25(1):190-196.
- (122) Liu M, Tremblay L, Cassivi SD et al. Alterations of nitric oxide synthase expression and activity during rat lung transplantation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 278(5):L1071-L1081.
- (123) Lu YT, Chen PG, Liu SF. Time course of lung ischemia-reperfusion-induced ICAM-1 expression and its role in ischemia-reperfusion lung injury. *J Appl Physiol* 2002; 93(2):620-628.
- (124) Luh SP, Tsai CC, Shau WY et al. The effects of inhaled nitric oxide, gabexate mesilate, and retrograde flush in the lung graft from non-heart beating minipig donors. *Transplantation* 2000; 69(10):2019-2027.
- (125) Maclouf J, de Lacroix BF, Borgeat P. Stimulation of leukotriene biosynthesis in human blood leukocytes by platelet-derived 12-hydroperoxy-icosatetraenoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982; 79(19):6042-6046.
- (126) Maclouf J, Fruteau dL, Borgeat P. Effects of 12-hydroxy- and 12-hydroperoxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic acids on the synthesis of 5-hydroxy-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid and leukotriene B<sub>4</sub> in human blood leukocytes. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 1983; 11:159-162.

- (127) Malmros C, Blomquist S, Dahm P, Martensson L, Thorne J. Nitric oxide inhalation decreases pulmonary platelet and neutrophil sequestration during extracorporeal circulation in the pig. *Crit Care Med* 1996; 24(5):845-849.
- (128) Marcus AJ, Broekman MJ, Safier LB et al. Formation of leukotrienes and other hydroxy acids during platelet-neutrophil interactions in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 109(1):130-137.
- (129) Martin BA, Dahlby R, Nicholls I, Hogg JC. Platelet sequestration in lung with hemorrhagic shock and reinfusion in dogs. *J Appl Physiol* 1981; 50(6):1306-1312.
- (130) Massberg S, Eisenmenger S, Enders G, Krombach F, Messmer K. Quantitative analysis of small intestinal microcirculation in the mouse. *Res Exp Med (Berl)* 1998; 198(1):23-35.
- (131) Massberg S, Enders G, Leiderer R et al. Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. *Blood* 1998; 92(2):507-515.
- (132) Massberg S, Enders G, Matos FC et al. Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo. *Blood* 1999; 94(11):3829-3838.
- (133) Massoudy P, Zahler S, Becker BF, Braun SL, Barankay A, Meisner H. Evidence for inflammatory responses of the lungs during coronary artery bypass grafting with cardiopulmonary bypass. *Chest* 2001; 119(1):31-36.
- (134) Massoudy P, Zahler S, Becker BF et al. Significant leukocyte and platelet retention during pulmonary passage after declamping of the aorta in CABG patients. *Eur J Med Res* 1999; 4(5):178-182.
- (135) 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(1):92-99.
- (136) McGoon MD, Vanhoutte PM. Aggregating platelets contract isolated canine pulmonary arteries by releasing 5-hydroxytryptamine. *J Clin Invest* 1984; 74(3):828-833.
- (137) McLaughlin RF, Tyler WS, Canada RO. A study of subgross pulmonary anatomy in various mammals. *J Am Med Assoc* 1961; 175:149-158.
- (138) Mellgren K, Mellgren G, Lundin S, Wennmalm A, Wadenvik H. Effect of nitric oxide gas on platelets during open heart operations. *Ann Thorac Surg* 1998; 65(5):1335-1341.
- (139) Michelson AD, Benoit SE, Furman MI et al. Effects of nitric oxide/EDRF on platelet surface glycoproteins. *Am J Physiol* 1996; 270(5 Pt 2):H1640-H1648.

- (140) Midorikawa J, Maehara K, Yaoita H et al. Continuous observation of superoxide generation in an in-situ ischemia-reperfusion rat lung model. *Jpn Circ J* 2001; 65(3):207-212.
- (141) Minuz P, Andrioli G, Degan M et al. The F2-isoprostane 8-epiprostaglandin F2alpha increases platelet adhesion and reduces the antiadhesive and antiaggregatory effects of NO. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18(8):1248-1256.
- (142) Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329(27):2002-2012.
- (143) Moore TM, Khimenko P, Adkins WK, Miyasaka M, Taylor AE. Adhesion molecules contribute to ischemia and reperfusion-induced injury in the isolated rat lung. *J Appl Physiol* 1995; 78(6):2245-2252.
- (144) Morgan BC, Church SC, Guntherroth WG. Hypoxic constriction of pulmonary artery and vein in intact dogs. *J Appl Physiol* 1968; 25:356-361.
- (145) Müller B, Schäfer H, Barth P, von Wichert P. Lung surfactant components in bronchoalveolar lavage after inhalation of NO<sub>2</sub> as markers of altered surfactant metabolism. *Lung* 1994; 172(2):61-72.
- (146) Murakami S, Bacha EA, Herve P et al. Prevention of reperfusion injury by inhaled nitric oxide in lungs harvested from non-heart-beating donors. Paris-Sud University Lung Transplantation Group. *Ann Thorac Surg* 1996; 62(6):1632-1638.
- (147) Murakami S, Bacha EA, Herve P et al. Inhaled nitric oxide and pentoxifylline in rat lung transplantation from non-heart-beating donors. The Paris-Sud University Lung Transplantation Group. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997; 113(5):821-829.
- (148) Nakashima S, Tohmatsu T, Hattori H, Okano Y, Nozawa Y. Inhibitory action of cyclic GMP on secretion, polyphosphoinositide hydrolysis and calcium mobilization in thrombin-stimulated human platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 135(3):1099-1104.
- (149) Ney L, Kemming G, Kuebler WM, Sckell A, Goetz AE. Dosage of inhaled nitric oxide: a simple method for experimental studies. *Res Exp Med (Berl)* 1999; 199(3):121-128.
- (150) Nolte D, Bayer M, Lehr HA et al. Attenuation of postischemic microvascular disturbances in striated muscle by hyperosmolar saline dextran. *Am J Physiol* 1992; 263(5 Pt 2):H1411-H1416.
- (151) Offermanns S, Laugwitz KL, Spicher K, Schultz G. G proteins of the G12 family are activated via thromboxane A<sub>2</sub> and thrombin receptors in human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(2):504-508.
- (152) Offermanns S, Toombs CF, Hu YH, Simon MI. Defective platelet activation in G alpha(q)-deficient mice. *Nature* 1997; 389(6647):183-186.

- (153) Osterud B. Tissue factor expression by monocytes: regulation and pathophysiological roles. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1998; 9 Suppl 1:S9-14.
- (154) Osterud B. Tissue factor expression in monocytes: in vitro compared to ex vivo. *Thromb Haemost* 2000; 84(3):521-522.
- (155) oude Egbrink MG, Tangelder GJ, Slaaf DW, Weijmer-van Velzen S, Reneman RS. Influence of hypercapnia and hypoxia on rabbit platelet aggregation. *Thromb Res* 1990; 57(6):863-875.
- (156) Overholser KA, Bhattacharya AJ, Staub NC. Pressure in the isolated, perfused dog lung: Comparison between theory and measurement. *Microvasc Res* 1982; 23:67-76.
- (157) Pepke-Zaba J, Higenbottam TW, Dinh-Xuan AT, Stone D, Wallwork J. Inhaled nitric oxide as a cause of selective pulmonary vasodilatation in pulmonary hypertension. *Lancet* 1991; 338(8776):1173-1174.
- (158) Persson MG, Kalzen H, Gustafsson LE. Oxygen or low concentrations of nitric oxide reverse pulmonary vasoconstriction induced by nitric oxide synthesis inhibition in rabbits. *Acta Physiol Scand* 1994; 150(4):405-411.
- (159) Pietra GG, Ruttner JR, Wust W, Glinz W. The lung after trauma and shock--fine structure of the alveolar-capillary barrier in 23 autopsies. *J Trauma* 1981; 21(6):454-462.
- (160) Plewes JL, Olszowka AJ, Farhi LE. Transpleural diffusion of carbon dioxide. *Respir Physiol* 1981; 44(2):187-194.
- (161) Pratico D, Pasin M, Barry OP et al. Iron-dependent human platelet activation and hydroxyl radical formation: involvement of protein kinase C. *Circulation* 1999; 99(24):3118-3124.
- (162) Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P, Gross JF. Blood flow in microvascular networks. Experiments and simulation. *Circ Res* 1990; 67(4):826-834.
- (163) Puybasset L, Rouby JJ, Mourgeon E et al. Inhaled nitric oxide in acute respiratory failure: dose-response curves. *Intensive Care Med* 1994; 20(5):319-327.
- (164) Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 1987; 2(8567):1057-1058.
- (165) Ramamurthi A, Lewis RS. Influence of agonist, shear rate, and perfusion time on nitric oxide inhibition of platelet deposition. *Ann Biomed Eng* 2000; 28(2):174-181.

- (166) Redl H, Hammerschmidt DE, Schlag G. Augmentation by platelets of granulocyte aggregation in response to chemotaxins: studies utilizing an improved cell preparation technique. *Blood* 1983; 61(1):125-131.
- (167) Rossaint R, Falke KJ, Lopez F, Slama K, Pison U, Zapol WM. Inhaled Nitric Oxide for the Adult Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med* 1993; 328(6):399-405.
- (168) Rubenfeld GD, Christie JD. The epidemiologist in the intensive care unit. *Intensive Care Med* 2004; 30(1):4-6.
- (169) Sachs L. *Angewandte Statistik. Anwendung Statistischer Methoden.* 1992. Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest, Springer Verlag.
- (170) Salas E, Moro MA, Askew S et al. Comparative pharmacology of analogues of S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine on human platelets. *Br J Pharmacol* 1994; 112(4):1071-1076.
- (171) Sarelius IH, Duling BR. Direct measurement of microvessel hematocrit, red cell flux, velocity, and transit time. *Am J Physiol* 1982; 243(6):H1018-H1026.
- (172) Sarelius IH, McKinlay SM. Statistical constraints on microvascular measurements using fluorescent erythrocytes. *Am J Physiol* 1985; 248(4 Pt 2):H577-H586.
- (173) Sato Y, Hogg JC, English D, van Eeden SF. Endothelin-1 changes polymorphonuclear leukocytes' deformability and CD11b expression and promotes their retention in the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 23(3):404-410.
- (174) Sato Y, Walley KR, Klut ME et al. Nitric oxide reduces the sequestration of polymorphonuclear leukocytes in lung by changing deformability and CD18 expression. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159(5 Pt 1):1469-1476.
- (175) Shibata K, Cregg N, Engelberts D, Takeuchi A, Fedorko L, Kavanagh BP. Hypercapnic acidosis may attenuate acute lung injury by inhibition of endogenous xanthine oxidase. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158(5 Pt 1):1578-1584.
- (176) Shimada Y, Kutsumi Y, Nishio H et al. Role of platelets in myocardial ischemia-reperfusion injury in dogs. *Jpn Circ J* 1997; 61(3):241-248.
- (177) Sicker T, Wuchold F, Kaiser B, Glusa E. Systemic vascular effects of thrombin and thrombin receptor activating peptide in rats. *Thromb Res* 2001; 101(6):467-475.
- (178) Singhal S, Henderson R, Horsfield K, Harding K, Cumming G. Morphometry of the human pulmonary arterial tree. *Circ Res* 1973; 33(2):190-197.

- (179) Sirs JA. The flow of human blood through capillary tubes. *J Physiol* 1991; 442:569-583.
- (180) Skimming JW, Blanch PB, Banner MJ. Behavior of nitric oxide infused at constant flow rates directly into a breathing circuit during controlled mechanical ventilation. *Crit Care Med* 1997; 25(8):1410-1416.
- (181) Skimming JW, Cassin S, Blanch PB. Nitric oxide administration using constant-flow ventilation. *Chest* 1995; 108(4):1065-1072.
- (182) Sokol GM, Van Meurs KP, Wright LL et al. Nitrogen dioxide formation during inhaled nitric oxide therapy. *Clin Chem* 1999; 45(3):382-387.
- (183) Spagnuolo PJ, Ellner JJ, Hassid A, Dunn MJ. Thromboxane A<sub>2</sub> mediates augmented polymorphonuclear leukocyte adhesiveness. *J Clin Invest* 1980; 66(3):406-414.
- (184) Spagnuolo PJ, Ellner JJ, Hassid A, Dunn MJ. Mediation of augmented monocyte adhesiveness by thromboxane. *Inflammation* 1988; 12(1):1-9.
- (185) Sprung CL, Loewenherz JW, Baier H, Hauser MJ. Evidence for increased permeability in reexpansion pulmonary edema. *Am J Med* 1981; 71(3):497-500.
- (186) Sternbergh WC, III, Makhoul RG, Adelman B. Heparin prevents posts ischemic endothelial cell dysfunction by a mechanism independent of its anticoagulant activity. *J Vasc Surg* 1993; 17(2):318-327.
- (187) Stewart GN. Researches on the circulation time and on the influences which offset it. IV. The output of the heart. *J.Physiol.* 22, 159-183. 1897.
- (188) Sunose Y, Takeyoshi I, Ohwada S et al. The effect of FK409-a nitric oxide donor-on canine lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2000; 19(3):298-309.
- (189) Takashima S, Date H, Aoe M, Yamashita M, Andou A, Shimizu N. Effects of inhaled nitric oxide in canine lung transplantation from non-heart-beating donor. *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg* 1998; 46(8):657-663.
- (190) Takeyoshi I, Otani Y, Yoshinari D et al. Beneficial effects of novel nitric oxide donor (FK409) on pulmonary ischemia-reperfusion injury in rats. *J Heart Lung Transplant* 2000; 19(2):185-192.
- (191) Tanahashi Y, Takeyoshi I, Aiba M, Ohwada S, Matsumoto K, Morishita Y. The effects of FK409 on pulmonary ischemia-reperfusion injury in dogs. *Transpl Int* 1999; 12(6):402-407.

- (192) Tangelder GJ, Slaaf DW, Reneman RS. Fluorescent labeling of blood platelets in vivo. *Thromb Res* 1982; 28(6):803-820.
- (193) Tangelder GJ, Teirlinck HC, Slaaf DW, Reneman RS. Distribution of blood platelets flowing in arterioles. *Am J Physiol* 1985; 248(3 Pt 2):H318-H323.
- (194) Taylor SJ, Chae HZ, Rhee SG, Exton JH. Activation of the beta 1 isozyme of phospholipase C by alpha subunits of the Gq class of G proteins. *Nature* 1991; 350(6318):516-518.
- (195) Thabut G, Vinatier I, Stern JB et al. Primary graft failure following lung transplantation: predictive factors of mortality. *Chest* 2002; 121(6):1876-1882.
- (196) Tibballs J, Hochmann M, Carter B, Osborne A. An appraisal of techniques for administration of gaseous nitric oxide. *Anaesth Intensive Care* 1993; 21(6):844-847.
- (197) Tomita Y, Tanahashi N, Tomita M et al. Role of platelet glycoprotein IIb/IIIa in ADP-activated platelet adhesion to aortic endothelial cells in vitro: observation with video-enhanced contrast microscopy. *Clin Hemorheol Microcirc* 2001; 24(1):1-9.
- (198) Totapally BR, Raszynski A, Sussmane J et al. Nitric oxide and nitrogen dioxide concentrations during in vitro high-frequency oscillatory ventilation. *J Crit Care* 1999; 14(3):141-149.
- (199) Vickers JD, Kinlough-Rathbone RL, Mustard JF. Changes in the platelet phosphoinositides during the first minute after stimulation of washed rabbit platelets with thrombin. *Biochem J* 1984; 219(1):25-31.
- (200) Vollmar B, Slotta JE, Nickels RM, Wenzel E, Menger MD. Comparative analysis of platelet isolation techniques for the in vivo study of the microcirculation. *Microcirculation* 2003; 10(2):143-152.
- (201) Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 1991; 64(6):1057-1068.
- (202) Vural KM, Oz MC. Endothelial adhesivity, pulmonary hemodynamics and nitric oxide synthesis in ischemia-reperfusion. *Eur J Cardiothorac Surg* 2000; 18(3):348-352.
- (203) Wagner Wj, Latham LP. Pulmonary capillary recruitment during airway hypoxia in the dog. *J Appl Physiol* 39, 900-905. 2003. 1975.
- (204) Walter U. Physiological role of cGMP and cGMP-dependent protein kinase in the cardiovascular system. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1989; 113:41-88.

- (205) Weiss DJ, Evanson OA. Detection of activated platelets and platelet-leukocyte aggregates in horses. *Am J Vet Res* 1997; 58(8):823-827.
- (206) Weksler BB, Coupal CE. Platelet-dependent generation of chemotactic activity in serum. *J Exp Med* 1973; 137(6):1419-1430.
- (207) Wessel DL, Adatia I. Clinical applications of inhaled nitric oxide in children with pulmonary hypertension. *Adv Pharmacol* 1995; 34:475-504.
- (208) Wessel DL, Adatia I, Thompson JE, Hickey PR. Delivery and monitoring of inhaled nitric oxide in patients with pulmonary hypertension. *Crit Care Med* 1994; 22(6):930-938.
- (209) Winn R, Harlan J, Nadir B, Harker L, Hildebrandt J. Thromboxane A2 mediates lung vasoconstriction but not permeability after endotoxin. *J Clin Invest* 1983; 72(3):911-918.
- (210) Woldhuis B, Tangelder GJ, Slaaf DW, Reneman RS. Concentration profile of blood platelets differs in arterioles and venules. *Am J Physiol* 1992; 262(4 Pt 2):H1217-H1223.
- (211) Xiao Z, Theroux P, Frojmovic M. Modulation of platelet-neutrophil interaction with pharmacological inhibition of fibrinogen binding to platelet GPIIb/IIIa receptor. *Thromb Haemost* 1999; 81(2):281-285.
- (212) Yamazaki F, Wada H, Aoki M, Inui K, Hitomi S. An evaluation of the tolerance of the autotransplanted canine lung against warm ischemia. *Jpn J Surg* 1989; 19(3):326-333.
- (213) Yoshikawa T, Date H, Yamashita M, Nagahiro I, Aoe M, Shimizu N. Inhaled nitric oxide ameliorates postoperative acute graft dysfunction after living-donor lobar lung transplantation. *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg* 2000; 48(11):742-745.
- (214) Zhao G, Ayene IS, Fisher AB. Role of iron in ischemia-reperfusion oxidative injury of rat lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 16(3):293-299.
- (215) Zhao G, Al Mehdi AB, Fisher AB. Anoxia-reoxygenation versus ischemia in isolated rat lungs. *Am J Physiol* 1997; 273(6):L1112-L1117.
- (216) Zimmerhackl B, Parekh N, Brinkhus H, Steinhausen M. The use of fluorescent labeled erythrocytes for intravital investigation of flow and local hematocrit in glomerular capillaries in the rat. *Int J Microcirc Clin Exp* 1983; 2(2):119-129.
- (217) Zimmerman GA, Elstad MR, Lorant DE et al. Platelet-activating factor (PAF): signalling and adhesion in cell-cell interactions. *Adv Exp Med Biol* 1996; 416:297-304.

- (218) Zwissler B, Kemming G, Habler O et al. Inhaled prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) versus inhaled nitric oxide in adult respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154:1671-1677.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
12-HETE	Hydroxyeicosatetraensäure
Ad [mm <sup>2</sup> ]	Korrigierte Anzahl ortsständiger Thrombozyten in Kapillargebieten
A <sub>Alv</sub>	Fläche des Kapillarareals
Ad	Korrigierte Anzahl ortsständiger Thrombozyten in Arteriolen und Venolen
ADP	Adenosindiphosphat
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrom</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BE	Basenüberschuss
BGA	Blutgasanalyse
cNOS	konstitutive NO-Synthetase
CO	Herzzeitvolumen
CPI	Kapillarer Perfusions-Index
C <sub>T</sub>	Katheterkonstante
CV(x)	Variationskoeffizient von "x"
D	Gefäßdurchmesser
eNOS	endotheliale NO-Synthetase
Ery	Erythrozyten
ET-1	Endothelin-1
FiO <sub>2</sub>	inspiratorische Sauerstoffkonzentration
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
GC-S	lösliche Guanylatcyclyase
GP	Glykoprotein
Hb	Hämoglobin
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Bikarbonatkonzentration
H <sub>D</sub>	Abflußhämatokrit
Hk	Hämatokrit
H <sub>T</sub>	dynamischem Mikrohämatokrit
HZV	Herzzeitvolumen
I/R	Ischämie/Reperfusion
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
iNO	inhaliertes Stickstoffmonoxid

IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
γ	Wandscherrate
L <sub>Alv</sub>	Länge der erythrozytenperfundierten Kapillarstrecke
Leuk	Leukozyten
L <sub>seg</sub>	Länge des untersuchten Gefäßsegmentes
LTB <sub>4</sub>	Leukotrien B <sub>4</sub>
MAP	Mittlerer arterieller Blutdruck
MAP	Mittlerer arterieller Blutdruck
MCV	Mittleres korpuskuläres Volumen
n	Anzahl
NF	<i>nuclear factor</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthetase
n <sub>Thz Alv</sub>	Anzahl in Kapillargebieten ortsständiger Thrombozyten
paCO <sub>2</sub>	Arterieller Kohlendioxidpartialdruck
PAF	<i>platelet activating factor</i>
PAF	Platelet Activating factor
paO <sub>2</sub>	Arterieller Sauerstoffpartialdruck
PAP	Mittlerer pulmonalarterieller Blutdruck
PAR	<i>protease-activated-receptor</i>
p <sub>d</sub>	diastolischer Blutdruck
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PEEP	positiver endexpiratorischer Druck
p <sub>m</sub>	mittlerer Blutdruck
ppm	parts per million
p <sub>s</sub>	systolischer Blutdruck
PSGL	<i>p-selectine glycoproteine ligand</i>
Q	Blutvolumenfluß
R6G	Rhodamin6G
σ <sup>2</sup>	Varianz
SIT	silicone intensified
Thz	Thrombozyten
$\bar{v}_{Thz}$	mittlere Thrombozytenfliessgeschwindigkeit
Thz <sub>Ad</sub>	Anzahl ortständiger Thrombozyten

TRAP	<i>thrombin receptor activating protein</i>
U	Einheiten
$V_{rel}$	Relative Thrombozytenfließgeschwindigkeit
VASP	vasoaktives Polypeptid / <i>vasodilator-stimulated-phosphoprotein</i>
VECAM	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
$v_{Ery}$	Individuelle Erythrozytenfliessgeschwindigkeit
$\bar{v}_{Ery}$	Mittlere Erythrozytenfliessgeschwindigkeit
$v_Q$	Blutfließgeschwindigkeit
$v_{Thz}$	Individuelle Thrombozytenfliessgeschwindigkeit
vWF	Von Willebrand-Faktor

## Danksagung

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

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. A. E. Goetz für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, das in mich gesetzte Vertrauen und für seine fortwährende Unterstützung, auch weit über die Belange dieser Arbeit hinaus, sehr herzlich.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. L. Ney für seinen persönlichen Einsatz bei der praktischen Durchführung der Versuche, für seine aktive Mithilfe und seine kompetenten fachlichen Ratschläge, die wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben. Ohne die freundschaftliche Zusammenarbeit hätte die Durchführung dieser Promotion nicht halb so viel Spaß bereitet. In einzigartiger Weise ist es ihm gelungen, seine Begeisterung für das Wechselspiel zwischen Forschung und klinischer Tätigkeit an mich weiter zu geben.

Ich danke Herrn Dr. med. M. Eichhorn für die Einführung in die Technik der Thrombozyten-separation und *in vitro*-Fluoreszenzmarkierung.

Ich danke den Tierpflegern des Instituts für Chirurgische Forschung, im Besonderen Herrn Otto Frisch und Frau Brigitte Blount, die sich in vorbildlicher Weise um die Versorgung und Pflege der Versuchstiere kümmerten.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank meiner Mutter für den Rückhalt und die fortwährende Unterstützung während der Zeit des Studiums und der Durchführung dieser Promotion.

Last, but not least, danke ich herzlich Frau Dr. med. S. Steinhauser für Ihr Durchhaltevermögen und Ihre Unterstützung in den vergangenen Jahren.



# Lebenslauf

**Andreas Bayer**

**Geburtsdatum** 18.09.1973 in München

**Eltern** Ingeborg Bayer  
Josef Bayer ( U 09.04.1990)

**Schulbildung** 1980-1984 Grundschule, Pullach b. München  
1984-1991 Gymnasium Fürstenried, München  
1991- 1993 Klenze-Gymnasium, München  
Juli 1993 Allgemeine Hochschulreife

**Berufsausbildung** 1993 - 1995 Ausbildung zum Forstwirt  
(Bayerischen Staatsforstverwaltung)

**Studium** 1995 –2003 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-  
Maximilians-Universität, München.  
Im letzten Studienjahr Ableistung des Praktischen Jahres an der  
Klinik für Anaesthesiologie am Klinikum der Universität  
München (Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. K. Peter), an der I.  
Medizinische Klinik Krankenhaus München Schwabing  
(Direktor: Prof. Dr. M. Nerl) und am Regionalspital Visp (CH)  
(Chefarzt Dr. M. Arigoni)

**Studienabschluss:** 21.05.2003

**Berufliche Tätigkeit:** 01.07.2003 – 30.09.2004 Arzt im Praktikum an der Klinik für  
Anaesthesiologie (Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. Peter) am  
Klinikum der Universität München. Approbation als Arzt am  
1.10.2004, seitdem als Assistenzarzt an der Klinik für  
Anaesthesiologie am Klinikum der Universität München.  
Mitgliedschaft in der Deutschen Gesellschaft für Anästhesie und  
Intensivmedizin und in der Österreichischen Gesellschaft für  
Alpin- und Höhenmedizin.