Aus dem
Institut für Chirurgische Forschung
Ludwig-Maximilians-Universität München
Kommissarischer Leiter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. K. Meßmer
Jetziger Leiter: Prof. Dr. med. A.Baethmann

THROMBOZYTEN-ENDOTHELZELL-INTERAKTIONEN WÄHREND ISCHÄMIE UND REPERFUSION DES DÜNNDARMES

-

EINE IN VIVO ANALYSE AN DER MAUS

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

vorgelegt von
Simone Julia Eisenmenger
aus München/Bayern
2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. K. Meßmer
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. U. Pohl
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. W. Siess Priv. Doz. Dr. med. M. Bilzer
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. S. Massberg
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	03.07.2003

Inhaltsverzeichnis:

1 EINLEITUNG 1

2 ZIEL DER STUDIE 10

3 MATERIAL UND METHODEN 12

3.1 Vorbemerkung 12

3.2 Modelletablierung 12
3.2.1 Versuchstiere 12
3.2.2 Narkose 12
3.2.3 Lagerung und makrohämodynamisches Monitoring 13
3.2.4 Chirurgische Technik 13
3.2.5 Thrombozytenpräparation 16
3.2.6 Durchflußzytometrie 16
3.2.7 Intravitalmikroskopie 18
3.2.7.1 Technisches Setup 18
3.2.7.2 Mikrozirkulatorische Parameter 20
3.2.7.2.1 Leukozyten-/Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen 20
3.2.7.2.2 Funktionelle Kapillardichte 21
3.2.8 Versuchsprotokoll 22
3.2.8.1 Versuchsgruppen 22
3.2.8.2 Versuchsablauf 23

3.3 Die Rolle von P-Selektin für die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen 24
3.3.1 Allgemeiner Teil 24
3.3.2 Versuchstiere 24
3.3.3 Antikörper 25
3.3.4 Mikrochirurgische Technik 25
3.3.5 Parameter 26
3.3.5.1 Intravitale Videofluoreszenzmikroskopie. 26
3.3.6 Histologie 27
3.3.6.1 Immunhistologie 27
3.3.6.2 Elektronenmikrokopie 27
3.3.7 Versuchsprotokoll 27
3.3.7.1 Versuchsgruppen 27
3.3.7.2 Versuchsablauf 30

3.4 Der Einfluss von Stickstoffmonoxid auf die postischämischen Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen *in vivo* 31
3.4.1 Allgemeiner Teil 31
3.4.2 Versuchstiere 31
3.4.3 Reagenzien 31
3.4.4 Mikrochirurgische Technik 32
3.4.5 Thrombozytenseparation 32
3.4.6 Parameter 33
3.4.6.1 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie 33
3.4.7 Versuchsprotokoll 33
3.4.7.1 Versuchsgruppen 33

3.4.7.2 Versuchsablauf 35

4 STATISTIK 37

5 ERGEBNISSE 38

5.1 1. Abschnitt: Modelletablierung 38
5.1.1 Makrohämodynamik und Körpertemperatur 38
5.1.1.1 Mittlerer arterieller Blutdruck 38
5.1.1.2 Temperatur 38
5.1.2 Durchflußzytometrie 38
5.1.3 Mikrohämodynamik 41
5.1.3.1 Blutzell-Endothelzell-Interaktionen 41
5.1.3.1.1 Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen 41
5.1.3.1.2 Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen 41
5.1.3.2 Nutritive Perfusion der Mukosa und der glatten Muskulatur 43

5.2 Abschnitt 2: Bedeutung von P-Selektin für die postischämische Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion Mikrozirkulation 46
5.2.1 Mikrohämodynamik 46
5.2.1.1 Sham-Operation 46
5.2.1.1.1 Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen 46
5.2.1.1.2 Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen 46
5.2.1.2 Ischämie/Reperfusion 46
5.2.1.2.1 Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen 46
5.2.1.2.2 Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen 47
5.2.1.3 Bedeutung von P-Selektin für die postischämischen Thrombozyten- und Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen 50
5.2.1.3.1 Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen 50
5.2.1.3.2 Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion 50
5.2.2 Histologie 54
5.2.2.1 Immunhistologie 54
5.2.2.2 Elektronenmikrokopie 54

5.3 Abschnitt 3: Der Einfluss von NO auf die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen 57
5.3.1 Mikrohämodynamik 57
5.3.1.1 Sham-Operation 57
5.3.1.1.1 Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen 57
5.3.1.2 Ischämie/Reperfusion 57
5.3.1.2.1 Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen 57
5.3.1.3 Bedeutung der endogenen NO-Synthese für die postischämische Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion (L-NAME-behandelte Tiere) 57
5.3.1.4 Bedeutung der iNOS für die Regulation der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion nach Ischämie/Reperfusion (iNOS-defiziente Tiere) 58

6 DISKUSSION 63

6.1 Wissenschaftlicher Hintergrund und Zielsetzungen. 63

6.2 Diskussion des Modells (1. Abschnitt: Modelletablierung). 64

6.2.1 Einsatz der intravitalen Videofluoreszenzmikroskopie zur Analyse der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen. ... 64
6.2.2 Untersuchung der Parameter in der Mikrozirkulation des Dünndarmes. ... 65
6.2.3 Mikrohämodynamische Parameter. ... 65
6.2.4 Thrombozytenseparation. ... 67
6.2.5 Einsatz der Maus als Versuchstier. ... 68
6.2.6 Abschließende Beurteilung des Modells. ... 68

6.3 2. Abschnitt: Bedeutung von P-Selektin für die postischämische Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion. ... 69
6.3.1 Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen während postischämischer Reperfusion. ... 69
6.3.2 Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen während postischämischer Reperfusion. ... 73
6.3.3 Die Rolle von P-Selektin für die postischämischen Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen. ... 74
6.3.4 Proinflammtorische Funktionen des Thrombozyten – Relevanz für den Ischämie-Reperfusionsschaden. ... 78

6.4 3. Abschnitt: Bedeutung von Stickstoffmonoxid für die Regulation der postischämischen Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion. ... 82
6.4.1 Historischer Hintergrund ... 82
6.4.2 NO-Synthese ... 83
6.4.3 NO-Metabolismus ... 85
6.4.4 Wirkung von NO ... 86
6.4.5 Regulativer Einfluss von NO auf die postischämische Thrombozytenakkumulation in vivo ... 87
6.4.6 Signaltransduktion: zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) ... 89

7 ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNGEN ... 91

8 LITERATUR ... 94

9 DANK ... 120

10 ABKÜRZUNGEN ... 121

11 CURRICULUM VITAE ... 122

1 Einleitung

In seinem 1882 erschienen Artikel „Ueber einen neuen Formbestandteil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und der Blutgerinnung“ formulierte der italienische Pathologe Bizzozero (1846-1891) erstmals schriftlich seine These über eine eigenständige, von den roten und weißen Blutzellen unabhängige dritte Blutzellart, die er Blutplättchen nannte [9]. Zwar hatte man schon zuvor „Donnésche-Kügelchen“ bzw. „Körnchen“ beobachtet, doch waren sie für Zerfallsprodukte von weißen oder roten Blutzellen gehalten worden, die inkonstant nach verschiedenen Stimuli wie chronischen Erkrankungen auftreten und deren Funktion nicht vollständig klar war. Bizzozero konnte mit Hilfe eines Lichtmikroskops und eines Glasspatels, mit dem er den Blutfluß in den Mesenterialgefäßen von Kaninchen und Meerschweinchen verlangsamte, nachweisen, dass die Blutplättchen immer - auch ohne äußeren Einfluss - bei gesunden Tieren vorhanden waren. Im Jahre 1883 wurde erstmals über die wichtige Funktion der Thrombozyten für die Hämostase spekuliert (zitiert nach [28]). Nachfolgend wurden die ersten mit Thrombozytendefekten assoziierten Krankheiten 1918 von Glanzmann und 1948 von Bernand und Soulier beschrieben (zitiert nach [22]). Es kamen weitere Kenntnisse über die Morphologie der Thrombozyten, wie etwa die Beschreibung der Thrombozytenrezeptoren GPIIb/IIIa und GPIb, so wie über neue Funktionen der Blutplättchen hinzu. Auch die Entwicklung neuer Methoden zur Thrombozytenfunktionsdiagnostik konnte wesentlich zur Klärung der Bedeutung von Thrombozyten für die Blutstillung beitragen.

Limitiert die Adhäsion von Thrombozyten und die nachfolgende Thrombozytenaggregation den Blutverlust nach traumatischen Gefäßverletzungen, so hat die Formation von Thrombozytenaggregaten andererseits, vor allem in Zusammenhang mit atherosklerotischen Gefäßveränderungen und deren Komplikationen, einen wesentlichen Anteil an der Gesamtmorbidität und Gesamtmortalität in den westlichen Industrienationen [158-160]. Die häufigste negative Folge der Atherosklerose ist die Organischämie, initiiert durch die Ulzeration einer atherosklerostischen Plaque mit konsekutivem, thrombotischem Verschluss des betroffenen Gefäßes [166] (Abb.-1).

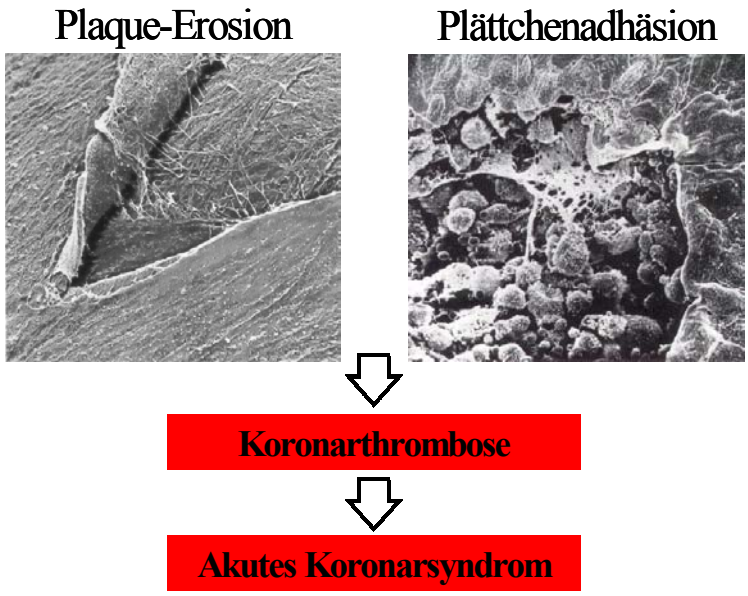


Abb.- 1: Plaqueerosion in einer Arterie ohne und mit Auflagerung von Thrombozyten. Sie ist die häufigste Ursache des akuten Koronarsyndroms (Rasterelekronenmikroskopische Aufnahmen, dankenswerterweise von Prof. Dr. Gawaz, Technische Universität München, zur Verfügung gestellt).

Eine besondere Bedeutung hat dieser Prozess in der koronaren und cerebralen Zirkulation, da sowohl das Gehirn als auch das Herz durch Endgefäße versorgt werden. In Deutschland versterben rund 57.000 Menschen jährlich an cerebralen Insulten bzw. 175.000 an einer myokardialen Minderperfusion (Angaben des statistischen Bundesamtes, Bonn, 1999).

In den letzten Jahren ist es gelungen, verschiedene Methoden zu entwickeln, mit deren Hilfe die Ischämie lebenswichtiger Organe sehr rasch beendet werden kann. Neben der Lyse hat in diesem Zusammenhang vor allem die in der Kardiologie, der Gefäßchirurgie und der interventionellen Radiologie angewandte perkutane transluminale Angioplastie an Bedeutung gewonnen [167]. Die alleinige Therapie der Organischämie hat jedoch in den meisten Fällen keine restitutio ad integrum zur Folge, da auch die Reperfusion selbst zur Manifestation eines Organschadens, dem sog. Reperfusionsschaden, beiträgt.

Das primäre Angriffsziel des Reperfusions-/Reoxygenierungsschadens stellt die Mikrozirkulation des betroffenen Organs dar [40;115;125;126].Wie Untersuchungen aus dem

Institut für Chirurgische Forschung, aber auch anderer Arbeitsgruppen in den vergangenen Jahren zeigen konnten, spielt die Akkumulation von Leukozyten in postkapillaren Venolen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des Ischämie-Reperfusionsschadens (IRS) [71;95]. Leukozyten adhärieren an der postischämischen Endothelzelle, emigrieren in das Interstitium und setzen eine Reihe proinflammatorischer Mediatoren, aber auch Radikale und proteolytische Enzyme frei [95]. Auf diese Weise tragen sie wesentlich zur Entstehung des postischämischen Gewebeschadens bei (Abb.-2).

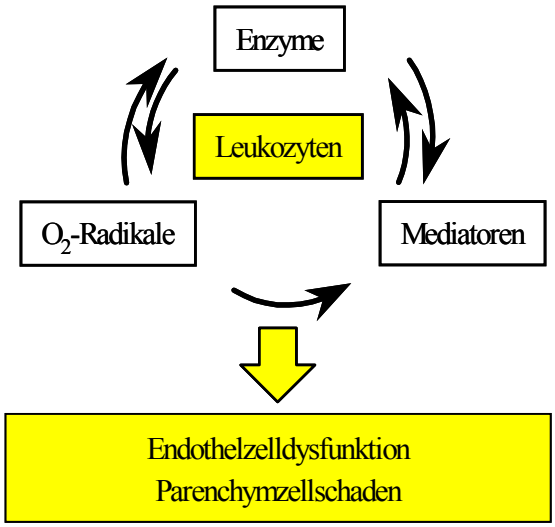


Abb.-2: Schematische Darstellung der zentralen Bedeutung des Leukozyten für den postischämischen Reperfusionsschaden. Leukozyten sezernieren proinflammatorische Mediatoren, Sauerstoffradikale und eine Reihe proteolytischer Enzyme. So tragen sie wesentlich zur Manifestation des postischämischen Reperfusionsschadens bei.

Doch nicht nur Leukozyten akkumulieren während der Reperfusion im postischämischen Gefäßbett. Bereits Ende der 80er-Jahre konnten Hammersen et al. mit Hilfe der Elektronenmikroskopie nachweisen, dass es während der Reperfusionsphase auch zu einer Adhäsion von Thrombozyten in der postischämischen Mikrozirkulation kommt [66] (Abb.-3). Ein Indiz für die kausale Bedeutung der Rekrutierung von Thrombozyten in der reperfundierten Mikrozirkulation für die Manifestation des

Reperfusionsschaden lieferten Kuroda und Mitarbeiter; sie konnten zeigen, dass eine Thrombozyten-Depletion zu einer Reduktion des Ischämie-Reperfusionsschadens des Pankreas und der Leber führt [93;94].

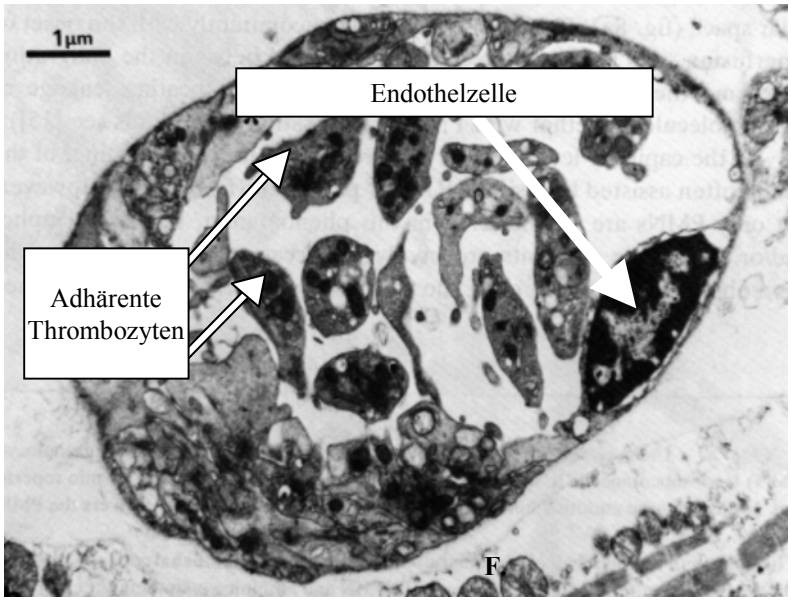


Abb.- 3: Am Endothel ahhärierende Thrombozyten im Skelettmuskel des Hamsters nach 4 h Ischämie und 1,5 h Reperfusion aus Hammersen et al. [15].

Im nachfolgenden soll kurz auf einige wichtige grundsätzliche Charakteristika von Thrombozyten eingegangen werden, die für die Funktion dieser Blutzellen in der Zirkulation entscheidend sind. Interessanterweise verfügen Thrombozyten - trotz ihrer Kernlosigkeit - über Fähigkeiten, die in vielen Aspekten denjenigen der Leukozyten gleich sind. So ist für den Thrombozyt ein dynamisches Zytoskelett charakteristisch. Überschreitet die intrazelluläre Calcium-Konzentration (z.B. im Rahmen einer Thrombozytenaktivierung) eine kritische Schwelle, erfährt der Thrombozyt eine Formveränderung mit Bildung von Pseudopodien. Dieser sog. „shape change“ erfordert Veränderungen der strukturellen Zone des Thrombozyten mit Anreicherung von Aktinfilamenten in den Pseudopodien. Die Formveränderung bewirkt eine Zunahme der

Thrombozytenoberfläche, die eine erhöhte Interaktion mit plasmatischen Komponenten, aber auch mit zellulären Interaktionspartnern ermöglicht [10;55].

Thrombozyten sind in der Lage, eine Reihe proinflammatorischer Mediatoren und Wachstumsfaktoren zu produzieren und im Rahmen der Thrombozytenaktivierung in das umgebende Mikromileu freizusetzen [6;17;31;75;142;190]. Dieser Vorgang wird Sekretion, Freisetzungsreaktion oder Degranulation genannt. Die Verschmelzung von Granula und damit die Freisetzung granulärer Inhaltsstoffe, ist ein ATP- und Calcium-abhängiger Prozess. Prinzipiell besitzt der Thrombozyt drei verschiedene Formen von Granula: dichte Granula, Lysosomen und α–Granula. Für die dichten Granula ist ihre charakteristische elektronenoptische Dichte namensgebend. Sie enthalten eine Reihe von niedermolekularen Mediatoren (ADP, ATP, Calcium, Serotonin), die den Aggregationsvorgang fördern [131]. Die lysosomalen Granula enthalten hydrolytische Enzyme und ähneln den Lysosomen anderer Zellen. Die α-Granula sind zahlenmäßig am häufigsten vorhanden; sie beinhalten eine Reihe von Proteinen, die verschiedenste biologische Funktionen beeinflussen (Adhäsion, Aggregation, Chemotaxis, Proliferation, Inflammation, Koagulation). Neben adhäsiven Proteinen wie Fibrinogen, vWF, GPIIb/IIIa, Vitronektin und Fibronektin sezernieren Thrombozyten Zytokine wie Interleukin (IL) 1β, Chemokine, und Wachstumsfaktoren (Tab.-1) [80].

Dichte Granula	α-Granula	Lysosomen
ATP ADP Ca^{2+} Serotonin Phosphat Guaninnukleotide	**Enzyme** - α_1-Antitrypsin - α_2-Makroglobulin - α_2-Antiplasmin - C1-Esterase-Inhibitor **Adhäsive Proteine** - Fibrinogen - Fibronektin - vWF - Thrombospondin - Vitronektin - GPIIb/IIIa **Wachstumfaktoren** - PDGF - Transforming growth factor-β - Epidermal growth factor - Endothelial cell growth factor **Zytokinähnliche Proteine** - Interleukin-1 - CD40-Ligand - Plättchenfaktor-4 - β-Thromboglobulin **Koagulationsfraktion** - HMWK - Plasminogen - PAI-1 - Faktor V - Faktor XI - Fibrinogen - Protein S	α-Arabinoside β-Galactosidase β-Glucuronidase N-Acetyl-glucosaminidase Elastase Kollagenase Kathepsin

Tab-1: Inhaltsstoffe der unterschiedlichen, thrombozytären Speichergranula.

Über die Freisetzung proinflammatorischer und proliferativer Substanzen könnten Thrombozyten wesentlich zur Entstehung einer Inflammationsreaktion in der postischämischen Mikrozirkulation und damit zur Manifestation des IRS beitragen.

Die Rekrutierung von Thrombozyten in der postischämischen Mikrozirkulation ist jedoch bislang nur wenig charakterisiert. Prinzipiell verfügen Thrombozyten über eine Reihe von membranständigen Adhäsionsmolekülen, die die Adhäsion an Strukturen der subendothelialen Matrix (z.B. nach Gefäßverletzung im Rahmen der primären

Hämostase) vermitteln (Abb.-4). Die extrazelluläre Matrix ist ein Faserwerk aus verschiedenen Komponenten, wie Kollagenen und elastischen Fibrillen, die in ein viskös-elastisches Gel aus Proteoglykanen, Glykoproteinen und Wasser eingebettet sind. Die extrazelluläre Matrix garantiert die biomechanische Stabilität der Gefäße und besteht aus verschiedenen Struktur- und Adhäsionsmolekülen. Hierbei sind vor allem verschiedene Typen von Kollagen, Fibronektin, Laminin, Thrombospondin und von-Willebrand-Faktor (vWF) von Bedeutung. Die Adhäsion der Thrombozyten erfolgt in mehreren Schritten. Über Interaktion des thrombozytären Rezeptors Glykoprotein (GP)Ib-V-IX mit kollagen-immobilisiertem vWF wird der erste Kontakt zirkulierender Thrombozyten mit der subendothelialen Matrix hergestellt (Kontaktphase). Die Interaktion von vWF mit GPIb-V-IX ist charakterisiert durch eine sehr hohe Affinität, welche besonders in Gefäßbereichen mit hoher Scherkraft, wie z.B. im arteriellen Stromgebiet, die Adhäsion der Thrombozyten an die Gefäßwand ermöglicht [29;68;136;161]. Die Bedeutung der Interaktion dieser beiden Rezeptoren für die Hämostase zeigt sich bei Patienten mit angeborenem Funktionsdefekt von vWF (von-Willebrand-Jürgens-Sydrom) oder seines Rezeptors GPIb (Bernand-Soulier-Syndrom). Die Patienten leiden unter einer erhöhten Blutungsneigung. In der nachfolgenden Stabilisierungsphase erfolgt eine Stabilisierung der Plättchadhäsion über weitere membranständige Rezeptoren der Thrombozyten wie GPIIb/IIIa, Fibronektin- und Lamininrezeptoren, die der Rezeptorenfamilie der Integrine zugeordnet werden [11;57;67;72;161;163;169;192]. Insbesondere die Bindung des thrombozytären Kollagenrezeptors an Kollagen führt zur Aktivierung und der bereits oben beschriebenen Formveränderung der adhärenten Thrombozyten. Die auf diesem Weg aktivierten Thrombozyten setzen Mediatoren frei, die sowohl autokrin den Aktivierungsvorgang verstärken, als auch parakrin durch Stimulation noch ruhender Thrombozyten diese aus der Zirkulation rekrutieren und so zur Aggregation mit schon adhärenten Thrombozyten anregen [161;162].

Neben Adhäsionsrezeptoren, die die Thrombozyten-Matrix-Interaktion vermitteln, besitzen Thrombozyten P-Selektin, ein Selektin, sowie PECAM-1, ein zur Familie der Immunglobuline gehörendes Adhäsionsmolekül. Sowohl P-Selektin als auch PECAM-1 lassen sich nicht nur in Thrombozyten, sondern insbesondere auch in Endothelzellen nachweisen. Anders als PECAM-1, welches konstitutiv auf der Endothelzelle und Thrombozytenoberfläche exprimiert wird, liegt P-Selektin unter physiologischen Bedingungen in α-Granula beziehungsweise in Weibel-Palade-Körpern gespeichert vor [11;41;50;192]. Während die Bedeutung von GPIb und GPIIb/IIIa für die Thrombozyten-

Matrix gut definiert ist, ist über die Bedeutung von P-Selektin für die Thrombozyten-Gefäßwand-Interaktion und insbesondere für die Interaktion Thrombozyt - aktiviertes Endothel, bislang nur wenig bekannt.

Endothelzellen spielen eine entscheidende Rolle für die Regulation der Thrombozytenfunktion *in vivo*. Neben einer proadhäsiven / proaggregatorischen Wirkung des Endothels (endotheliale Adhäsionsrezeptoren, vWF, etc.) verfügt die Endothelzelle auch über die Möglichkeit, die Thrombozytenadhäsion inhibitorisch zu beeinflussen. Neben der Produktion von Thrombomodulin und Adenosin durch die Endothelzelle ist das gasförmige, vom Endothel freigesetzte Stickstoffmonoxid *in vitro* einer der potentesten Thrombozyteninhibitoren [7;21;149;150]. So zeigten Michelson und Mitarbeiter, dass NO die durch Thrombin verursachte Expression von P-Selektin, CD63 (lysosomales Protein) und GPIIb/IIIa signifikant reduzieren konnte [86;127]. Auch eine hemmende Wirkung auf die Sekretion der dichten Granula, sowie auf den shape change aktivierter Thrombozyten wurde bereits beschrieben [16;102]. Zusätzlich inhibiert von Endothelzellen gebildetes NO *in vitro* die Adhäsion aktivierter Thrombozyten an kultivierte Endothelzellen. Doch nicht nur Endothelzellen sezernieren NO, auch Thrombozyten sind in der Lage, NO freizusetzen und regulieren auf diesem Wege die homotypische Thrombozyten-Thrombozyten-Interaktion [104;197]

Eine Gruppe von Enzymen, die sog. NO-Synthasen (NOS), sind für die Bildung von NO aus L-Arginin verantwortlich [132]. Drei unterschiedliche NOS sind bislang beschrieben, zwei konstitutiv exprimierte Formen, die erstmals aus neuronalen (nNOS) bzw. Endothelzellen (ecNOS) isoliert wurden, und eine induzierbare NOS (iNOS), die u.a. in Leukozyten nach Stimulation exprimiert wird. Wie bereits erwähnt, bilden auch Thrombozyten NO. Sowohl ecNOS als auch iNOS wird in Plättchen konstitutiv exprimiert [24;120]. Die Bedeutung der endothelialen bzw. der plättcheneigenen NO-Produktion während Ischämie und Reperfusion (I/R) für die postischämische Plättchenadhäsion *in vivo* ist jedoch bislang nicht untersucht.

Auch wenn histologische Untersuchungen eine Rekrutierung von Thrombozyten in der postischämischen Mirozirkulation dokumentierten, sind die Kinetik der Thrombozytenakkumulation und die ihr zugrundeliegenden molekularen Mechanismen bislang nur wenig untersucht. Auch bei der Analyse des Einflusses von NO auf die Thrombozyten-Zell-Interaktionen stützen sich die bisher bekannten Befunde vor allem auf *in vitro* Untersuchungen. Daher waren wir an der Entwicklung und Etablierung eines geeigneten *in vivo* Modells zur Visualisierung und quantitativen Analyse der

Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion während I/R interessiert. Mit diesem sollte dann die Kinetik der postischämischen Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion untersucht werden. Besonderes Augenmerk sollte dabei auf die molekularen Adhäsionsmechanismen und die Rolle des antiadhäsiv wirkenden NO für die Regulation der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion nach I/R gelegt werden.

2 Ziel der Studie

Ziel der Arbeit war es, in einer experimentellen *in vivo* Studie die Kinetik und regulativen Mechanismen der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion während Ischämie-Reperfusion (I/R) zu untersuchen. Zum einen war der zeitliche und örtliche Ablauf der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion (TEI) im Vergleich zu den Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen (LEI) von Interesse. Zum anderen sollten die der Rekrutierung von Thrombozyten in der postischämischen Mikrostrombahn zugrundeliegenden molekularen Mechanismen und die regulativen Funktionen von *NO in vivo* charakterisiert werden.

Im ersten Abschnitt der Studie sollte dazu ein Modell etabliert werden, das die Visualisierung und Quantifizierung von Thrombozyten in der Mikrozirkulation *in vivo* ermöglicht. Um die TEI nach I/R *in vivo* untersuchen zu können, wurde die intravitale Fluoreszenzmikroskopie als Untersuchungsverfahren gewählt. Diese Methode ermöglicht die direkte Darstellung des mikrovaskulären Blutflusses, sowie die quantitative Beurteilung zellulärer Interaktionen in der Mikrozirkulation verschiedener Organe.

Mit Hilfe dieses *in vivo* Modells sollten im Anschluß folgende Fragen geklärt werden:

1.) Welche Art von Interaktion erfolgt zwischen Thrombozyten und Endothel in der Mikrozirkulation?
2.) Wie gestaltet sich der zeitliche Ablauf der TEI? Dieser sollte vor allem mit dem bereits bekannten Verlauf der LEI nach I/R koreliert werden.
3.) Welchen Einfluss hat I/R auf die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen?
4.) Über welche molekularen Mechanismen werden die frühen Interaktionen der Thrombozyten mit dem Endothel nach I/R vermittelt? Hierbei steht vor allem die Klärung der Rolle von P-Selektin im Vordergrund.
5.) Inwieweit spielt NO als Thrombozyteninhibitor bei den TEI nach Ischämie *in vivo* ein Rolle?
6.) Welche der verschiedenen NO-Synthasen sind an der Beeinflussung der Interaktionen beteiligt?

Diesem Konzept folgend, ist die Arbeit in folgende Abschnitte gegliedert.

1.) Etablierung eines Modells zur Visualisierung der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen am Dünndarm der Maus.

2.) Quantifizierung der TEI nach einstündiger Ischämie, sowie nach Inhibition von P-Selektin durch Antikörper. In einem Unterabschnitt sollte die unterschiedliche Rolle von endothelialem und thrombozytärem P-Selektin definiert werden

3.) Untersuchung des Einflusses einer unselektiven NOS-Inhibition durch L-NAME, auf die Interaktionen in der postischämischen Mikrozirkulation. Nachfolgend soll vor allem auf die Bedeutung der iNOS in diesem Prozess eingegangen werden.

3 Material und Methoden

3.1 Vorbemerkung

Alle im folgenden beschriebenen Untersuchungen wurden mit der Genehmigung der zuständigen Behörde der Regierung von Oberbayern in der Zeit vom März 1997 bis zum März 1999 am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Wie bereits erwähnt, existieren nur wenige Untersuchungen zum Verhalten von Thrombozyten in der Mikrozirkulation. Ziel des ersten Abschnitts dieser Arbeit war es daher, ein videofluoreszenzmikroskopisches Modell zu etablieren, welches die Visualisierung und quantitative Analyse der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion (TEI) in der Mikrozirkulation des Dünndarmes der Maus erlaubt und mit dem nachfolgend Untersuchungen zur Kinetik und Mechanismen der TEI nach I/R durchgeführt werden können.

3.2 Modelletablierung

3.2.1 Versuchstiere

Für die im folgenden aufgeführten Untersuchungen wurden weibliche, 5-7 Wochen alte Balb/c Mäuse (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Die Tiere unterlagen einem kontrollierten 12 h Tag-/Nachtzyklus und wurden in Gruppen von zwei bis sechs Mäusen in Käfigen gehalten. Sie hatten freien Zugang zu Wasser und wurden mit Standardnahrung (Ssniff Spezialdiäten, Soest, Deutschland: 18000 I.E./kg Vit A, 1280 I.E./kg Vit D_3, 120 mg/kg Vit. E) gefüttert.

3.2.2 Narkose

Die spontan atmenden Mäuse wurden durch Inhalation eines Isofluran-Lachgas-Gemisches (FiO_2 0,35; 5 Vol % Isofluran für die Induktion der Anästhesie und 1,5 Vol % für den weiteren Verlauf der Untersuchung) anästhesiert. Dieses Protokoll galt sowohl für die eigentlichen Versuchstiere, als auch zur Narkotisierung der für die zur Separation der Thrombozyten benötigten Spendertiere.

3.2.3 Lagerung und makrohämodynamisches Monitoring

Nach der Induktion der Narkose wurden die Tiere in Rückenposition auf einer Heizplatte (Effenberger, München, Deutschland) gelagert, um eine konstante Körpertemperatur zwischen 36,5°C und 37,5°C zu gewährleisten. Zur Registrierung des mittleren arteriellen Blutdruckes (MAP) bzw. zur intravenösen Applikation von fluorochromierten Thrombozyten und Fluoreszenzmarkern wurden die linke A. carotis und die V. jugularis externa freigelegt und mit Polypropylenkathetern (innerer Durchmesser: 0,28 mm; Portex, Lynthe, Kent, England) kanüliert. Die Platzierung der Katheter in die Halsgefäße erfolgt unter Zuhilfenahme eines Leitz Operationsmikroskopes (Leitz, Wetzlar, Deutschland). Der MAP in der A. carotis com. wurde mittels eines an den intraarteriell liegenden Katheter gekoppelten Druckaufnehmers (Viggo-Spectramed, DTX/Plus, Oxnard USA) registriert und auf einen Bildschirmmonitor (Videoskop, Hellige GmbH, Freiburg, Deutschland) übertragen. Aufgrund des geringen Blutvolumens der Maus wurde auf eine regelmäßige Analyse der arteriellen Blutgase (inkl. O_2 und CO_2-Partialdrücke oder pH-Wert) verzichtet. Über den gesamten Zeitraum der Untersuchung erfolgte über die implantierten Katheter eine kontinuierliche Volumensubstitution mit Ringer-Laktat (50 ml/kg/h; Perfusor V, B.Braun, München, Deutschland).

3.2.4 Chirurgische Technik

Nach Kanülierung der Halsgefäße wurde bei den zu untersuchenden Tieren eine transverse Laparotomie durchgeführt. Es folgte die Darstellung eines Segmentes des distalen Jejunums. Das jejunale Segment wurde auf einer mit Kunststoff beschichteten, in Abb.- 5 und 6 dargestellten Plattform ausgelagert und für die spätere videofluoreszenzmikroskopische Untersuchung mit einem Deckglas bedeckt. Um ein Austrocknen des Gewebes zu vermeiden und die Temperatur auf einem Niveau von 37°C konstant zu halten, wurde das ischämische, jejunale Segment kontinuierlich mit körperwarmer Ringer-Laktat Lösung superfundiert. Nach einer Stabilisierungsphase von 10 Minuten erfolgte die intravitalmikroskopische Untersuchung der Mikrozirkulation des ausgelagerten jejunalen Segmentes.

Um die nutritive Perfusion der Mukosa untersuchen zu können, musste die Intravitalmikroskopie von *luminal* erfolgen. Hierzu wurde antimesenterial mit Hilfe einer Mikrokauterpinzette eine ca. 1cm lange Inzision angelegt. Die auf diese Weise

dargestellte Mukosa wurde mit einem Deckglas bedeckt. Die Visualisierung der nutritiven Perfusion der Villi erfolgte nach dem bereits oben beschriebenen Vorgehen. (Abb.-5 und 6).

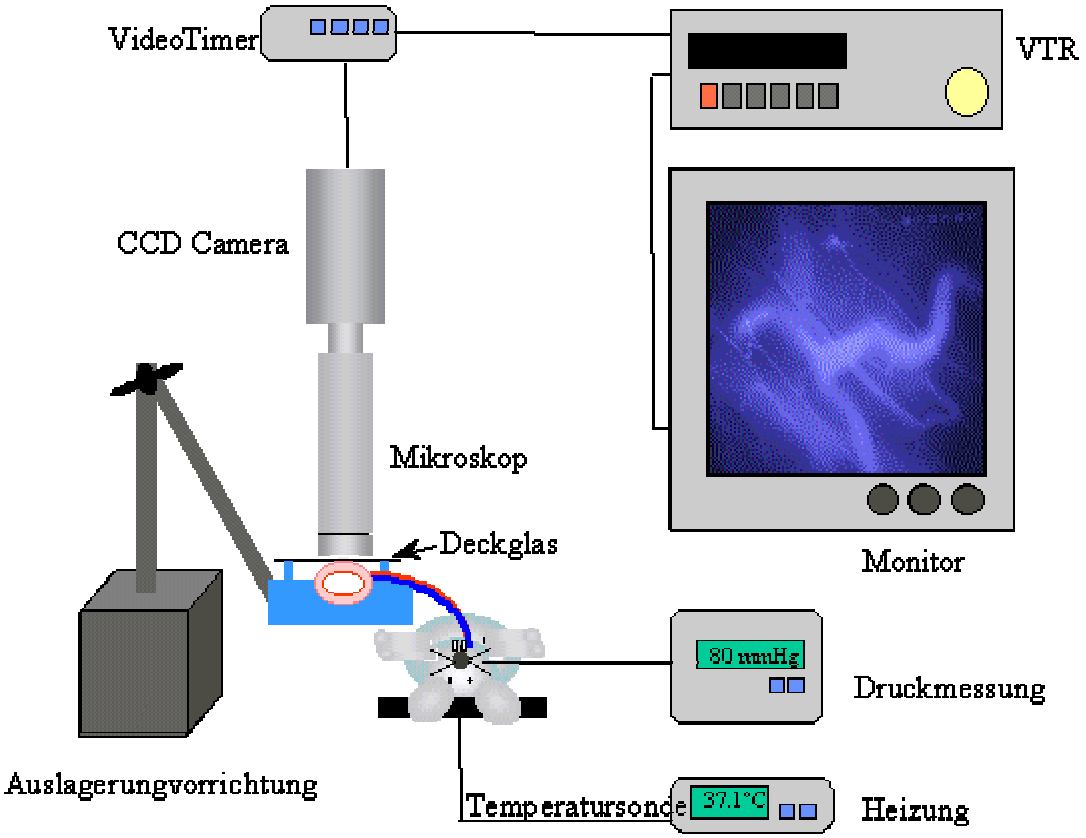


Abb.-5: Schematische Darstellung des technischen Setups der Versuche. Einzelheiten siehe Text.

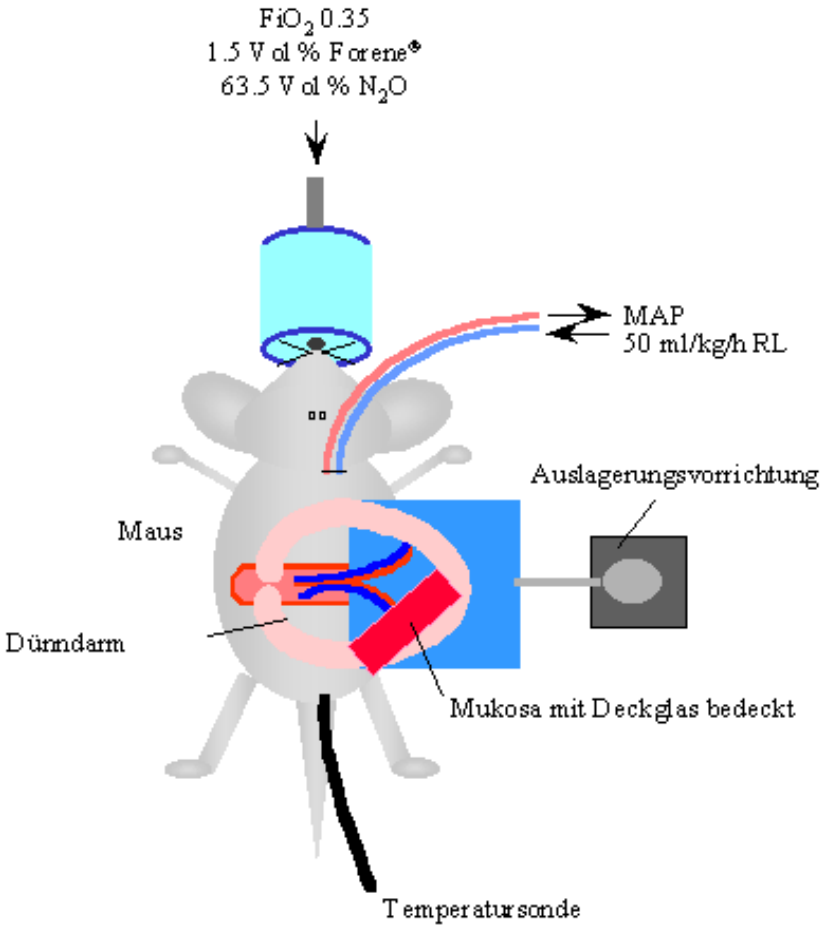


Abb.-6: Schematische Darstellung des technischen Setups der Versuche. Einzelheiten siehe Text.

3.2.5 Thrombozytenpräparation

In Ermangelung eines thrombozyten-spezifischen Fluoreszenzmarkers war es für die *in vivo* Visualisierung der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion erforderlich, Thrombozyten eines syngenen Spendertieres zu separieren und *ex vivo* mit einem Fluorochrom zu beladen. Hierzu wurde (in der Phase der Stabilisierung oder Ischämie des eigentlichen Versuchstieres) ein zweites Tier narkotisiert (Thrombozytenspender). Durch kardiale Punktion wurden den Spendertieren ca. 800µl Vollblut entzogen und in Polypropylenröhrchen aufgenommen und mit 100µl Citrat (Sigma, Deisenhofen, Deutschland), sowie 2 µmol/l PGE_1 (Serva, Heidelberg, Deutschland) und 50 µl Rhodamin-6 G (0,05g/dl, MW 479, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) versetzt. Durch 10 minütige Zentrifugation (Hettrich, Deutschland) der Suspension bei 250 x g und 37°C wurde plättchenreiches Plasma (PRP) hergestellt. Das abpipetierte PRP wurde in 200µl Citrat und 500µl PBS resuspendiert. Durch erneute Zentrifugation mit 2000 x g für 10 Minuten und 37°C erfolgte die Pelletierung der fluorochromierten Thrombozyten. Nach Verwerfung des Überstandes wurde das Thrombozytenpellet vorsichtig in 500µl PBS resuspendiert. Die in der Suspension befindliche Thrombozytenzahl wurde mit Hilfe eines Coulter Counters (Sysmex F-800 Microcell counter; Sysmex, Tokyo, Japan) analysiert. $5x10^8$ mit Rhodamin-6G fluorochromierte Thrombozyten wurden 5min vor Beginn der intravitalmikroskopischen Untersuchungen mittels über den in die V. jugularis platzierten Katheter, i.v. appliziert.

3.2.6 Durchflußzytometrie

Vor Infusion der markierten Thrombozyten erfolgte eine durchflußzytometrische Untersuchung der Thrombozytensuspension. Diese sollte die Reinheit der zu infundierenden Suspension bestätigen und eine Verunreinigung mit Leukozyten ausschließen. Zusätzlich wurde eine Analyse der oberflächlichen P-Selektin Expression durchgeführt, um eine durch den Separationsvorgang verursachte Aktivierung nachweisen zu können. Zur Kontrolle der zur Untersuchung der P-Selektin Expression verwendeten FITC-markierten Ratte-Antimaus-P-Selektin-Antiköper (Pharmingen, Hamburg, Deutschland) kamen fluoreszierende IgG_1 isotypspezifische Kontrollantikörper (Pharmingen) zur Anwendung. Die separierten Thrombozyten wurden mit 5µg/ml des monoklonalen Antikörpers für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine

zweifache Waschung der Zellen mit D-PBS (PAN Systems, Aidenbach, Deutschland). Die Analyse wurde an einem FACSort Durchflußzytometer (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Mit Hilfe eines Datenverarbeitungsprogrammes (Lysis II, Becton Dickinson) wurden die Thrombozyten selektiv auf ihre oberflächengebundene Fluoreszenz analysiert.

3.2.7 Intravitalmikroskopie

3.2.7.1 Technisches Setup

Wie bereits dargestellt, erfolgte die intravitalmikroskopische Untersuchung der Thrombozyten- und Leukozyten-Endothelzell-Interaktion 15 bis 30min nach Auslagerung des distalen Jejunums auf eine dazu konzipierte Plattform. Zur Darstellung der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen wurden die mit Rhodamin-6G fluorochromierten Thrombozyten i.v. infundiert. Zur *in vivo* Visualisierung der Leukozyten erfolgte die intravenöse Gabe von 0.05 ml 0.05% Acridine Orange (MW 302, Merck, Darmstadt, Deutschland). Nach Aufzeichnung der Zell-Zell-Interaktionen wurden 0.05ml 5% Fluoreszein-Isothiozyanat (FITC)-markiertes Dextran (MW 150,000; Sigma, Deisenhofen, Deutschland, 5g/dl) als Plasmamarker zur Visualisierung der nutritiven Perfusion der glatten Muskulatur sowie der Mukosa ebenfalls i.v. appliziert (Abb.-7 und 8).

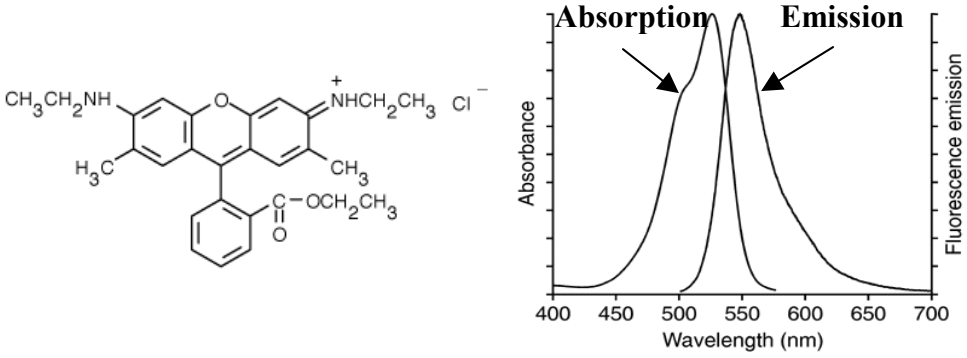


Abb.-7: Rhodamin-6G: Strukturformel und Anregungs- und Emissionsspektrum

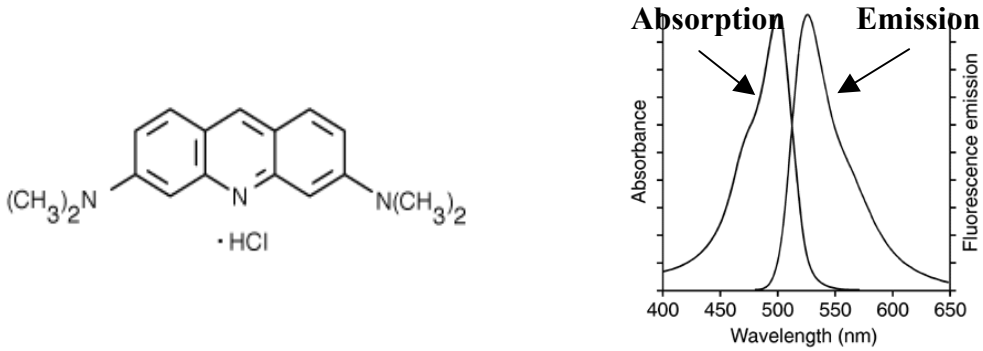


Abb.-8: Acridine-Orange: Chemische Formel und Anregungs- und Emissionsspektrum

Alle videofluoreszenzmikroskopischen Analysen erfolgten in Epiilluminationstechnik an einem modifizierten Leitz Orthoplan Mikroskop mit einer Ploemo-Pak-Lichtquelle (Leitz, Wetzlar, Deutschland) und einer 100 W Quecksilberlampe (HBO, Osram, München, Deutschland). Wir verwendeten $I_{2/3}$ (Anregung: 450-490nm, Emission: >515nm) und N_2 (Anregung: 530-560 nm, Emission: >580) Filterblöcke (Leitz, Wetzlar, Deutschland). Durch Verwendung verschiedener Fluorochrome mit unterschiedlichem Emissionsspektrum konnten durch Wechseln der Filterblöcke die Leukozyten- und Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen in

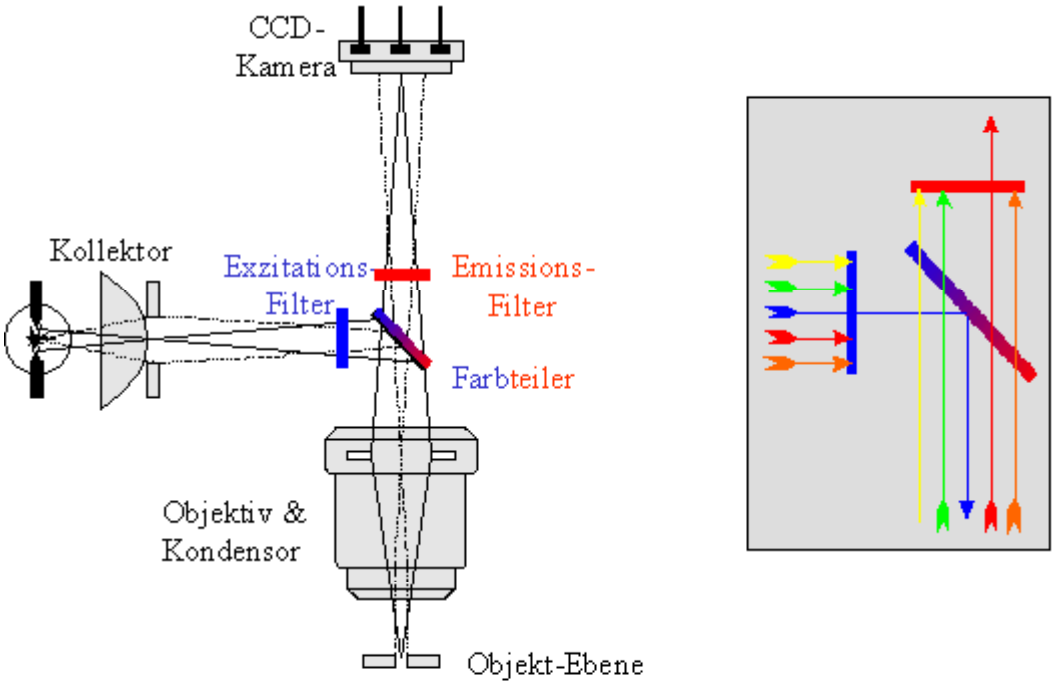


Abb.-9: Aufbau des Intravitalmikroskops

identischen Gefäßsegmenten visualisiert werden (Abb.-9)

Mit einem 10x bzw. 25x Objektiv und unter Berücksichtigung der Vergrößerung des Bildschirms (PVM-1442 QM, Diagonale 33cm, Sony, München, Deutschland) kann insgesamt eine 180-fache bzw. eine 450-fache Vergrößerung erzielt werden. Die Mikrozirkulation wurde mittels einer charge-coupled device (CCD)-Videokamera (FK 6990, Cohu, Perspective Measurments, San Diego, USA) auf den Bildschirm übermittelt und auf Videokassetten gespeichert, um später off-line an einer computergestützten Auswerteeinheit (CAP IMAGE, Dr. Zeintl, Heidelberg, Deutschland) analysiert werden zu können [88]. Datum und Uhrzeit wurden über einen in das Videosignal eingeblendeten Videozeitgenerator (VTG-33, For-A-Company, Tokyo, Japan) aufgezeichnet, um später die aufgenommenen Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen, wie auch die Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen in einen zeitlichen Zusammenhang zu bringen.

Durch Variation der Fokusebene konnten von *serosal* sowohl die mikrovaskuläre Perfusion der glatten Muskulatur, als auch Zell-Zell-Interaktionen in Arteriolen und Venolen der Submukosa visualisiert werden. Im Anschluss hieran erfolgte die Darstellung der mukosalen Mikrozirkulation von *luminal*. Hierzu wurde – wie bereits erwähnt - antimesenterial eine ca. 1cm lange Inzision angelegt. Nach Eröffnung des Darmes konnte so die mikrovaskuläre Perfusion einzelner jejunaler Villi visualisiert werden.

3.2.7.2 Mikrozirkulatorische Parameter

Mit Hilfe der Auflicht-Videofluoreszenzmikroskopie wurden folgende mikrohämodynamischen Parameter quantifiziert. 1.) Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in Arteriolen und Venolen der Submukosa, 2.) Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion in Arteriolen und Venolen der jejunalen Submukosa und 3.) funktionelle Kapillardichte (FCD) der glatten Muskulatur sowie der Mukosa.

3.2.7.2.1 Leukozyten-/Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen

Um die Leukozyten- (LEI) bzw. die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen (TEI) zu untersuchen, wurden durch Änderung der Fokusebene in der Submukosa Arteriolen und Venolen bei 450-facher Vergrößerung visualisiert. Sowohl LEI als auch TEI wurden jeweils in 5-7 Arteriolen zweiten Grades (mittlerer Durchmesser 40 µm) und postkapillären Venolen (mittlerer Durchmesser 60 µm) pro Tier analysiert. Dabei wurden

die verschiedenen Interaktionen von Leukozyten und Thrombozyten mit dem Endothel in freifließend, rollend und adhärent unterteilt.

Während freifließende Zellen den untersuchten Gefäßabschnitt ohne Interaktion mit der Gefäßwand passierten, wurden als rollend solche Blutzellen definiert, die eine imaginär durch das Gefäß gelegte Linie mit einer signifikant geringeren Geschwindigkeit passierten als die Thrombozyten, die mit Zentralstromgeschwindigkeit fließen. Die Anzahl rollender Thrombozyten wird pro Sekunde und mm Gefäßdurchmesser angegeben [n/mm/sec].

Als adhärent wurden Zellen definiert, die ohne Positionsänderung in einem Gefäßabschnitt dem Endothel länger als 30 Sekunden anhafteten. Sie werden angegeben als Anzahl pro mm^2 Endotheloberfläche. Die Endotheloberfläche wurde aus Gefäßdurchmesser und Länge des untersuchten Segments errechnet, wobei eine zylindrische Geometrie des entsprechenden Gefäßabschnittes angenommen wurde [110].

3.2.7.2.2 Funktionelle Kapillardichte

Bei 450-facher Vergrößerung wurde die funktionelle Kapillardichte FCD in der Muskularis bestimmt. Dabei lässt es die vaskuläre Anatomie des Dünndarmes der Maus - im Gegensatz zur derjenigen der Ratte - nicht zu, das mikrovaskuläre Kapillarnetz der Muskulatur in eine longitudinale und zirkuläre Schicht zu unterscheiden. Zur Quantifizierung der FCD wurde pythagoreisch die Länge der mit Erythrozyten perfundierten Kapillaren pro Beobachtungsfeld (cm/cm^2) bestimmt. Die FCD berücksichtigt somit lediglich die Kapillaren, welche zur Gewebeoxygenierung beitragen, während nur mit Plasma perfundierte Kapillaren oder Kapillaren mit fehlender Perfusion unberücksichtigt bleiben. Erythrozyten waren dabei als dunkle, diskoide Aussparungen (Negativkontrastierung) in der mit Plasmamarker FITC-Dextran gefärbten Plasmasäule zu erkennen. Es wurden je fünf nicht überlappende Gesichtsfelder (entsprechen dem gesamten Bildausschnitt) untersucht.

In der gleichen Weise wurde auch die FCD, also die Dichte der mit Erythrozyten perfundierten Kapillaren, pro Villusfläche im Querschnitt (cm/cm^2) in der Mukosa analysiert. Auch in der Mukosa wurden jeweils fünf nicht überlappende Beobachtungsfelder untersucht. Dazu wurde der Darm, wie bereits dargestellt, antimesenterial eröffnet und anschließend druckfrei mit einem Deckglas bedeckt. Die Gefäßstruktur der einzelnen Dünndarmzotten im Längsschnitt ist der Schemazeichnung

zu entnehmen (Abb. 10). Eine zentral im Villus liegende Arteriole speist ein dichtes Kapillarnetz, das von mehreren postkapillaren Venolen drainiert wird.

Der Index der kapillären Heterogenität (HI) wurde für jeweils fünf Untersuchungsareale der Muskularis und Mukosa mit nachfolgender Formel berechnet:

$$HI=(FCD_{max}-FCD_{min})/FCD_{mean},$$

wobei FCD_{max}, FCD_{min},FCD_{mean} jeweils den höchsten Wert, den niedrigsten Wert und den Mittelwert der FCD repräsentieren.

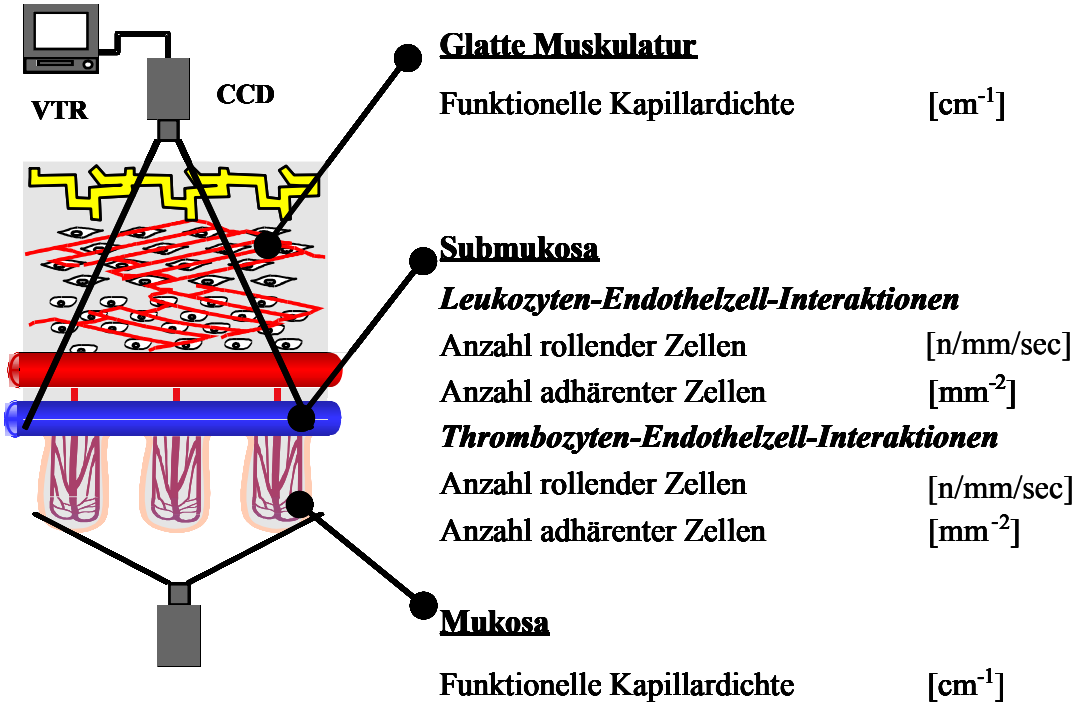


Abb.-10: Mikrohämodynamische Parameter. Einzelheiten siehe Text.

3.2.8 Versuchsprotokoll

3.2.8.1 Versuchsgruppen

Zur Modelletablierung wurden zwei Gruppen mit insgesamt zehn Tieren untersucht. In den Gruppen (jeweils n=5) wurden die LEI und TEI sowie die nutritive Perfusion der Mukosa und des glatten Muskels analysiert.

3.2.8.2 Versuchsablauf

Den Tieren wurden Katheter implantiert. Nachfolgend erfolgte die Laparotomie und Präparation für die Intravitalmikroskopie (Dauer der Präparation ca. 30min). 10min nach Abschluss der Präparation erfolgte die i.v. Applikation der fluoreszenz-markierten Thrombozyten sowie die Gabe von Acridine Orange zur intravitalmikroskopischen Untersuchung der TEI und LEI entsprechend der oben aufgeführten Technik. Nach Untersuchung der Zell-Zell-Interaktionen wurde der Plasmamarker FITC-Dextran 150.000 intravenös appliziert. Im Anschluss wurde die nutritive Perfusion zunächst der glatten Muskulatur und schließlich - nach Eröffnung des zu untersuchenden jejunalen Segmentes – auch der Mukosa visualisiert. Die Versuche wurden 120 min nach Beginn der intravitalen Videofluoreszenzmikroskopie durch Entnahme von Organproben terminiert.

Der Ablauf der Untersuchungen ist schematisch in Abb.-11 wiedergegeben.

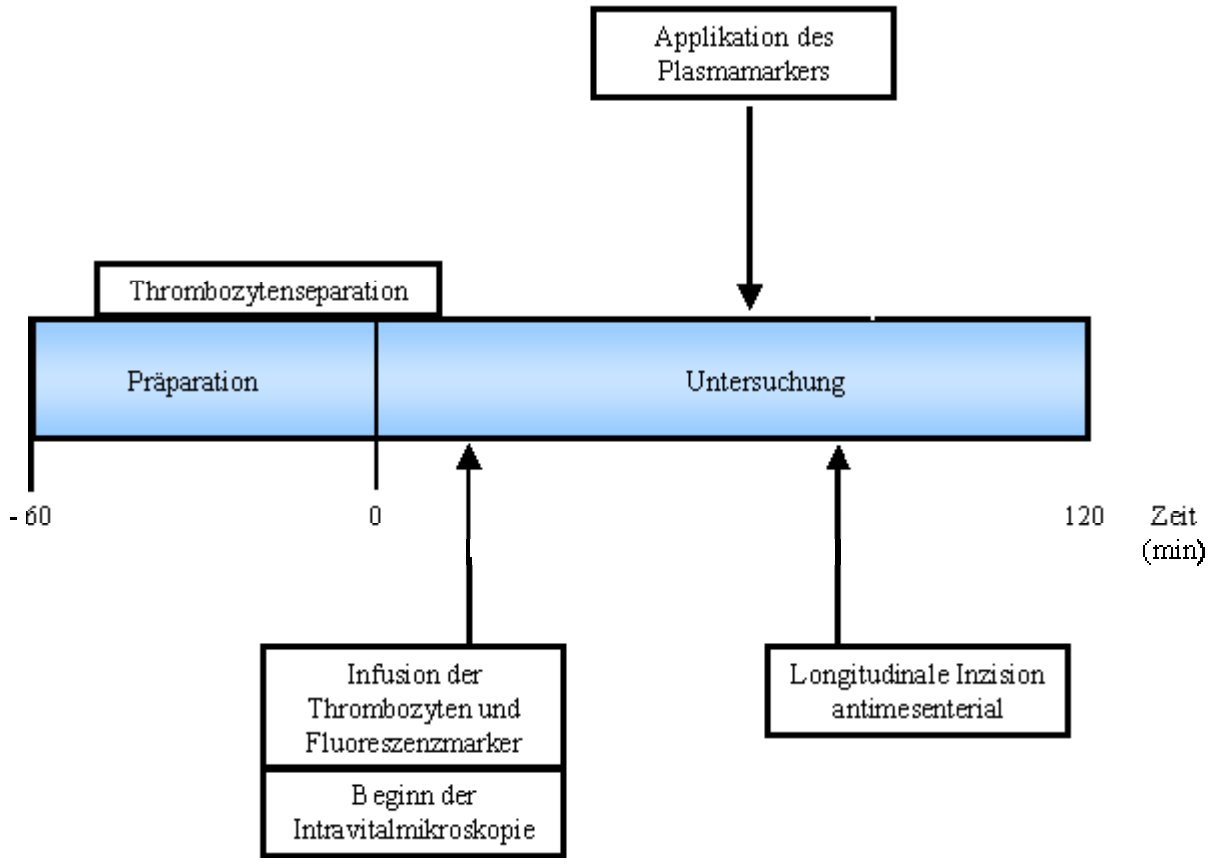


Abb.-11: Experimentelles Protokoll des ersten Abschnittes der Arbeit. Einzelheiten vgl. Text.

3.3 Die Rolle von P-Selektin für die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen

3.3.1 Allgemeiner Teil

Bei der Untersuchung der Pathogenese des I/R-Schadens standen in den letzten Jahren vor allem die Leukozyten im Mittelpunkt des Interesses. Doch lassen neuere Studien, bei denen eine Thrombozytendepletion während I/R zu einer Reduktion des I/R-Schadens führte [93;94], vermuten, dass auch die Thrombozyten wesentlich an der Manifestation des I/R-Schadens beteiligt sind. Während im ersten Abschnitt der Arbeit ein Modell zur Visualisierung der TEI in der jejunalen Mikrozirkulation erarbeitet und hierdurch die Kinetik der TEI in der Mikrozirkulation unter physiologischen Bedingungen charakterisiert werden sollte, war es Ziel des zweiten Abschnittes, die TEI nach I/R, sowie die der Akkumulation von Thrombozyten während I/R zugrundeliegenden Mechanismen zu charakterisieren. Sowohl Thrombozyten als auch Endothelzellen exprimieren eine Vielzahl von Adhäsionsmolekülen, die prinzipiell für die Interaktion zwischen Thrombozyt und vaskulärer Oberfläche von Bedeutung sein könnten. Ein Adhäsionsrezeptor, der sowohl von Endothelzellen als auch von Thrombozyten exprimiert wird, ist das Selektin CD62P. P-Selektin wird in α-Granula des Thrombozyten und Weibel-Palade Körperchen der Endothelzelle gespeichert und innerhalb von Sekunden nach Stimulation, z.B. durch Hypoxie/Reoxygenierung, an die Zelloberfläche mobilisiert. Während die Rolle von P-Selektin für die Rekrutierung von Leukozyten in der postischämischen Mikrostrombahn gut charakterisiert ist, ist die Bedeutung des P-Selektins für die TEI bislang nur unzureichend untersucht. Im zweiten Abschnitt der Arbeit analysierten wir daher den Einfluss von I/R auf die TEI und die Rolle von P-Selektin für die Rekrutierung von Thrombozyten in der postischämischen jejunalen Mikrostrombahn. Wir bedienten uns mit dieser Zielsetzung des eingangs beschriebenen *in vivo* Modells. Auf die für diesen Versuchsablauf notwendigen Modifikationen wird im folgenden genauer eingegangen.

3.3.2 Versuchstiere

Für die Untersuchungen der TEI nach I/R verwendeten wir weibliche Balb/c Mäuse (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) und C57BL/6J/129Sv als Wildtypmäuse. Zur Verifizierung der Rolle des endothelialen versus des thrombozytären P-Selektins

arbeiteten wir mit P-Selektin defizienten Mäusen, die uns dankenswerterweise von Herrn Prof. D. Vestweber (Universität Münster) zur Verfügung gestellt wurden. Alle für die im folgenden dargestellten Untersuchungen eingesetzten Tiere waren 5-7 Wochen alt. Die Mäuse hatten freien Zugang zu Wasser und der bereits erwähnten Standardnahrung (Ssniff Spezialdiäten, Soest, Deutschland: 18000 I.E./kg Vit A, 1280 I.E./kg Vit D_3, 120 mg/kg Vit. E).

3.3.3 Antikörper

Zur Charakterisierung der Bedeutung von P-Selektin für die postischämische TEI wurden für die *in vivo* Untersuchung unmarkierte Antimaus-P-Selektin-Antikörper aus der Ratte (dankenswerter Weise von Prof. Vestweber, Universität Münster, zur Verfügung gestellt) verwendet. Die für die FACS-Analysen angewandten Ratte-anti-Maus P-Selektin Antikörper (Pharmingen, Hamburg, Deutschland) waren FITC-markiert. Zusammen mit anti-vWF-Antikörpern (Pharmingen) dienten Ratte-anti-Maus P-Selektin Antikörper (Pharmingen, Hamburg, Deutschland) zur immunhistochemischen Untersuchung der nach Versuchsbeendigung entnommenen Organproben. Sowohl bei den FACS-Analysen, wie auch bei den immunhistochemischen Untersuchungen verwendeten wir IgG Antikörper (Pharmingen) als Kontrollantikörper.

3.3.4 Mikrochirurgische Technik

Die Präparation erfolgt nach dem eingangs bereits beschriebenen Protokoll. Die spontan-atmenden Tiere wurden mit einem Isofluran-Lachgas-Gemisch narkotisiert. Die Halsgefäße wurden kanüliert und das Abdomen eröffnet. Während der gesamten Versuchsdauer erfolgte eine kontinuierliche Kontrolle des MAP. Die Körpertemperatur wurde durch eine in den Operationstisch integrierte, an eine Temperatursonde gekoppelte Heizplatte konstant gehalten. Nach der transversalen Laparotomie wurde ein jejunales Segment des Dünndarms auf eine Plattform ausgelagert. Mit Hilfe eines atraumatischen Mikroclips wurden die das Segment versorgenden bzw. drainierenden Mesenterialgefäße für die Dauer von 60min reversibel okkludiert. Nach der 60-minütigen Ischämie wurde durch Entfernung der Mikroclips mittels eines Cliphalters die postischämische Reperfusion eingeleitet.

Während der Ischämie erfolgte die Separation und Anfärbung der Thrombozyten nach dem oben beschriebenen Protokoll. Ca. 5min vor Beginn der Reperfusion wurden

die fluoreszierenden Plättchen i.v. infundiert, 15-30min nach Beginn der Reperfusion erfolgte die intravitalmikroskopische Untersuchung nach dem bereits dargestellten Vorgehen.

3.3.5 Parameter

3.3.5.1 Intravitale Videofluoreszenzmikroskopie.

Auf das für die Intravitalmikroskopie verwendete technische Setup wurde bereits ausführlich eingegangen. Der Arbeitsplatz bestand aus einem modifizierten Leitz Orthoplan Mikroskop mit einer Ploemo-Pak Lichtquelle (Leitz, Wetzlar, Deutschland) und einer 1000 Watt HBO Quecksilberlampe (Osram GmbH, München, Deutschland) sowie $I_{2/3}$ und N_2 Filterblöcken. Mit Hilfe eines 10x Long Distance- sowie eines 25x Wasserimmersionsobjektives und dem Monitor wurden Vergrößerungen auf 180 bzw. 450fach erreicht. Die Untersuchungen wurden mittels einer charge-coupled device (CCD)-Videokamera (FK 6990, Cohu, Prospective Measurements, San Diego, USA) aufgenommen und von einer Videoanlage („U"-matic video tape recorder, Sony, Tokyo, Japan) aufgezeichnet.

Wie im ersten Teil der Arbeit wurde ein jejunales Segment des Darmes auf eine spezielle Kunststoff-Plattform ausgelagert und mit einem Mikroskopierdeckglas bedeckt. Während der intravitalmikroskopischen Analyse wurde das ausgelagerte Darmsegment kontinuierlich mit körperwarmer Ringer-Laktat-Lösung superfundiert.

Zur Anfärbung der Leukozyten in der intestinalen Mikrozirkulation verwendeten wir Acridine-Orange (MW 302, Merck, Darmstadt, Deutschland) und Rhodamin-6-G (MW 479, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) für die *ex vivo* Fluoreszensmarkierung der Thrombozyten in den oben aufgeführten Dosierungen. Auch im zweiten Abschnitt der Arbeit wurden die markierten Plättchen vor Beginn der Untersuchung über die Halsvene i.v. infundiert. Die intravitale Beobachtungsphase erfolgte 15 bis 30min nach Beginn der Reperfusion.

Im Gegensatz zum ersten Untersuchungsabschnitt, beschränkt wir uns auf die Thrombozyten-/Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen und verzichteten auf die Bestimmung der Funktionellen Kapillardichte und des Heterogenitätsindexes.

3.3.6 Histologie

3.3.6.1 Immunhistologie

Proben für die immunhistologische Aufarbeitung wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C aufbewahrt. Sechs Mikrometer (µm) dicke, in Aceton fixierte Gefrierschnitte wurden immunhistologisch auf P-Selektin und vWF gefärbt. Hierfür fanden Maus-spezifische monoklonale anti-vWF-Antikörper (Pharmingen) und anti-P-Selektin Antikörper (Pharmingen) sowie kommerziell erhältliche immunhistochemische Kits (Vectastain; Camon, Wiesbaden, Deutschland) Verwendung. Die spezifische Färbung stellt sich mit den genannten Kits rötlich-braun dar. Die endogene Peroxidaseaktivität wurde durch 10 minütiger Applikation von Methanol und H_2O_2 bei Raumtemperatur blockiert. Abschließend wurden die Schnitte mit Mayer´s Hämalaun gegengefärbt. Als Kontrolle wurden Gefrierschnitte mit isotypspezifischem Kontroll-Antikörper inkubiert.

3.3.6.2 Elektronenmikrokopie

Nach Entnahme der für die Lichtmikroskopie bestimmten Proben erfolgte die Perfusionsfixation mit 2 ml Ringer-Laktat und nachfolgend mit Karnovsky Lösung (0,04ml/g Körpergewicht) über den in der A. carotis platzierten Polypropylenkatheter für etwa 5 Minuten. Die daraufhin entnommenen, etwa 1-2mm großen jejunalen Proben wurden für 2-3 Tagen in Karnovsky Lösung fixiert. Anschließend erfolgte eine weitere Fixierung in Sörensen-Puffer, der 2%-Osmiumtetroxid enthielt. Die Proben wurden dehydriert und bei 60°C in ein Araldite-Monomer eingebettet. Ultradünne Schnitte wurden erstellt, mit Uranylacetat und Zitrat gefärbt und mit Hilfe eines Zeiss EM 9000 Transmissionselektronenmikroskops beurteilt.

3.3.7 Versuchsprotokoll

3.3.7.1 Versuchsgruppen

Ziel des zweiten Abschnittes war es, 1.) die Kinetik der postischämischen TEI und 2.) die Bedeutung von P-Selektin für die postischämische TEI zu evaluieren. Hierzu wurden insgesamt folgende sechs Gruppen untersucht, denen die Tiere (n=6) randomisiert zugeteilt wurden:

Sham-operierte Mäuse dienten als Kontrolltiere (Gruppe A). Kontrolltiere wurden dem gleichen chirurgischem Protokoll, d.h. Gefäßkanülierung, transversale Laparotomie

und Auslagerung eines jejunalen Segmentes, jedoch ohne I/R, unterzogen. In der Gruppe B wurde eine 60-minütige Ischämie induziert. Vor Reperfusion wurden 50µl PBS (Vehikel) i.v. injiziert. In Gruppe D wurden die Tieren unmittelbar vor Reperfusion (und damit vor der intravitalmikroskopischen Analyse) mit einem monoklonalen, gegen P-Selektin gerichteten, blockierenden Antikörper vorbehandelt (2mg/kg Körpergewicht). In Gruppe C wurden die Tiere ebenfalls einer 60-minütigen I/R unterzogen. Vor Reperfusion wurden 2 mg/kg eines Kontroll-Antikörpers (IgG, ChromPure Ratte IgG; Dianova, Hamburg, Deutschland) i.v. appliziert. Um die Rolle des P-Selektin in Thrombozyten und Endothel unabhängig voneinander untersuchen zu können, arbeiteten wir mit den oben bereits erwähnten P-Selektin-defizienten (P-Selektin$^{-/-}$) Tieren (vgl. Abb.-12). In Gruppe E wurden Thrombozyten aus Wildtypmäusen separiert und *ex vivo* fluorochromiert. P-Selektin-defiziente Mäuse (Empfängertiere) wurden einer 60-minütigen Ischämie unterzogen. 15-30min nach Reperfusion wurden die fluoreszenzmarkierten P-Selektin$^{+/+}$ (Wildtyp-) Thrombozyten in die P-Selektin$^{-/-}$ Empfängertiere infundiert und deren Verhalten in der postischämischen jejunalen Mikrozirkulation analysiert. Anders wurden in Gruppe F fluorochromierte P-Selektin-defiziente Thrombozyten in Wildtypmäuse nach jejunaler Ischämie und 15 bis 30-minütiger Reperfusion appliziert (Abb.-12 und Tab.-2).

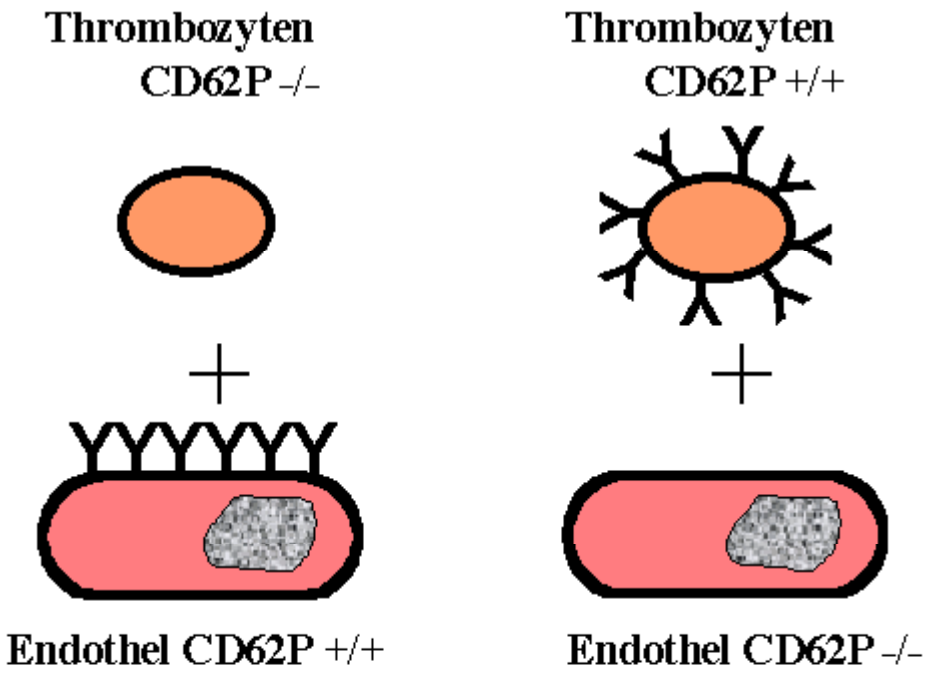


Abb.-12: Analyse der Bedeutung von thrombozytärem vs. endothelialem P-Selektin. Fluorochromierte P-Selektin-defiziente Thrombozyten (CD62P-/-) werden in Wildtyp-Mäuse (CD62P +/+) infundiert und *vice versa*.

	A	B	C	D	E	F
Empfängertier	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp	Wildtp	CD62P-/-	Wildtyp
Spendertier	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp	CD62P-/-
Protokoll	Sham	I/R	I/R Kontroll IgG	I/R Anti-CD62P-Ak	I/R	I/R

Tab-2: Versuchsgruppen des 2. Abschnittes zur Untersuchung des Einflusses von I/R auf die TEI, sowie zur Untersuchung der Rolle von P-Selektin für die postischämische TEI.

3.3.7.2 Versuchsablauf

Nach Gefäßkanülierung und transversaler Laparotomie wurden sham-operierte Tiere für die Intravitalmikroskopie präpariert. Im Anschluss an eine 60-minütige Stabilisierungsphase wurde ein jejunales Dünndarmsegment ausgelagert und die intravitalmikroskopische Untersuchung durchgeführt. Der Versuch wurde 90 min später beendet und Organproben entnommen.

In den I/R Gruppen (Gruppen B - F) erfolgte die Applikation der Vehikel und Antikörper jeweils kurz vor Beginn der Reperfusionsphase. Die Separation der Thrombozyten wurde in allen Gruppen während der Ischämie (Gruppen B - F) bzw. während der Stabilisierungsphase (Gruppe A) des Empfängertieres vorgenommen. Das Vollblut wurde durch kardiale Punktion gewonnen und die syngenen Thrombozyten nach dem oben beschriebenen Protokoll separiert und fluoreszenzmarkiert. Die i.v. Infusion der Thrombozyten erfolgte jeweils ca. 5 min vor Beginn der Reperfusion (Abb.-13).

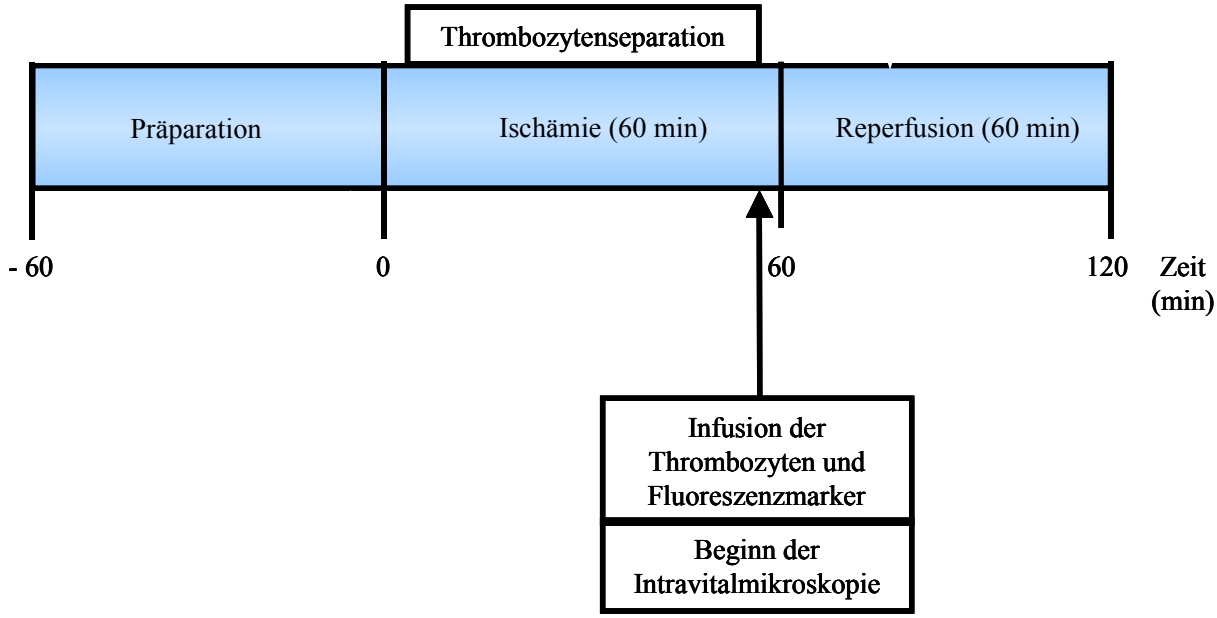


Abb.-13: Experimentelles Protokoll des zweiten Abschnittes der Arbeit. Einzelheiten vgl. Text.

3.4 Der Einfluss von Stickstoffmonoxid auf die postischämischen Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen *in vivo*

3.4.1 Allgemeiner Teil

Ziel des dritten Teils dieser Arbeit war es, die Rolle des Thrombozyteninhibitors Stickstoffmonoxid (NO) auf die postischämischen Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen *in vivo* zu untersuchen. Aus *in vitro* Untersuchungen weiß man, dass NO die durch Agonisten-induzierte Thrombozytenaggregation inhibiert [4;62]. Daneben verhindert es die Expression und Konformationsänderungen von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche der Thrombozytenmembran, wie P-Selektin und GPIIb/IIIa, und blockiert die Adhäsion der Thrombozyten an Endothelzellen [86;127]. Welchen Einfluss NO jedoch auf die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion *in vivo* hat, ist bislang nur unzureichend untersucht. In diesem Teil der Untersuchung analysierten wir daher den Einfluss der Blockade der endogenen NO-Synthese durch den nicht-selektiven NO-Synthase-Inhibitor Nω-Nitro-L-Arginin-Methyl-Ester (L-NAME) auf die TEI in der postischämischen Mikrozirkulation *in vivo*. Desweiteren charakterisierten wir selektiv die Bedeutung der durch die induzierbare NO-Synthase (iNOS) vermittelten NO-Synthese für die Rekrutierung von Thrombozyten in der postischämischen Mikrozirkulation.

3.4.2 Versuchstiere

Für die Untersuchungen zur Blockade der endogenen NO-Synthese mittels L-NAME verwendeten wir weibliche Balb/c-Mäuse. Zur Klärung der Beteiligung der iNOS arbeiteten wir mit weiblichen C57BL/6/129Sv Wildtypmäusen und iNOS-defizienten C57BL/6/129Sv Mäusen. Die Tiere wurden unter denselben, oben bereits erwähnten Bedingungen gehalten und mit einer Standardnahrung (Ssniff Spezialdiäten, Soest, Deutschland: 18000 I.E./kg Vit A, 1280 I.E./kg Vit D_3, 120 mg/kg Vit. E) gefüttert.

3.4.3 Reagenzien

Der nicht selektive NOS-Inhibitor Nω-Nitro-L-Arginin-Methyl-Ester (L-NAME, MW 269,7, SIGMA; Deisenhofen, Deutschland) hemmt über einen kompetitiven

Mechanismus die Aktivität der NO-produzierenden Enzyme. Das L-Arginin-Analogon inhibiert sowohl die konstitutiv exprimierte ecNOS, wie auch die induzierbare iNOS. Neben der Verdrängung der L-Arginins spielt bei der Inhibition auch die Störung des Elektronenflusses sowie die Reduktion des Häm-Eisens eine Rolle. (Abb.-14)

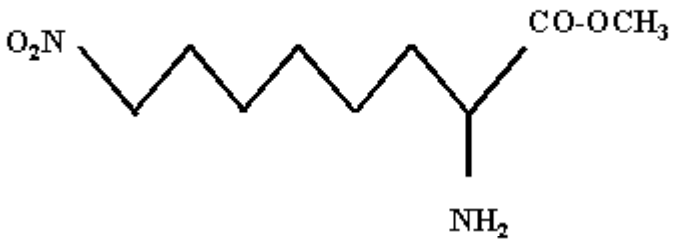


Abb.-14: Struktuformel des nicht-selektiven NOS-Inhibitors Nω-Nitro-L-Arginin-Methyl-Ester (L-NAME).

3.4.4 Mikrochirurgische Technik

Auch für diesen Teil der Untersuchungen verwendeten wir das bereits im ersten Abschnitt ausführlich beschriebene Tiermodell. Im folgenden sollen lediglich die zentralen Schritte kurz zusammengefasst werden.

Die Halsgefäße, der auf einer Heizplatte platzierten Mäuse, werden zur kontinuierlichen Messung des MAP, zur Volumensubstitution und zur Applikation der fluoreszierenden Thrombozyten kanüliert. Nach der transversalen Laparotomie erfolgt die Auslagerung eines jejunalen Segmentes. Die das Segment versorgenden Gefäße werden mittels eines Mikrogefäßclips okkludiert. Die normotherme Ischämiezeit betrug – wie bereits in den vorangegangenen Untersuchungen - 60 Minuten mit nachfolgender 60 minütiger Reperfusion. Vor Beginn der Reperfusion wurde das zu untersuchende Segment auf eine Plattform ausgelagert (Abb. 5 und 6) und mit einem Objektglas bedeckt. Zehn Minuten nach Beginn der Reperfusion wurden die Thrombozyten i.v. infundiert und mit Hilfe der intravitalen Videofluoreszenzmikroskopie in submukosalen Arteriolen und Venolen visualisiert.

3.4.5 Thrombozytenseparation

Die Separation der Thrombozyten erfolgte nach dem eingangs beschriebenen Protokoll. Das Blut wurde jeweils von separaten Spendertieren durch kardiale Punktion

entnommen. In den Gruppen A (I/R + L-NAME), B (I/R + Vehikel) und C (sham-operierte Kontrolltiere) dienten Balb/c-Wildtypmäuse als Spendertiere. In den Untersuchungen zur Bedeutung der induzierbaren NO-Synthase wurden iNOS-defiziente bzw. Wildtyp-C57BL/6/129Sv Mäuse als Thrombozytenspender eingesetzt (Gruppen D und E). Aus Vollblut wurde entsprechend dem oben beschriebenen Protokoll durch differentielle Zentrifugation Thrombozyten isoliert und mit Rhodamin-6G *ex vivo* fluoreszenzmarkiert. Während die Thrombozyten in den Gruppen B-E nach Pelletierung in PBS resuspendiert wurden, wurden Thrombozyten der Gruppe A nach dem Pelletieren in PBS mit 740 µM L-NAME resuspendiert und für 10min inkubiert, um auch eine mögliche thrombozytäre NO-Produktion zu inhibieren. In allen Gruppen wurden die Thrombozyten jeweils 10 Minuten nach Beginn der Reperfusion i.v. infundiert.

3.4.6 Parameter

3.4.6.1 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Wir verwendeten erneut das unter Punkt 3.2 ausführlich beschriebene intravitalmikroskopische Setup. 10 Minuten nach Beginn der Reperfusion erfolgte die Applikation der fluoreszierenden Thrombozyten.

Die intravitalmikroskopische Analyse der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen unterschied sich nicht von dem oben bereits beschriebenen Vorgehen. Neben den bereits dargestellten mikrohämodynamischen Paramtern (TEI) wurde im dritten Abschnitt der Arbeit zusätzlich die Thrombozytenaggregtion in Arteriolen und Venolen analysiert. Als wandadhärentes Thrombozytenaggregat wurde eine Akkumulation von drei oder mehr Thrombozyten an der Gefäßwand definiert, wobei die Grenzen zwischen den Thrombozyten nicht mehr identifiziert werden konnten. Die Anzahl der Thrombozytenaggregate in Arteriolen bzw. Venolen wurde pro Gesichtfeld angegeben.

3.4.7 Versuchsprotokoll

3.4.7.1 Versuchsgruppen

Wir untersuchten an fünf Gruppen den Einfluss von Stickstoffmonoxid auf die postischämische TEI *in vivo*. Fünf sham-operierte Tiere (Gruppe C) dienten als Kontrollgruppe. In den folgenden vier Gruppen wurde jeweils eine einstündige Ischämie induziert mit nachfolgender 60-minütiger Reperfusion. In Gruppe A (I/R + L-NAME)

wurde jeweils 5 Minuten vor Beginn der Ischämie und Reperfusion der nicht-selektive NOS-Inhibitor 0,1 ml L-NAME (100mg/kg) i.v. infundiert. Zusätzlich wurden in dieser Gruppe die fluorochromierten Thrombozyten für 10min mit 740 μM L-NAME vorinkubiert um eine thrombozytäre NO-Produktion auszuschließen. In Gruppe C wurde statt L-NAME 0.1 ml PBS (Vehikel) infundiert. In dieser Gruppe erfolgte die Inkubation der fluorochromierten Thrombozyten mit PBS statt mit L-NAME. In Gruppe D wurden iNOS defiziente Thrombozyten separiert und fluorochromiert. Die fluoreszierenden iNOS-/- Thrombozyten wurden Wildtyp-C57BL/6/129Sv nach 60-minütiger Ischämie und 10-minütiger Reperfusion i.v. infundiert und in der postischämischen Mikrozirkulation visualisiert. In der letzten Gruppe, Gruppe E, wurden iNOS-defiziente Thrombozyten isoliert, fluorochromiert und in ebenfalls iNOS-defiziente Empfängertiere nach I/R infundiert. Die Gruppen dieses Versuchsabschnittes sind in Tabelle 3 und in Abb.-15 zusammengefasst.

	A	**B**	**C**	**D**	**E**
Empfängertier	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp	iNOS-/-
Spendertier	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp	iNOS-/-	iNOS-/-
Protokoll	Sham	I/R	I/R + L-NAME	I/R	I/R

Tab-3: Versuchsgruppen des 3. Abschnittes zur Untersuchung der Bedeutung von NO für die Regulation der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen.

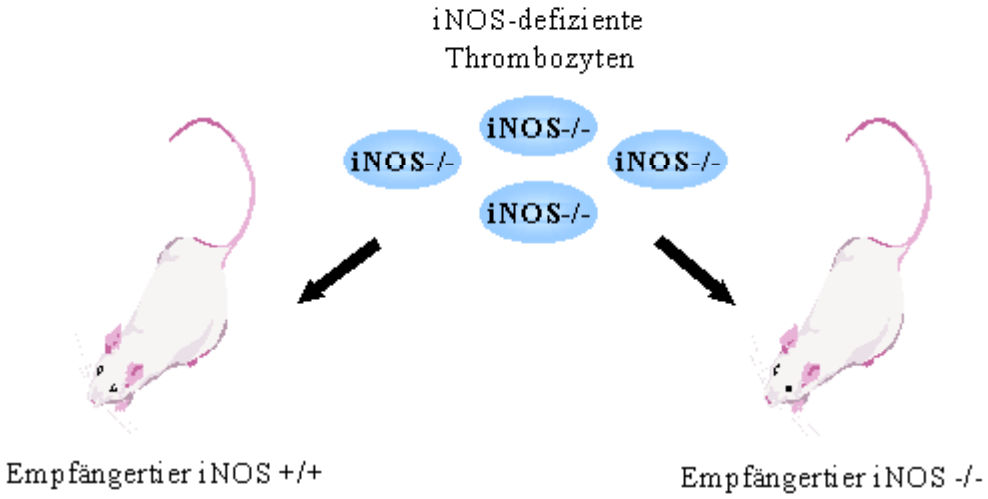


Abb.-15: iNOS defiziente Thrombozyten (iNOS -/-) werden in Wildtypmäuse (iNOS +/+) oder iNOS defiziente Mäuse (iNOS -/-) nach 1 Stunde Ischämie infundiert.

3.4.7.2 Versuchsablauf

Nach der Kanülierung der Halsgefäße erfolgte die Laparotomie und Auslagerung des jejunalen Segmentes. Vor Induktion der einstündigen, segmentalen, intestinalen Ischämie wurde je nach Gruppe entweder PBS als Vehikel oder L-NAME infundiert. Auch vor Beginn der 60 minütigen Reperfusion erhielten die Tier entweder PBS als Vehikel oder L-NAME (100 mg/kg). Da es durch die Gabe von L-NAME zu einer kurzzeitigen Zunahme des mittleren arteriellen Blutdruckes kam, wurden in diesem Abschnitt der Untersuchungen die fluoreszierenden Thrombozyten erst nach einer kurzen Stabilisierungsphase i.v. über den in der V.jugularis platzierten Kathter infundiert, d.h. zehn Minuten nach Beginn der Reperfusion. Die intravitalmikroskopischen Untersuchungen erfolgten 15 bis 30min nach Reperfusion (Abb.-16).

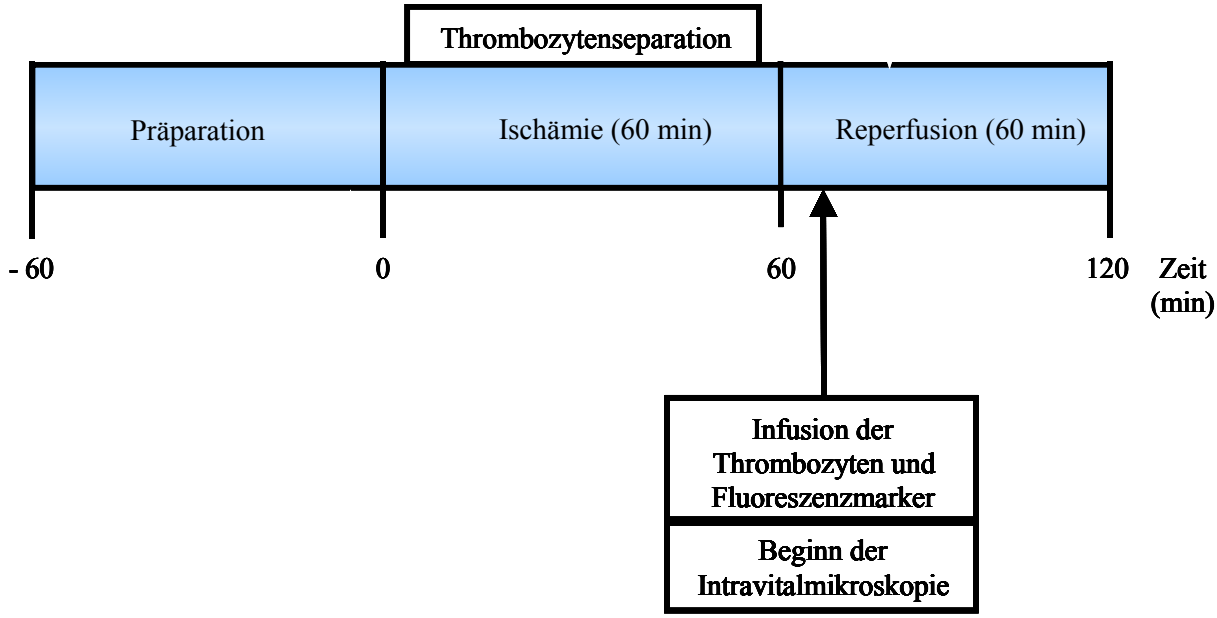


Abb.-16: Experimentelles Protokoll des dritten Abschnittes der Arbeit. Einzelheiten vgl. Text.

4 Statistik

Sämtliche Werte werden als Mittelwert (MW) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die Mittelwerte der jeweiligen Parameter rekrutieren sich aus den Mittelwerten der einzelnen Versuchstiere.

Sämtliche statischen Analysen wurden unter Verwendung des Software Pakets Sigma Stat™ (Jandel Cooperation St. Rafael, CA, USA) durchgeführt. Zum Vergleich zweier unverbundener Proben verwendeten wir den Mann-Whitney Rangsummentest, Vergleiche mehrerer unverbundener Proben (>2 Stichproben) erfolgten mit Hilfe der Kruskal-Wallis-Analyse (mit darauffolgendem Dunn´s post hoc Test zum Vergleich der einzelnen Gruppen). Zur statistischen Analyse repetitiver Messungen (1. Abschnitt der Arbeit) wurde der Friedman Test eingesetzt. Die jeweils verwendeten Testverfahen sind in den Legenden zu den Tabellen und Abbildungen aufgeführt.

Unterschiede wurden bei einem $p<0,05$ als signifikant angesehen.

5 Ergebnisse

5.1 1. Abschnitt: Modelletablierung

Im folgenden werden die Ergebnisse der Modelletablierung dargestellt. Zunächst wird auf die hämodynamischen Veränderungen der Tiere eingegangen. Anschließend soll auf die analysierten mikrohämodynamischen Parameter der intestinalen Mikrozirkulation eingegagen werden.

5.1.1 Makrohämodynamik und Körpertemperatur

5.1.1.1 Mittlerer arterieller Blutdruck

Der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) war während der gesamten Versuchsdauer konstant. Er lag nach der Laparotomie bei 91±3 mmHg und nach der letzten intravitalmikroskopischen Messung bei 82±3mmHg.

5.1.1.2 Temperatur

Der zweite Parameter, die rektale Temperatur, war während des gesamten Versuchsablaufs konstant zwischen 36,5°C und 37°C.

5.1.2 Durchflußzytometrie

Die Analyse der nach dem unter 3.2.5 beschriebenen Protokoll separierten Thrombozytensuspension ergab eine fast reine Thrombozytenlösung mit einer vernachlässigbaren Menge an anderen Blutzellen. Die Fraktion der mit Rhodamin-6G markierten Thrombozyten in der Suspension betrug >99%. Um eine Aktivierung durch die Thrombozytenpräparation ausschließen zu können, wurde die Oberflächenexpression des vor Aktivierung der Thrombozyten in α-Granula gespeicherten P-Selektins mit Hilfe monoklonaler Antikörper untersucht. Hierbei konnte keine Zunahme des Adhäsionsmoleküls und Aktivitätsmarkers P-Selektin auf der Oberfläche der separierten Thrombozyten im Vergleich zu Thrombozyten im Vollblut verzeichnet werden. Im nächsten Schritt sollte mit Hilfe der Durchflußzytometrie geklärt werden, ob die nach oben beschriebenem Protokoll isolierten Thrombozyten noch adäquat auf von außen

wirkende Stimuli reagieren. Hierfür wurden separierte, fluoreszenzmarkierte Thrombozyten mit Thrombin (5 U/ml) inkubiert. Die Aktivierung der Thrombozyten hatte einen 10-fachen Anstieg der Expression des P-Selektins auf der Oberfläche der Thrombozyten zur Folge (Abb.-17).

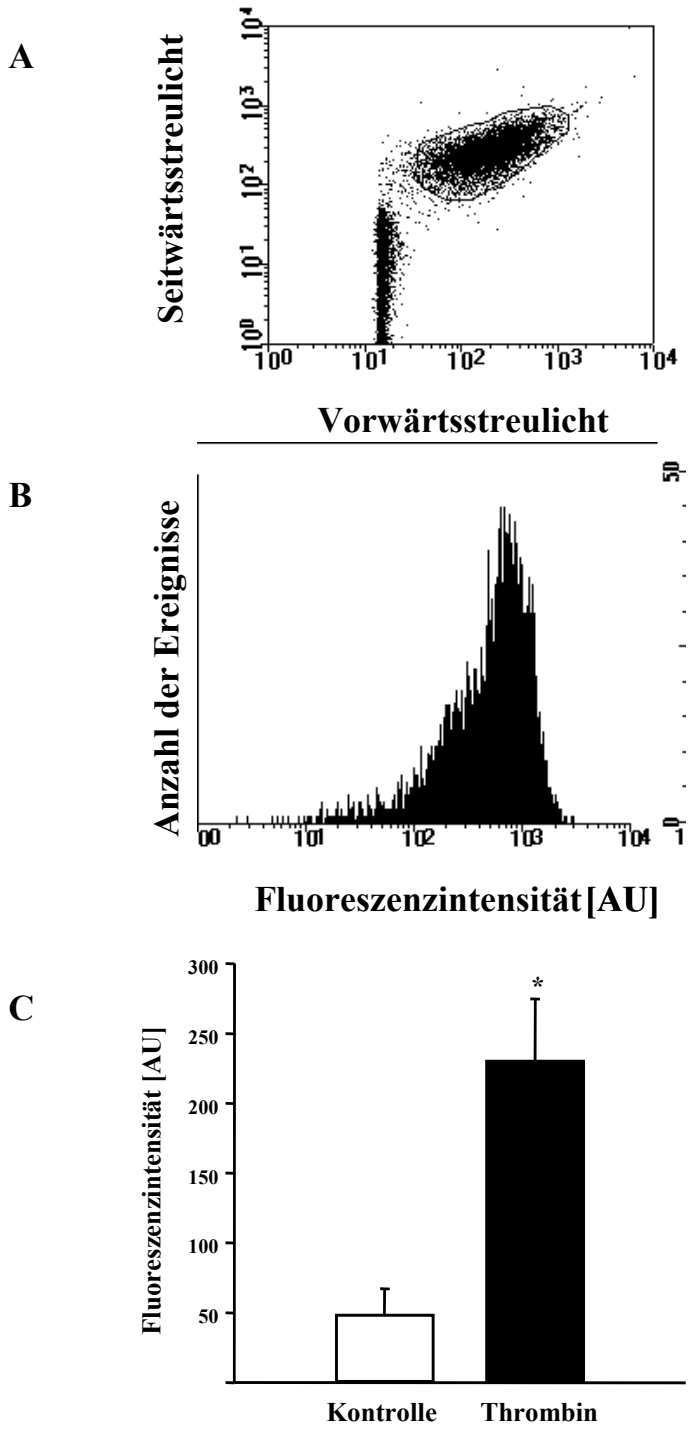


Abb.-17: Durchflußzytometrie der separierten Thrombozyten: **A** Repräsentativer Dot Plot der separierten Thrombozyten. Die Thrombozyten werden durch ihr für sie charakteristisches Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht identifiziert. **B** Nach Inkubation mit 0.05% Rhodamin-6G stellen sich 99% der Zellen als gefärbt dar. **C** Nach Separation ist die P-Selektin-Expression niedrig. Durch Inkubation mit Thrombin (5U/ml) kommt es zu einer signifikanten Erhöhung der P-Selektin Expression. MW ±SEM, n=4 pro Gruppe, *p<0.05 vs. Kontrolle, Mann-Whitney Rangsummentest.

5.1.3 Mikrohämodynamik

5.1.3.1 Blutzell-Endothelzell-Interaktionen

5.1.3.1.1 Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen

Wie bereits beschrieben, erfolgte die *in vivo* Fluoreszenzmarkierung der Leukozyten durch i.v. Infusion von Acridine-Orange. Die so markierten Leukozyten ließen sich mittels Intravitalmikroskopie gut in der Mikrozirkulation visualisieren. Die Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen waren unter dem oben beschriebenen Versuchsprotokoll ohne I/R ein sehr seltenes Phänomen (Tab.-5). Die dabei beobachteten Interaktionen der Leukozyten mit dem Endothel in Form von Rollen und fester Adhäsion beschränkten sich auf postkapilläre Venolen.

	Baseline	60 min	120 min
Rollende Leukozyten (1/s/mm)	1±0.2	1±0.1	1±0.1
Adhärente Leukozyten (mm^{-2})	19±7	12±8	19±14

Tab.-5: Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen in den postkapillären Venolen der intestinalen Submukosa. MW±SEM, n=5 pro Gruppe, Friedman Test.

5.1.3.1.2 Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen

Erstmals konnten im Rahmen unserer Untersuchungen die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen mit fluoreszierenden Thrombozyten *in vivo* quantifiziert werden. Die Thrombozytendynamik wurde in der submukosalen Mikrozirkulation untersucht. Die mit Rhodamin-6G gefärbten Thrombozyten ließen sich leicht in den arteriellen und venösen Mikrogefäßen des Dünndarmes der Maus darstellen.

Unter physiologischen Bedingungen konnten nur sehr selten Interaktionen zwischen zirkulierenden Thrombozyten und Endothel detektiert werden. Wie bei den LEI konnte auch bei den Interaktionen der Thrombozyten mit dem Endothel in freifließende, rollende

und adhärente Thrombozyten unterschieden werden. Zu keinem Zeitpunkt aber waren Aggregate nachweisbar.

Von besonderer Bedeutung ist die Beobachtung, dass sich die TEI in der intestinalen Mikrozirkulation nicht nur auf die postkapillären Venolen beschränken, wie dies bei den LEI der Fall ist, sondern dass rollende und adhärente Thrombozyten zusätzlich auch in den Arteriolen beobachtet werden konnten (Abb.-18).

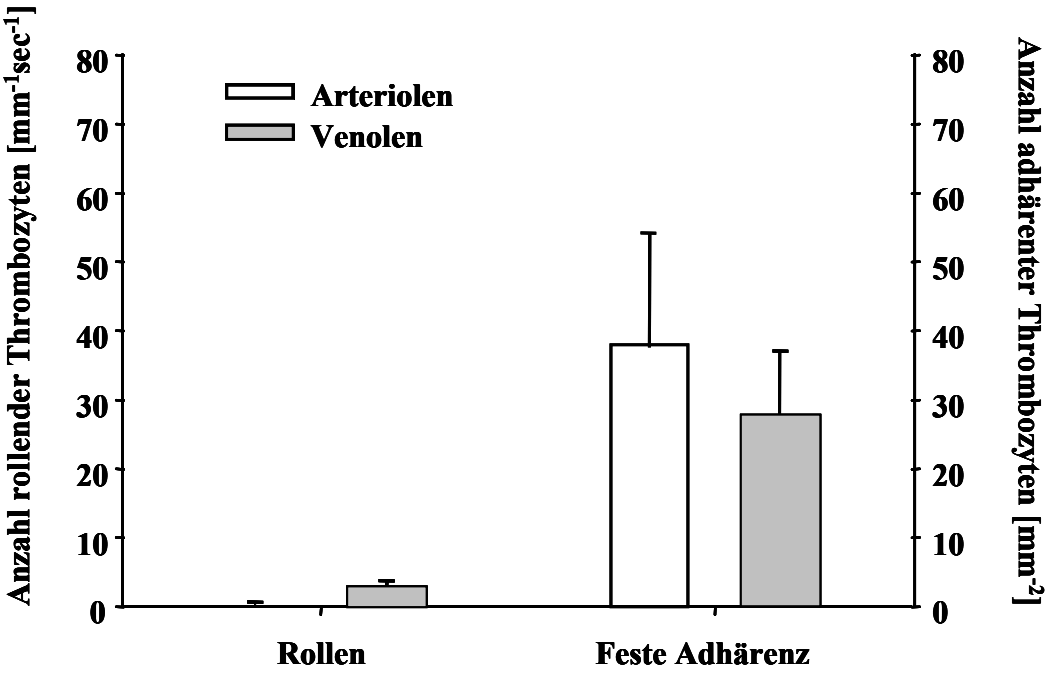


Abb.-18: Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen unter physiologischen Bedingungen in Arteriolen (weiße Säulen) und Venolen (graue Säulen). Wie Leukozyten-Endothel-Interaktionen werden auch die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen in Rollen und Adärenz unterteilt (vgl. Text). Unter physiologischen Bedingungen waren TEI ein sehr seltenes Phänomen. Im Gegensatz zu LEI können TEI auch in Arteriolen gefunden werden. Mean ±SEM, n=5, *p<0.01 vs. Arteriolen, Dunn´s Test.

5.1.3.2 Nutritive Perfusion der Mukosa und der glatten Muskulatur

Mittels des i.v. applizierten Fluoreszenz-Markers FITC-Dextran 150.000 wurde die intestinale Mikrozirkulation visualisiert. Der fluoreszierende Farbstoff flutet über die terminalen Arteriolen an und wird nach Passage des Kapillarbettes über die postkapillären Venolen drainiert. Unter physiologischen Bedingungen können aufgrund der geringen Extravasation dieser hochmolekularen Substanz sämtliche Gefäßsegmente der Mikrozirkulation über einen längeren Zeitraum dargestellt werden. Nach entsprechender Wahl der Fokusebene bzw. nach Eröffnung der Darmwand kann das gesamte kapilläre Netzwerk der Muskularis und der Mukosa des Jejunums der Maus analysiert werden. Die Angioarchitektur der Kapillaren in der Muskularis und in den Villi der Mukosa ist beispielhaft in den Abb.-19 a und b wiedergegeben.

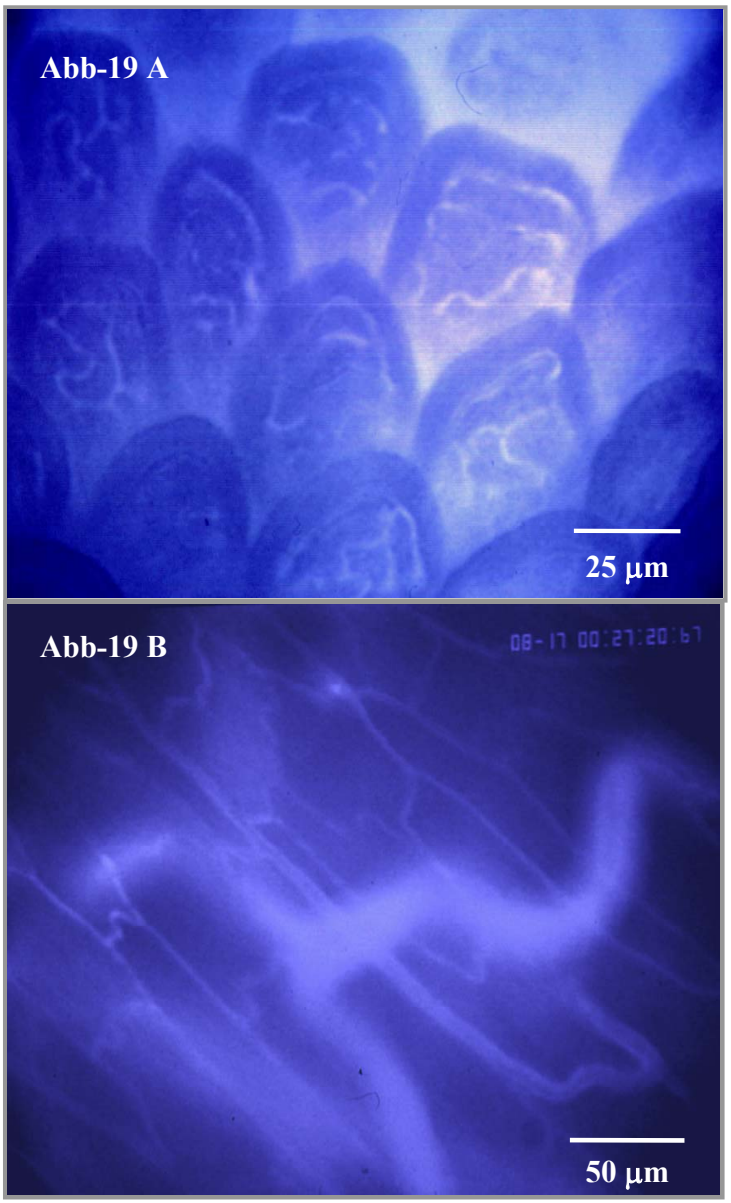


Abb.-19 A und B: Intravitalmikroskopische Bilder der intestinalen Mikrozirkulation. **A:** Perfusion der Mukosa. **B:** Perfusion der Muskularis. Die nutritive Perfusion stellt sich nach i.v.Applikation des Plasmamarkers FITC-Dextran dar. Vergrößerung x 450.

Das dichte kapillare Netzwerk eines einzelnen Villus wird dabei von einer afferenten Arteriole versorgt, die im zentralen Stroma in Richtung Villusspitze zieht und daher in der Epiilluminationstechnik meist orthogonal dargestellt wird. Mehrere postkapilläre Venolen drainieren das dichte kapilläre Netzwerk der Zotten

Während des gesamten Untersuchungszeitraumes präsentierte sich die Mukosa mit einer homogenen Perfusion. Es kam weder zu einer signifikanten Änderung des Heterogenitäts-Indexes (HI), der am Anfang der Untersuchung bei 0,3 ± 0,1 lag, noch zu einer signifikanten Änderung der Funktionellen Kapillardichte (FCD). Diese blieb mit 512 ± 15 cm^{-1} als Ausgangswert während der gesamten Untersuchung nahezu konstant (Tab-6).

Auch die Perfusion der glatten Muskulatur stellte sich homogen dar. Auffällig war jedoch, dass sowohl die longitudinale, wie auch die zirkuläre von einem singulären, mehr oder weniger zwei-dimensionalen Kapillarnetzwerk perfundiert wurde. Auch hier präsentierten sich sowohl die FCD als auch der HI über den gesamten Zeitverlauf ohne signifikante Änderungen. Erwähnenswert ist jedoch, dass die FCD Wert der Muskularis mit 226 ± 21 cm^{-1} signifikant niedriger war als in der Mukosa.

	Baseline	60 min	120 min
Mukosa			
FCD [cm^{-1}]	512±15	515±12	524±31
HI	0,30±0,1	0,21±0,02	0,22±0,02
Muskularis			
FCD [cm^{-1}]	226±21*	204±6*	207±7*
HI	0,27±0,02	0,21±0,03	0,16±0,07

Tab.-6: Nutritive Perfusion: Funktionelle Kapillardichte (FCD) und Heterogenitätsindex (HI) in der Mukosa und Muskularis. MW±SEM, *$p<0.05$ Muscularis vs. Mukosa (Mann-Whitney Rangsummentest). Die Kapillardichten im Bereich von Mukosa und Muskularis zeigten keine signifkanten Änderungen im Zeitverlauf (Friedman Test).

5.2 Abschnitt 2: Bedeutung von P-Selektin für die postischämische Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion Mikrozirkulation

5.2.1 Mikrohämodynamik

5.2.1.1 Sham-Operation

5.2.1.1.1 Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen

Bei sham-operierten Kontrolltieren fanden sich nur eine geringe Interaktion zwischen Leukozyten und mikrovaskulärem Endothel. Insgesamt beschränkte sich die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion strikt auf postkapilläre Venolen (Tab.-7).

5.2.1.1.2 Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen

Ähnlich wie bei den LEI konnten auch bei den Thrombozyten neben freifließenden Zellen sowohl eine rollende, als auch eine fest adhärente Zell-Fraktion nachgewiesen werden. Es besteht jedoch ein signifikanter Unterschied in der Lokalisation der Interaktionen zwischen LEI und TEI. Während sich die Leukozyten-Interaktionen auf die postkapilläre Mikrozirkulation beschränken, finden sich rollende und adhärierende Thrombozyten (insbesondere nach I/R, s.u.) zusätzlich auch in präkapillären Arteriolen. Entsprechend den Leukozyten sind die Interaktionen unter Kontrollbedingungen ein nur seltenes Phänomen, was die Vermutung nahelegt, dass den Interaktionen mit dem Endothel unter physiologischen Bedingungen keine große Bedeutung zukommt. In den Arteriolen betrug die Zahl adhärenter Thrombozyten 60 ± 26 mm^{-2}, in den Venolen konnten 24 ± 9 mm^{-2} (Abb.-20 bis 23)

5.2.1.2 Ischämie/Reperfusion

5.2.1.2.1 Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen

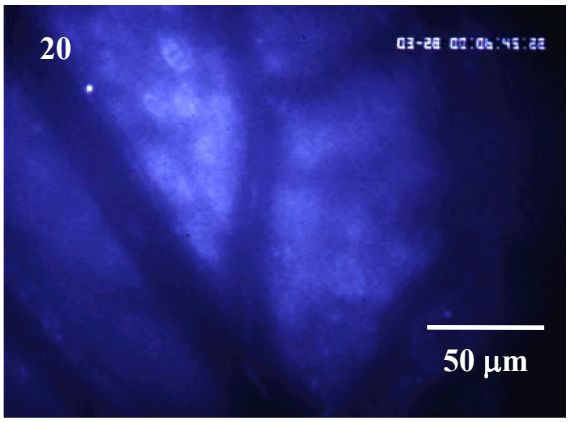
Nach einer Stunde segmentaler, intestinaler Ischämie kam es zu einem dramatischen Anstieg der Leukozyten-Interaktionen mit dem postischämischen Endothel. Es fand sich eine signifikante Zunahme der Anzahl rollender und fest adhärenter Leukozyten im Bereich postkapillärer Venolen (Tab.-7).

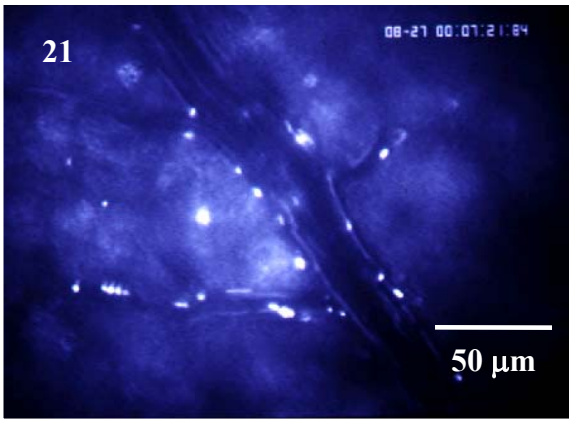
	Sham	I/R+Vehikel
Rollende Leukozyten(1/s/mm)	6±1	24±6*
Adhärente Leukozyten (mm^{-2})	2±2	213±22*

Tab.-7: Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen in den postkapillären Venolen der intestinalen Submukosa nach Sham-Operation und nach Induktion einer einstündigen Ischämie. MW±SEM, n=6 pro Gruppe,*p<0,05 vs. Sham. Dunn´s Test (Auszug aus Tabelle 8).

5.2.1.2.2 Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen

Dagegen waren die TEI nicht auf die postkapillären Venolen beschränkt, sondern fanden insbesondere auch im Bereich postischämischer Arteriolen statt. Bereits 5 Minuten nach Beginn der Reperfusion kam es zu einer Zunahme der Anzahl rollender und fest adhärenter Thrombozyten, die sich über den weiteren Beobachtungszeitraum nicht änderte (Abb 20 und 21).





Sham **I/R**

Abb.-20 und 21: Intravitalmikroskopische Aufnahmen submuköser Gefäße unter Kontrollbedingungen (links, Nr. 20) und nach 1 Stunde Ischämie (rechts, Nr. 21). Während unter Kontrollbedingungen nur ein einziger Thrombozyt am Endothel adhärent ist, kommt es nach I/R zu einem signifikanten Anstieg der TEI.

Die Zahl von rollenden Thrombozyten betrug in den Arteriolen 27 ± 3/s/mm, in Venolen 42 ± 6/s/mm. Auch die sekundäre Form der Wechselwirkung zwischen Thrombozyten und dem mikrovaskulären, postischämischen Endothel, die feste Adhärenz, konnte sowohl in Arteriolen als auch in den Venolen beobachtet werden. Auch hier kam es zu einem signifikanten, beeindruckenden Anstieg nach einer Stunde Ischämie (Abb.-21 bis 23).

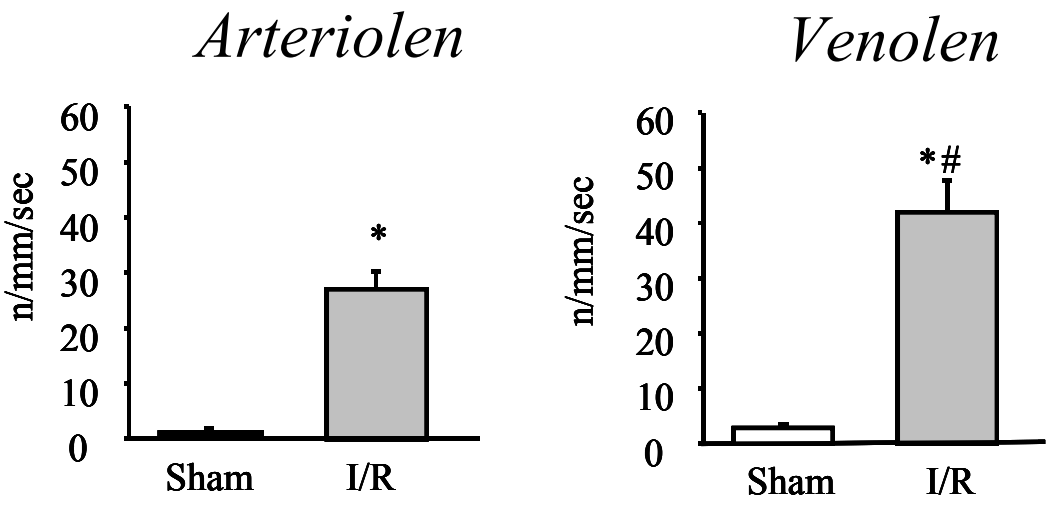


Abb.-22: Anzahl rollender Thrombozyten im Dünndarm: Nach Sham-Operation und nach einstündiger Ischämie. Mean ±SEM, n=5, *p<0.01 vs Sham, Dunn´s Test.

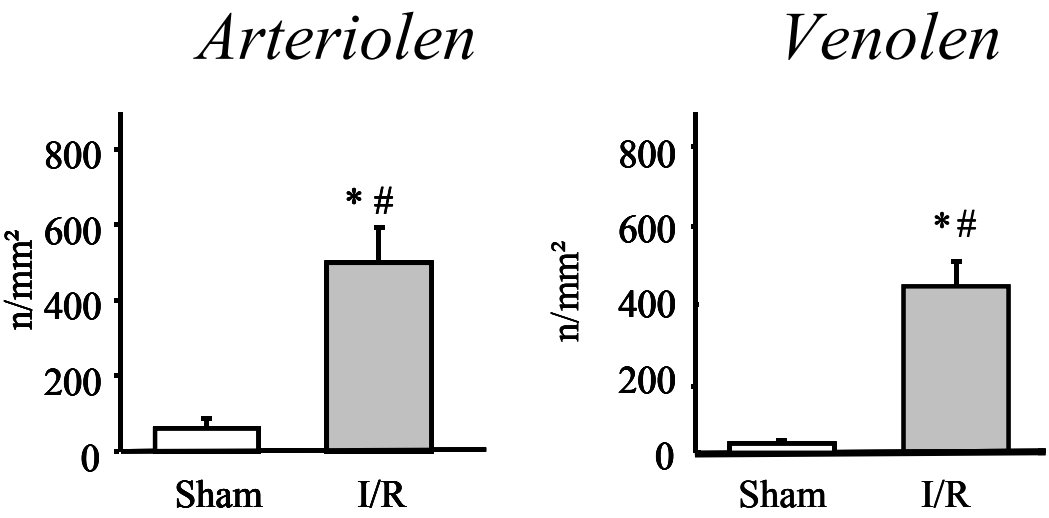


Abb.-23: Anzahl adhärenter Thrombozyten im Dünndarm: Nach Sham-Operation und nach einstündiger Ischämie. MW ±SEM, n=5, *p<0.01 vs Sham, Dunn´s Test.

5.2.1.3 Bedeutung von P-Selektin für die postischämischen Thrombozyten- und Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen

5.2.1.3.1 Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen

Um die Bedeutung von P-Selektin für die postischämischen LEI und TEI zu analysieren, wurde in einer weiteren Versuchgruppe unmittelbar vor Reperfusion ein blockierender, monoklonaler, gegen P-Selektin gerichteter Antikörper i.v. appliziert. Die *in vivo* Immuninhibition von P-Selektin führte zu einer dramatischen Reduktion der Anzahl rollender, aber auch fest adhärenter Leukozyten in postkapillaren Venolen (Tab.-8).

	Sham	I/R+Vehikel	I/R+Kontroll-IgG	I/R+Anti-CD62P
Anzahl rollender Leukozyten [1/s/mm]	6 ±1	24±.6*	36±8*	1±0,4
Anzahl adhärenter Leukozyten [mm^{-2}]	2±2	213±22#	179±37#	53±13

Tab.-8: Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen. Unter Kontroll-Bedingungen, nach 1h I/R, sowie nach Gabe eines monoklonalen P-Selektin-Antikörpers. MW ±SEM, n=5, #p<0.01 vs Sham, *p<0.01 vs Anti-CD62P, Dunn´s Test.

5.2.1.3.2 Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion

Daneben kam es zusätzlich zu einer signifikanten Abnahme des Thrombozyten-Rollings und der festen Thrombozytenadhäsion, sowohl in Arteriolen als auch in Venolen. Als Kontrolle dienten Tiere, welchen ein irrelevanter Kontrollantikörper intravenös appliziert wurde.

Da, wie bereits erwähnt, sowohl Endothel, als auch Thrombozyten P-Selektin exprimieren, war es für uns von Interesse, welches der beiden P-Selektine, das endotheliale und/oder das thrombozytäre, an der durch I/R induzierten Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion beteiligt ist. Um diese Frage beantworten zu können, war der Einsatz P-Selektin-defizienter Tiere erforderlich. Zwei Gruppen wurden untersucht. In

einem Fall wurden P-Selektin-defiziente Thrombozyten fluorochromiert und in der postischämischen Mikrozirkulation von Wildtyp-Tieren untersucht. Im anderen Fall, wurden Wildtyp-Thrombozyten separiert und mit Rhodamin-6G beladen, um anschließend in der postischämischen Mikrostrombahn P-Selektin-defizienter Tiere analysiert werden zu können.

Während der Mangel an thrombozytärem P-Selektin keinen Einfluss auf die Anzahl rollender und fest adhärenter Thrombozyten hatte, zeigte sich bei fehlender endothelialer P-Selektin-Expression eine signifikante Reduktion der Anzahl rollender und fest adhärenter Thrombozyten, sowohl in postischämischen Arteriolen als auch Venolen. Diese Ergebnisse legen nahe, dass für die Interaktionen von Thrombozyten mit dem postischämischen Gefäßendothel das endotheliale P-Selektin mitverantwortlich ist (Abb.-24 und 25).

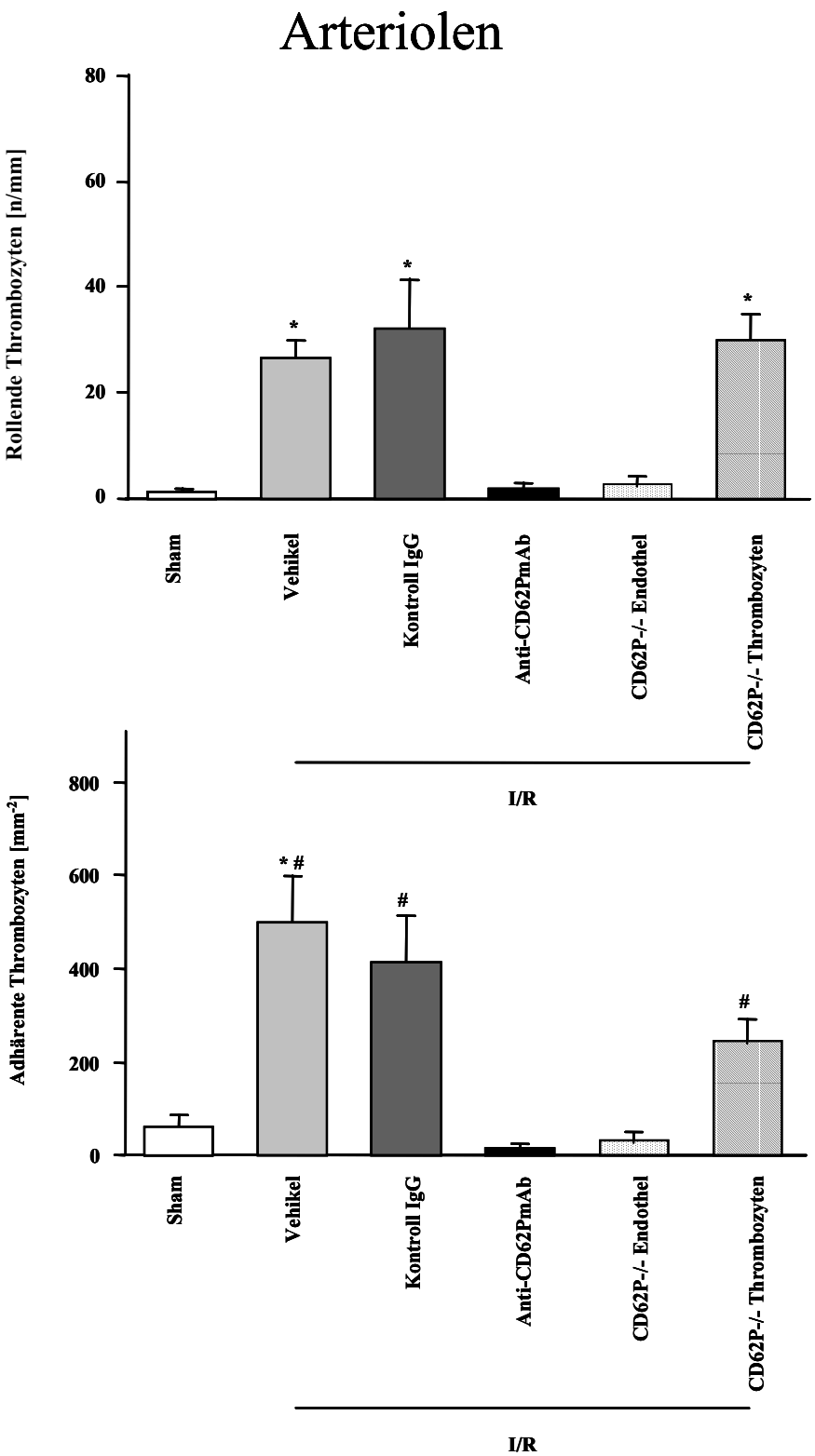


Abb.-24: Thrombozyten-Rolling (oben) und Adhäsion (unten) in Arteriolen unter Kontroll-Bedingungen, nach 1 h I/R, sowie nach Gabe eines monoklonalen P-Selektin-Antikörpers bzw. bei CD62P-defizientem Endothel oder CD62P-defizienten Thrombozyten. MW ±SEM, n=5, #p<0.01 vs. Sham, *p<0.01 vs. anti-CD62P, Dunn´s Test.

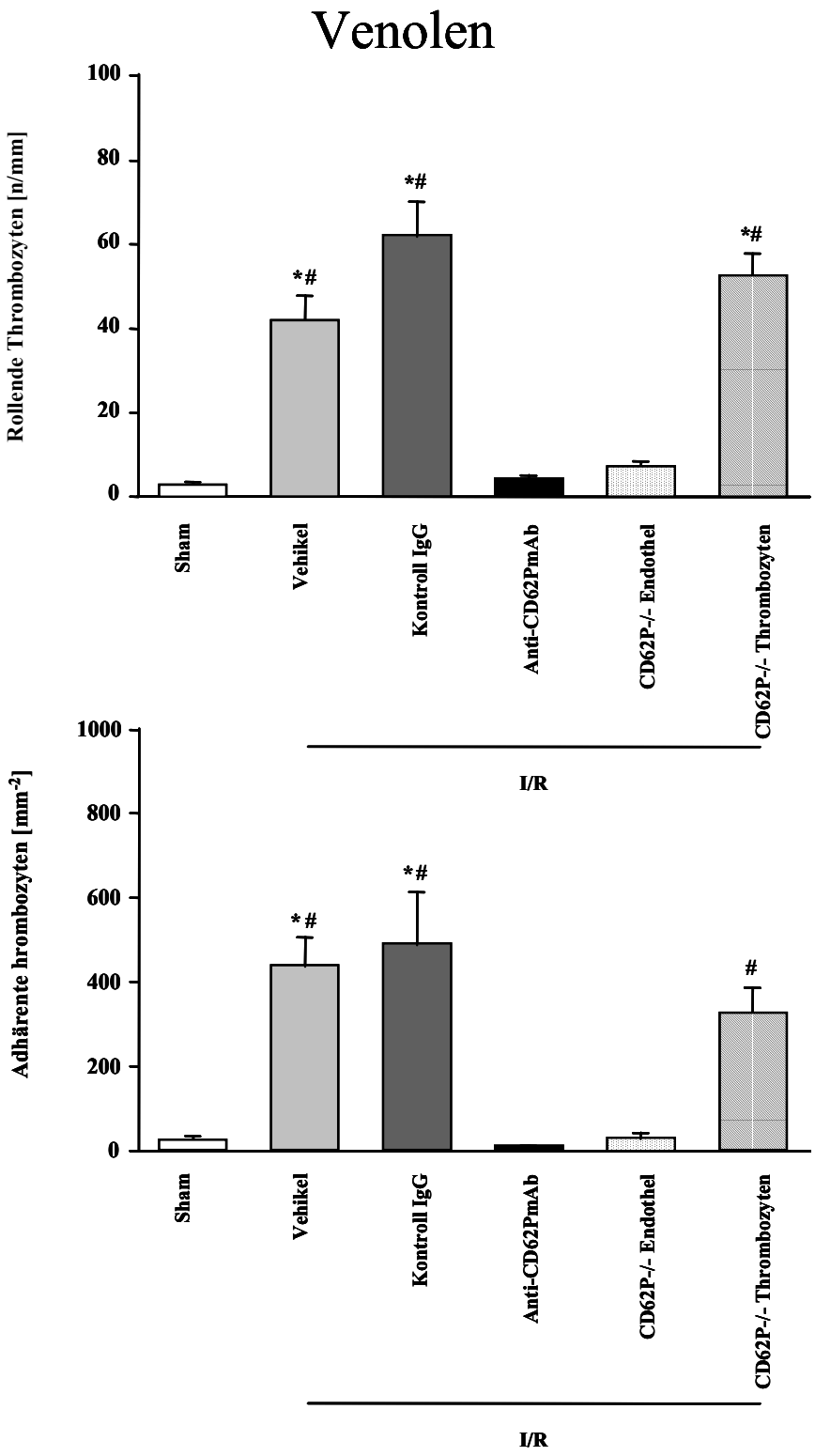


Abb.-25: Thrombozyten-Rolling (oben) und Adhäsion (unten) in Venolen unter Kontroll-Bedingungen, nach 1 h I/R, sowie nach Gabe eines monoklonalen P-Selektin-Antikörpers bzw. bei CD62P-defizientem Endothel oder CD62P-defizienten Thrombozyten. MW ±SEM, n=5, #p<0.01 vs. Sham, *p<0.01 vs. anti-CD62P, Dunn´s Test.

5.2.2 Histologie

5.2.2.1 Immunhistologie

Um die Expression von P-Selektin in der Mikrostrombahn des Dünndarmes zu analysieren, wurden nach Abschluss der intravitalmikroskopischen Untersuchung Proben für die Immunhistologie gewonnen. An Gefrierschnitten erfolgte anschließend die immunhistochemische Analyse der Expression von P-Selektin mit Hilfe eines spezifischen monoklonalen Antikörpers. Der gleichzeitige immunhistologische Nachweis von von Willebrand Faktor diente zum Nachweis vaskulärer Strukturen im Gewebe.

Die immunhistologische Analyse zeigte eine allenfalls geringe Expression von P-Selektin in Arteriolen und Venolen des Dünndarmes sham-operierter Tiere. Nach Ischämie-Reperfusion fand sich dagegen eine deutliche Zunahme der P-Selektin-Expression, erkennbar an einer braun-rötlichen, spezifischen Färbung. P-Selektin fand sich dabei sowohl in Arteriolen als auch in Venolen (Abb.-26). Auf zellulärer Ebene war CD62P auf Thrombozyten nachweisbar, die dem postischämischen Endothel anhafteten (granuläres Färbungsmuster). Die postischämischen Arteriolen und Venolen zeigten eine deutliche endotheliale Expression des Selektins (lineares Färbungsmuster), während dieses bei den P-Selektin-defizienten Tieren weder unter physiologischen Bedingungen noch nach Ischämie-Reperfusion P-Selektin nachweisbar war (Abb.-26).

5.2.2.2 Elektronenmikrokopie

Perfusions-fixierte Proben des Dünndarmes dienten der elektronenmikroskopischen Analyse. Bei Kontrolltieren ließen sich elektronenmikroskopisch keine wand-adhärenten Thrombozyten nachweisen. Dagegen fand sich nach Ischämie-Reperfusion eine direkte Interaktion zwischen Thrombozyt und Endothelzelle. Defekte in der Endothelzellschicht sowie Interaktionen zwischen Thrombozyten und subendothelialer Matrix zeigten sich nicht. Am Endothel adhärente Thrombozyten waren in unterschiedlichen Aktivierungsstadien nachweisbar; eine teilweise oder vollständige Degranulation der Thrombozyten war zu beobachten, zum Teil bildeten sie Pseudopodien aus. Neben am Endothel adhärenten Thrombozyten fanden sich auch Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate in postischämischen Mikrogefäßen (Abb.-27).

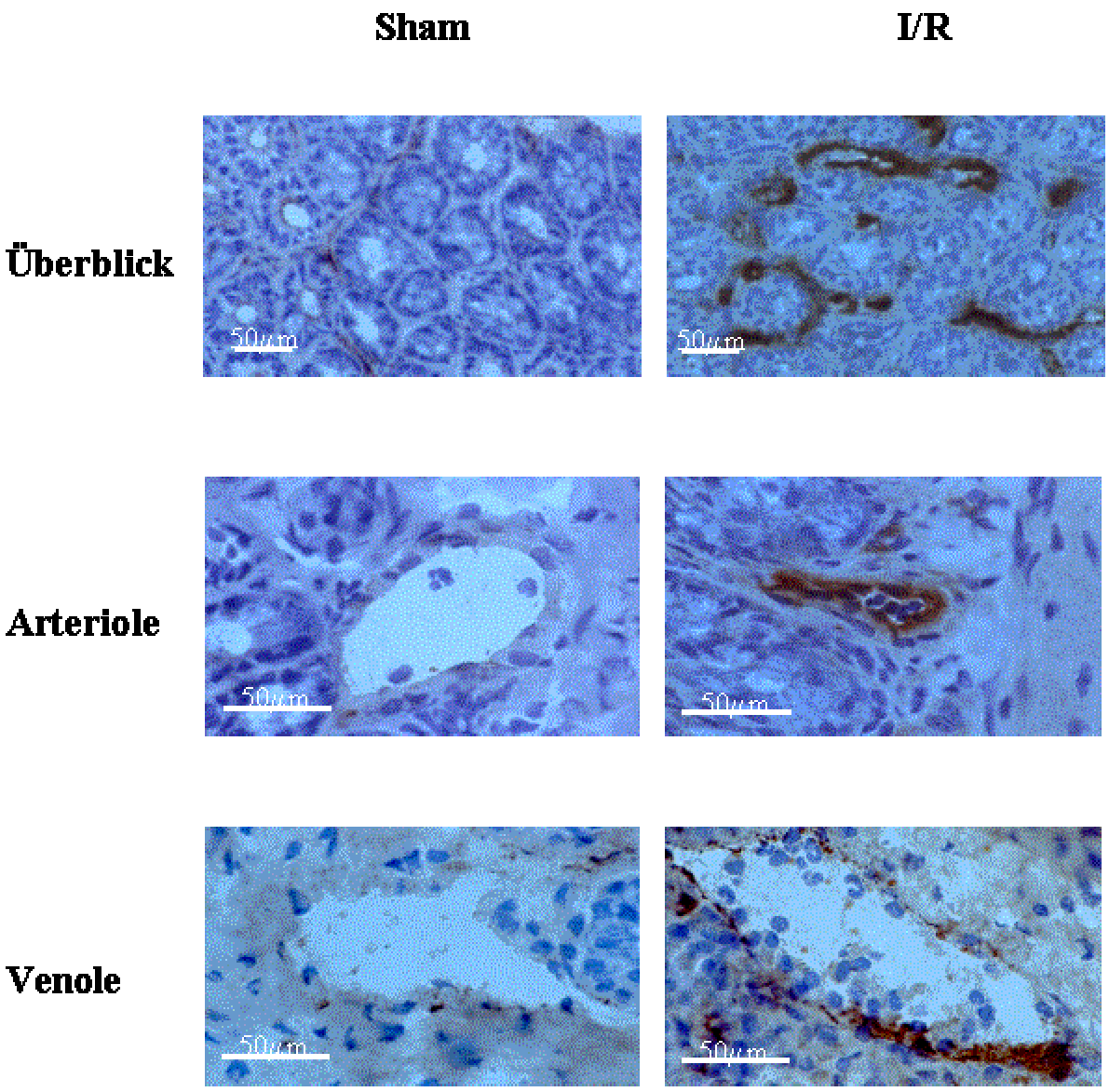
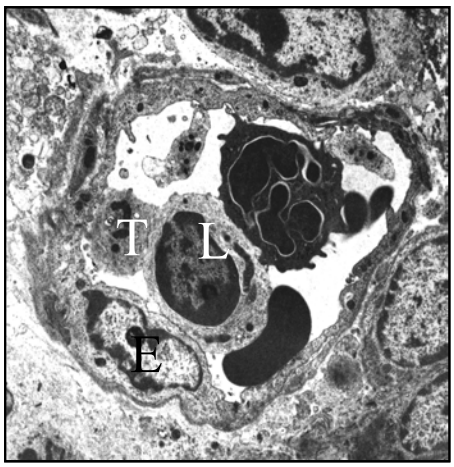


Abb.-26: P-Selektin-Expression des Dünndarms der Maus vor und nach I/R unter Verwendung von anti-P-Selektin Antikörpern (Pharmingen) sowie kommerziell erhältlicher immunhistochemischer Kits (Vectastain;Camon, Wiesbaden, Deutschland). Nach einstündiger Ischämie kommt es zu einer starken P-Selektin-Expression in der postischämischen Mikrozirkulation, sowohl in Arteriolen, als auch in Venolen.

27 A



27 B

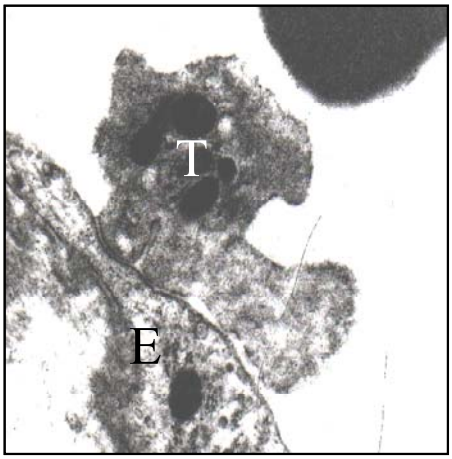


Abb.-27A und B: Elektronenmikroskopische Analyse der Mikrostrombahn nach Ischämie-Reperfusion. A: Thrombozyten (T) interagieren mit dem Endothel (E), wie auch mit Leukozyten (L) in einer kleinen Venole (Vergrößerung 3.000x). B: Am Endothel adhärenter Thrombozyt (Vergrößerung 20.000x). Man erkennt eine „Verzahnung“ zwischen Thrombozyt und Endothelzelle (Elektronenmikroskopische Bilder wurden dankenswerterweise von Dr. Dr.Leiderer angefertigt) .

5.3 Abschnitt 3: Der Einfluss von NO auf die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen

5.3.1 Mikrohämodynamik

5.3.1.1 Sham-Operation

5.3.1.1.1 Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen

Es fanden sich bei den sham-operierten Tieren dieses Abschnittes unserer Untersuchungen nur eine geringe Interaktion zwischen Thrombozyten und physiologischem Endothel von submukosalen Arteriolen und Venolen des Dünndarmes der Maus (Abb.-28A).

5.3.1.2 Ischämie/Reperfusion

5.3.1.2.1 Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen

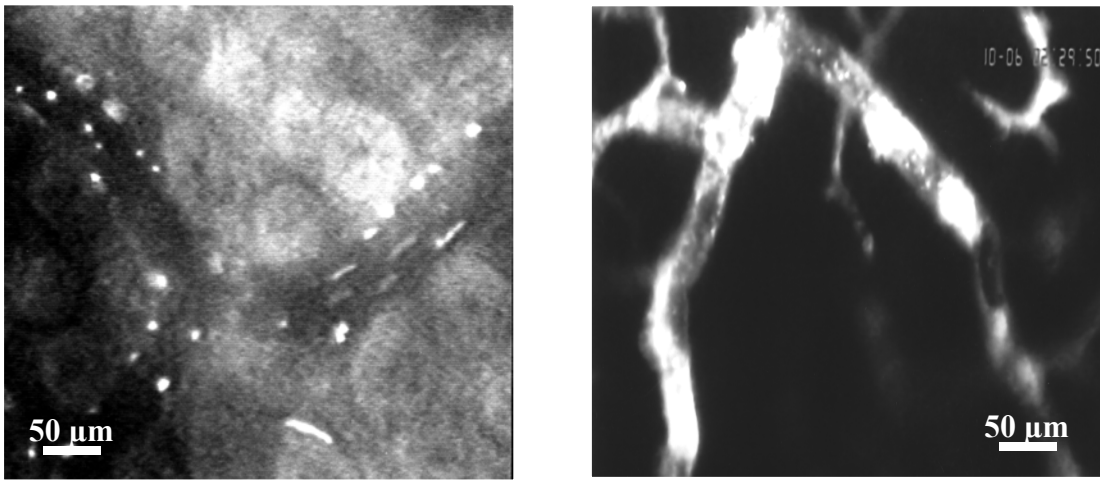
Nach einstündiger segmentaler Ischämie des Dünndarms fand sich eine deutliche Zunahme von mit dem postischämischen Endothel interagierenden Thrombozyten. Die Anzahl adhärenter Thrombozyten stieg im Vergleich zur sham operierten Kontrollgruppe um mehr als das Doppelte an.
Thrombozytenaggregate konnten nicht nachgewiesen werden.

5.3.1.3 Bedeutung der endogenen NO-Synthese für die postischämische Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion (L-NAME-behandelte Tiere)

Die Infusion des nicht selektiven NOS-Inhibitors kurz vor Induktion der Ischämie und vor Beginn der Reperfusion führte zu einem weiteren signifikanten Anstieg der Anzahl von Interaktionen zwischen Thrombozyten und postischämischem Endothel. Neben einer signifikanten Zunahme der Anzahl rollender Thrombozyten kam es zu einem dramatischen Anstieg der Adhärenz um etwa das 5-fache in den postischämischen Arteriolen. Auch in den Venolen war eine Zunahme der festen Interaktionen um das 9-fache zu verzeichnen (Abb. 29-32).

Auffälliger war die dramatische Zunahme der Anzahl von Plättchenaggregaten in der postischämischen Mikrostrombahn. Die Aggregate fanden sich, wie auch die

Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen, sowohl in Arteriolen, als auch in Venolen der postischämischen Mikrozirkulation (Abb.-29, 33 und 34).



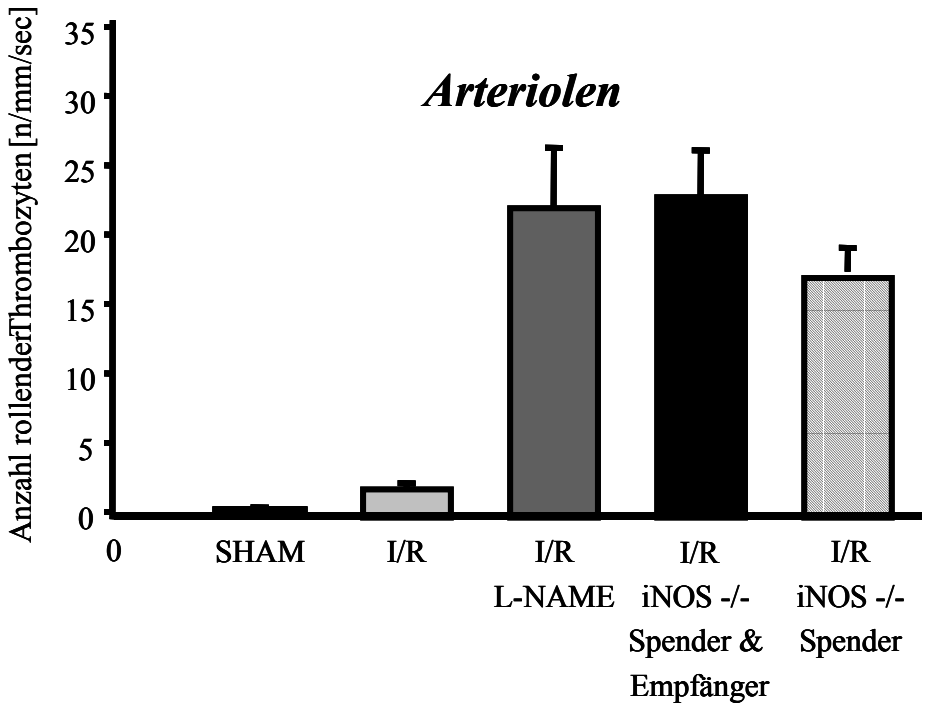
I/R **I/R + L-NAME**

Abb.-28 A und B: Bedeutung der endogenen NO-Synthese für die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen. Nach Ischämie-Reperfusion finden sich zahlreiche am Endothel adhärente Thrombozyten, jedoch keine Thrombozytenaggregate (links). Dagegen kommt es nach Ischämie-Reperfusion *und* zusätzlicher Inhibition der endogenen NO-Synthese zur Thrombozytenaggregation in der Mikrostrombahn (rechts).

5.3.1.4 Bedeutung der iNOS für die Regulation der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion nach Ischämie/Reperfusion (iNOS-defiziente Tiere)

Da L-NAME unselektiv auf die verschiedenen Isoformen der NOS wirkt, analysierten wir zwei zusätzliche Gruppen. Rhodamin-6G-markierte, iNOS defiziente Thrombozyten wurden in einem Fall in iNOS defiziente Empfängertiere, im anderen Fall in Wildtyp-Mäuse nach Ischämie/Reperfusion infundiert. Bei beiden Gruppen erfolgte die Infusion der Fluoreszenz-markierten Thrombozyten ca. 10-15 min nach Reperfusion. Unabhängig von dem iNOS-Status der Empfängertiere, fanden sich in diesen Gruppen nach Ischämie-Reperfusion ein bemerkenswerter Anstieg rollender und adhärenter Thrombozyten. Wie bei den anderen Gruppen zeigte sich dieser Anstieg sowohl in Arteriolen, wie auch in Venolen. Wie bereits bei den mit L-NAME behandelten Tieren fand sich auch bei einem Defekt der thrombozytären iNOS (unabhängig von der Abwesenheit bzw. dem Vorhandensein des Enzyms bei den Empfängern) ein

signifikanter Anstieg der Anzahl von Thrombozyten-Aggregaten in der postischämischen Mikrostrombahn. Diese auffällige postischämische Aggregationsbildung lässt vermuten, dass NO nicht alleine die heterotypische Interaktion zwischen Thrombozyten und postischämischem Endothel, sondern insbesondere auch die homotypische Thrombozyten–Thrombozyten-Interaktion (Aggregation) während Ischämie/Reperfusion reguliert (Abb.-29 bis 34).



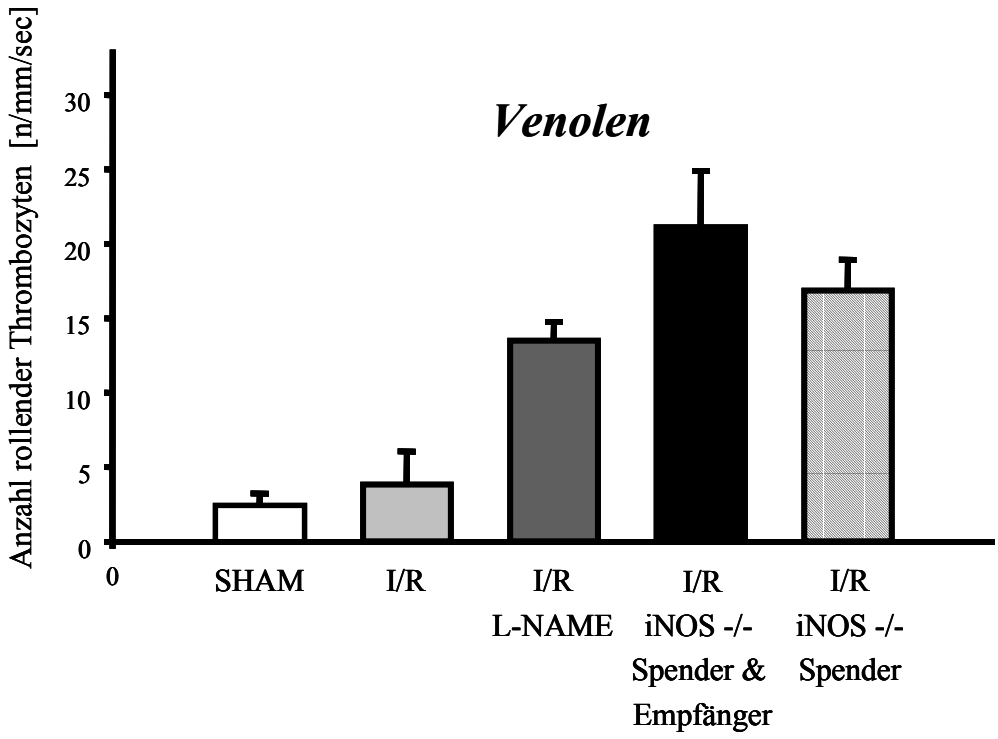


Abb.-29 und 30: Anzahl rollender Thrombozyten in Arteriolen und Venolen. Durch Blockade der NO-Synthese mittels L-NAME kommt es zu einem signifikanten Anstieg der Anzahl rollender Thrombozyten. Bei fehlender iNOS in den Thrombozyten fand sich eine Zunahme rollender Thrombozyten in Arteriolen und Venolen. MW ±SEM, n=5,*p<0,05 vs. Sham, Dunn´s Test

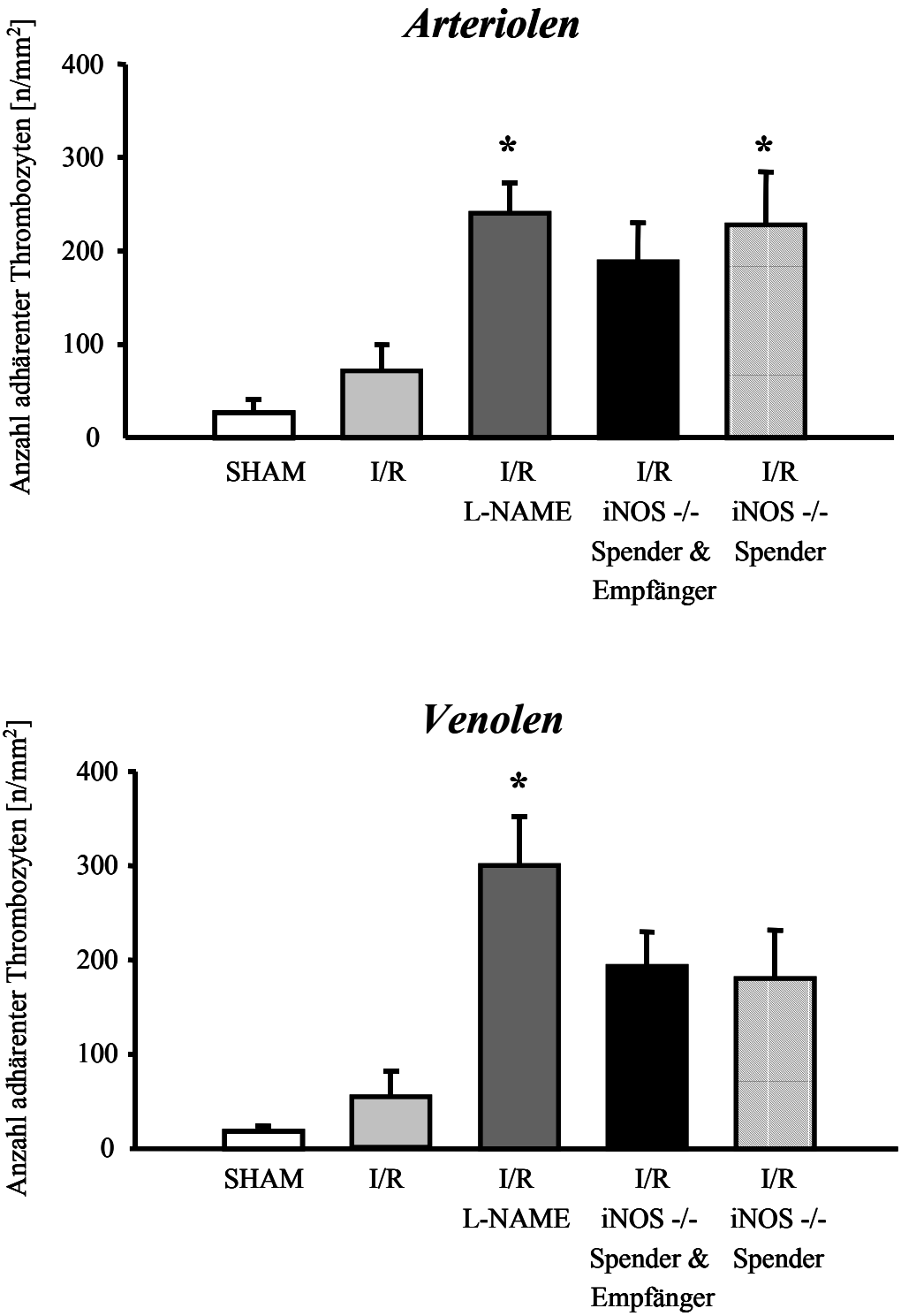
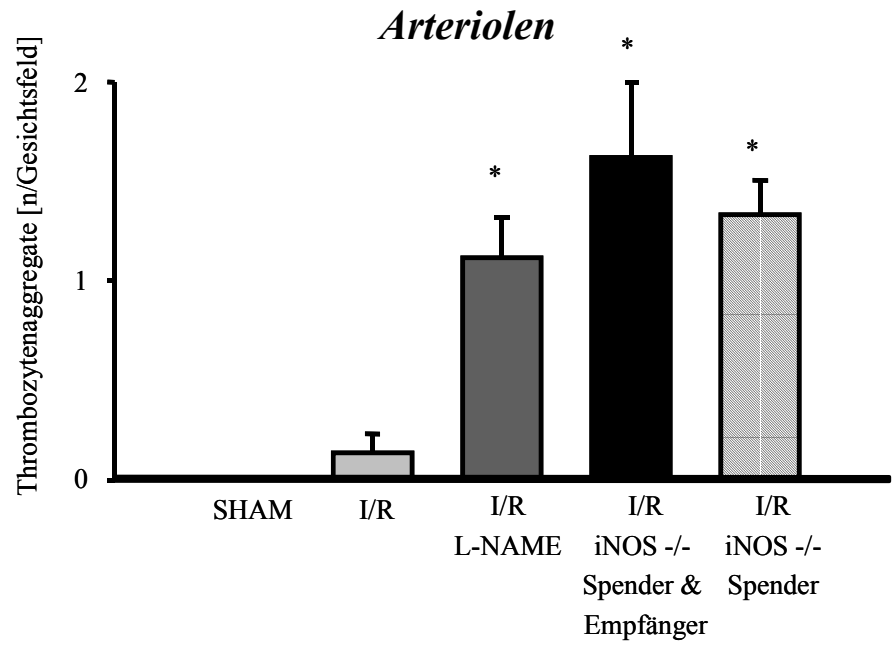


Abb.-31 und 32: Anzahl adärenter Thrombozyten in Arteriolen und Venolen. Durch Blockade der NO-Synthase kommt es zu einem signifikanten Anstieg adhärenter Thrombozyten. Das Fehlen der iNOS in den Thrombozyten führt zu einem Anstieg der Anzahl adhärenter Thrombozyten in Arteriolen und Venolen. MW ±SEM, n=5,*p<0,05 vs. Sham, Dunn´s Test.



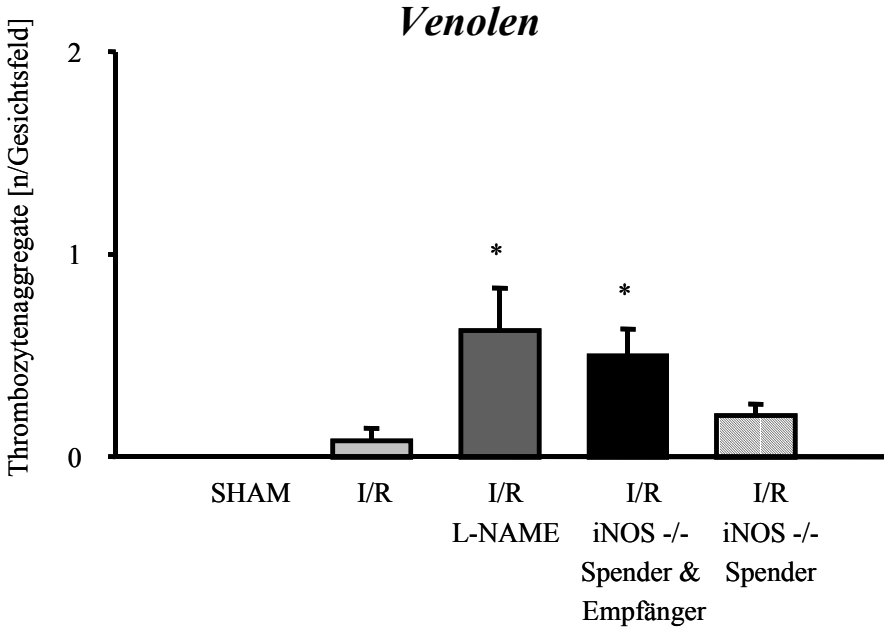


Abb.-33 und 34: Thrombozytenaggregate pro Gesichtsfeld. Nach NOS-Inhibition oder iNOS-Defizienz kommt es zu einem signifikanten Anstieg aggregierender Thrombozyten in der postischämischen Mikrozirkulation. Mean ±SEM, n=5,*p<0,05 vs. Sham, Dunn´s Test.

6 Diskussion

6.1 Wissenschaftlicher Hintergrund und Zielsetzungen.

Atherosklerotische Gefäßveränderungen und die durch sie induzierte Minderperfusion vitaler Organe wie des Herzens (akutes Koronarsyndrom) oder des Gehirns (zerebrale Ischämie) tragen noch immer wesentlich zur Morbidität und Mortalität in den westlichen Industrienationen bei [158-160]. Die Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten im Bereich atherosklerotischer Plaques (Abb.-35) spielt eine zentrale Rolle für die Entstehung akuter Gefäßverschlüsse auf dem Boden vorbestehender atherosklerotischer Gefäßveränderungen. Heute können viele der ischämischen Episoden mit Hilfe pharmakologischer (z.B. rtPA, Streptokinase, u.a.) oder interventioneller Verfahren (z.B. Carotis-PTA, PTCA) oft bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt terminiert werden [167]. Doch nicht nur die Ischämie *per se* trägt zur Manifestation eines Organschadens bei, auch in der Phase der Reperfusion kommt es zur einer Gewebeschädigung.

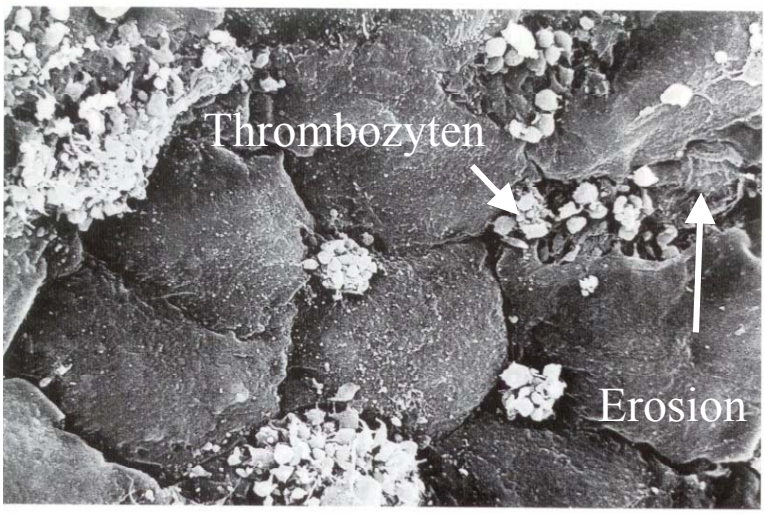


Abb.-35: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Erosion in einem arteriellen Gefäß mit adhärenten Thrombozyten (Aufnahme dankenswerter Weise von Prof. Dr. Gawaz, Technische Universität München, zur Verfügung gestellt).

Dieser sog. Reperfusionsschaden ist ein inflammatorischer Prozess, der sich insbesondere auf der Ebene der Mikrozirkulation manifestiert. Bislang werden Leukozyten, insbesondere Granulozyten, als zentrale Mediatoren des Reperfusionsschadens angesehen. Doch auch Thrombozyten werden im Bereich der postischämischen Mikrozirkulation rekrutiert und können über die Freisetzung von Sauerstoffradikalen, Chemokinen, Cytokinen sowie über die Expression von Transmembranproteinen, wie des CD40 Liganden, wesentlich zur Entstehung und Aufrechterhaltung eines inflammatorischen Prozesses beitragen (s.u.) [40;115;117]. Über die Kinetik und Mechanismen der Rekrutierung von Thrombozyten in der postischämischen Mikrozirkulation ist bislang jedoch nur wenig bekannt. Ziel unserer Untersuchung war es daher, die Dynamik der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen in der postischämischen Mikrozirkulation und die an deren Regulation beteiligten molekularen Determinanten *in vivo* zu charakterisieren. Hierzu etablierten wir ein Modell, welches die *in vivo* Visualisierung und quantitative Analyse der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion in der Mikrozirkulation des postischämischen Dünndarmes der Maus ermöglichte.

6.2 Diskussion des Modells (1. Abschnitt: Modelletablierung).

6.2.1 Einsatz der intravitalen Videofluoreszenzmikroskopie zur Analyse der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen.

Als Methode zur direkten Visualisierung von Thrombozyten in der postischämischen Mirkozirkulation verwendeten wir die intravitale Videofluoreszenzmikroskopie. Anders als histologische [27] bzw. szintigraphische Verfahren [mit Einsatz ^{111}Indium-markierter Thrombozyten [26]] erlaubt die intravitale Videofluoreszenzmikroskopie den direkten Einblick in die Dynamik der Mikrozirkulation des untersuchten Gewebes mit quantitativer Beurteilung zellulärer Phänomene einerseits und des mikrovaskulären Blutflusses andererseits. Zusätzlich ermöglicht die *in vivo* Fluoreszenzmikroskopie dabei die getrennte Visualisierung und quantitative Analyse der einzelnen Segmente der Mikrozirkulation, wie Arteriolen, Kapillaren sowie Venolen und vermag die nutritive Perfusion selektiv zu erfassen. Die intravitale Mikroskopie ist daher für experimentelle Studien den übrigen indirekten Untersuchungsverfahren überlegen.

6.2.2 Untersuchung der Parameter in der Mikrozirkulation des Dünndarmes.

Die *in vivo* Mikroskopie wurde seit vielen Jahren an verschiedensten Organen wie Gehirn [85], Lunge [92], Leber [125;180;182], Pankreas [76-79], Skelettmuskel [123;124] und anderen als Methode zur quantitativen Analyse der Mikrozirkulation eingesetzt [126]. In der vorliegenden Untersuchung entschieden wir uns für den Dünndarm, da er einer intravitalmikroskopischen Untersuchung leicht zugänglich ist und aufwendige, traumatisierende Präparationen entfallen. Zusätzlich lässt der Dünndarm – im Gegensatz zu anderen Organen - aufgrund seiner charakteristischen Angioarchitektur die Analyse aller Gefäßsegmente der Mikrostrombahn zu, d.h. der Arteriolen, Kapillaren und Venolen [15;56;109;113]. Dadurch werden differenzierte Aussagen über das Verhalten von Thrombozyten in den unterschiedlichen Abschnitten der postischämischen Mikrostrombahn möglich.

6.2.3 Mikrohämodynamische Parameter.

Sämtliche Analysen mikrozirkulatorischer Parameter, sowohl der zellulären Phänomene als auch der mikrovaskulären Perfusion, erfolgten off-line, wodurch der Zeitraum des Versuches auf ein Minimum reduziert werden konnte. Durch den Einsatz einer computergestützten Bildanalyseeinheit [Computer assissted microcirculation analysis system CAMAS [195;196]] zur Untersuchung der Mikrozirkulation konnte eine detaillierte Quantifizierung der Mikrohämodynamik erreicht werden. Im Einzelnen wurden folgende Parameter analysiert.

1.) Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion: Bei der Interaktion zwischen Thrombozyten und mikrovaskulärem Endothel konnte, ähnlich wie die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion, eine intermittierende Adhäsion, das sog. Thrombozyten-Rolling, und eine stationäre Adhäsion, bei der die Thrombozyten über einen längeren Zeitraum am Endothel adhärieren, unterschieden werden. Entsprechend den in der Literatur für die Analyse der Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen gängigen Definitionen [195] wurden als rollend solche Thrombozyten bezeichnet, die eine imaginär durch das Gefäß gelegte Linie mit einer signifikant geringeren Geschwindigkeit, als mit der Zentralstromgeschwindigkeit, passierten. Als adhärent wurden dagegen Thrombozyten definiert, die ohne Positionsänderung in einem Gefäßabschnitt dem Endothel länger als 30 Sekunden anhafteten. Anders als nach Ischämie/Reperfusion, fand sich unter physiologischen Bedingungen keine relevante Interaktion zwischen

Thrombozyten und endothelialer Auskleidung intestinaler Arteriolen und Venolen, was zusammen mit den durchflußzytometrischen Ergebnissen eine Präaktivierung der separierten und *ex vivo* mit Rhodamin-6G beladenen Zellen unwahrscheinlich erscheinen lässt.

Zu erwähnen bleibt, dass sich die Anzahl rollender und adhärenter Thrombozyten nach Ischämie/Reperfusion in Abschnitt 2 und 3 der vorliegenden Untersuchung unterscheidet. Erklärung hierfür ist a.e. die Tatsache, dass in den beiden Abschnitten die Applikation der fluoreszenzmarkierten Thrombozyten aus technischen Gründen zu unterschiedlichen Zeitpunkten erfolgte. So wurden in den Versuchen zur Charakterisierung der Bedeutung von P-Selektin (Abschnitt 2) die markierten Thrombozyten bereits 5 min vor Reperfusionsbeginn injiziert (siehe Seite 31, 3.3.7.2) und zirkulierten somit bereits während der initialen Reperfusion in der postischämischen Mikrostrombahn. Dagegen wurden im dritten Abschnitt der Arbeit zur Untersuchung der Bedeutung von endogenem Stickstoffmonoxid die Thrombozyten erst einige Zeit nach Reperfusion appliziert. Rationale hierfür war die Beobachtung, dass es durch die Infusion von L-NAME zu einem kurzfristigen Blutdruckanstieg kam. Die fluoreszierenden Thrombozyten wurden daher erst nach einer Stabilisierungsphase appliziert (siehe S 36, 3.4.7.2). Diese Unterschiede im Aufbau der Versuche ist eine wahrscheinliche Ursache für die unterschiedliche Anzahl rollender und adhärenter Thrombozyten in den verschiedenen Abschnitten der vorliegenden Arbeit. So konnten nicht publizierte Arbeiten aus dem Institut für Chirurgische Forschung zeigen, dass das Ausmaß der postischämischen Thrombozytenakkumulation mit dem Verlauf der Reperfusion zunimmt.

2.) Leukozyten-Endothel-Interaktion: Die Adhärenz von Leukozyten am mikrovaskulären Endothel - neben kapillaren Perfusionsausfällen - charakterisiert den I/R-Schaden. In der vorliegenden Arbeit diente die Analyse der Interaktion zwischen Leukozyten und Endothel als Maß für die postischämische inflammatorische Leukozytenakkumulation. Der Beurteilung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in postkapillaren Venolen der Submukosa wurden dabei die in der Literatur gängigen Definitionen für Leukozytenadhärenz und Leukozytenrolling zugrundegelegt [195].

3.) Mikrovaskuläre Perfusion: In der Mukosa und der Muskularis wurden die funktionelle Kapillardichte (FCD) und der Heterogenitätsindex bestimmt. Hierbei wurde unter Einsatz der computergestützten Bildanalyseeinheit CAMAS pythagoreisch die Länge der mit Erythrozyten-perfundierten Kapillaren pro Fläche des Beobachtungsfelds analysiert [134]. Die Ermittlung der FCD berücksichtigt damit nur Kapillaren, welche von

roten Blutkörperchen perfundiert werden und damit gegebenenfalls zur Oxygenierung des Gewebes beitragen, während Kapillaren mit fehlender Perfusion oder aber nur von Plasma durchströmte Kapillaren unberücksichtigt bleiben. Somit stellt die funktionelle Kapillardichte einen physiologisch wie pathophysiologisch hochrelevanten Parameter für die nutritive Perfusion des betroffenen Gewebes dar. Durch die getrennte Visualisierung des Kapillarbettes sowohl der Muskulatur als auch der Mukosa war es erstmals möglich, die Mikrozirkulation des Dünndarmes der Maus unter Kontrollbedingungen sowie nach Ischämie/Reperfusion differenziert zu untersuchen. Die Angioarchitektur der Mukosa der Maus gleicht derjenigen der Ratte [56;113]: eine singuläre Arteriole speist ein dichtes kapilläres Netzwerk das von mehreren postkapillären Venolen drainiert wird. Die Lamina muscularis propria der Maus wird, anders als bei der Ratte, bei der longitudinale und zirkuläre Muskulatur von zwei unterschiedlichen Kapillarsystemen perfundiert werden, von einem einzigen mehr oder weniger zweidimensionalen Kapillarnetzwerk versorgt. Ähnlich wie in früheren Untersuchungen an der Ratte zeigten auch die aktuellen Untersuchungen an der Maus eine deutlich niedrigere funktionelle Kapillardichte in der Muskularis im Vergleich zur Mukosa [15;56;109;113;114].

6.2.4 Thrombozytenseparation.

Während Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen durch intravenöse Applikation von Fluorchromen wie Acridine Orange oder Rhodamin-6G dargestellt werden können, ließ sich auf diesem Wege eine hinreichende Visualisierung von Thrombozyten nicht erzielen. Zur quantitativen Analyse der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen wurden Thrombozyten daher aus dem Vollblut separater Spendertiere isoliert und *ex vivo* mit dem Fluoreszenzmarker Rhodamin-6G beladen. Um eine relevante Aktivierung der Zellen im Rahmen der Separation auszuschließen, bestimmten wir die P-Selektin Expression auf Thrombozyten im Vollblut, sowie nach differentieller Zentrifugation. Die Expression von P-Selektin auf der Thrombozytenoberfläche diente dabei als Marker für die α-Granula Sekretion und ist als sensitiver Marker für eine Thrombozytenaktivierung allgemein akzeptiert [176]. Die Expression von P-Selektin zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen Thrombozyten im Vollblut im Vergleich zu separierten Thrombozyten. Gleichzeitig fand sich nach Inkubation mit Thrombin sowohl im Vollblut als auch nach Separation eine dramatische Hochregulation der P-Selektin-Oberflächenexpression. Eine signifikante Thrombozytenaktivierung/-passivierung im Rahmen des Separationsprozesses konnte auf diese Weise ausgeschlossen werden. Auch

die Tatsache, dass sich unter physiologischen Bedingungen (d.h. bei Sham-operierten Tieren) nur sehr wenige Interaktionen zwischen *ex vivo*-fluorchromierten Thrombozyten und Endothel nachweisen ließ, spricht gegen eine relevante Präaktivierung der Zellen im Rahmen der Separation.

6.2.5 Einsatz der Maus als Versuchstier.

Alle in der vorliegenden Arbeit dargestellten Untersuchungen wurden an der Maus durchgeführt. Diese Spezies ist, anders als andere Spezies, immunologisch sehr gut charakterisiert. Zahlreiche Antikörper gegen Mausantigene sind kommerziell erhältlich. Zudem stehen eine Vielzahl von Mutanten (z.B. L-, P-Selektin, ICAM-1, iNOS, eNOS u.v.a.m.) und transgenen Stämmen (z.B. HSP 72-überexprimierende Mäuse) zur Verfügung [18;61;83]. Die Verwendung der Maus als Versuchstier ermöglicht daher über den Einsatz monoklonaler Antikörper sowie von gen-defizienten Stämmen die isolierte und selektive Analyse molekularer und humoraler Mechanismen, die für die Regulation der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion von Bedeutung sind.

6.2.6 Abschließende Beurteilung des Modells.

Wir konnten erstmals ein Modell etablieren, das die direkte Visualisierung und quantitative Analyse nicht nur der nutritiven Perfusion und der Leukozytenakkumulation, sondern zusätzlich auch der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen in der Mikrozirkulation des Dünndarmes der Maus ermöglicht. Die Separation der Thrombozyten zur Beladung mit Rhodamin-6G war nicht mit einer Aktivierung der Zellen verbunden. Auch die chirurgische Präparation des Versuchstieres hatte keine Aktivierung der Blutzellen und damit eine vermehrte Endothelzell-Interaktion zur Folge. Eine Beeinträchtigung der nutritiven Perfusion war nicht zu beobachten. Das im Rahmen unseres Projektes erarbeitete Modell erlaubt daher insgesamt eine zuverlässige, detaillierte Evaluation der nutritiven Perfusion sowie zellulärer Phänomene in der Mikrozirkulation des Dünndarmes unter physiologischen wie auch unter pathophysiologischen Bedingungen.

6.3 2. Abschnitt: Bedeutung von P-Selektin für die postischämische Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion.

6.3.1 Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen während postischämischer Reperfusion.

Die Reperfusion ischämischer Gewebe induziert einen inflammatorischen Prozess, der sich auf der Ebene der Mikrozirkulation manifestiert. Der Rekrutierung von Leukozyten, insbesondere von polymorphkernigen Neutrophilen (PMN), scheint dabei eine zentrale Bedeutung für die Pathophysiologie des Ischämie-Reperfusionsschadens zuzukommen. Bereits in frühen Arbeiten konnten Grisham et al. nach intestinaler Ischämie (3h) und Reperfusion (1h) einen 18-fachen Anstieg der mukosalen Myeloperoxidase-Aktivität als Maß für die Infiltration von Leukozyten nachweisen [64]. Die Akkumulation neutrophiler Granulozyten ist jedoch kein spezifisches Charakteristikum des postischämischen Dünndarms [58,137]. Sie stellt vielmehr ein ubiquitäres Phänomen nach Reperfusion postischämischer Gewebe, wie beispielsweise des Herzens [39;157;171], der Leber [42;180;182], des Pankreas [77;79], der Lunge [3] und des quergestreiften Muskels [23;100;122;123;173] dar. Durch Induktion einer Neutropenie mit Hilfe von Leukopak-Leukozytenfiltern bzw. durch Verabreichung eines Antineutrophilenserums (ANS) konnte der Reperfusionsschaden nach Ischämie ebenso effektiv reduziert werden [23;89;96;157], wie durch die Applikation von Antikörpern, welche die Interaktion zwischen Leukozyten und mikrovaskulärem Endothel blockieren [23;74;168;181]. Dies zeigt, das die Akkumulation von PMNs eine kausale Bedeutung für die Manifestation des postischämischen Reperfusionsschadens besitzt.

Auch in der vorliegenden Untersuchung am Dünndarm der Maus kam es im Rahmen der postischämischen Reperfusion zu einer signifikanten Zunahme der Anzahl wandadhärenter Leukozyten. Die Interaktion zwischen Leukozyten und postischämischem Endothel beschränkte sich dabei streng auf die postkapillären Venolen, eine Interaktion zwischen arteriolärem Endothel und Leukozyt konnte im Darm nicht nachgewiesen werden.

Zwei charakteristische Formen der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion wurden während der Wiederperfusion des Dünndarmes beobachtet: 1.) Leukozyten, die am mikrovaskulären Endothel entlang rollten (“Roller“), und 2.) solche, die fest adhärent waren („Sticker“).

Wie *in vivo* Untersuchungen ergaben, erfolgt die Adhäsion der Leukozyten am venolären Endothel in drei Schritten. Nach einer niedrig-affinen Interaktion zwischen

Endothel und PMN („Tethering“ und „Rolling“) kommt es zur Aktivierung der weißen Blutzellen mit darauffolgender fester Bindung (Leukozytenadhärenz oder „Sticking“) und schließlich zur Emigration in das perivaskuläre Gewebe. Hierbei spielen verschiedene Rezeptoren auf der Oberfläche des Endothels und der Leukozyten eine entscheidende Rolle [2;59;69;174;198].

Die lockere Bindung zwischen PMN und Endothelzelle, das sogenannte Tethering sowie das darauffolgende Rolling als primäre Formen der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion werden über Lektin-ähnliche Verbindungen, die Selektine mediiert. Selektine sind Glykoproteine und binden mit hohen Assoziations- und Dissoziationskonstanten an Sialyl-Lewis^x und andere fukosylierte Kohlehydratreste in der Zellmembran der Partnerzelle [174;175], aber auch Interaktionen zwischen den einzelnen Selektinen wurden postuliert [143].

L-Selektin wird konstitutiv auf der Oberfläche aller zirkulierenden Leukozyten exprimiert [59;60;199]. Nach Aktivierung der Leukozyten kommt es initial zu einer Zunahme der Affinität des L-Selektins für den Liganden, wodurch ein erster lockerer Kontakt mit dem Endothel, das „tethering“, ermöglicht werden soll [101;183]. Während diesem Kontakt können verschiedene Mediatoren den Aktivierungsstatuts des PMN weiter steigern, wobei L-Selektin von der Zelloberfläche verschwindet (sog. „Shedding“) [184;70]

Auch die Endothelzelle besitzt Selektine, die das Rolling von Leukozyten vermitteln können. E-Selektin wird nicht konstitutiv exprimiert, sondern muß nach Endothelzellaktivierung *de-novo* synthetisiert werden und erscheint erst Stunden später an der Zelloberfläche [118]. Entsprechend spielt E-Selektin für die initiale Rekrutierung von Leukozyten nach einem inflammatorischen Stimulus wie Ischämie/Reperfusion eine untergeordnete Bedeutung [138]. P-Selektin, ein weiteres endotheliales Selektin, das unter physiologischen Bedingungen nicht auf der Zelloberfläche exprimiert wird, ist in den Weibel-Palade-Körperchen von Endothelzellen sowie in den α-Granula von Thrombozyten gespeichert [8;37;51]. Von dort wird es innerhalb von Sekunden nach Stimulation der Zelle z.B. mit Thrombin oder Histamin [5;59;199] zur Zelloberfläche mobilisiert. Blockierende Antikörper gegen P-Selektin verhindern weitgehend das Leukozyten-Rolling während postischämischer Reperfusion des Dünndarmes [91] und bewirken eine signifikante Reduktion des myokardialen Reperfusionsschadens [191]. Auch in der vorliegenden Untersuchung am Dünndarm der Maus führte die Gabe eines blockierenden, monoklonalen Antikörpers gegen P-Selektin zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl rollender Leukozyten, was die Bedeutung des Selektins für die

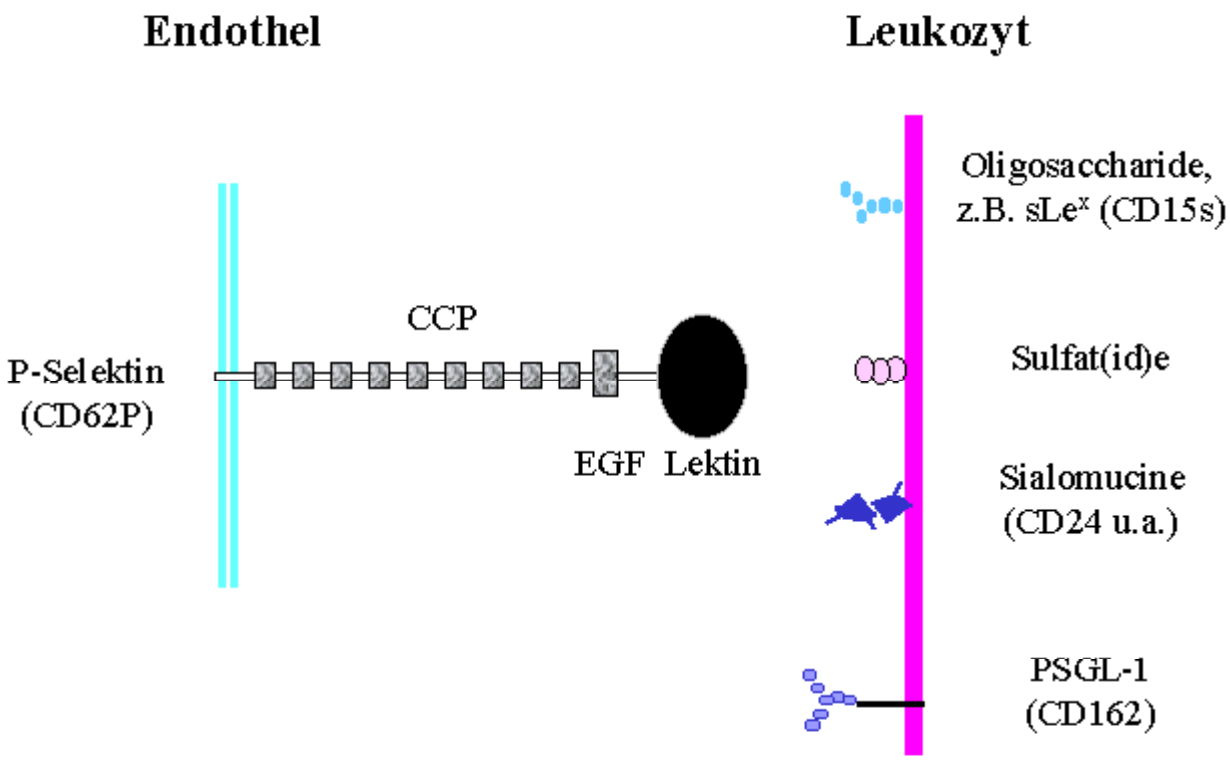


Abb.-36: Schematische Darstellung möglicher leukozytärer Interaktionspartner für endotheliales P-Selektin. CCP: Complement-ähnliche Domänen, EGF: Endothelial Growth Faktor-Domäne.

Leukozytenrekrutierung insbesondere in der frühen Phase der Reperfusion unterstreicht [111]. Eine Darstellung möglicher leukozytärer Interaktionspartner für endotheliales P-Selektin findet sich in Abb.-36.

Der lose Kontakt zwischen Leukozyt und Endothelzelle ermöglicht eine Aktivierung der weißen Blutzellen durch proinflammatorische Mediatoren (Superoxid, Histamin, PAF, Endothelin, IL-8, LTB_4), die von der Endothelzelle selbst oder aber von glatten Gefäßmuskelzellen bzw. Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems freigesetzt werden [14;33;84;90;119]. Infolgedessen kommt es zur Leukozytenadhärenz. Der kausale Zusammenhang zwischen Leukozytenrolling und -adhärenz ist nicht unumstritten [91]. Die Tatsache, dass die Blockade des Leukozytenrollings, z.B. durch Fucoidin, gleichzeitig auch zu einer signifikanten Reduktion der Leukozytenadhärenz führt, macht jedoch eine kausale Sequenz Rolling-Adhärenz wahrscheinlich [91]. Entsprechend hatte auch in der vorliegenden Untersuchung die Gabe eines gegen P-Selektin gerichteten Antikörpers nicht nur eine Reduktion des Leukozyten-Rollings, sondern auch der festen Leukozyten-Adhärenz zur Folge [111].

Ebenso wie das Leukozyten-Rolling wird auch die Adhärenz von Leukozyten über verschiedene Rezeptorklassen, nämlich über Integrine, sowie die zur Immunglobulinsuperfamilie gehörigen interzellulären Adhäsionsmoleküle (ICAM) mediiert. Die β_2-Integrine CD11a/CD18 und CD11b/CD18 werden konstitutiv auf der Oberfläche unter anderem von Neutrophilen exprimiert. Nach Zellaktivierung erfolgt eine Konformationsänderung und der rasche Übergang des Adhäsionsmoleküls in einen aktiven Zustand, der die Adhärenz der weißen Blutzelle am Endothel ermöglicht. CD11b/CD18 kann zusätzlich nach Stimulation aus präformierten Vesikeln an die Zelloberfläche mobilisiert werden [59;87]. Als Ligand für CD11/CD18 dient das Adhäsionsmolekül ICAM-1, welches bereits unter physiologischen Bedingungen von Endothelzellen exprimiert wird. Die Aktivierung von Endothelzellen induziert die *de-novo* Synthese von ICAM-1 und damit innerhalb mehrerer Stunden die Hochregulation dieses Rezeptormoleküls [87]. Monoklonale Antikörper gegen ICAM-1 bzw. gegen die β-Untereinheit der Integrine reduzieren die Akkumulation von Leukozyten in postkapillären Venolen nach Applikation proinflammatorischer Mediatoren wie C5a, PAF, LTB_4, H_2O_2, ebenso wie nach I/R und hämorrhagischem Schock [95;137;179].

Der stationäre, adhärente Leukozyt kann über die Ausbildung von Pseudopodien das Gefäß verlassen und in den subendothelialen Raum und schließlich in das umgebende Gewebe übertreten [59]. Dieser hochkomplexe Vorgang der Emigration verlangt die Umorganisation des Zytoskeletts, sowie Änderungen der Membranfluidität. Auch an diesem Prozess sind zelluläre Adhäsionsmoleküle beteiligt. Etwa 20% aller während postischämischer Reperfusion adhärenten Leukozyten emigrieren in das perivaskuläre Bindegewebe [90]. Der aktivierte PMN sezerniert eine Reihe hydrolytischer Enzyme, darunter Kollagenasen, Elastase und Gelatinasen, die an der Emigration wesentlich beteiligt sind. *In vitro* Untersuchungen zeigten, dass adhärente Leukozyten eine Reihe von Strukturkomponenten der Basallamina zerstören können. Entsprechend verhindern Elastase-Inhibitoren wie Eglin C oder L658,758 den durch die PMNs vermittelten Gewebeschaden [198].

6.3.2 Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen während postischämischer Reperfusion.

Nicht nur Leukozyten akkumulieren in postischämischen Organen. Histologische Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Kuroda et al. [93;94] sowie szintigraphische Untersuchungen von Chintala und Mitarbeitern mit Hilfe ^{111}Indium-markierter Thrombozyten [26] konnten belegen, dass neben Leukozyten, auch Thrombozyten in postischämischen Geweben rekrutiert werden. In der vorliegenden Arbeit konnten erstmals die Kinetik und die örtliche Verteilung (Arteriolen, Kapillaren, Venolen) der Thromboyzten-Akkumulation in der postischämischen Mikrostrombahn im Detail *in vivo* analysiert werden.

Unsere Untersuchungen konnten zeigen, dass im Rahmen der Reperfusion ischämischer Gewebe, wie des Dünndarmes, innerhalb der ersten Minuten eine dramatische Akkumulation von Thrombozyten in der postischämischen Mikrostrombahn erfolgt. Die Thrombozytenadhäsion beschränkte sich dabei, anders als die Leukozyten-Akkumulation, nicht auf postkapilläre Venolen, sondern fand insbesondere auch im Bereich von Arteriolen statt. Verschiedene Gründe mögen dieses unterschiedliche Verhalten von Thrombozyten und Leukozyten erklären. Zum einen haben Untersuchungen von Woldhuis und Mitarbeitern gezeigt, dass sich in Arteriolen, bedingt durch die dort wirkenden, hohen Scherkräfte, signifikant mehr Thrombozyten als Leukozyten im Randstrom, d.h. wandnah, befinden [193]. Leukozyten bewegen sich bei hohen Scherraten, wie sie beispielsweise in Arteriolen vorherrschen, bevorzugt im Zentralstrom fort. Zusätzlich sind wand-adhärente Thrombozyten aufgrund ihres im Vergleich zu Leukozyten deutlich geringeren Durchmessers (2-3µm) wesentlich geringeren Scherkräften ausgesetzt. Trotz der hohen Fließgeschwindigkeiten in Arteriolen könnten daher bereits schwache Ligand-Rezeptor-Interaktionen ausreichen, um eine Adhäsion von Thrombozyten, nicht jedoch von Leukozyten, zu vermitteln.

Ähnlich wie bei der postischämischen Akkumulation von Leukozyten waren auch bei der durch Ischämie/Reperfusion induzierten Rekrutierung von Thrombozyten zwei prinzipielle Formen der Interaktion mit dem Endothel zu unterscheiden, ein loser Kontakt, das Thrombozyten-Rolling, sowie die feste Adhärenz von Thrombozyten an der Gefäßwand. Wie eigene ultrastrukturelle Untersuchungen mittels Elektronenmikroskopie belegen (5.2.1.5, Abb. 27), treten die Thrombozyten dabei direkt mit der postischämischen Endothelzelle, und nicht etwa mit Strukturen der subendothelialen Matrix in Kontakt [111].

6.3.3 Die Rolle von P-Selektin für die postischämischen Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen.

Die der Rekrutierung von Thrombozyten in der postischämischen Mikrostrombahn zugrundeliegenden Mechanismen waren bislang weitgehend unbekannt. Ziel des zweiten Abschnittes unserer Untersuchungen war es daher, die an der postischämischen Akkumulation von Thrombozyten beteiligten molekularen Mechanismen zu analysieren. Wie bereits dargestellt, tritt die Rekrutierung von Thrombozyten in der postischämischen Mikrozirkulation innerhalb weniger Minuten nach initialer Reperfusion auf. An der Regulation der Thrombozyten-Akkumulation in der frühen Phase der Reperfusion muß daher ein rasch regulierbares Adhäsionsmolekül beteiligt sein. Da P-Selektin in Weibel-Palade-Bodies der Endothelzellen und in den α-Granula der Thrombozyten gespeichert vorliegt und nach Zell-Aktivierung, z.B. auch durch Hypoxie/Reoxygenierung [144;155] sehr rasch (unabhängig von einer *de novo*-Synthese) mobilisiert werden kann, untersuchten wir die Bedeutung des Lektin-ähnlichen Adhäsionsmoleküls für die Rekrutierung von Thrombozyten in der postischämischen Mikrozirkulation des Darmes der Maus (eine schematische Darstellung des Aufbaus von P-Selektin findet sich in Abb.-37).

P-Selektin

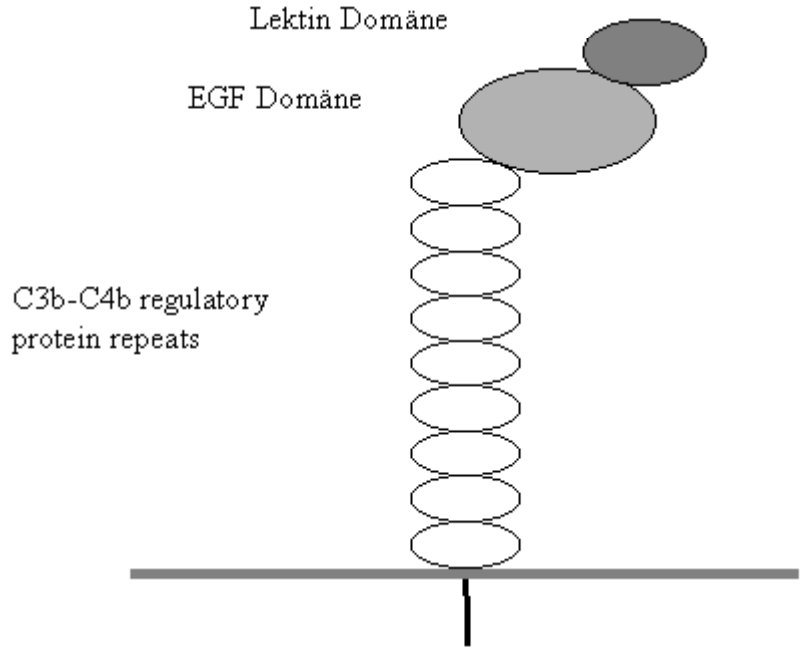


Abb.-37*:* Aufbau von P-Selektin.
Das Lektin-ähnliche Adhäsionsmolekül setzt sich aus eine Lektin-, einer Epidermal Growth Factor (EGF) Domäne, sowie aus neun C3b-C4b regulatory protein repeats zusammen.

Tatsächlich führte die Gabe eines gegen P-Selektin gerichteten Antikörpers nicht nur zu einer Reduktion der Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen, sie hatte auch eine dramatische Reduktion der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen zu Folge [111]. Wie bereits dargestellt exprimieren sowohl Endothelzellen, wie auch Thrombozyten P-Selektin. Durch den gewählten Ansatz mit systemischer Applikation eines blockierenden Antikörpers, blieb jedoch unklar, inwieweit das thrombozytäre oder aber das endotheliale P-Selektin für die Rekrutierung von Thrombozyten in der postischämischen Mikrozirkulation verantwortlich ist. Um diese Frage beantworten zu können, war der Einsatz eines P-Selektin-defizienten Mausstammes erforderlich. Dies ermöglichte die selektive Untersuchung des endothelialen und des thrombozytären P-Selektins. Folgende Ergebnisse konnten hierdurch erarbeitet werden: Exprimierten die Endothelzellen kein P-Selektin, so war die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion in der initialen Reperfusion deutlich reduziert; dagegen hatte der Mangel an P-Selektin in den Thrombozyten keinen Einfluss auf das Ausmaß der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion in der postischämischen Mikrozirkulation. Mit Hilfe der P-Selektin Knockout-Maus konnten wir damit erstmals zeigen, dass das endotheliale, nicht jedoch das thrombozytäre P-

Selektin für die Akkumulation von Thrombozyten in der postischämischen Mikrostrombahn des Dünndarmes der Maus von zentraler Bedeutung ist. Inzwischen konnten auch Untersuchungen an der Leber die Bedeutung des endothelialen P-Selektins für die postischämische Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion bestätigen (Khandoga, A., Shock, eingereicht).

Während auf Leukozyten der sog. P-Selektin-Glykoprotein-Ligand (PSGL-1) als Gegenrezeptor für endotheliales P-Selektin fungiert [13;130;135], ist der auf Thrombozyten exprimierte und an der Rekrutierung von Thrombozyten in der postischämischen Mikrozirkulation beteiligte P-Selektin Ligand bislang nicht näher charakterisiert. Wagner und Mitarbeiter zeigten, dass Thrombozyten der Maus PSGL-1 exprimieren [46]. Die Immuninhibition des 210kDa Glykoproteins führte zu einer Reduktion der Thromboyzenadhäsion an inflammatorisch-verändertes Endothel [46]. Versuche von Laszik und Mitarbeitern dagegen konnten eine Expression von PSGL-1 auf humanen Thrombozyten nicht belegen [98]. Neben PSGL-1 können jedoch auch andere thrombozytäre Membranrezeptoren als Liganden für P-Selektin fungieren. Insbesondere sind dies sialylierte Glykoproteine, wie beispielsweise Sialyl-Lewis^x [175]. Daneben scheint auch der von Willebrand Rezeptor, das leuzin-reiche Glykoprotein Ib-IX, als Ligand für endotheliales P-Selektin zu fungieren [156].

Die Inhibition der Interaktion zwischen P-Selektin und seinem putativen Liganden führte zu einer Reduktion sowohl der Anzahl rollender als auch fest adhärenter Thrombozyten. Aufgrund der physikochemischen Eigenschaften der Selektine (hohe Bindungsaffinität, hohe „off-rate“ der Bindung [175]) erscheint es dennoch unwahrscheinlich, dass P-Selektin selbst die feste Adhäsion von Thrombozyten vermittelt. Tatsächlich konnte in weitergehenden Experimenten unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die feste Adhäsion von Thrombozyten an postischämisches Endothel über endotheliales ICAM-1, Fibrinogen und thrombozytäres α_{IIb}/β_3-Integrin (GPIIb/IIIa) vermittelt wird [112]. Dabei lagert sich in der initialen Reperfusion zirkulierendes Fibrinogen in einem ICAM-1-abhängigen Prozess auf der Oberfläche postischämischer Endothelzellen ab. Endothelial gebundenes Fibrinogen fungiert als Substrat für die nachfolgende Adhäsion von Thrombozyten über deren Fibrinogen-Rezeptor (α_{IIb}/β_3-Integrin). Über eine Reduktion der Fließgeschwindigkeit des Thrombozyten (P-Selektin-mediiertes Thrombozyten-Rolling) ermöglicht P-Selektin möglicherweise erst – ähnlich wie bei der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion – das Auftreten niedrig-affiner Integrin-Ligand-Interaktionen. Neben ICAM-1 könnte auch der

von Endothelzellen exprimierte Vitronektin-Rezeptor als endothelialer Bindungspartner für Fibrinogen fungieren und auf diesem Weg ebenfalls zur postischämischen Thrombozyten-Adhäsion beitragen [12;54]. Adhärente Thrombozyten können zur Rekrutierung weiterer Thrombozyten beitragen. Es resultiert die Bildung von Thrombozyten-Aggregaten, die das Gefäßlumen teilweise oder komplett okkludieren können. Insbesondere Integrine, wie der thrombozytäre Fibrinogenrezeptor, aber auch lösliche Liganden sind hierbei von Bedeutung. Eine schematische Darstellung der an der Rekrutierung von Thrombozyten beteiligten molekularen Mechanismen findet sich in Abbildung-38.

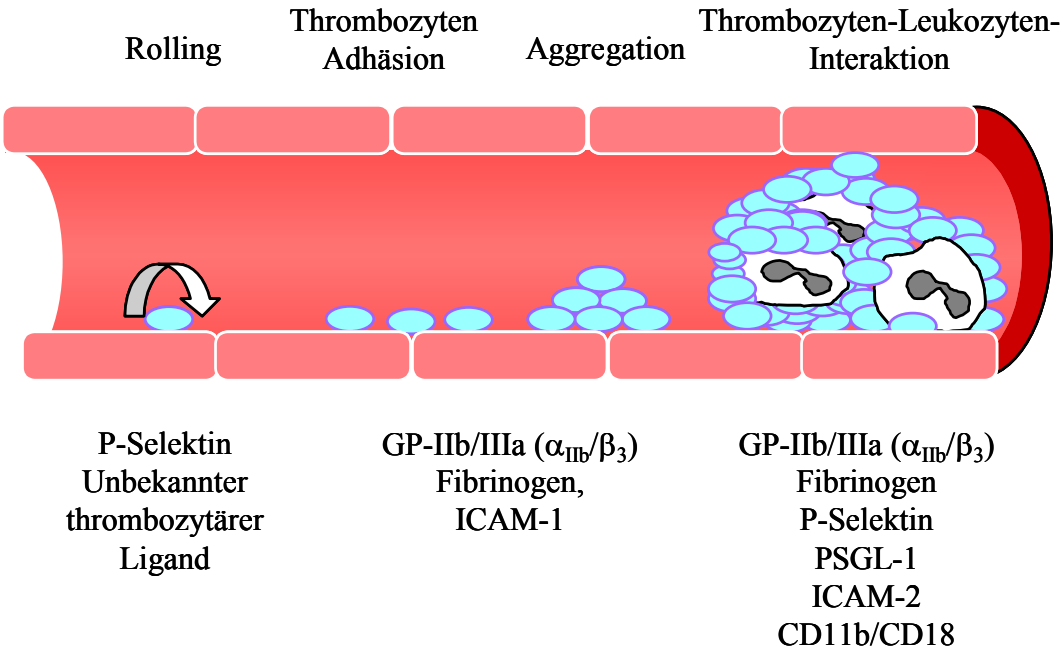


Abb.-38: Mechanismen der Thrombozyten-Endothezell-Interaktionen während Ischämie-Reperfusion *in vivo*. P-Selektin vermittelt den losen Kontakt zwischen Thrombozyten und postischämischem Endothel (Rolling). Integrine sind für die nachfolgende feste Adhäsion von Bedeutung. Die Thrombozyten-Aggregation sowie die Interaktion zwischen Thrombozyt und Leukozyt wird durch Integrine, Selektine, den zur Immunglobulinen gehörenden Adhäsionsmolekülen sowie durch lösliche Liganden („bridging molecules“) vermittelt.

6.3.4 Proinflammtorische Funktionen des Thrombozyten – Relevanz für den Ischämie-Reperfusionsschaden.

Thrombozyten besitzen, zusätzlich zu ihrer Bedeutung in der Hämostase und Gerinnung, Funktionen einer Entzündungszelle. Sie sezernieren eine Reihe proinflammatorischer Mediatoren (vgl. Abb.-39), wie IL-1β, β-Thromboglobulin, Connective tissue-activating peptide III, Platelet factor 4, Neutrophil-activating peptide-2 und RANTES [6;17;52;53;133;142;190]. Zusätzlich besitzen Thrombozyten inflammatorische Transmembranproteine, wie den CD40Liganden (CD154) [73].

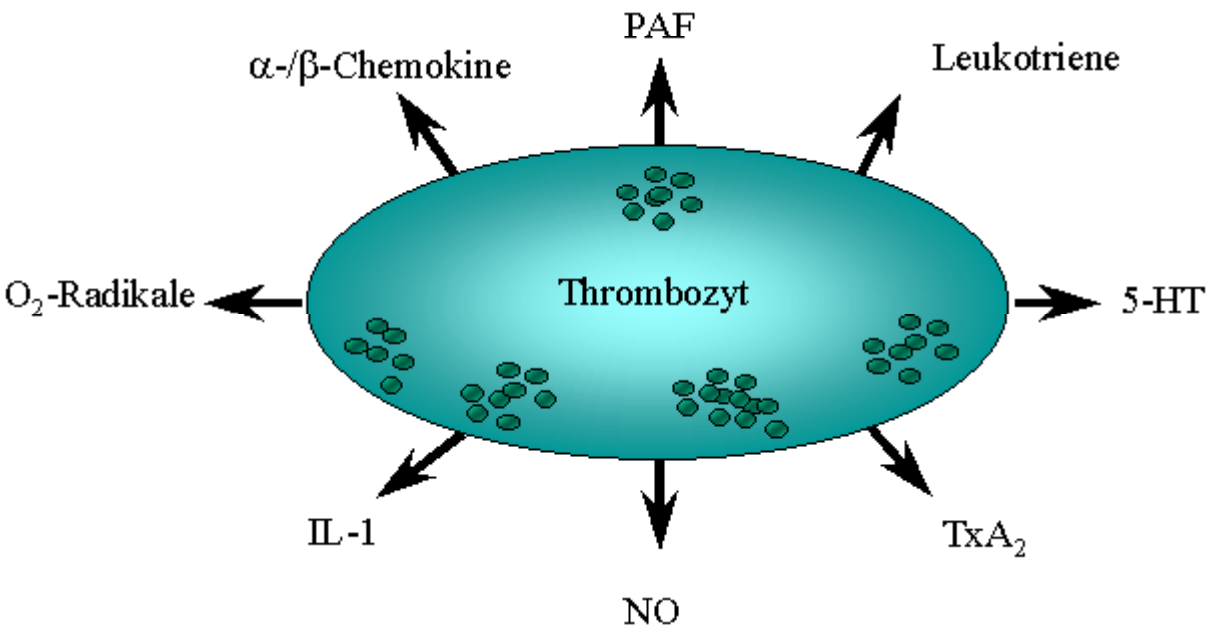


Abb.-39: Freisetzung von proinflammatorisch wirkenden Mediatoren aus Thrombozyten.

Über die Freisetzung potenter Chemokine (insbesondere IL-1β), aber auch durch die Oberflächen-Expression von CD40L sind Thrombozyten *in vitro* in der Lage die endotheliale Gentranskription zu modulieren (z.B. durch eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB). Auf diesem Wege induzieren Thrombozyten die Expression von Chemokinen wie MCP-1, sowie von Adhäsionsrezeptoren, wie ICAM-1, in Endothelzellen [53;73;172].

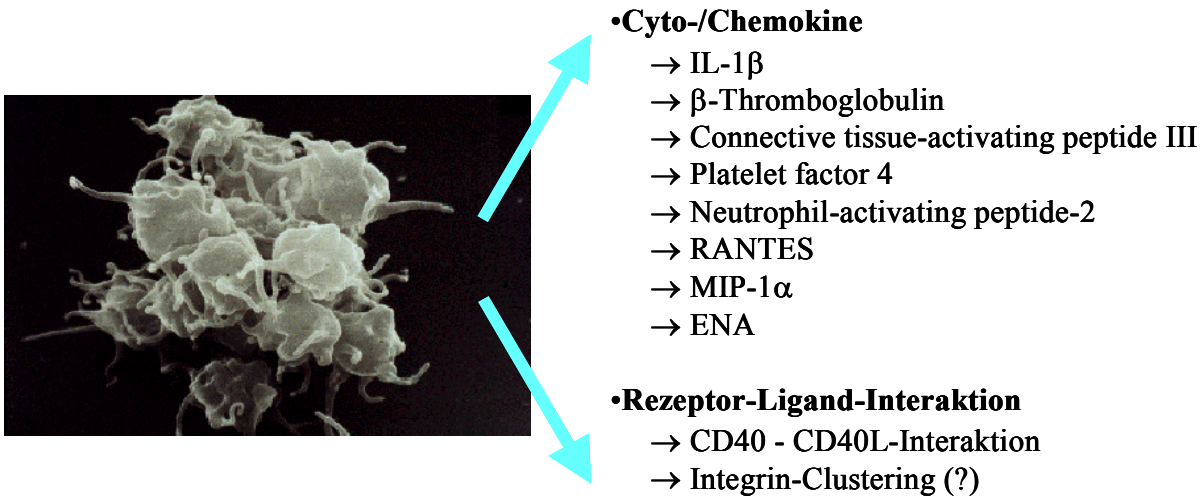


Abb.-40: Proinflammatorische Funktionen des Thrombozyten. Neben löslichen Mediatoren besitzen Thrombozyten membranständige Rezeptoren, wie das zur TNF-Familie gehörende CD40L. Auch Integrine können proinflammatorische Signale übermitteln (Elektronenmikroskopische Aufnahme aus http.//www.platelet page.org).

Nicht nur Endothelzellen werden durch adhärente Thrombozyten aktiviert, auch in Leukozyten induzieren Thrombozyten inflammatorische Prozesse. Sowohl Leukozyten als auch Thrombozyten akkumulieren, wie die vorliegende Arbeit zeigen konnte, in der

postischämischen Mikrozirkulation. Neumann und Mitarbeiter konnten zeigen, dass Thrombozyten in Leukozyten die Expression und Sekretion von Cyto-/Chemokinen wie IL-1β oder IL-8 und MCP-1 initiieren [133]. Auf diesem Wege könnten Thrombozyten wesentlich zur Rekrutierung weiterer Entzündungszellen in geschädigtes Gewebe beitragen und einen Entzündungsprozess unterhalten. Auch eine direkt durch Thrombozyten vermittelte Leukozytenrekrutierung könnte für die Akkumulation von Leukozyten in der postischämischen Mikrostrombahn verantwortlich sein.

Aus *in vitro* Untersuchungen weiß man, dass P-Selektin, welches von Oberflächen-adhärenten Thrombozyten exprimiert wird, die Adhäsion von Leukozyten auf eben diesen adhärenten Thrombozyten vermitteln kann; auch *in vivo* scheint eine durch

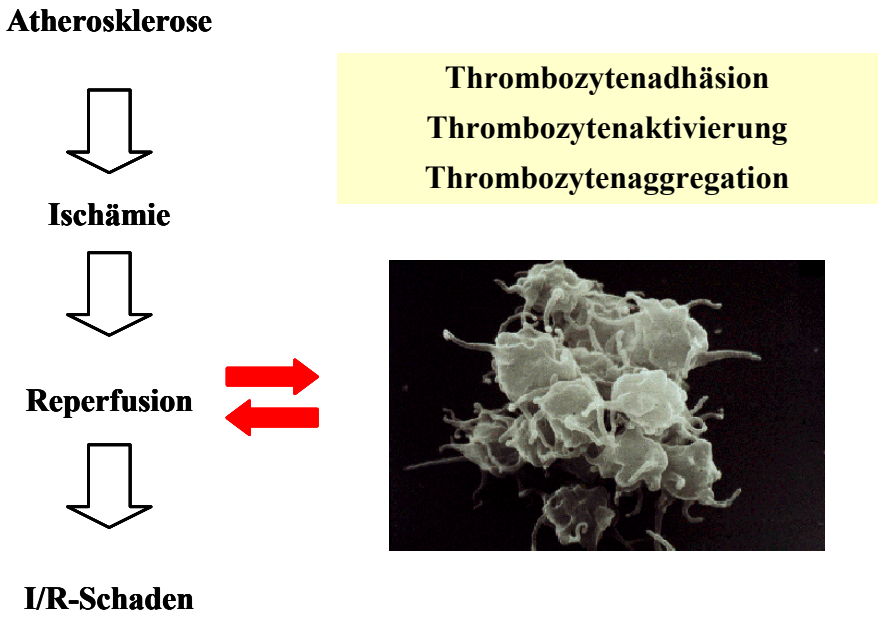


Abb.-41: Rolle der Thrombozyten für den Ischämie-Reperfusionsschaden. Über die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren können Thrombozyten wesentlich zur Manifestation des Ischämie-Reperfusionsschadens beitragen. Thrombozytenaggregate können zusätlich eine (Re-)Okklusion von Mikrogefäßen induzieren und damit den Reperfusionsschaden weiter verstärken (Elektronenmikroskopische Aufnahme aus http.//www.platelet page.org).

Thrombozyten vermittelte Adhäsion von Leukozyten an der Gefäßwand von Bedeutung zu sein, so beispielsweise beim Lymphozyten-Homing in den `High Endothelial Venules´ der Peyer´schen Plaques [20;32;34;35;97;194]. In der vorliegenden Untersuchung konnte jedoch eine direkte Interaktion zwischen wandadhärenten Thrombozyten und zirkulierenden Leukozyten nur in seltenen Fällen nachgewiesen werden. Inwieweit daher eine direkte, durch Thrombozyten mediierte Leukozyten-Adhäsion für die postischämische Leukozytenakkumulation von Bedeutung ist, ist bislang nicht hinreichend geklärt. Unabhängig davon könnten Thrombozyten jedoch über 1.) eine endotheliale und 2.) eine leukozytäre Aktivierung wesentlich zur Initiierung und Aufrechterhaltung eines inflammatorischen Prozesse in der postischämischen Mikrozirkulation beitragen. Die tatsächliche Bedeutung für den durch Ischämie/Reperfusion induzierten Gewebeschaden muss in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden. Erste Hinweise auf eine pathophysiologische Relevanz der Thrombozyten für den postischämischen Reperfusionsschaden lieferten jedoch, neben den bereits angeführten Arbeiten von Kuroda und Mitarbeitern [93;94], Untersuchungen aus dem Institut für Chirurgische Forschung unserer eigenen Arbeitsgruppe. So hatte an der Leber die Blockade der Thrombozyten-Adhäsion eine deutliche Reduktion des hepatozellulären Schadens zu Folge (Khandoga, A., Shock, eingereicht)).

6.4 3. Abschnitt: Bedeutung von Stickstoffmonoxid für die Regulation der postischämischen Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion.

Die Reperfusion postischämischer Gewebe führt zu einer Rekrutierung von Thrombozyten in der postischämischen Mikrostrombahn [111]. Thrombozyten sezernieren, wie bereits dargestellt, eine Reihe von Zyto- und Chemokinen und könnten daher an der Manifestation eines inflammatorischen Prozesses in der postischämischen Mikrozirkulation von ganz eminenter Bedeutung sein. Zentral ist daher die Frage - insbesondere auch im Hinblick auf mögliche therapeutische Interventionen - über welche Mechanismen, bzw. durch welche humoralen Faktoren die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen während Ischämie/Reperfusion reguliert werden. *In vitro* Untersuchungen zeigten, dass das von vaskulären Zellen gebildete und freigesetzte Gas Stickstoffmonoxid (NO) einen potenten Inhibitor der Thrombozytenfunktion darstellt. Daher waren wir interessiert, die Bedeutung von NO für die Regulation der TEI nach Ischämie/Reperfusion *in vivo* zu charakterisieren.

6.4.1 Historischer Hintergrund

„Molekül des Jahres“, „kleinste physiologische aktive Verbindung“, biologisches Tausendsassa“ sind nur einige Schlagwörter, die in den letzten Jahren im Zusammenhang mit NO gefallen sind. Doch was macht dieses Molekül so besonders, dass es in den letzten Jahren das Interesse zahlreicher Forscher in der ganzen Welt auf sich zog (44.000 Publikationen zu dem Schlagwort NO in PUBMED der NIH)? Die Geschichte des NO in der Medizin begann vor über hundert Jahren, als erkannt wurde, dass die Gabe von organischen Nitraten zur Besserung der Symptome der Angina pectoris führt. Als physiologischer Mediator ist NO jedoch erst seit zwanzig Jahren bekannt und in diesem Zusammenhang untrennbar mit den Namen Furchgott, Ignarro und Moncada verbunden. 1980 berichteten Furchgott und Zawadzki, dass 1.) für die dilatierende Wirkung von Acetylcholin auf die glatte Muskulatur in Aortenringpräparaten die Anwesenheit eines intakten Endothels obligat erforderlich ist und 2.) die Dilatation durch einen labilen humoralen Faktor, später als „enothelium-derived relaxing factor (EDRF) bezeichnet, vermittelt wird [49]. Dies war in zweifacher Hinsicht von Bedeutung. Zum einen wurde die Rolle des Endothels für physiologische Prozesse (z.B. Regulation des basalen Gefäßtonus) wie pathophysiologische Prozesse (z.B. Modulation von Entzündungsreaktion) zum Gegenstand intensiver Forschung. Zum anderen begann ein

Wettrennen um die Identifizierung des neu entdeckten EDRF. 1986 stellten Furchgott und Ignarro unabhängig voneinander die Vermutung an, dass es sich bei EDRF um NO oder eine diesem verwandte Verbindung handelt. Diese Vermutung stützte sich vor allem auf die Ähnlichkeit der biologischen Wirkung. So konnte der vasodilatierende Effekt beider sehr kurzlebigen Substanzen durch Hämoglobin und Sauerstoffradikale inhibiert werden. Umgekehrt führte der Einsatz von Superoxid-Dismutase, welche Sauerstoffradikale abbaut, zu einer verstärkten Wirkung [82;108]. Auch eine inhibierende Wirkung auf Thrombozytenadhäsion und –aggregation konnte bei beiden Substanzen beobachtet werden [148]. Die endgültige Identifizierung von EDRF als Stickstoffmonoxid, also einem anorganischem Gas, 1987 durch Moncada und Palmer war von fundamentaler Bedeutung für das Verständnis regulativer Prozesse in der vaskulären Biologie [139]. In Anerkennung ihrer Bemühungen um die Erforschung von EDRF und NO erhielten Furchgott, Ignaro und Moncada 1998 den Nobelpreis.

6.4.2 NO-Synthese

Die Aminosäure L-Arginin ist die einzige physiologische Stickstoffquelle zur Bildung von Stickstoffmonoxid beim Menschen. L-Arginin wurde im Plasma von Gesunden in einer Konzentration von etwa 150 µM nachgewiesen. Die zelluläre Aufnahme von L-Arginin erfolgt über einen kationischen Aminosäuren-Transporter (MCAT-2B). Über den selben Transporter werden L-Lysin und L-Ornithin in die Zelle befördert. Beide Aminosäuren können entsprechend die Aufnahme von L-Arginin über diesen aktiven Transport kompetitiv hemmen. Neben diesem Mechanismus zur Bereitstellung des Substrates für die NO-Synthasen (NOS) kann L-Arginin auch durch die Argininsuccinat-Synthase endogen gebildet werden. Auch eine Resynthese von L-Arginin aus L-Citrullin ist möglich. Unter dem katalytischen Einfluss der NOS kommt es in einer sauerstoffabhängigen Reaktion mit NADPH als Kosubstrat zur Bildung der Aminosäure L-Citrullin, sowie äquimolarer Mengen von NO. Tetrahydrobiopterin, Flavinnukleotide und Häm werden als Kofaktoren dieser Redoxreaktion benötigt [65;177](Abb.-42).

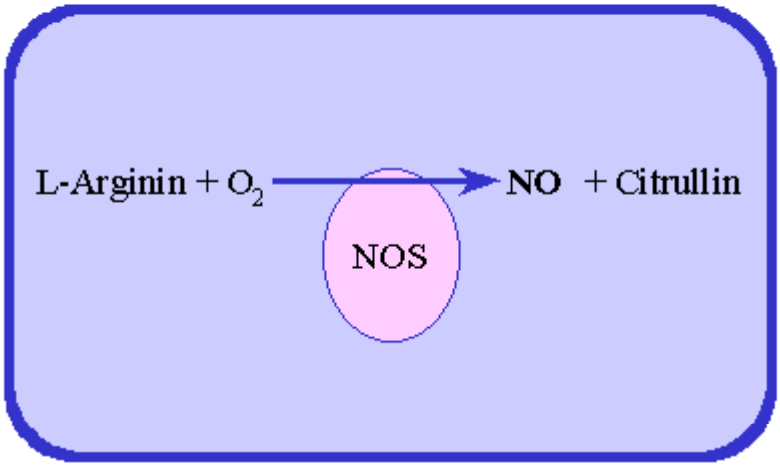


Abb.-42: Die NO-Synthase (NOS) produziert aus L-Arginin und Sauerstoff Stickstoffmonoxid und Citrullin.

Bislang konnten drei verschiedene NO-Synthasen (NOS)-Isoformen charakterisiert werden, die diese Reaktion katalysieren (Tab.-9). Die unter physiologischen Bedingungen konstitutiv exprimierten Formen werden nach ihrem überwiegenden Vorkommen als neuronale ncNOS (NOS I) und endotheliale ecNOS (NOS III) bezeichnet. Daneben existiert eine induzierbare Form, die iNOS (NOS II) [107;132]. Während Substrate und Kofaktoren für alle Isoenzyme der NOS identisch sind und die konstitutive, wie die induzierbare NOS in ihrer aktiven Form als Homodimer vorliegen, unterscheiden sich die Regulationsmechanismen der Enzymaktivität für die einzelnen Isoformen grundlegend. Die Bildung des potentiell zytotoxischen NO wird unter physiologischen Bedingungen engmaschig kontrolliert bei weitgehend konstanter Expression der mRNA sowie der Proteinmonomere für die beiden cNOS. Eine Regulation der konstitutiven NOS über Induktion bzw. Hemmung der Genexpression ist unter physiologischen, akuten und chronischen pathophysiologischen Gegebenheiten möglich. Die Regulation erfolgt jedoch primär posttranslational über Veränderungen der Enzymaktivität, insbesondere durch den intrazellulären Calciumspiegel nach reversibler Bindung des regulatorischen Proteins Calmodulin an das cNOS Homodimer, daneben jedoch aber auch durch Phosphorylierung an Serin- oder Tyrosinresten [36;47]. Im Gegensatz dazu sind weder mRNA noch Protein der induzierbaren NOS im Zytosol unstimulierter Zellen vorhanden. Nach Stimulation z.B. durch Zytokine oder mikrobielle

Faktoren kommt es zur *de novo*-Expression der NOS II-mRNA und, bedingt durch eine Latenz der Proteinbiosynthese, zur verzögerten Akkumulation des NOS II Proteins. Im Gegensatz zu den konstitutiven Isoformen erfolgt die Synthese als aktives Homodimer, wobei Calmodulin irreversibel an das Enzym gebunden ist. Somit produziert NOS II weitgehend unabhängig vom regulatorischen Einfluss des intrazellulären Calciumgehalts konstante Mengen an NO, welche bis zu 10-fach höher sind als die durch die beiden konstitutiven NOS (NOSI und NOSIII) freigesetzten Mengen. NOS II unterliegt im Gegensatz zu den konstitutiven NOS-Isoformen in den allermeisten Geweben primär einer transkriptionellen Kontrolle. Nach der Expression des Proteins ist die Verfügbarkeit von Substrat und Kofaktoren der limitierende Faktor der NO-Produktion durch die iNOS [106;107;132].

Neben neutrophilen Granulozyten und Makrophagen, die NO im Rahmen der unspezifischen Abwehr produzieren, konnte eine Expression des Enzyms NOS II auch bei einer Subpopulation von Megakaryozyten im Knochenmark nachgewiesen werden [186]. 1995 konnten Chen und Mehta eine Expression der induzierbaren Form der NOS auch in menschlichen Thrombozyten nachweisen [25;121]. Im Gegensatz zu allen bisher untersuchten Zellen scheinen Thrombozyten die iNOS auch unter physiologischen Bedingungen konstitutiv zu exprimieren.

Die konstitutive NOS I und III sowie die induzierbare NOS sind verschiedene Proteine, deren Aminosäuresequenzen nur zu 52-58% übereinstimmten und die von Genen auf drei verschiedenen Chromosomen kodiert werden. Die einzelnen NOS-Isoformen sind jedoch zwischen den Säugetieren-Spezies in ihrer Aminosäurensequenz stark konserviert, d.h. es bestehen Sequenzhomologien von ca. 90% (NOSI und NOSIII) bzw. 80% (NOSII). Die fast vollständige Übereinstimmung im Enzymaufbau zwischen den Säugetierespezies erlaubt somit Rückschlüsse vom Tiermodell auf den Menschen [43].

6.4.3 NO-Metabolismus

NO hat in biologischen Flüssigkeiten eine Halbwertszeit von wenigen Sekunden, da es rasch zu Nitrit und Nitrat oxidiert wird. Die Metabolite können über die Niere ausgeschieden werden. NO kann auch mit schwefelhaltigen Aminosäuren und Proteinen im Blut zu S-Nitroso-Verbindungen reagieren, aus denen wieder NO freigesetzt werden kann.

6.4.4 Wirkung von NO

NO besitzt eine ungerade Elektronenzahl; sie ist für die hohe Reaktionsfähigkeit und damit kurze Halbwertszeit des Moleküls in biologischen Systemen verantwortlich. Eine weitere chemische Eigenschaft des NO-Moleküls ist die leichte Membrangängigkeit, die trotz der kurzen Halbwertszeit neben autokrinen, auch parakrine Wirkung erlaubt [48;63].

Das durch die unterschiedlichen NOS-Isoformen freigesetzte NO hat verschiedene Wirkungen im Körper. Im Nervensystem fungiert NO als Neurotransmitter und ist an Lernprozessen beteiligt. Auch humane Neutrophile exprimieren unter physiologischen Bedingungen NOS I. Durch Stimulation mit Zytokinen oder Endotoxin erfolgt die *de novo* Synthese der iNOS. Das von ihr produzierte NO dient vor allem der Abwehr von Bakterien, Parasiten, Viren und der Bekämpfung von Tumorzellen [128;165].

Unter physiologischen Bedingungen ist eine basale Freisetzung von Stickstoffmonoxid aus dem Gefäßendothel für eine koninuierliche Vasodilatation verantwortlich. NO wird sowohl luminal wie auch abluminal freigesetzt. Durch die abluminale Freisetzung erfolgt die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur [128]. Auch weisen Untersuchungen darauf hin, dass NO vor allem in größeren Arteriolen maßgeblich der myogen bedingten Kontraktion der Gefäße entgegenwirkt [30;145-147]. Der vaskuläre NO-Weg ist jedoch nicht nur für die Kurzzeitregulation des Vasotonus essentiell. Auch eine antiproliferative, antimigrative und in seiner Gesamtheit antiatherogene Wirkung wird dem gasförmigen Mediator zugeschrieben. In den Gefäßen kommt es zu einer Interaktion von NO mit den Blutzellen und Proteinen. Einige Plasmaproteine, wie z.B. Albumin, werden nitrosyliert und fungieren möglicherweise als zirkulierender Stickstoffmonoxidspeicher. Scherkräfte, Hypoxie und andere Substanzen induzieren die Freisetzung verschiedener Mediatoren, unter anderem auch von NO. Zusätzlich reguliert das von den Endothelzellen freigesetzte NO, zusammen mit Prostacylin, Adhäsion und Aggregation aktivierter Thrombozyten [149;200]. *In vitro* Untersuchungen zum Einfluss von NO auf die Thrombozyten zeigten eine Reduktion des shape change, sowie der Expression von Adhäsionsmolekülen (GPIIb/IIIa, P-Selektin) bei durch Agonisten stimulierten Thrombozyten [127]. Auch die thrombozytäre Sekretionsreaktion ist durch den Mediator betroffen [16;102] Die beobachteten Phänomene sind auf eine Reduktion des durch Agonisten-induzierten Anstieges der intrazellulären Calciumkonzentration durch NO zurückzuführen. Aber nicht nur die Endothelzelle, sondern auch aktivierte Thrombozyten können über ihre eigene NO Produktion die Rekrutierung und Aktivierung weiterer Thrombozyten aus der Zirkulation steuern [44;151]. Hierfür sind wahrscheinlich zwei

konstitutiv exprimierte NOS-Isoformen verantwortlich. Die ecNOS und die in anderen Zellen und Geweben unter physiologischen Bedingungen fehlende aber in Thrombozyten konstitutiv exprimierte iNOS. Eine NO Freisetzung findet man nicht erst nach Stimulation, auch unter physiologischen Bedingungen wird NO von den thrombozytären NOS-Formen produziert. Die Konzentrationen bewegen sich dabei zwischen 4.5±0.6 pmol unter physiologischen Bedingungen und kann sich bis auf 11.2±1.3 pmol pro Minute pro 10^8 Zellen bzw. nach Aktivierung steigern [197].

6.4.5 Regulativer Einfluss von NO auf die postischämische Thrombozytenakkumulation in vivo

Diesen *in vitr*o Untersuchungen entsprechend, weisen klinische Untersuchungen darauf hin, dass NO auch *in vivo* einen Einfluss auf die Funktion und auf funktionelle Parameter der Thrombozyten hat. So zeigten Simon et al., dass die intraarterielle Gabe eines NOS-Inhibitors in den Unterarm gesunder Probanden zu einer Verkürzung der Blutungszeit führt [170]. Desweiteren konnten Gries et al. bei Patienten einen Effekt von inhaliertem NO auf Thrombozyten nachweisen. Sowohl die Aggregation der Thrombonzyten wie auch die P-Selektin Expression und die Fibrinogenbindung war nach Inhalation von NO reduziert [62]. Die Bedeutung von NO für die Regulation der TEI unter den pathophysiologischen Bedingungen der I/R war jedoch bislang nicht untersucht. Vor allem fehlte bislang eine direkte Quantifizierung des Einflusses von NO auf die postischämische TEI.

Mit dem Ziel, die Bedeutung von NO für die Regulation der TEI nach Ischämie und Reperfusion *in vivo* zu charakterisieren, verwendeten wir das bereits diskutierte Modell der Intravitalmikroskopie am Dünndarm der Maus. Um den Einfluss von endogen freigesetztem NO auf die postischämischen TEI *in vivo* zu untersuchen, erfolgte - zusätzlich zur Induktion einer intestinalen Ischämie mit nachfolgender Reperfusion - die Gabe des NOS-Inhibitors L-NAME. Wie bereits erwähnt inhibiert L-NAME die NOS-Isoformen unselektiv, d.h. sowohl die NOS II, wie auch die NOS III werden in der Syntheseleistung durch das L-Arginin Analogon gehemmt. In diesem Versuchsansatz wird nicht nur die endotheliale, sondern auch die thrombozytäre NO-Synthese durch den NOS-Inhibitor L-NAME blockiert [197].

In unseren Untersuchungen hatte die systemische Blockade der NO-Synthese nach Ischämie-Reperfusion einen dramatischen Anstieg der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen in der postischämischen Mikrostrombahn zu Folge. Diese Ergebnisse

deuten nicht nur darauf hin, dass NO in die Ereignisse nach I/R involviert ist, sondern implizieren auch die Möglichkeit eines therapeutischen Einsatzes von NO während I/R. So könnte durch eine vermehrte Bereitstellung von NO, sei es durch pharmakologische Maßnahmen, sei es durch adenoviralen NOS-Gentransfer, über eine verminderte Plättchenaktivierung eine Reduktion des postischämischen Reperfusionsschadens erzielt werden [99;178].

Unsere Experimente scheinen darauf hin zu deuten, dass nicht nur die endothel-abhängige, sondern vor allem die thrombozytäre NO-Synthese – im Sinne einer parakrinen Autoregulation – wesentlich an der durch NO mediierten Inhibition der postischämischen Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion beteiligt ist. Entsprechend hatte ein selektiver Defekt der thrombozytären iNOS in unserem Modell einen 4-5-fachen Anstieg der festen Adhärenz in der postischämischen Mikrozirkulation zur Folge.

Neben der heterotypischen Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion reguliert thrombozytäres NO auch die homotypische Interaktion, d.h. die Interaktionen der Thrombozyten untereinander, die sich in der Thrombozytenaggregation ausdrückt. Entsprechend hat nicht nur die unselektive NOS-Inhibition mittels L-NAME, sondern auch der isolierte Mangel an iNOS in Thrombozyten eine signifikante Zunahme der Anzahl von Thrombozytenaggregaten in der postischämischen Mikrozirkulation zur Folge.

Die Ergebnisse legen nahe, dass NO und hierbei insbesondere, das von der thrombozytären iNOS gebildete NO, an der Regulation der Interaktionen der Thrombozyten untereinander beteiligt ist. Dies steht im Einklang mit *in vitro* Ergebnissen von Freedman und Mitarbeitern. Sie konnten zeigen, dass die NOS-Inhibition mittels L-NAME in einer Plättchensuspension zu einer erhöhten Aggregation und Sekretion der Thrombozyten führte [44]. Daneben induzierten Thrombozyten, deren NO-Synthese inhibiert worden war, eine erhöhte Aggregabilität und Sekretion bei später zugegebenen, nicht aktivierten Thrombozyten [44]. Zusätzlich unterstreichen auch *in vivo* Untersuchungen der selben Arbeitsgruppe die biologische Bedeutung des thrombozytären NOs für die Regulation der Thrombozytenrekrutierung. So produzieren die Thrombozyten bei Patienten mit instabiler Angina pectoris oder Infarkt, also Erkrankungen, denen eine Minderperfusion das Myokards zugrunde liegen, weniger NO als Thrombozyten von Kontrollpatienten [45].

Unsere sowie die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen deuten darauf hin, dass Thrombozyten über ihre eigene NO Produktion ihre eigene Adhäsion aber auch das

Wachsen eines Thrombus zu steuern vermögen und somit NO, sowohl endotheliales als auch thrombozytäres, an der Regulation der Thrombozyten-Endothelzell- und Thrombozyten-Thrombozyten-Interaktionen nach I/R *in vivo* beteiligt ist.(Abb.-43)

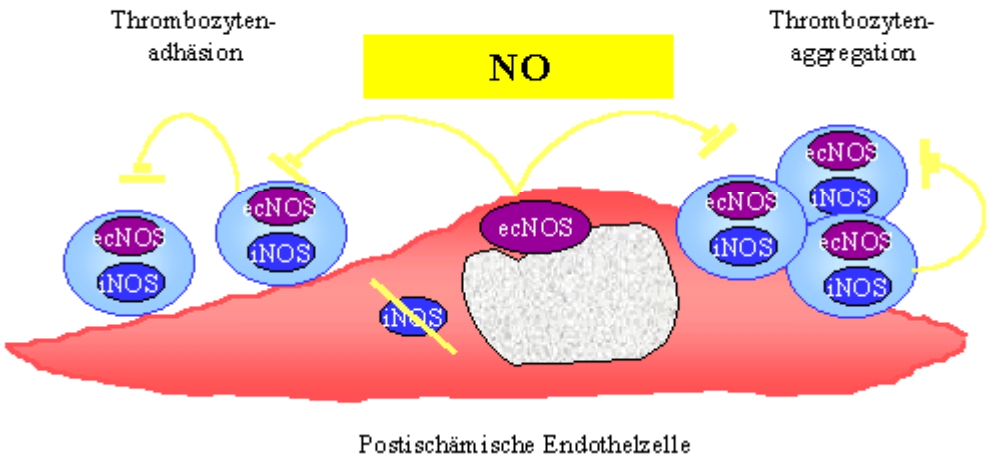


Abb-43: Schematische Darstellung der Bedeutung der thrombozytären und der endothelialen NO-Synthese für die Regulation der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion sowie für die Thrombozytenaggregation.

6.4.6 Signaltransduktion: zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP)

Als lipophile Substanz diffundiert NO durch die Zellmembran. Dort bindet es an eine Hämgruppe der löslichen Guanylatzyklase. Dies führt zu einer Aktivierung des Enzyms und nachfolgend zur Bildung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP), dem zentralen second messenger von NO, aus Guanosintriphosphat (GTP). cGMP aktiviert die cGMP-abhängige Proteinkinase (cGK). Zwei Formen der cGK sind bislang beschrieben. Während die cGKII insbesondere in Epithelzellen und glatten Muskelzellen des Gastrointestinaltraktes nachzuweisen ist [140], finden sich in vaskulären Zellen, wie glatten Muskelzellen, Endothelzellen und insbesondere auch Thrombozyten hohe Konzentrationen der cGKI [38;141;185]. Daß die cGKI für die weitere NO-vermittelte Signaltransduktion in Thrombozyten von Bedeutung ist, zeigen Untersuchungen, die im Rahmen einer Kooperation zwischen dem Institut für Pharmakologie der TU München (hier wurde die für das Projekt zentrale cGKI-defiziente Maus generiert) und dem Institut für Chirurgische Forschung entstanden. So führt ein Defekt des thrombozytären cGKI-

Systems zu einer vollständigen Unterbrechung der NO/cGMP-Effekte auf den Thrombozyten, die mit einer vermehrten Thrombozyten-Akkumulation in postischämischen Geweben wie der Niere oder des Dünndarmes einhergehen [116].

Nach Aktivierung durch cGMP phosphoryliert cGKI eine Reihe von Ziel-Proteinen. Hierzu zählen der 1.) Thromboxan-Rezeptor, der durch Phosphorylierung desensitiviert wird [189], 2.) IRAG [164](inositol 1,4,5-trisphophate receptor-associated cGMP kinase substrate) und 3.) das Vasodilator stimulated Phosphoprotein VASP, das von der Arbeitsgruppe um Walter und Mitarbeiter an der Universität Würzburg isoliert und charakterisiert wurde [1;19;81;105;129;152-154;187]. VASP liegt in Thrombozyten in hohen Konzentrationen vor und scheint für die Vermittlung der Effekte von NO eine zentrale Rolle zu spielen [103;188] (Abb.-44).

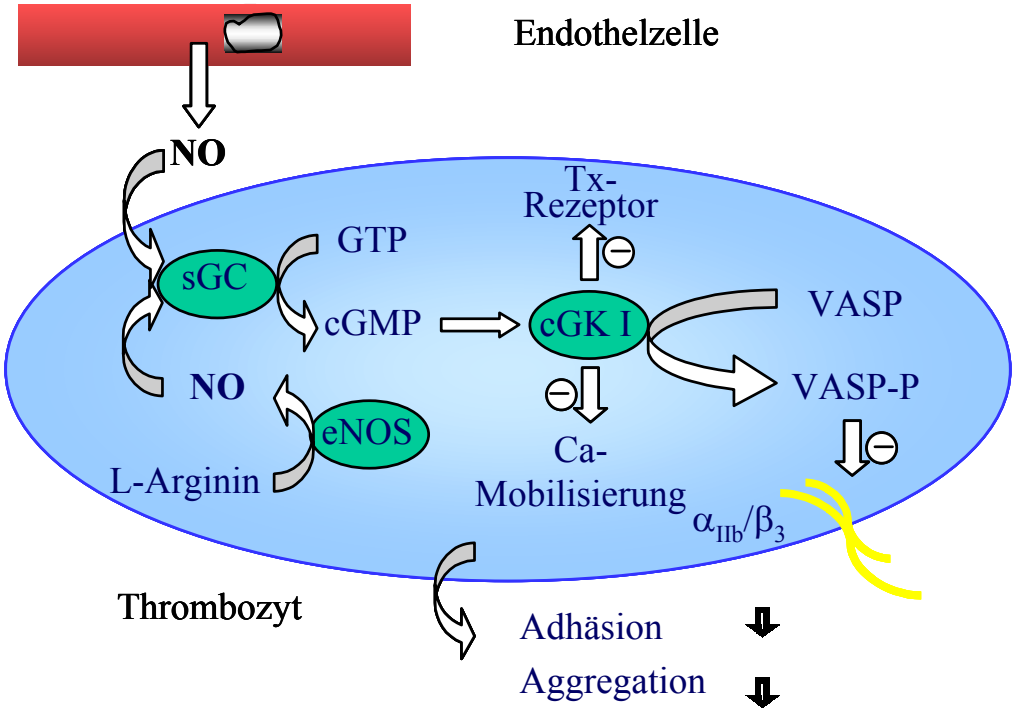


Abb-44: Schematische Darstellung der NO/cMPG-abhängigen intrazellulären Signaltransduktion. NO aktiviert die lösliche Guanylatcyclase (sGC). Diese setzt GTP zu zyklisches GMP (cGMP) um. Zyklisches GMP fungiert als zentraler „second messenger“ von NO. In Thrombozyten aktiviert cGMP die cGMP-abhängige Proteinkinase I. Diese ist an der Vermittlung der weiteren NO-Effekte auf den Thrombozyten beteiligt. Sie phosphoryliert VASP (Vasodilator-stimulated Phosphoprotein), was mit einer Reduktion der Bindungsaffinität von α_{IIb}/β_3-Integrin (Fibrinogenrezeptor) für dessen Liganden Fibrinogen einhergeht. Die Interaktion Fibrinogen- α_{IIb}/β_3-Integrin ist für die Thrombozytenaggregation entscheidend. Daneben inhibiert cGKI den Thromboxan A_2-Rezeptor (Tx) und reduziert die durch Agonisten induzierte Calcium-Mobilisierung in Thrombozyten. Insgesamt resultiert dies in einer Inhbition der Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten.

7 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Durch Ischämie und Reperfusion lebenswichtiger Gewebe und Organe hervorgerufene Erkrankungen wie der Myokardinfarkt oder die zerebrale Ischämie haben noch immer wesentlichen Anteil an der Morbidität und Mortalität in westlichen Industrieländern und sind somit nicht zuletzt auch aus gesundheitspolitischer Sicht von ganz eminenter Bedeutung.

Primärer Angriffspunkt des Ischämie-Reperfusionsschadens ist die Organmikrozirkulation. Zentrale Bedeutung für den mit Ischämie-Reperfusion assoziierten Gewebeschaden hat die Akkumulation von Leukozyten in der postischämischen Mikrostrombahn. Wie histologische Untersuchungen zeigten, findet sich neben der Akkumulation von Leukozyten auch eine ausgeprägte Rekrutierung von Thrombozyten in den Mikrogefäßen des postischämischen Gewebes. Über die Kinetik und die Mechanismen der postischämischen Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen war jedoch bislang nur wenig bekannt.

Im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurde ein Modell etabliert, das mit Hilfe der intravitalen Videofluoreszenzmikroskopie die Visualisierung der Leukozyten- und Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen ermöglicht. Alle Untersuchungen wurden am Dünndarm der Maus durchgeführt, der die fluoreszenzmikroskopische Analyse aller Segmente der Mikrozirkulation, d.h. von Arteriolen, Kapillaren und Venolen zulässt. Nach Narkotisierung wurden die Tiere einer Laparotomie unterzogen, es folgte die Auslagerung des Dünndarmes. Zur Visualisierung der TEI wurden die von einem zweiten, narkotisierten Tier durch kardiale Punktion und Separation gewonnenen Thrombozyten *ex vivo* mit dem Fluoreszenzmarker Rhodamin-6G markiert. Die fluoreszierenden Thrombozyten ($50x10^8$/500 µl) wurden vor Beginn der intravitalmikroskopischen Untersuchungen i.v. infundiert. Die Färbung der Leukozyten erfolgte *in vivo* mittels Acridine Orange. Aufgrund unterschiedlicher Anregungs- und Emissionsbereiche können mit Acridine Orange *in vivo* gefärbte Leukozyten neben den TEI in einem Tier und in identischen Gefäßsegmenten analysiert werden. Unsere Untersuchungen zeigen, dass das etablierte Modell reproduzierbar die Analyse der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen sowie der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen erlaubte.

Mit Hilfe dieses Modells wurde die Kinetik der Thrombozyten-Endothelzell-

Interaktion nach Ischämie und Reperfusion und die ihr zugrundeliegenden molekularen Mechanismen analysiert. Unsere Untersuchungen konnten *in vivo* bestätigen, dass im Rahmen der postischämischen Reperfusion nach einer 60-minütigen Ischämie neben Leukozyten auch Thrombozyten in der Mikrostrombahn akkumulieren und am postischämischen Endothel adhärieren. Die Thrombozytenakkumulation tritt innerhalb weniger Minuten nach Reperfusion auf und findet - anders als die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion - nicht allein in Venolen statt, sondern betrifft insbesondere auch postischämische Arteriolen. So finden sich in beiden Gefäßtypen eine signifikante Zunahme rollender Thrombozyten um das 4-5-fache. Bei den festen TEI, der Adhärenz, kam es nach Ischämie sogar zu einer Zunahme um das ca. 10fache, sowohl in Arteriolen als auch in Venolen.

Unter Zuhilfenahme monoklonaler, gegen das P-Selektin der Maus gerichteter, blockierender Antikörper sowie P-Selektin-defizienter Mäuse analysierten wir die Rolle von P-Selektin für die postischämische TEI. Die Blockade des Selektins führte zu einer signifikanten Reduktion der TEI, sowohl rollender als auch adhärenter Thrombozyten in Arteriolen und Venolen, was die Bedeutung von P-Selektin für die Rekrutierung von Thrombozyten in der postischämischen Mikrostrombahn verdeutlicht. Da P-Selektin sowohl in Endothelzellen, in Weibel-Palade-Körperchen sowie in Thrombozyten in α-Granula gespeichert vorliegt und nach Aktivierung innerhalb von Sekunden an die Oberfläche der jeweiligen Zelle mobilisiert wird, untersuchten wir mit dem Einsatz P-Selektin-defizienter Mäuse, welches P-Selektin maßgeblich an den TEI beteiligt ist. Während in dem Versuchsansatz mit P-Selektin-defizienten Thrombozyten so gut wie keine Reduktion des postischämischen Rollens und Adhärierens erzielt werden konnte, kam es bei Tieren mit P-Selektin-defizientem Endothel zu einer signifikanten dramatischen Reduktion der TEI auf Werte, die mit den Werten in Tieren ohne I/R vergleichbar waren. Dies deutet darauf hin, dass nicht das thrombozytäre, sondern das von Endothelzellen exprimierte P-Selektin die postischämische Rekrutierung von Thrombozyten vermittelt.

Im letzten Abschnitt der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, welche Bedeutung dem Gas Stickstoffmonoxid für die Regulation der postischämischen Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion zukommt. Tiere wurden erneut einer intestinalen Ischämie/Reperfusion unterzogen. Zusätzlich wurde die NO-Synthese durch i.v.-Applikation des unselektiven NO-Synthase-Inhibitors L-LAME blockiert. Die Inhibition der endogenen NO-Synthese führte zu einem dramatischen, signifikanten Anstieg der

Thrombozyten-Adhäsion in der postischämischen Mikrozirkulation. Zusätzlich fanden sich bei den mit L-NAME behandelten Tieren - anders als nach Applikation von Vehikel - zahlreiche Thrombozytenaggregate in der postischämischen Mikrozirkulation, die zu einer partiellen oder kompletten Okklusion der reperfundierten Mikrostrombahn führten.

Sowohl Endothelzellen als auch Thrombozyten fungieren als Quellen für NO. Während Ischämie-Reperfusion ist auch die thrombozytären NO-Synthese maßgeblich an der Regulation der TEI beteiligt. In der vorliegenden Untersuchung hatte ein Defekt der thrombozytären NO-Synthese ($iNOS^{-/-}$ Thrombozyten) ähnlich wie nach systemischer Inhibition durch L-NAME eine Zunahme der Thrombozyten-Adhäsion in der postischämischen Mikrostrombahn zur Folge. Die vermehrte Adhäsivität der iNOS defizienten Thrombozyten äußerte sich auch in einer signifikanten Zunahme der Anzahl von Thrombozytenaggregaten in der postischämischen Mikrozirkulation iNOS-defizienter Tiere. Das Gas NO und hierbei vor allem das von Thrombozyten freigesetzte NO scheint also *in vivo* einen zentralen Inhibitor der postischämischen Akkumulation von Thrombozyten darzustellen.

Im Rahmen der postischämischen Reperfusion kommt es nicht nur zur Akkumulation von Leukozyten sondern auch von Thrombozyten in der postischämischen Mikrostrombahn. Die Rekrutierung von Thrombozyten betrifft insbesondere postischämische Arteriolen und wird über endotheliales P-Selektin vermittelt. Das von Endothelzellen und insbesondere das von Thrombozyten freigesetzte NO reguliert die postischämische Thrombozytenakkumulation und verhindert die Aggregation in der postischämischen Mikrostrombahn. Da die Thrombozytenadhäsion/-aggregation, anders als die Akkumulation von Leukozyten, nicht alleine in Venolen sondern insbesondere auch in Arteriolen auftritt, könnten Thrombozyten über einen partiellen oder kompletten Verschluss der arteriellen Mikrogefäße wesentlich zur Manifestation des mikrovaskulären Perfusionsversagens beitragen. Zusätzlich sind Thrombozyten in der Lage, eine Reihe proinflammatorischer Mediatoren freizusetzen. Auf diesem Wege aktivieren sie andere vaskuläre Zellen und könnten so zur Entstehung eines inflammatorischen Prozesses in der postischämischen Strombahn beitragen. Die Inhibition der Rekrutierung, Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten in der reperfundierten Mikrostrombahn könnte daher für die Reduktion des postischämischen Perfusionsversagens („no-reflow“) und damit für die Reduktion des postischämischen Gewebeschadens von wichtiger, therapeutischer Bedeutung sein.

8 Literatur

1. Abel,K., G.Mieskes, and U.Walter. 1995. Dephosphorylation of the focal adhesion protein VASP in vitro and in intact human platelets. *FEBS Lett.* 370:184-188.

2. Adams,D.H. and S.Shaw. 1994. Leucocyte-endothelial interactions and regulation of leucocyte migration. *Lancet* 343:831-836.

3. Adkins,W.K. and A.E.Taylor. 1990. Role of xanthine oxidase and neutrophils in ischemia-reperfusion injury in rabbit lung. *J.Appl.Physiol.* 69:2012-2018.

4. Amano,M., M.Takahashi, T.Kosaka, and M.Kinoshita. 1994. Differential inhibition of platelet aggregation and calcium mobilization by nitroglycerin and stabilized nitric oxide. *J Cardiovasc.Pharmacol.* 24:860-866.

5. Asako,H., I.Kurose, R.Wolf, S.DeFrees, Z.L.Zheng, L.Phillips, J.C.Paulson, and D.N.Granger. 1994. Role of H1-receptors and P-selectin in histamine-induced leukocyte rolling and adhesion in postcapillary venules. *J.Clin.Invest.* 93:1508-1515.

6. Barry,O.P., D.Pratico, J.A.Lawson, and G.A.FitzGerald. 1997. Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *J.Clin.Invest.* 99:2118-2127.

7. Bernhardt,J., M.R.Tschudi, Y.Dohi, I.Gut, B.Urwyler, F.R.Buhler, and T.F.Luscher. 1991. Release of nitric oxide from human vascular smooth muscle cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 180:907-912.

8. Bienvenu,K. and D.N.Granger. 1993. Molecular determinants of shear rate-dependent leukocyte adhesion in postcapillary venules. *Am.J.Physiol.* 264:H1504-8.

9. Bizzozero,J. 1882. Ueber einen neuen Formbestandtheil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und Blutgerinnung. *Archiv für Pathologische Anatomie* 90:261-332.

10. Blockmans,D., H.Deckmyn, and J.Vermylen. 1995. Platelet activation. *Blood Rev.* 9:143-156.

11. Body,S.C. 1996. Platelet activation and interactions with the microvasculature. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 27 Suppl 1:S13-25.

12. Bombeli,T., B.R.Schwartz, and J.M.Harlan. 1998. Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIbIIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), alphavbeta3 integrin, and GPIbalpha. *J.Exp.Med.* 187:329-339.

13. Borges,E., W.Tietz, M.Steegmaier, T.Moll, R.Hallmann, A.Hamann, and D.Vestweber. 1997. P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) on T helper 1 but not on T helper 2 cells binds to P-selectin and supports migration into inflamed skin. *J.Exp.Med.* 185:573-578.

14. Boros,M., J.Kaszaki, and S.Nagy. 1991. Histamine release during intestinal ischemia-reperfusion: role of iron ions and hydrogen peroxide. *Circ.Shock* 35:174-180.

15. Boros,M., S.Massberg, L.Baranyi, H.Okada, and K.Messmer. 1998. Endothelin-1 induces leukocyte adhesion in submucosal venules of the rat small intestine. *Gastroenterology* 114:103-114.

16. Broekman,M.J., A.M.Eiroa, and A.J.Marcus. 1991. Inhibition of human platelet reactivity by endothelium-derived relaxing factor from human umbilical vein endothelial cells in suspension: blockade of aggregation and secretion by an aspirin-insensitive mechanism. *Blood* 78:1033-1040.

17. Bubel,S., D.Wilhelm, M.Entelmann, H.Kirchner, and H.Kluter. 1996. Chemokines in stored platelet concentrates. *Transfusion* 36:445-449.

18. Bullard,D.C., L.Qin, I.Lorenzo, W.M.Quinlin, N.A.Doyle, R.Bosse, D.Vestweber, C.M.Doerschuk, and A.L.Beaudet. 1995. P-selectin/ICAM-1 double mutant mice: acute emigration of neutrophils into the peritoneum is completely absent but is normal into pulmonary alveoli. *J.Clin.Invest.* 95:1782-1788.

19. Butt,E., K.Abel, M.Krieger, D.Palm, V.Hoppe, J.Hoppe, and U.Walter. 1994. cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets. *J.Biol.Chem.* 269:14509-14517.

20. Buttrum,S.M., R.Hatton, and G.B.Nash. 1993. Selectin-mediated rolling of neutrophils on immobilized platelets. *Blood* 82:1165-1174.

21. Cadroy,Y., A.Diquelou, D.Dupouy, J.P.Bossavy, K.S.Sakariassen, P.Sie, and B.Boneu. 1997. The thrombomodulin/protein C/protein S anticoagulant pathway modulates the thrombogenic properties of the normal resting and stimulated endothelium. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 17:520-527.

22. Caen,J.P. and J.P.Rosa. 1995. Platelet-vessel wall interaction: from the bedside to molecules. *Thromb.Haemost.* 74:18-24.

23. Carden,D.L., J.K.Smith, and R.J.Korthuis. 1990. Neutrophil-mediated microvascular dysfunction in postischemic canine skeletal muscle. Role of granulocyte adherence. *Circ.Res.* 66:1436-1444.

24. Chen,L.Y. and J.L.Mehta. 1996. Further evidence of the presence of constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms in human platelets. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 27:154-158.

25. Chen,L.Y. and J.L.Mehta. 1996. Further evidence of the presence of constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms in human platelets. *J Cardiovasc Pharmacol* 27:154-158.

26. Chintala,M.S., V.Bernardino, and P.J.Chiu. 1994. Cyclic GMP but not cyclic AMP prevents renal platelet accumulation after ischemia-reperfusion in anesthetized rats. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 271:1203-1208.

27. Cywes,R., M.A.Packham, L.Tietze, J.R.Sanabria, P.R.Harvey, M.J.Phillips, and S.M.Strasberg. 1993. Role of platelets in hepatic allograft preservation injury in the rat. *Hepatology* 18:635-647.

28. de Gaetano,G. 2001. Historical overview of the role of platelets in hemostasis and thrombosis. *Haematologica* 86:349-356.

29. de Groot,P.G. and J.J.Sixma. 1990. Platelet adhesion. *Br.J.Haematol.* 75:308-312.

30. de Wit,C., B.Jahrbeck, C.Schafer, S.S.Bolz, and U.Pohl. 1998. Nitric oxide opposes myogenic pressure responses predominantly in large arterioles in vivo. *Hypertension* 31:787-794.

31. Deuel,T.F., R.M.Senior, D.Chang, G.L.Griffin, R.L.Heinrikson, and E.T.Kaiser. 1981. Platelet factor 4 is chemotactic for neutrophils and monocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 78:4584-4587.

32. Diacovo,T.G., M.D.Catalina, M.H.Siegelman, and U.H.von Andrian. 1998. Circulating activated platelets reconstitute lymphocyte homing and immunity in L-selectin-deficient mice. *J.Exp.Med.* 187:197-204.

33. Diacovo,T.G., A.R.deFougerolles, D.F.Bainton, and T.A.Springer. 1994. A functional integrin ligand on the surface of platelets: intercellular adhesion molecule-2. *J.Clin.Invest.* 94:1243-1251.

34. Diacovo,T.G., K.D.Puri, R.A.Warnock, T.A.Springer, and U.H.von Andrian. 1996. Platelet-mediated lymphocyte delivery to high endothelial venules. *Science* 273:252-255.

35. Diacovo,T.G., S.J.Roth, J.M.Buccola, D.F.Bainton, and T.A.Springer. 1996. Neutrophil rolling, arrest, and transmigration across activated, surface adherent platelets via sequential activation of P-selectin and the beta(2) integrin CD11b/CD18. *Blood* 88:146-157.

36. Dimmeler,S., I.Fleming, B.Fisslthaler, C.Hermann, R.Busse, and A.M.Zeiher. 1999. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399:601-605.

37. Dore,M., R.J.Korthuis, D.N.Granger, M.L.Entman, and C.W.Smith. 1993. P-selectin mediates spontaneous leukocyte rolling in vivo. *Blood* 82:1308-1316.

38. Draijer,R., A.B.Vaandrager, C.Nolte, H.R.De Jonge, U.Walter, and V.W.van Hinsbergh. 1995. Expression of cGMP-dependent protein kinase I and phosphorylation of its substrate, vasodilator-stimulated phosphoprotein, in human endothelial cells of different origin. *Circ.Res.* 77:897-905.

39. Entman,M.L., L.Michael, R.D.Rossen, W.J.Dreyer, D.C.Anderson, A.R.Taylor, and C.Wayne Smith. 1991. Inflammation in the course of early myocardial ischemia. *FASEB J.* 5:2529-2537.

40. Eppihimer,M.J. and D.N.Granger. 1997. Ischemia/reperfusion-induced leukocyte-endothelial interactions in postcapillary venules. *Shock* 8:16-25.

41. Eppihimer,M.J., J.Russell, D.C.Anderson, C.J.Epstein, S.Laroux, and D.N.Granger. 1997. Modulation of P-selectin expression in the postischemic intestinal microvasculature. *Am.J.Physiol.* 273:G1326-1332.

42. Ferguson,D., P.F.McDonagh, J.Biewer, C.N.Paidas, and M.G.Clemens. 1993. Spatial relationship between leukocyte accumulation and microvascular injury during reperfusion following hepatic ischemia. *Int.J.Microcirc.Clin.Exp.* 12:45-1260.

43. Forstermann,U., E.I.Closs, J.S.Pollock, M.Nakane, P.Schwarz, I.Gath, and H.Kleinert. 1994. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 23:1121-1131.

44. Freedman,J.E., J.Loscalzo, M.R.Barnard, C.Alpert, J.F.Keaney, and A.D.Michelson. 1997. Nitric oxide released from activated platelets inhibits platelet recruitment. *J.Clin.Invest.* 100:350-356.

45. Freedman,J.E., R.Sauter, E.M.Battinelli, K.Ault, C.Knowles, P.L.Huang, and J.Loscalzo. 1999. Deficient platelet-derived nitric oxide and enhanced hemostasis in mice lacking the NOSIII gene. *Circ Res* 84:1416-1421.

46. Frenette,P.S., C.V.Denis, L.Weiss, K.Jurk, S.Subbarao, B.Kehrel, J.H.Hartwig, D.Vestweber, and D.D.Wagner. 2000. P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is

expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *J.Exp.Med.* 191:1413-1422.

47. Fulton,D., J.P.Gratton, T.J.McCabe, J.Fontana, Y.Fujio, K.Walsh, T.F.Franke, A.Papapetropoulos, and W.C.Sessa. 1999. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 399:597-601.

48. Furchgott,R.F. and P.M.Vanhoutte. 1989. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J.* 3:2007-2018.

49. Furchgott,R.F. and J.V.Zawadzki. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373-376.

50. Furie,B. and B.C.Furie. 1995. 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.* 74:224-227.

51. Gaboury,J.P., D.C.Anderson, and P.Kubes. 1994. Molecular mechanisms involved in superoxide-induced leukocyte- endothelial cell interactions in vivo. *Am.J.Physiol.* 266:H637-642.

52. Gawaz,M., K.Brand, T.Dickfeld, G.Pogatsa-Murray, S.Page, C.Bogner, W.Koch, A.Schömig, and F.Neumann. 2000. Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis. *Atherosclerosis* 148:75-85.

53. Gawaz,M., F.J.Neumann, T.Dickfeld, W.Koch, K.L.Laugwitz, H.Adelsberger, K.Langenbrink, S.Page, D.Neumeier, A.Schömig, and K.Brand. 1998. Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation* 98:1164-1171.

54. Gawaz,M., F.J.Neumann, T.Dickfeld, A.Reininger, H.Adelsberger, A.Gebhardt, and A.Schömig. 1997. Vitronectin receptor (alpha(v)beta3) mediates platelet adhesion to the luminal aspect of endothelial cells: implications for reperfusion in acute myocardial infarction. *Circulation* 96:1809-1818.

55. Gear,A.R. 1994. Platelet adhesion, shape change, and aggregation: rapid initiation and signal transduction events. *Can.J.Physiol Pharmacol.* 72:285-294.

56. Gonzalez,A.P., S.Sepulveda, S.Massberg, R.Baumeister, and M.D.Menger. 1994. In vivo fluorescence microscopy for the assessment of microvascular reperfusion injury in small bowel transplants in rats. *Transplantation* 58:403-408.

57. Goto,S., D.R.Salomon, Y.Ikeda, and Z.M.Ruggeri. 1995. Characterization of the unique mechanism mediating the shear- dependent binding of soluble von Willebrand factor to platelets. *J.Biol.Chem.* 270:23352-23361.

58. Granger,D.N., J.N.Benoit, M.Suzuki, and M.B.Grisham. 1989. Leukocyte adherence to venular endothelium during ischemia- reperfusion. *Am.J.Physiol.* 257:G683-688.

59. Granger,D.N. and P.Kubes. 1994. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte- endothelial cell adhesion. *J.Leukoc.Biol.* 55:662-675.

60. Granger,D.N., P.R.Kvietys, and M.A.Perry. 1993. Leukocyte - endothelial cell adhesion induced by ischemia and reperfusion. *Can.J.Physiol.Pharmacol.* 71:67-75.

61. Grassl,G., C.L.Pummerer, I.Horak, and N.Neu. 1997. Induction of autoimmune myocarditis in interleukin-2-deficient mice. *Circulation* 95:1773-1776.

62. Gries,A., C.Bode, K.Peter, A.Herr, H.Bohrer, J.Motsch, and E.Martin. 1998. Inhaled nitric oxide inhibits human platelet aggregation, P- selectin expression, and fibrinogen binding in vitro and in vivo. *Circulation* 97:1481-1487.

63. Griffith,T.M., D.H.Edwards, M.J.Lewis, A.C.Newby, and A.H.Henderson. 1984. The nature of endothelium-derived vascular relaxant factor. *Nature* 308:645-647.

64. Grisham,M.B., L.A.Hernandez, and D.N.Granger. 1986. Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *Am.J.Physiol.* 251:G567-574.

65. Gross,S.S. and M.S.Wolin. 1995. Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu.Rev.Physiol* 57:737-69.:737-769.

66. Hammersen,F., J.H.Barker, A.Gidlöf, M.D.Menger, E.Hammersen, and K.Messmer. 1989. The ultrastructure of microvessels and their contents following ischemia and reperfusion. *Prog.Appl.Microcirc.* 13:1-26.

67. Hantgan,R.R., G.Hindriks, R.G.Taylor, J.J.Sixma, and P.G.de Groot. 1990. Glycoprotein Ib, von Willebrand factor, and glycoprotein IIb:IIIa are all involved in platelet adhesion to fibrin in flowing whole blood. *Blood* 76:345-353.

68. Hantgan,R.R., G.Hindriks, R.G.Taylor, J.J.Sixma, and P.G.de Groot. 1990. Glycoprotein Ib, von Willebrand factor, and glycoprotein IIb:IIIa are all involved in platelet adhesion to fibrin in flowing whole blood. *Blood* 76:345-353.

69. Harlan,J.M. 1985. Leukocyte-endothelial interactions. *Blood* 65:513-525.

70. Harlan,J.M. and D.Y.Liu. 1992. Adhesion: its role in inflammatory disease. W. H. Freeman and Company, New York.

71. Harris,A.G., R.Leiderer, F.Peer, and K.Messmer. 1996. Skeletal muscle microvascular and tissue injury after varying durations of ischemia. *Am.J.Physiol.* 271:H2388-2398.

72. Hawiger,J. 1995. Mechanisms involved in platelet vessel wall interaction. *Thromb.Haemost.* 74:369-372.

73. Henn,V., J.R.Slupsky, M.Grafe, I.Anagnostopoulos, R.Forster, G.Müller-Berghaus, and R.A.Kroczek. 1998. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 391:591-594.

74. Hernandez,L.A., M.B.Grisham, B.Twohig, K.E.Arfors, J.M.Harlan, and D.N.Granger. 1987. Role of neutrophils in ischemia-reperfusion-induced microvascular injury. *Am.J.Physiol.* 253:H699-703.

75. Hervig,T.A. and M.Farstad. 1996. Human blood platelet serotonin studied in vitro: Endogenous serotonin may stimulate thrombin induced serotonin release in stored platelets. *Platelets* 7:53-57.

76. Hoffmann,T.F., R.Leiderer, A.G.Harris, and K.Messmer. 1997. Ischemia and reperfusion in pancreas. *Microsc.Res.Tech.* 37:557-571.

77. Hoffmann,T.F., R.Leiderer, H.Waldner, and K.Messmer. 1995. Ischemia/reperfusion of the pancreas: a new in vivo model for acute pancreatitis in rats. *Res.Exp.Med.* 195:125-144.

78. Hoffmann,T.F., M.Steinbauer, H.Waldner, and K.Messmer. 1996. Exogenous bradykinin enhances ischemia/reperfusion injury of pancreas in rats. *J.Surg.Res.* 62:144-151.

79. Hoffmann,T.F., E.Uhl, and K.Messmer. 1996. Protective effect of the somatostatin analogue octreotide in ischemia/reperfusion-induced acute pancreatitis in rats. *Pancreas* 12:286-293.

80. Holt,J.C. and S.Niewiarowski. 1985. Biochemistry of alpha granule proteins. *Semin.Hematol.* 22:151-163.

81. Holt,M.R., D.R.Critchley, and N.P.J.Brindle. 1998. The focal adhesion phosphoprotein, VASP. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 30:307-311.

82. Hutchinson,P.J., R.M.Palmer, and S.Moncada. 1987. Comparative pharmacology of EDRF and nitric oxide on vascular strips. *Eur.J.Pharmacol.* 141:445-451.

83. Hutter,J.J., R.Mestril, E.K.Tam, R.E.Sievers, W.H.Dillmann, and C.L.Wolfe. 1996. Overexpression of heat shock protein 72 in transgenic mice decreases infarct size in vivo. *Circulation* 94:1408-1411.

84. Kanwar,S. and P.Kubes. 1994. Mast cells contribute to ischemia-reperfusion-induced granulocyte infiltration and intestinal dysfunction. *Am.J.Physiol.* 267:G316-G321.

85. Kawamura,S., L.Schürer, A.Goetz, B.Kempski, B.Schmucker, and A.Baethmann. 1990. An improved closed cranial window technique for investigation of blood brain barrier function and cerebral vasomotor control in the rat. *Int.J.Microcirc.* 9:369-383.

86. Keh,D., M.Gerlach, I.Kurer, S.Seiler, T.Kerner, K.J.Falke, and H.Gerlach. 1996. The effects of nitric oxide (NO) on platelet membrane receptor expression during activation with human alpha-thrombin. *Blood Coagul.Fibrinolysis* 7:615-624.

87. Kishimoto,T.K. and D.C.Anderson. 1992. The role of integrins in inflammation. *In* Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates. J.I.Gallin, I.M.Goldstein, and R.Snyderman, editors. Raven, New York. 353-406.

88. Klyscz,T., M.Jünger, F.Jung, and H.Zeintl. 1997. CAP IMAGE: a newly developed computer aided videoframe analysis system for dynamic capillaroscopy. *Biomedizinische Technik* 42:168-175.

89. Korthuis,R.J., M.B.Grisham, and D.N.Granger. 1988. Leukocyte depletion attenuates vascular injury in postischemic skeletal muscle. *Am.J.Physiol.* 254:H823-827.

90. Kubes,P., G.Ibbotson, J.Russell, J.L.Wallace, and D.N.Granger. 1990. Role of platelet-activating factor in ischemia/reperfusion- induced leukocyte adherence. *Am.J.Physiol.* 259:G300-305.

91. Kubes,P., M.Jutila, and D.Payne. 1995. Therapeutic potential of inhibiting leukocyte rolling in ischemia/reperfusion. *J.Clin.Invest.* 95:2510-2519.

92. Kuebler,W.M., G.E.Kuhnle, J.Groh, and A.E.Goetz. 1994. Leukocyte kinetics in pulmonary microcirculation: intravital fluorescence microscopic study. *J.Appl.Physiol.* 76:65-71.

93. Kuroda,T. and E.Shiohara. 1996. Leukocyte and platelet depletion protects the liver from damage induced by cholestasis and ischemia-reperfusion in the dog. *Scand.J.Gastroenterol.* 31:182-190.

94. Kuroda,T., E.Shiohara, T.Homma, Y.Furukawa, and S.Chiba. 1994. Effects of leukocyte and platelet depletion on ischemia-- reperfusion injury to dog pancreas. *Gastroenterology* 107:1125-1134.

95. Kurose,I. and D.N.Granger. 1994. Evidence implicating xanthine oxidase and neutrophils in reperfusion-induced microvascular dysfunction. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 723:158-179.

96. Kurtel,H., K.Fujimoto, B.J.Zimmerman, D.N.Granger, and P.Tso. 1991. Ischemia-reperfusion-induced mucosal dysfunction: role of neutrophils. *Am.J.Physiol.* 261:G490-496.

97. Lalor,P. and G.B.Nash. 1995. Adhesion of flowing leucocytes to immobilized platelets. *Br.J.Haematol.* 89:725-732.

98. Laszik,Z., P.J.Jansen, R.D.Cummings, T.F.Tedder, R.P.McEver, and K.L.Moore. 1996. P-selectin glycoprotein ligand-1 is broadly expressed in cells of myeloid, lymphoid, and dendritic lineage and in some nonhematopoietic cells. *Blood* 88:3010-3021.

99. Laufs,U., K.Gertz, P.Huang, G.Nickenig, M.Bohm, U.Dirnagl, and M.Endres. 2000. Atorvastatin upregulates type III nitric oxide synthase in thrombocytes, decreases platelet activation, and protects from cerebral ischemia in normocholesterolemic mice. *Stroke* 31:2442-2449.

100. Lehr,H.A., A.Guhlmann, D.Nolte, D.Keppler, and K.Messmer. 1991. Leukotrienes as mediators in ischemia-reperfusion injury in a microcirculation model in the hamster. *J.Clin.Invest.* 87:2036-2041.

101. Ley,K., P.Gaehtgens, C.Fennie, M.S.Singer, L.A.Lasky, and S.D.Rosen. 1991. Lectin-like cell adhesion molecule 1 mediates rolling in mesenteric venules in vivo. *Blood* 77:2553-2555.

102. Lieberman,E.H., S.O'Neill, and M.E.Mendelsohn. 1991. S-nitrosocysteine inhibition of human platelet secretion is correlated with increases in platelet cGMP levels. *Circ.Res.* 68:1722-1728.

103. Lincoln,T.M., T.L.Cornwell, and A.E.Taylor. 1990. cGMP-dependent protein kinase mediates the reduction of Ca2+ by cAMP in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 258:399-407.

104. Malinski,T., M.W.Radomski, Z.Taha, and S.Moncada. 1993. Direct electrochemical measurement of nitric oxide released from human platelets. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 194:960-965.

105. Markert,T., V.Krenn, J.Leebmann, and U.Walter. 1996. High expression of the focal adhesion- and microfilament- associated protein VASP in vascular smooth muscle and endothelial cells of the intact human vessel wall. *Basic.Res.Cardiol.* 91:337-343.

106. Marletta,M.A. 1993. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J.Biol.Chem.* 268:12231-12234.

107. Marletta,M.A. 1994. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell* 78:927-930.

108. Martin,W., J.A.Smith, and D.G.White. 1986. The mechanisms by which haemoglobin inhibits the relaxation of rabbit aorta induced by nitrovasodilators, nitric oxide, or bovine retractor penis inhibitory factor. *Br.J.Pharmacol.* 89:563-571.

109. Massberg,S., M.Boros, R.Leiderer, L.Baranyi, H.Okada, and K.Messmer. 1998. Endothelin-1-induced mucosal damage in the rat small intestine: role of ET_A receptors. *Shock* 9:177-183.

110. Massberg,S., S.Eisenmenger, G.Enders, F.Krombach, and K.Messmer. 1998. Quantitative analysis of small intestinal microcirculation in the mouse. *Res.Exp.Med.(Berlin)* 198:23-35.

111. Massberg,S., G.Enders, R.Leiderer, S.Eisenmenger, D.Vestweber, F.Krombach, and K.Messmer. 1998. Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. *Blood* 92:507-515.

112. Massberg,S., G.Enders, F.C.Matos, L.I.Tomic, R.Leiderer, S.Eisenmenger, K.Messmer, and F.Krombach. 1999. Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo. *Blood* 94:3829-3838.

113. Massberg,S., A.P.Gonzalez, R.Leiderer, M.D.Menger, and K.Messmer. 1998. In vivo assessment of the influence of cold preservation time on microvascular reperfusion injury after experimental small bowel transplantation. *Br.J.Surg.* 85:127-133.

114. Massberg,S., A.P.Gonzalez, M.D.Menger, and K.Messmer. 1996. Carolina rinse attenuates ischemia/reperfusion injury following small bowel transplantation. *Langenbecks Arch.Chir.* Suppl I:571-575.

115. Massberg,S. and K.Messmer. 1998. The nature of ischemia/reperfusion injury. *Transplant.Proc.* 30:4217-4223.

116. Massberg,S., M.Sausbier, P.Klatt, M.Bauer, A.Pfeifer, W.Siess, R.Fassler, P.Ruth, F.Krombach, and F.Hofmann. 1999. Increased adhesion and aggregation of platelets lacking cyclic guanosine 3',5'-monophosphate kinase I. *J.Exp.Med.* 189:1255-1264.

117. Maxwell,S.R. and G.Y.Lip. 1997. Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. *Int.J.Cardiol.* 58:95-117.

118. McEver,R.P. 1991. Selectins; novel receptors that mediate leukocyte adhesion during inflammation. *Thromb.Haemost.* 65:223-228.

119. McMillen,M., M.Huribald, and B.Sumpio. 1993. Common pathway of endothelial-leukocyte interaction in shock, ischemia, and reperfusion. *Am.J.Surg.* 166:557-562.

120. Mehta,J.L., L.Y.Chen, B.C.Kone, P.Mehta, and P.Turner. 1995. Identification of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in human platelets. *J.Lab.Clin.Med.* 125:370-377.

121. Mehta,J.L., L.Y.Chen, B.C.Kone, P.Mehta, and P.Turner. 1995. Identification of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in human platelets. *J Lab Clin Med* 125:370-377.

122. Menger,M.D., H.-A.Lehr, and K.Messmer. 1991. The role of oxygen radicals in postischemic injury - microcirculatory derangements and oxygen radicals. *Klin.Wochenschr*. 69:1050-1055

123. Menger,M.D., S.Pelikan, D.Steiner, and K.Messmer. 1992. Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "reflow paradox". *Am.J.Physiol.* 263:H1901-1906.

124. Menger,M.D., F.U.Sack, J.H.Barker, G.Feifel, and K.Messmer. 1988. Quantitative analysis of microcirculatory disorders after prolonged ischemia in skeletal muscle. Therapeutic effects of prophylactic isovolemic hemodilution. *Res.Exp.Med.Berl.* 188:151-165.

125. Menger,M.D., B.Vollmar, J.Glasz, S.Post, and K.Messmer. 1993. Microcirculatory manifestations of hepatic ischemia/reperfusion injury. *In* Liver microcirculation and hepatobiliary function. Messmer K. and M.D.Menger, editors. Karger, Basel. 106-124.

126. Messmer,K. and F.Krombach. 1998. Microcirculation research in experimental surgery. *Chirurg.* 69:333-338.

127. Michelson,A.D., S.E.Benoit, M.I.Furman, W.L.Breckwoldt, M.J.Rohrer, M.R.Barnard, and J.Loscalzo. 1996. Effects of nitric oxide/EDRF on platelet surface glycoproteins. *Am.J.Physiol.* 270:H1640-1648.

128. Moncada,S., R.M.Palmer, and E.A.Higgs. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol.Rev.* 43:109-142.

129. Monks,D., V.Lange, R.E.Silber, T.Markert, U.Walter, and V.Nehls. 1998. Expression of cGMP-dependent protein kinase I and its substrate VASP in neointimal cells of the injured rat carotid artery. *Eur J Clin Invest.* 28:416-423.

130. Moore,K.L., K.D.Patel, R.E.Bruehl, L.Fugang, D.A.Johnson, H.S.Lichtenstein, R.D.Cummings, D.F.Bainton, and R.P.McEver. 1995. P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin. *J.Cell Biol.* 128:661-671.

131. Morgenstern,E. 1995. The formation of compound granules from different types of secretory organelles in human platelets (dense granules and alpha-granules). A cryofixation/-substitution study using serial sections. *Eur.J.Cell Biol.* 68:183-190.

132. Nathan,C. and Q.W.Xie. 1994. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 78:915-918.

133. Neumann,F.J., N.Marx, M.Gawaz, K.Brand, I.Ott, C.Rokitta, C.Sticherling, C.Meinl, A.May, and A.Schömig. 1997. Induction of cytokine expression in leukocytes by binding of thrombin-stimulated platelets. *Circulation* 95:2387-2394.

134. Nolte,D., H.Zeintl, M.Steinbauer, S.Pickelmann, and K.Messmer. 1995. Functional capillary density: an indicator of tissue perfusion? *Int.J Microcirc.Clin.Exp* 15:244-249.

135. Norman,K.E., K.L.Moore, R.P.McEver, and K.Ley. 1995. Leukocyte rolling in vivo is mediated by P-selectin glycoprotein ligand-1. *Blood* 86:4417-4421.

136. Nurden,A.T. 1986. Platelet membrane glycoproteins and their role in platelet adhesion and aggregation. *Agents Actions Suppl* 20: 29-44.

137. Oliver,M.G., R.D.Specian, M.A.Perry, and D.N.Granger. 1991. Morphologic assessment of leukocyte-endothelial cell interactions in mesenteric venules subjected to ischemia and reperfusion. *Inflammation* 15:331-346.

138. Olofsson,A.M., K.E.Arfors, L.Ramezani, B.A.Wolitzky, E.C.Butcher, and U.H.von Andrian. 1994. E-selectin mediates leukocyte rolling in interleukin-1-treated rabbit mesentery venules. .*Blood* 84:2749-2758.

139. Palmer,R.M., A.G.Ferrige, and S.Moncada. 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327:524-526.

140. Pfeifer,A., A.Aszodi, U.Seidler, P.Ruth, F.Hofmann, and R.Fassler. 1996. Intestinal secretory defects and dwarfism in mice lacking cGMP- dependent protein kinase II. *Science* 274:2082-2086.

141. Pfeifer,A., P.Klatt, S.Massberg, L.Ny, M.Sausbier, C.Hirneiss, G.X.Wang, M.Korth, A.Aszodi, K.E.Andersson, F.Krombach, A.Mayerhofer, P.Ruth, R.Fässler, and F.Hofmann. 1998. Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *EMBO J.* 17:3045-3051.

142. Piccardoni,P., V.Evangelista, A.Piccoli, G.de Gaetano, A.Walz, and C.Cerletti. 1996. Thrombin-activated human platelets release two NAP-2 variants that stimulate polymorphonuclear leukocytes. *Thromb Haemost* 76:780-785.

143. Picker,L.J., R.A.Warnock, A.R.Burns, C.M.Doerschuk, E.L.Berg, and E.C.Butcher. 1991. The neutrophil selectin LECAM-1 presents carbohydrate ligands to the vascular selectins ELAM-1 and GMP-140. *Cell* 66:921-933.

144. Pinsky,D.J., Y.Naka, H.Liao, M.C.Oz, D.D.Wagner, T.N.Mayadas, R.C.Johnson, R.O.Hynes, M.Heath, C.A.Lawson, and D.M.Stern. 1996. Hypoxia-induced exocytosis of endothelial cell Weibel-Palade bodies. A mechanism for rapid neutrophil recruitment after cardiac preservation. *J.Clin.Invest.* 97:493-500.

145. Pohl,U. and C.de Wit. 1996. Interaction of nitric oxide with myogenic and adrenergic vasoconstrictor processes in the control of microcirculatory blood flow. *Pflugers Arch.* 432:R107-R110.

146. Pohl,U. and C.de Wit. 1999. A Unique Role of NO in the Control of Blood Flow. *News Physiol Sci.* 14:74-80.

147. Pohl,U., C.de Wit, and T.Gloe. 2000. Large arterioles in the control of blood flow: role of endothelium- dependent dilation. *Acta Physiol Scand.* 168:505-510.

148. Radomski,M.W., R.M.Palmer, and S.Moncada. 1987. Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. *Br.J.Pharmacol.* 92:181-187.

149. Radomski,M.W., R.M.Palmer, and S.Moncada. 1987. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 2:1057-1058.

150. Radomski,M.W., R.M.Palmer, and S.Moncada. 1987. The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 148:1482-1489.

151. Radomski,M.W., R.M.J.Palmer, and S.Moncada. 1990. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 87:5193-5197.

152. Reinhard,M., K.Giehl, K.Abel, C.Haffner, T.Jarchau, V.Hoppe, B.M.Jockusch, and U.Walter. 1995. The proline-rich focal adhesion and microfilament protein VASP is a ligand for profilins. *EMBO J.* 14:1583-1589.

153. Reinhard,M., M.Halbrugge, U.Scheer, C.Wiegand, B.M.Jockusch, and U.Walter. 1992. The 46/50 kDa phosphoprotein VASP purified from human platelets is a novel protein associated with actin filaments and focal contacts. *EMBO J.* 11:2063-2070.

154. Reinhard,M., K.Jouvenal, D.Tripier, and U.Walter. 1995. Identification, purification, and characterization of a zyxin- related protein that binds the focal adhesion and microfilament protein VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein). *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 92:7956-7960.

155. Rinder,H.M., E.L.Snyder, J.L.Bonan, P.A.Napychank, H.Malkus, and B.R.Smith. 1993. Activation in stored platelet concentrates: correlation between membrane expression of P-selectin, glycoprotein IIb/IIIa, and beta-thromboglobulin release. *Transfusion* 33:25-29.

156. Romo,G.M., J.-F.Dong, A.Schade, E.E.Gardiner, G.S.Kansas, Li C.Q., L.V.McIntire, M.C.Berndt, and J.A.López. 1999. The glykoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin. *J.Exp.Med.* 190:803-813.

157. Romson,J.L., B.G.Hook, S.L.Kunkel, G.D.Abrams, M.A.Schork, and B.R.Lucchesi. 1983. Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. *Circulation* 67:1016-1023.

158. Ross,R. 1986. The pathogenesis of atherosclerosis - an update. *N.Engl.J.Med.* 314:488.

159. Ross,R. 1993. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362:801-809.

160. Ross,R. 1999. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115-126.

161. Ruggeri,Z.M. 1994. New insights into the mechanisms of platelet adhesion and aggregation. *Semin.Hematol.* 31:229-239.

162. Ruggeri,Z.M. 1997. Mechanisms initiating platelet thrombus formation. *Thromb.Haemost.* 78:611-616.

163. Savage,B., E.Saldivar, and Z.M.Ruggeri. 1996. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell* 84:289-297.

164. Schlossmann,J., A.Ammendola, K.Ashman, X.Zong, A.Huber, G.Neubauer, G.X.Wang, H.D.Allescher, M.Korth, M.Wilm, F.Hofmann, and P.Ruth. 2000. Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase Ibeta. *Nature* 404:197-201.

165. Schmidt,H.H. and U.Walter. 1994. NO at work. *Cell* 78:919-925.

166. Schoenhagen,P., E.S.McErlean, and S.E.Nissen. 2000. The vulnerable coronary plaque. *J.Cardiovasc.Nurs.* 15:1-12.

167. Schömig,A., A.Kastrati, J.Dirschinger, J.Mehilli, U.Schricke, J.Pache, S.Martinoff, F.J.Neumann, and M.Schwaiger. 2000. Coronary stenting plus platelet glycoprotein

IIb/IIIa blockade compared with tissue plasminogen activator in acute myocardial infarction. Stent versus Thrombolysis for Occluded Coronary Arteries in Patients with Acute Myocardial Infarction Study Investigators. *N.Engl.J.Med.* 343:385-391.

168. Schraut,W.H., A.S.Rosemurgy, and R.M.Riddell. 1983. Prolongation of intestinal allograft survival without immunosuppressive drug therapy. Transplantation of small bowel allografts. *J.Surg.Res.* 34:597-607.

169. Shattil,S.J., H.Kashiwagi, and N.Pampori. 1998. Integrin signaling: the platelet paradigm. *Blood* 91:2645-2657.

170. Simon,D.I., J.S.Stamler, E.Loh, J.Loscalzo, S.A.Francis, and M.A.Creager. 1995. Effect of nitric oxide synthase inhibition on bleeding time in humans. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 26:339-342.

171. Simpson,P.J., R.F.Todd, J.C.Fantone, J.K.Mickelson, J.D.Griffen, and B.R.Griffen. 1988. Reduction of experimental canine myocardial reperfusion injury by a monoclonal antibody (anti-Mol, anti-CD11b) that inhibits leukocyte adhesion. *J.Clin.Invest.* 81:624-629.

172. Slupsky,J.R., M.Kalbas, A.Willuweit, V.Henn, R.A.Kroczek, and G.Muller-Berghaus. 1998. Activated platelets induce tissue factor expression on human umbilical vein endothelial cells by ligation of CD40. *Thromb.Haemost.* 80:1008-1014.

173. Smith,J.K., M.B.Grisham, D.N.Granger, and R.J.Korthuis. 1989. Free radical defense mechanisms and neutrophil infiltration in postischemic skeletal muscle. *Am.J.Physiol.* 253:H789-H793.

174. Springer,T.A. 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76:301-314.

175. Springer,T.A. and L.A.Lasky. 1991. Sticky sugars for selectins. *Nature* 349:196-197.

176. Stenberg,P.E., R.P.McEver, M.A.Shuman, Y.V.Jacques, and D.F.Bainton. 1985. A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J.Cell Biol.* 101:880-886.

177. Stuehr,D.J. and O.W.Griffith. 1992. Mammalian nitric oxide synthases. *Adv.Enzymol.Relat Areas Mol.Biol.* 65:287-346.:287-346.

178. Suda,T., B.N.Mora, F.D'Ovidio, J.A.Cooper, M.Hiratsuka, W.Zhang, T.Mohanakumar, and G.A.Patterson. 2000. In vivo adenovirus-mediated endothelial nitric oxide synthase gene transfer ameliorates lung allograft ischemia-reperfusion injury. *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 119:297-304.

179. Suzuki,M., W.Inauen, P.R.Kvietys, M.B.Grisham, C.Meininger, M.E.Schelling, H.J.Granger, and D.N.Granger. 1989. Superoxide mediates reperfusion-induced leukocyte-endothelial cell interactions. *Am.J.Physiol.* 257:H1740-1745.

180. Vollmar,B., J.Glasz, R.Leiderer, S.Post, and M.D.Menger. 1994. Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. *Am.J.Pathol.* 145:1421-1431.

181. Vollmar,B., J.Glasz, M.D.Menger, and K.Messmer. 1995. Leukocytes contribute to hepatic ischemia/reperfusion injury via intercellular adhesion molecule-1-mediated venular adherence. *Surgery* 117:195-200.

182. Vollmar,B., M.D.Menger, J.Glasz, R.Leiderer, and K.Messmer. 1994. Impact of leukocyte-endothelial cell interaction in hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am.J.Physiol.* 267:G786-G793.

183. von Andrian,U.H., J.D.Chambers, L.M.McEvoy, R.F.Bargafze, K.E.Arfors, and E.C.Butcher. 1991. Two step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte beta 2 integrins in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 88:7538-7542.

184. von Andrian,U.H., P.Hansell, J.D.Chambers, E.M.Berger, I.T.Filho, E.C.Butcher, and K.E.Arfors. 1992. L-selectin function is required for β2-integrin-mediated neutrophil adhesion at physiological shear rates in vivo. *Am.J.Physiol.* 263:H1034-H1044.

185. Waldmann,R., S.Bauer, C.Gobel, F.Hofmann, K.H.Jakobs, and U.Walter. 1986. Demonstration of cGMP-dependent protein kinase and cGMP- dependent phosphorylation in cell-free extracts of platelets. *Eur.J.Biochem.* 158:203-210.

186. Wallerath,T., I.Gath, W.E.Aulitzky, J.S.Pollock, H.Kleinert, and U.Forstermann. 1997. Identification of the NO synthase isoforms expressed in human neutrophil granulocytes, megakaryocytes and platelets. *Thromb.Haemost.* 77:163-167.

187. Walter,U., M.Eigenthaler, J.Geiger, and M.Reinhard. 1993. Role of cyclic nucleotide-dependent protein kinases and their common substrate VASP in the regulation of human platelets. *Adv.Exp.Med.Biol.* 344:237-249.

188. Walter,U., J.Geiger, C.Haffner, T.Markert, C.Nehls, R.E.Silber, and P.Schanzenbacher. 1995. Platelet-vessel wall interactions, focal adhesions, and the mechanism of action of endothelial factors. *Agents Actions Suppl.* 45:255-268.

189. Wang,G.R., Y.Zhu, P.V.Halushka, T.M.Lincoln, and M.E.Mendelsohn. 1998. Mechanism of platelet inhibition by nitric oxide: In vivo phosphorylation of thromboxane receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 95:4888-4893.

190. Weyrich,A.S., M.R.Elstad, R.P.McEver, T.M.McIntyre, K.L.Moore, J.H.Morrissey, S.M.Prescott, and G.A.Zimmerman. 1996. Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes. *J.Clin.Invest.* 97:1525-1534.

191. Weyrich,A.S., X.Y.Ma, D.J.Lefer, K.H.Albertine, and A.M.Lefer. 1993. In vivo neutralization of P-selectin protects feline heart and endothelium in myocardial ischemia and reperfusion injury. *J.Clin.Invest.* 91:2620-2629.

192. Williams,M.J., X.Du, J.C.Loftus, and M.H.Ginsberg. 1995. Platelet adhesion receptors. *Semin.Cell Biol.* 6:305-314.

193. Woldhuis,B., G.J.Tangelder, D.W.Slaaf, and R.S.Reneman. 1992. Concentration profile of blood platelets differs in arterioles and venules. *Am.J.Physiol.* 262:H1217-H1223.

194. Yeo,E.L., J.A.Sheppard, and I.A.Feuerstein. 1994. Role of P-selectin and leukocyte activation in polymorphonuclear cell adhesion to surface adherent activated platelets under physiologic shear conditions (an injury vessel wall model). *Blood* 83:2498-2507.

195. Zeintl,H., F.U.Sack, M.Intaglietta, and K.Messmer. 1989. Computer assisted leukocyte adhesion measurement in intravital microscopy. *Int.J.Microcirc.Clin.Exp.* 8:293-302.

196. Zeintl,H., W.R.Tompkins, K.Messmer, and M.Intaglietta. 1986. Static and dynamic microcirculatory video image analysis applied to clinical investigations. *Prog.Appl.Microcirc.* 11:1-10.

197. Zhou,Q., G.R.Hellermann, and L.P.Solomonson. 1995. Nitric oxide release from resting human platelets. *Thromb.Res.* 77:87-96.

198. Zimmerman,B.J. and D.N.Granger. 1990. Reperfusion-induced leukocyte infiltration: role of elastase. *Am.J.Physiol.* 259:H390-394.

199. Zimmerman,G.A., S.M.Prescott, and T.M.McIntyre. 1992. Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules. *Immunol.Today* 13:93-100.

200. Zoldhelyi,P., J.McNatt, X.M.Xu, D.Loose-Mitchell, R.S.Meidell, F.J.Jr.Clubb, L.M.Buja, J.T.Willerson, and K.K.Wu. 1996. Prevention of arterial thrombosis by adenovirus-mediated transfer of cyclooxygenase gene. *Circulation* 93:10-17.

9 Dank

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. Konrad Meßmer, Direktor des Instituts für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München. Durch die Aufnahme und Integration in sein Institut ermöglichte er mir die Arbeit in kooperativer und motivierender Atmosphäre. Mit Geduld und Verständnis führte er mich an wissenschaftlich-exaktes Denken heran und gab mir immer wieder richtungsweisende Impulse für meine experimentelle Arbeit. Seine Kompetenz und Kreativität wie auch seine persönliche Ausstrahlung haben mich für die experimentelle Medizin motiviert.

Besonders danke ich auch meinem Betreuer, Herrn Dr. med. Steffen Massberg,. Unter seiner Anleitung und konstruktiven Kritik lernte ich wissenschaftliches Arbeiten, von der Durchführung und Auswertung der Experimente bis hin zur kritischen Interpretation, Diskussion und Präsentation der Ergebnisse. Er unterstützte mich mit Geduld bei der Vorbereitung von Kongressbeiträgen sowie durch die differenzierte Korrektur meiner Manuskripte.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. vet. Fritz Krombach als Leiter der Arbeitgruppe Mikrozirkulation bedanken. Seine Unterstützung und hilfreiche Anleitung haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Frau Dr. Dr. Rosmarie Leiderer für die Durchführung und elektronenmikroskopische Beurteilung zahlreicher Schnitte. Doch nicht nur Ihr medizinisches, technisches Können verdient grössten Dank, sondern vor allem Ihr persönliches Engagement für andere Menschen verdient höchste Bewunderung.

Dank insbesondere auch Frau Elke Schütze für ihr fachkundiges Engagement bei der Erstellung licht- und elektronenmikroskopischer Präparate sowie für zahlreiche wertvolle Hinweise und Hilfestellungen.

Auch Frau Silvia Münzing gebührt mein Dank für die kompetente Durchführung und Auswertung der FACS-Analysen.

Schließlich danke ich den medizinisch-technischen Assistentinnen Christine Csapó und Alke Schropp, die bei der Durchführung von Laborarbeiten und der Erstellung von zahlreichen Abbildungen fachkundige und engagierte Mithilfe erwiesen.

Darüber hinaus Dank Herrn Müller sowie allen Mitarbeitern und Doktoranden des Instituts für Chirurgische Forschung, die mit vielen Gesprächen und Anregungen ganz wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

10 Abkürzungen

CAMAS:	Computer-Assisted Microcirculation Analysis System;
FCD:	Funktionelle Kapillardichte;
FITC:	Fluoreszeinisothiozyanat;
HI:	Heterogenitätsindex
I/R:	Ischämie / Reperfusion;
ICAM:	interzelluläres Adhäsionsmolekül;
i.a.:	intraarteriell
i.v.:	intravenös
IVM:	intravitale Fluoreszenzmikroskopie;
KG:	Körpergewicht;
MAP:	mittlerer arterieller Blutdruck;
LEI:	Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen
L-NAME:	Nω-Nitro-L-Arginin-Methyl-Ester
PMN:	polymorphonukleärer Leukozyt;
s.c.:	subkutan;
Sham:	sham-operierte Kontrollgruppe;
TEI:	Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionene

11 Curriculum Vitae

Name:		Simone Eisenmenger
Geburtsdatum:		14. Februar 1975
Geburtsort:		München
Eltern:		Prof. Dr. med. Wolfgang Eisenmenger, Arzt Gertrud Eisenmenger, geb. Cigolla, Kauffrau
Geschwister:		Irene Eisenmenger, Bankkauffrau, Studium der Betriebswirtschaftslehre
Schulischer Werdegang:	1981-1985: 1985-1994: 1994:	Fritz Kneidel Grundschule in Grünwald Mathematisch-naturwissenschaftlicher Zweig des Gymnasiums Oberhaching Abitur am Gymnasium Oberhaching
Studium:	seit 1994: 2001:	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München III. Staatsexamen (gut)
Praktische Erfahrung:	04/2000:	I. PJ-Tertial - Plastische Chirurgie und Gefäßchirurgie Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität München (Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. F.W. Schildberg)
	08/2000:	II. PJ-Tertial - Pathologie Massachusetts General Hospital Harvard Medical School Boston (Direktor: Dr. Colvin, MD)
	12/2000:	III. PJ-Tertial – Innere Medizin Krankenhaus Schwabing (Direktor: Prof. Dr. Nerl)
	1996-2000	Studentische Hilfskraft im OP-Bereich der orthopädischen Gemeinschaftspraxis Dr. Kirchhübel und Dr. Hoppert, Wolfratshausen

Berufliche Laufbahn:	seit 06/2001.	ÄiP an Chirurgischen Klinik und Poliklinik Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität München (Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. F.W. Schildberg, Prof. Dr. med. K. Jauch)
Wissenschaftliche Arbeit:	seit 02/1997:	Promotionsarbeit am Institut für Chirurgische Forschung, Klinikum Grosshadern, Ludwig-Maximilians-Universität, München (Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. K. Messmer) Titel: „Die Bedeutung von NO für die Regulation der postischämischen Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion in vivo“
	seit 06/2001:	Wissenschaftliche Tätigkeit in der Arbeitsgruppe Hatz/Angele Klinische Forschung Chirurgie Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität, München (Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. F.W. Schildberg)
Wissenschaftliche Preise:	8/98	1. Preis, Research Festival Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität München
	1998	Coautorin der Arbeit “Platelet-endothelial cell interactions during Ischemia/Reperfusion: The role of P-selctin“. Ausgezeichnet mit dem Schwarz-Pharmapreis für Angiologie der Deutschen Gesellschaft für Angiologie
Hobbys:	1991-94	Aktives Mitglied einer Showtanz Gruppe (1994 Europameister)
	1994-2001	Trainerin der Schüler- und Jugend- Gruppe des Showtanz-Vereins Taufkirchen
	seit 1987	Reiten

Publikationen

A.) Originalarbeiten:

1. Massberg S, Enders G, de Melo Matos F, Leiderer R, Domschke Tomic L, **Eisenmenger S,** Messmer K, Krombach F. Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo. *Blood* 1999;94, 3839-3838.
2. Massberg S, Enders G, Leiderer R, **Eisenmenger S**, Vestweber D, Krombach F, Messmer K. Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. *Blood* 1998; 92: 507-515.
3. Massberg S**, Eisenmenger S**, Enders G, Krombach F, Messmer K. Quantitative analysis of small intestinal microcirculation in the mouse. *Res Exp Med* 1998; 198: 23-35.

B) Beiträge zu Büchern und Kongressbänden

1. **Eisenmenger S,** Massberg S, Enders G, Dörger M, Krombach F, Messmer. Analyse des mikrovaskulären I/R-Schadens des Dünndarmes-ein in vivo Modell an der Maus. In: Demant T, Seidel D eds. *Research Festival ´97*. Geldern: MMV Medien & Medizin Verlagsgesellschaft mbH, 1997: 135.
2. Massberg S, Enders G, **Eisenmenger S**, Leiderer R, Vestweber D, Krombach F, Messmer K. Platelet-endothelial cell interactions in the postischemic microvasculature. In: Messmer K ed. *Progress in Applied Microcirculation*. 1999, 23: 66.81
3. Massberg S, Enders G, **Eisenmenger S,** Leiderer R, Vestweber D, Krombach F, Messmer K. P-selectin mediates postischemic platelet-endothelial cell interactions in vivo. In: Demant T, Seidel D eds. *Research Festival ´98*. Geldern: MMV Medien & Medizin Verlagsgesellschaft mbH, 1998: 135.
4. **Eisenmenger S,** Massberg S, Enders G, Dörger M, Krombach F, Messmer K. Effects of NOS-inhibition on postischemic platelet-endothelial cell interactions. In: Demant T, Seidel D eds. *Research Festival ´98*. Geldern: MMV Medien & Medizin Verlagsgesellschaft mbH, 1998: 222.
5. **Eisenmenger S,** Wichmann M, Hatz R, Schildberg F, Angele M. Die geschlechtsspezifische Immunantwort nach traumatisch-hämorrhagischem Schock: Vermittlung durch die LPS Rezeptoren CD14 und TLR4? Langenbecks Arch Chir 2002; Suppl. I:

C) Abstracts

1. **Eisenmenger. S**, Enders G.A., Maßberg S, Meßmer K. Intravitalmikroskopische Untersuchung des intstinalen I/R-Schadens der Maus. Acta Chir. Austr. 1997; Suppl. 137:23-4

2. Massberg S, Enders G, **Eisenmenger S**, Leiderer R, Vestweber D, Krombach F, Messmer K. Platelet-endothelial cell interactions during ischemia reperfusion. *Eur Surg Res* 1998; 30(S1):16.

3. Massberg S, Enders G, **Eisenmenger S**, Leiderer R, Krombach F, Messmer K. Platelet-endothelial cell interactions during ischemia reperfusion. *Shock* 1998;9 (Supplement):42.

4. Massberg S, Enders G, **Eisenmenger S**, Leiderer R, Vestweber D, Krombach F, Messmer K. Ischemia/reperfusion induces platelet-endothelial cell interactions in vivo. *Eur Surg Res* 1998;30(S1):16.

5. Massberg S, Enders G, **Eisenmenger S**, Leiderer R, Vestweber D, Krombach F, Messmer K. P-selectin mediates postischemic platelet-endothelial cell interactions in vivo. *J Vasc Res* 1998;35(S2):38.

6. **Eisenmenger S**, Massberg S, Enders G, Dörger M, Krombach F, Messmer K. Effects of NOS-inhibition on postischemic platelet-endothelial cell interactions in vivo. *J Vasc Res* 1998;35(S2):42.

7. Massberg S, **Eisenmenger S**, Krombach F, Messmer K. Dextran 70 attenuates postischemic platelet-endothelial cell interactions in vivo. *J Vasc Res* 1998;35(S2):55.

8. **Eisenmenger S**, Massberg S, Enders G, Dörger M, Krombach F, Messmer K. Effects of NOS inhibition on platelet-endothelial cell-interactions during Ischämia-Reperfusion in vivo. *J Vasc Res 1999, 36: 153*

9. **Eisenmenger S**, Seher T, Wichmann MW, Faist E, Hatz R, Schildberg FW, Angele MK. Is the gender specific immune response after trauma and hemorrhagic shock mediated by the different expression of LPS-receptors? Abstract band des 1st Joint Meeting SIS and SISE

10. **Eisenmenger S**, T. Seher, S. Nitsch, R. Hatz, M. Wichmann, E. Faist, F.W. Schildberg, M.K. Angele.Testosterone is not responsible for increased proinflammatory cytokine expression in the liver following trauma-hemorrhage. Shock 2002, Sup:35

D) Vorträge

1. Vortrag in Gossau: 21. Seminar der Österreichischen Gesellschaft für Chirurgische Forschung: 11/1997
2. Wissenschaftliches Kolloquium am Institut für Chirurgische Forschung 1/1998
3. Postervortrag in Paris: 20th European Conference on Microcirculation 9/1998
4. Vortrag in Tübingen: Deutsche Gesellschaft für Mikrozirkulation: 9/1998
5. Postervortrag in Grosshadern: Research Festival 1998: 10/1998
6. Wissenschaftliches Kolloquium am Institut für Chirurgische Forschung: 1/1999
7. Vortrag in München: Bayerischer Chirurgenkongress: 7/1999
8. Wissenschaftliches Kolloquium; MGH Pathologie; Boston: 10/1999
9. Wissenschaftliches Kolloquium; MGH Pathologie; Boston: 10/2000
10. Vortrag in Madrid, 1st Joint Meeting SIS and SISE, 05/2002
11. Vortrag im chirurgischem Forum, 119. Kongress der Dt. Gesellschaft für Chirurgie, Berlin, 5/2002
12. Postervortrag in Montana USA, Shock Meeting, 06/2002