

Aus der Medizinischen Klinik I im Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität

München

Direktor: Prof. Dr.med. G. Steinbeck

**DIE FIBRINOGENABHÄNGIGE INTERAKTION VON
POLYMORPHKERNIGEN GRANULOZYTEN UND THROMBOZYTEN
UND IHRE BEDEUTUNG IM REPERFUNDIERTEN HERZEN**

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

vorgelegt von
Peter Daniel Hanusch
aus
Wasserburg/Inn (Deutschland)

2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. P. Boekstegers

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. A. J. Reininger
Prof. Dr. E. Hiller

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. C. Kupatt

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 4.3.2004

1. EINLEITUNG	5
1.1. INTERAKTION POLYMORPHKERNIGER GRANULOZYTEN MIT DEM ENDOTHEL	6
1.2. THROMBOZYTEN UND IHR BEITRAG ZUM REPERFUSIONSSCHADEN	10
1.2.1. THROMBOZYTENAGGREGATION UND PMN-THROMBOZYTEN KOAGGREGATBILDUNG	11
1.2.2. PMN-THROMBOZYTEN-ENDOTHEL-INTERAKTION	13
1.3. ZIEL DER STUDIE	16
2. MATERIAL UND METHODEN	18
2.1. MATERIAL	18
2.2. METHODEN	18
2.2.1. HERZISOLIERUNG UND PRÄPARATION	18
2.2.2. PRÄPARATION VON HUMANEN POLYMORPHKERNIGEN GRANULOZYTEN (PMN) UND THROMBOZYTEN	19
2.2.3 PRINZIP DER PERFUSIONSANLAGE	22
2.2.4. VERSUCHSPROTOKOLL	24
2.2.4.1. Messung der externen Herzarbeit	24
2.2.4.2. Flusszytometrie	24
2.2.4.3. Fluoreszenzmikroskopie	25
2.2.5. STATISTISCHE AUSWERTUNG	28
3. ERGEBNISSE	29
3.1. FIBRINOGEN REZEPTOR EXPRESSION AUF THROMBOZYTEN UND POLYMORPHKERNIGEN GRANULOZYTEN	29
3.2. POSTISCHÄMISCHE INTERAKTION VON THROMBOZYTEN UND PMN IM KORONAREN EFFLUAT	33
3.3. RETENTION VON PMN-THROMBOZYTEN AGGREGATEN IM REPERFUNDIERTEN HERZ	36
3.4. MYOKARDIALE FUNKTION	40

<u>4. DISKUSSION</u>	<u>42</u>
4.1. INTERAKTION VON THROMBOZYTEN UND GRANULOZYTEN IM REPERFUNDIERTEN	
HERZEN	42
4.2. INTERAKTION VON C7E3FAB MIT MAC-1	44
4.3. THROMBOZYTEN-LEUKOZYTEN INTERAKTION UND IHRE RELEVANZ IM RAHMEN	
PERKUTANER TRANSLUMINALER KORONARANGIOPLASTIE	46
<u>5. ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>49</u>
<u>6. LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>51</u>
<u>7. DANKSAGUNG</u>	<u>64</u>
<u>8. CURRICULUM VITAE</u>	<u>65</u>

1. Einleitung

Durch Koronararterienverschluss beim Herzinfarkt kommt es aufgrund verminderter beziehungsweise fehlender Durchblutung zu einer ischämischen Schädigung des Myokards. Die rechtzeitige Reperfusion des verschlossenen Gefäßes ist eine der wichtigsten therapeutischen Maßnahmen, um ausgedehnte Nekrosen des Herzmuskels zu vermeiden (Jennings et al. 1995). Randomisierte Studien haben gezeigt, dass die direkte perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) den etablierten Thrombolyseprotokollen überlegen ist (Grines et al. 1993; Zijlstra et al. 1993). Zusätzliche Vorteile erbringt die Einlage von Stents in die dilatierte Koronararterie (Suryapranata et al., 1998). Obwohl die Wiederherstellung des Blutflusses heute zum therapeutischen Standard gehört, kann die Reperfusion selbst den ischämischen Zellschaden verstärken, ein Phänomen, das als „Reperfusionschaden“ bezeichnet wird. Hierbei treten beispielsweise Arrhythmien, ein vorübergehender Funktionsverlust des Myokards (myocardial stunning) (Braunwald et al. 1982; Bolli et al. 1989) oder des Gefäßendothels (endothelial stunning) (Seccombe et al. 1995) auf. Darüberhinaus sind Mikrozirkulationsstörungen und – in tierexperimentellen Studien (Gerber et al. 2000) – eine Vergrößerung des Infarktareals beschrieben worden (Maes et al. 1995).

In Rahmen der Pathophysiologie des Reperfusionschadens spielen myozytäre und vaskuläre Vorgänge eine wichtige Rolle. Auf Ebene der Myozyten führt die in der Reperfusion ansteigende Kalzium Konzentration zu Hyperkontrakturen der Herzmuskelzellen und zum Verlust von Myokard. Bei nicht hyperkontraktilen Zellen bewirkt der Ca^{2+} -Anstieg einen Anstieg der diastolischen Ruhespannung mit einem verringerten Relaxationsvermögen und somit einen gesteigerten Energiebedarf der Kardiomyozyten (Opie 1991; Piper et al. 1996). Auf vaskulärer Ebene ist die Aktivierung des Komplementsystems von Bedeutung. Die Bildung von Anaphylatoxinen (C3a, C4a, C5a) führt zur Ausschüttung von Histamin aus Mastzellen, welches eine Steigerung der Gefäßpermeabilität zur Folge hat. Zusätzlich bildet das Komplementsystem Poren in der Zellmembran aus (C5b-C9 Komplex, „Membranangriffskomplexes“), welche eine unbeschränkte Wasser- und Elektrolytbewegung zwischen Intra- u. Extrazellulärraum ermöglichen. Die

Unfähigkeit, das intrazelluläre Volumen und den Elektrolythaushalt zu regulieren, führt zur Lyse der Zelle und somit zum Zelltod.

Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, wie zum Beispiel Superoxidanion (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hydroxylradikal (OH^-) und Hypochloridanion (ClO^-), ist ein sowohl im myozytären als auch im vaskulären Kompartiment relevanter pathophysiologischer Prozeß in der Reperfusion. Zweier et al. (2000) ermittelte vor allem die PMN als Quelle von reaktiven Sauerstoffspezies. Ein früher Hinweis für die Beteiligung von Sauerstoffradikalen am myokardialen Reperfusionsbeschaden geht aus der Arbeit von Jolly et al. (1984) hervor, in welcher in Ischämie/Reperfusionsversuchen am Hundeherzen *in vivo* gezeigt wurde, dass durch die Gabe von Radikalfängern (Superoxiddismutase und Katalase) die Infarktausdehnung verringert wird.

Reaktive Sauerstoffmetabolite greifen zelluläre Enzymkomplexe an und schädigen die Zellmembran von Endothel und Myozyten (McCord, 1985) und sind mitverantwortlich für die verstärkte postischämische Adhäsion von polymorphkernigen Granulozyten. Sauerstoffradikale fördern direkt die reversible Anheftung der PMN an das Endothel („Rolling“) durch erhöhte Bereitstellung von P-Selektin aus intrazellulären Speichern (Weibel-Palade-bodies) (Geng et al. 1990). Zum anderen verstärken sie die Ausbildung einer festen Adhäsion der PMN an das Endothel („Sticking“) durch Erhöhung der Bindungsaffinität von ICAM-1 (Sellak et al. 1994) und induzieren zusätzlich die Bildung anderer Entzündungsmediatoren, wie z.B. Plättchen aktivierender Faktor (PAF) durch Endothelzellen, wodurch die Granulozytenadhäsion weiter verstärkt wird.

1.1. Interaktion polymorphkerniger Granulozyten mit dem Endothel

Mit der Reperfusion des ischämischen Myokards ist eine Entzündungsreaktion verbunden, die durch Produktion von Entzündungsmediatoren gekennzeichnet ist. Zu nennen sind dabei Produkte der Komplementaktivierung (C3a, C5a), Fibrinogen, Fibrinopeptid B, Plasminogen Aktivator, Kallikrein, Plättchen aktivierender Faktor (PAF) und Leukotrien B₄. Sie verstärken die Entzündungsantwort auf die ischämische Gewebeschädigung, indem sie Granulozyten in die reperfundierte Region locken und diese aktivieren. Insbesondere das Leukotrien B₄ ist stark

chemotaktisch wirksam und stimuliert die Produktion von Superoxidanionen in Neutrophilen, steigert die Anheftung von Granulozyten an die Gefäßwand und hat ähnlich wie C5_a die Fähigkeit die Gefäßreaktivität und die Kapillarpermeabilität zu verändern (Lucchesi 1994).

Es hat sich gezeigt, dass die regionale Anhäufung von Entzündungszellen zur Ausdehnung des Gewebeschadens nach Ischämie/Reperfusion beiträgt (Romson et al. 1982; Jolly et al. 1986; Stocks et al. 1974; Dormandy 1978). Dies ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass neutrophile Granulozyten aktiviert werden und diese reaktive Sauerstoffspezies und proteolytische Enzyme freisetzen.

Zwei unterschiedliche Mechanismen sind für die Retention von Leukozyten im koronaren Gefäßbett von Bedeutung: Zum einen das kapilläre "Plugging" (Kloner et al., 1974), welches vermutlich durch ein das Kapillarlumen einengendes endotheliales oder perivaskuläres Ödem (Fishbein et al. 1978) und durch das darauffolgende Einlagern von aktivierten Leukozyten entsteht, zum anderen die Adhäsion polymorphkerniger Granulozyten (PMN) an postkapilläre Venolen, vermittelt durch spezifische Zelloberflächenmoleküle (Engler et al. 1983).

Durch die Aktivierung von Neutrophilen kann es zur Veränderung der Zell-elastizität und zur Bildung von Zellaggregaten kommen, wodurch der kapilläre Blutfluss beinträchtigt werden kann (capillary plugging) (Schmid-Schoenbein et al. 1975) und die Ausdehnung des ischämischen Schadens größer wird (Engler et al. 1986). Die Akkumulation polymorphkerniger Granulozyten in den Gefäßen wird für das "low reflow" oder "no-reflow"-Phänomen nach kurzen ischämischen Perioden mit anschließender Reperfusion verantwortlich gemacht (Mazzoni et al. 1989; Harris et al. 1993; Barroso-Aranda et al. 1989; Carlos et Harlan 1994).

Die postischämische PMN-Adhäsion, die zu Beginn der Reperfusion bevorzugt an postkapillären Venolen stattfindet (Kupatt et al. 1997), wird selektiv durch Adhäsionsmoleküle vermittelt. Zu nennen sind hier die Selektine (P-Selektin, L-Selektin u. E-Selektin), die Integrine (z.B. β_2 -Integrine) und die Vertreter der Immunglobulin Superfamilie (ICAM-1, ICAM-2).

P-Selektin (CD62P) findet sich sowohl in Thrombozyten als auch in Endothelzellen. In beiden Zelltypen wird es nach Synthese in zytoplasmatischen Granula gespeichert und bei Aktivierung (zum Beispiel durch Thrombin, Histamin, PAF) schnell auf der Zelloberfläche exprimiert. P-Selektin bindet an Sialyl Lewis^x (Sle^x), einer Kohlenhydratstruktur, die unter anderem auf P-Selektin-Glycoprotein

Ligand-1 (PSGL-1) und auf L-Selektin (CD62L) vorkommt. Die Beteiligung von P-Selektin am "Rollen" und Adhäsion der Leukozyten wurde erstmals unter Bedingungen höherer Scherkräfte in vitro gezeigt (Lawrence et al. 1991). Damit übereinstimmend beobachtete man unter Gabe eines blockierenden anti-P-Selektin-Antikörper eine Verringerung des "Rollens" in vivo (Bienvenu et al. 1993). Interessant ist die Beobachtung, dass das spontane "Rollen" der Leukozyten in Mesenterialvenen von P-Selektin defizienten Mäusen praktisch völlig ausbleibt (Mayadas et al. 1993). Andere Modelle wiederum zeigen, daß auch bei Fehlen von P-Selektin noch „rolling“ auftritt. Diese Beobachtungen weisen auf die Bedeutung der anderen Selektin-Moleküle hin.

Auch L-Selektin ist am Prozess des "Rollens" beteiligt. Es findet sich konstitutionell auf nichtaktivierten Leukozyten und wurde ursprünglich in der Maus charakterisiert, als der "Homing"-Rezeptor, der die Bindung von Lymphozyten an HEV (high endothelial venules) im peripheren Lymphknoten ermöglicht (Gallatin et al. 1983). L-Selektin bindet aber auch an bisher noch nicht näher identifizierte Gegenstrukturen auf nichtlymphatischen Endothel, die von Zytokinen induziert werden. Man geht davon aus, dass L-Selektin ebenfalls das Tetrasaccharid sialyl Lewis^X erkennt und damit interagiert (Lefer 1995). Es gibt zahlreiche Hinweise dafür, dass L-Selektin mit der Aktivierung der Leukozyten durch proteolytische Spaltung nahe der Membraninsertion "abgeworfen" wird (Kishimoto et al. 1989; Jutila et al. 1989; Griffin et al. 1990; Jung et al. 1990). Zudem konnte man lösliches, zirkulierendes L-Selektin im Plasma gesunder Probanden in einer Konzentration nachweisen, in der das lösliche L-Selektin zum Teil in der Lage war, die Leukozytenadhäsion an von Zytokinen stimuliertes Endothel zu verhindern (Schleiffenbaum et al. 1992). Interessanterweise inhibierte die Gabe von monoklonalen Antikörpern (von Andrian et al. 1991; Ley et al. 1993) oder polyklonale Seren (Ley et al. 1991) gegen L-Selektin, ebenso wie ein rekombinantes Ig-Chimär von L-Selektin (Watson et al. 1991), in signifikanter Weise das "Rollen" der Leukozyten in vivo.

E-Selektin ist im ruhenden Endothel nicht vorhanden und wird erst als Antwort auf bestimmte Stimuli, wie zum Beispiel Ischämie und Reperfusion, neu synthetisiert, und ist dann relevant für die verzögerte und prolongierte Leukozyten-Adhäsion (Shen et al. 1994).

Integrine sind transmembrane Oberflächenproteine auf Leukozyten, die mit zytoskeletalen Proteinen verbunden sind und extrazelluläre Signale übertragen. Die β_2 -Integrine bestehen jeweils aus einer gemeinsamen β -Untereinheit (CD18) und einer von drei bekannten alpha-Untereinheiten, bezeichnet als CD11a (LFA-1), CD11b (MAC-1) und CD11c (p150,95)(48-50). LFA-1 ist auf allen Leukozyten präsent und ist via ICAM-1 und ICAM-2 (Intercellular adhesion molecule-1 bzw. 2; siehe unten) in die Leukozytenadhäsion an Endothelzellen involviert (Dustin et Springer 1988). MAC-1 kommt vorrangig auf Granulozyten und Monozyten vor und vermittelt dort vor allem zelladhäsionsabhängige Funktionen, wie z.B. Adhärenz, Aggregation, Chemotaxis, Zytotoxizität und zelluläre Interaktion mit iC3b. Auf zirkulierenden Leukozyten befindet sich MAC-1 physiologischerweise in einem inaktiven Status respektive in einem Status niedriger Avidität, in dem es nicht oder nur in geringem Ausmaß an seine endothelialen Liganden bindet. Durch aktivierende Stimuli kommt es sowohl zur raschen Verlagerung von CD11b/CD18 aus intrazellulären Granula auf die Zelloberfläche (Carlos et Harlan 1990), als auch zu einer qualitativen Veränderung der Rezeptorfunktion durch rasche Steigerung der Avidität.

Das im Rahmen der Komplementaktivierung entstehende iC3b dient in der frühen Phase der Entzündungsantwort als erster Ligand für MAC-1. Erst zu einem späteren Zeitpunkt interagiert CD11b/CD18 mit ICAM-1, da letzteres im Gegensatz zu MAC-1 und P-Selectin nicht in der Endothelzelle gespeichert wird, sondern konsekutiv exprimiert wird. Es hat sich gezeigt, dass die endotheliale Expression von ICAM-1 durch Hypoxie/ Reoxygenierung (Palluy et al. 1992) und durch Bildung von Sauerstoffradikalen (Lo et al. 1993; Kupatt et al. 1997) zusätzlich induziert werden kann.

Weiterhin geht man davon aus, daß auf der Endotheloberfläche exprimierter PAF die Adhäsion von Neutrophilen durch Aktivierung von β_2 -Integrinen verstärken kann (Lorant et al. 1991). Die Bindung von Zytokinen (zum Beispiel GM-CSF, IL-5), Chemokinen (zum Beispiel IL-8, MCP-1, MIP-1 β) und C5a an komplementäre Strukturen auf den Leukozyten kann durch Signaltransduktion zu einer Verstärkung der durch β -Integrine vermittelten Adhäsion führen. Die aktivierenden Substanzen können einerseits von lokalen Gewebszellen, bereits eingewanderten Leukozyten oder Mikroorganismen gebildet werden, aber interessanterweise auch vom Endothel selbst stammen: es wurde gezeigt, dass vom Endothel in die subendotheliale Matrix

abgegebenes oder oberflächengebundenes IL-8 die Adhäsion und Auswanderung von Neutrophilen unterstützt (Huber et al. 1991; Rot 1992; Zimmerman et al. 1990).

ICAM-1 ist ein Vertreter der Immunglobulin Superfamilie, kommt sowohl auf Leukozyten und Endothelzellen, als auch auf Fibroblasten und Epithelzellen vor. Sowohl an ICAM-1, als auch an MAC-1, bindet das Fibrinogen (Wright et al. 1988), das als Brückenmolekül zwischen den beiden Rezeptoren zur Leukozytenadhäsion beitragen kann (Languino et al. 1993).

Wie wichtig die Interaktion von β_2 -Integrinen und ICAM-1 für die Adhäsion und anschließende Migration der Leukozyten in entzündliches Gewebe ist, zeigen Versuche mit blockierenden monoklonalen CD18-Antikörpern, welche die Leukozytenakkumulation im Myokard reduzieren, die Infarktgrösse verringern und den Blutfluss im reperfundierte Herzen steigern (Lefer et al. 1993; Ma et al. 1991).

1.2. Thrombozyten und ihr Beitrag zum Reperfusions-schaden

Die Beteiligung von polymorphkernigen Granulozyten (PMN) am myokardialen Ischämie-Reperfusionschaden durch Ausschüttung von zytotoxischen und zellaktivierenden Substanzen, proteolytischen Enzymen und reaktiver Sauerstoffspezies ist bekannt. Aber auch Thrombozyten sind wichtige Blutbestandteile, die den Entzündungsprozess im Rahmen von Ischämie und Reperfusion verstärken können. Folgende pathophysiologischen Mechanismen werden zur Zeit diskutiert:

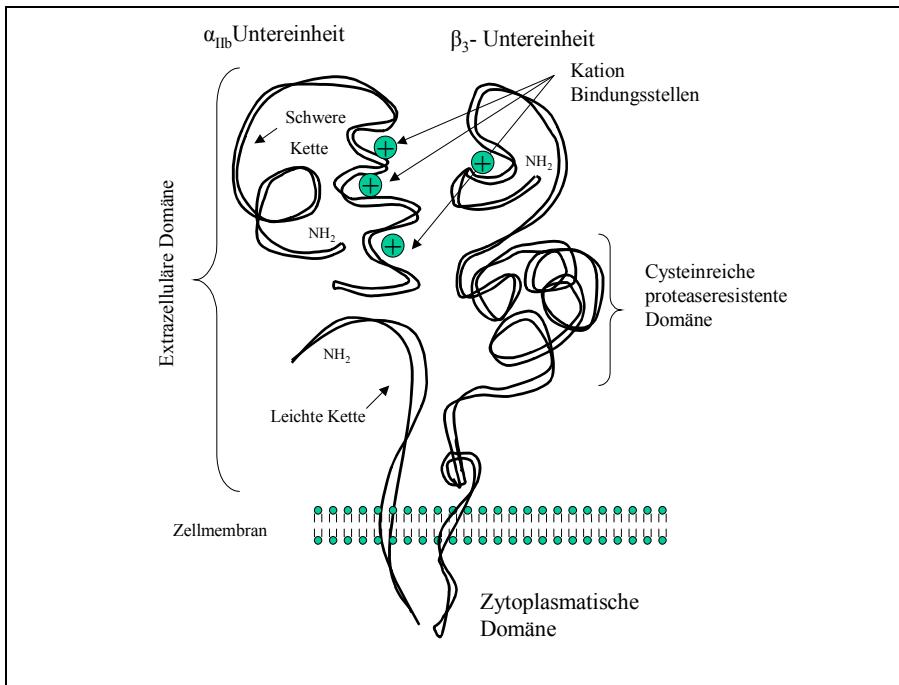
Zum einen ist die Ausbildung von Thrombozytenaggregaten und Thrombozyten-Granulozyten Koaggregaten von Bedeutung. Die periphere Embolisation solcher Aggregate kann zur Beeinträchtigung der Mikrozirkulation führen und damit den Reperfusionschaden verstärken. Zum anderen adhärieren Thrombozyten über bestimmte Oberflächenmoleküle am Endothel und können so durch Bildung eines Plättchenteppichs als Matrix für die Adhäsion von Granulozyten dienen und dadurch die PMN bedingte Entzündungsantwort gewährleisten (Weber et al. 1993). Sowohl im Rahmen der Koaggregatbildung, als auch im Rahmen der Interaktion von PMN mit endothelgebundenen Plättchen, tragen Thrombozyten auf humoralem Weg zum Ischämie/Reperfusionschaden bei. Sie sind die Quelle einer Vielzahl von Entzündungsmediatoren, wie z.B. Thromboxane A₂ (Hamberg et al. 1975), P-Selektin (McEver 1991) oder PF4 (Aziz et al. 1997), welche selbst wiederum entweder das

Komplementsystem oder zahlreiche Zytokine aktivieren. Durch die physikalische Interaktion mit den Granulozyten auf Membranebene werden optimale Voraussetzungen für den Austausch löslicher Entzündungsmediatoren (Evangelista et al. 1993) und Intermediärmetabolite (Maugeri et al. 1994) geschaffen, die eine gegenseitige Zellaktivierung begünstigen und damit den Entzündungsprozess nach Ischämie/Reperfusion verstärken können.

1.2.1. Thrombozytenaggregation und PMN-Thrombozyten Koaggregatbildung

Eine adäquate Reperfusion nach akutem Myokardinfarkt ist nicht nur abhängig von der Durchgängigkeit der infarktassoziierten Arterie, sondern auch von der Integrität der distalen Mikrozirkulation. So können Plättchenaggregate, die im Bereich des behandelten Plaque entstanden sind, durch Embolisierung nach distal, in Kombination mit der Ausschüttung von vasokonstriktiv wirkenden Plättchenmediatoren (Golino et al. 1989), das Ergebnis der Reperfusion verschlechtern. Zudem fanden Neumann et al. (1995) in Blutproben von Patienten mit ischämischen kardialen Ereignissen, wie z.B. akuter Myokardinfarkt oder instabile Angina pectoris, eine erhöhte Adhäsion von Leukozyten und Thrombozyten (Neumann et al. 1997; Ott et al. 1996). Mickelson et al. (1999) konnten bei Patienten nach PTCA eine gesteigerte CD11b Expression auf Leukozyten und ebenfalls eine gesteigerte Plättchenadhäsion auf Leukozyten nachweisen. Interessanterweise war das Ausmaß der Leukozytenaktivierung und der Leukozyten-Thrombozyten Koaggregatbildung höher bei Patienten, die späte klinische Komplikationen erlitten. Dies unterstreicht die klinische Relevanz der Leukozyten-Thrombozyten Interaktion.

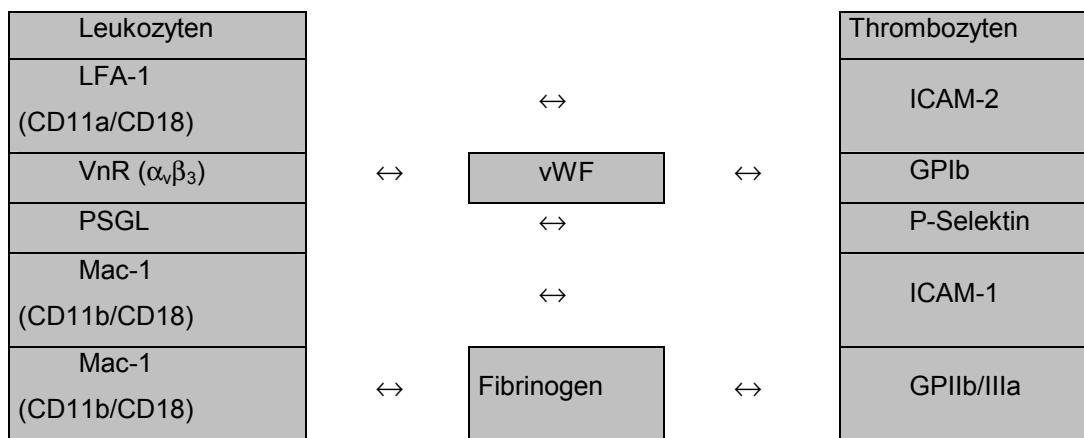
Die entscheidende Rolle bei der Ausbildung von Plättchenaggregaten spielt das Glykoprotein IIb/IIIa auf der Oberfläche von Thrombozyten. Wie jedes Integrin besteht GPIIb/IIIa aus zwei nicht kovalent verbundenen α (α_{IIb}) und β (β_3) Untereinheiten, wobei jede Untereinheit aus einer großen extrazellulären Domäne, einer einzelnen transmembranösen Region und einem kurzen zytoplasmatischen Teil besteht. Die α_{IIb} Untereinheit ist das Produkt eines einzelnen Gens und unterliegt intrazellulär der Proteolyse in eine schwere Kette (105 kDa) und eine leichte Kette (25 kDa) (Bennett 1996). GPIIb/IIIa besitzt zahlreiche Bindungsstellen für divalente Kationen (z.B. Ca^{2+}). Diese werden für die Bindung adhäsiver Liganden und anderer Integrine benötigt (siehe Abbildung 1).

**Abbildung 1**

Schematische Darstellung des Aufbaus von GPIIb/IIIa auf Thrombozyten.

Auf jedem zirkulierenden, nicht aktivierten Thrombozyten befinden sich circa 50.000 – 80.000 GPIIb/IIIa Komplexe, welche zu 80% willkürlich auf der Oberfläche verteilt und zu einem kleineren Teil intrazellulär in α -Granula gespeichert sind (Phillips et al. 1988). Stimuliert man Thrombozyten mit physiologischen Agonisten, erfährt der GPIIb/IIIa Rezeptor eine Konformationsänderung, die es ihm ermöglicht Fibrinogen zu binden. Auch andere adhäsive Proteine, wie zum Beispiel vWF, Fibronektin und Vitronekton, können an aktiviertes GPIIb/IIIa binden. Diese Interaktion wird durch eine Arg-Gly-Asp Sequenz (RGD) dieser Liganden vermittelt. Obwohl auch Fibrinogen RGD-Sequenzen enthält, wird die Bindung an GPIIb/IIIa hier hauptsächlich über eine Aminosäuresequenz am Carboxy-Terminus der γ -Kette vermittelt (Ginsberg et al. 1988). Das gebundene Fibrinogen vernetzt die einzelnen Thrombozyten untereinander und führt zur Aggregation und Thrombusbildung.

Auch in der Ausbildung von PMN-Thrombozyten Koaggregaten spielt das GPIIb/IIIa eine wichtige Rolle. Zunächst kommt es zu einer reversiblen, P-Selektin vermittelten Anheftung von Thrombozyten an PMN (Evangelista et al. 1996), anschließend erfolgt die Ausbildung eines festen Aggregats, indem Fibrinogen als Brückenmolekül sowohl an GPIIb/IIIa auf Thrombozyten, als auch an Mac-1 auf PMN bindet. Eine Übersicht über die wichtigsten Adhäsionsmoleküle im Rahmen der Thrombozyten-Leukozyten Interaktion gibt Tabelle 1.

**Tabelle 1**

Darstellung der wichtigsten Oberflächenrezeptoren für die Interaktion von Leukozyten und Thrombozyten.

GPIIb/IIIa ist das Ziel pharmakotherapeutischer Intervention zur Vermeidung von Restenosen und akuten ischämischen Ereignissen nach PTCA. Der erste Antagonist, der für klinische Untersuchungen entwickelt wurde, war der monoklonale Antikörper m7E3 gegen GPIIb/IIIa der Maus. Coller und Mitarbeiter (Coller et al. 1983) zeigten, dass m7E3 durch Inhibition der Fibrinogenbindung an GPIIb/IIIa die Aggregation von Thrombozyten verhinderte. Um die Immunogenität zu verringern, wurde Abciximab (c7E3 Fab, Reopro) entwickelt, ein Fab-Chimär, zusammengesetzt aus dem von der Maus stammenden variablen Teil von m7E3 und der konstanten Region von menschlichen IgG Fab. Aufgrund zahlreicher klinischer Studien (EPIC, EPILOG, 1994) gehört die Anwendung von GPIIb/IIIa Antagonisten heute zur Standardtherapie des akuten Koronarsyndroms.

1.2.2. PMN-Thrombozyten-Endothel-Interaktion

Die Interaktion von Thrombozyten mit dem Endothel ist Gegenstand intensiver Forschung im Rahmen der Pathogenese von Restenosen nach PTCA (Percutane transluminale Coronarangioplastie). Die Ballondillatation unterbricht die Kontinuität des Endotheliums und legt subendotheliale Strukturen frei, welche schnell von zirkulierenden Thrombozyten erkannt werden. Tabelle 2 gibt eine Auflistung der Rezeptoren und Liganden, die an der Thrombozytenadhäsion beteiligt sind.

Rezeptoren	Liganden	Funktion
GP Ib/IX	vWF, Thrombin, PSelektin	Adhäsion
Integrine:		
GPIa/IIa ($\alpha_2\beta_1$)	Kollagen	Adhäsion
GPIc/IIa ($\alpha_5\beta_1$)	Fibrinogen	Adhäsion
GPIc'/IIa ($\alpha_6\beta_1$)	Laminin	Adhäsion
VnR ($\alpha_v\beta_3$)	Vitronectin, Fibrinogen, vWF	?

VnR = Vitronectin Rezeptor; vWF = von Willebrand Faktor

Tabelle 2

Rezeptoren und Liganden im Rahmen der Thrombozytenadhäsion und Aggregation.

Der GPIb/IX-Komplex befindet sich in der Thrombozytenmembran und vermittelt, vor allem bei hohen Scherraten, die Anheftung von nicht-stimulierten Plättchen an den von-Willebrand-Faktor, der sich im Subendothelium geschädigter Gefäße befindet. Diese Anheftung führt zur Aktivierung und Ausschüttung intrazellulärer Granula, aber auch zur Thrombozytenaggregation (Chow et al. 1983).

Obwohl die Anheftung der Plättchen an das Subendothelium vorwiegend auf die GPIb-vWF Interaktion beruht, sind auch Rezeptoren der Integrinfamilie von Bedeutung. Alle Integrine sind Heterodimere bestehend aus einer alpha und einer beta Untereinheit. Plättchen besitzen fünf verschiedene Integrintypen, zwei davon gehören zur β_3 Subfamilie ($\alpha_2\beta_3$, $\alpha_v\beta_3$) und drei zur β_1 -Subfamilie ($\alpha_2\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$). Der $\alpha_2\beta_1$ -Rezeptor (GP Ia/IIa) ist ein universeller Rezeptor für Kollagen Typ I, welches ein Makromolekül des Subendotheliums von höchster thrombogenen Potenz ist, das nicht nur als wirkungsvolles Substrat für die Plättchenadhäsion dient, sondern auch eine wichtige Rolle in der Thrombozytenaggregation spielt. Der GP Ic/IIa Komplex vermittelt die Plättchenadhäsion an Fibronektin, der GPIc'/IIa Komplex die Adhäsion an Laminin.

Der Vitronectin Rezeptor $\alpha_v\beta_3$ kommt sowohl auf Thrombozyten (hier allerdings nur in einer geringen Anzahl von weniger als 50 Molekülen pro Plättchenoberfläche), als auch auf Endothelzellen, Monozyten, glatten Muskelzellen, Osteoklasten und Tumorzellen vor und bindet an verschiedene Proteine der extrazellulären Matrix, wie zum Beispiel Vitronectin, Fibronektin, Thrombospondin, Laminin und Kollagen Typ I und IV. Der Rezeptor vermittelt die Migration und Proliferation glatter Muskelzellen

und die Thrombinbildung aus Thrombozyten. Weiterhin vermutet man, dass sowohl Endothelzellen (via $\alpha_v\beta_3$ oder ICAM-1), als auch Thrombozyten (via $\alpha_{IIb}\beta_3$) das selbe Fibrinogenmolekül binden und somit zur Plättchenadhäsion beitragen können.

Vergleichbar mit der Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten bei der Koaggregatbildung verläuft die Anheftung von PMN an oberflächengebundenen Plättchen. Weber et al. zeigten in Flusskammerversuchen mit an Glasplättchen adhärenten Thrombozyten zunächst ein P-Selektin abhängiges Anheften („Rollen“) der PMN, nach Aktivierung von Tyrosinkinasen, welche die Avidität von MAC-1 stimulieren, eine Integrin abhängige feste Adhäsion („Sticking“). Es wird vermutet, dass MAC-1 via Fibrinogen an das GPIIb/IIIa von Thrombozyten bindet. Eine vorstellbare Rezeptor-Interaktion in vivo zeigt Abbildung 2.

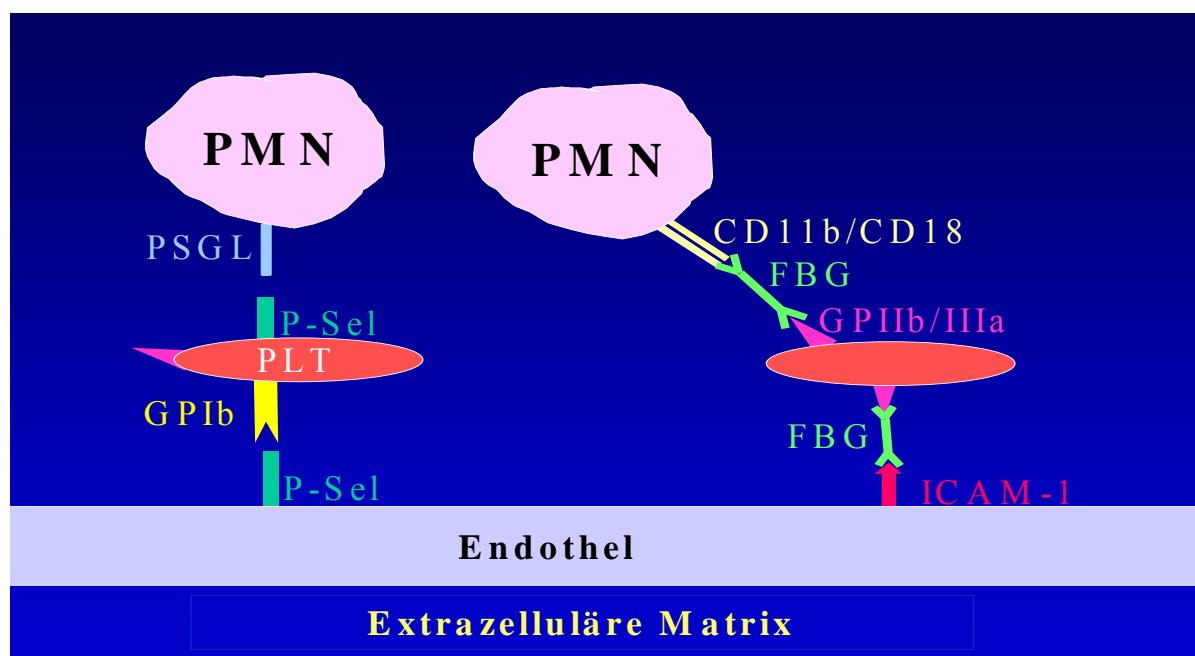


Abbildung 2

Darstellung der verschiedenen Interaktionsmöglichkeiten zwischen PMN, Thrombozyten und dem Endothel auf der Grundlage der bisher bekannten molekularen Mechanismen.

1.3. Ziel der Studie

Auf der Grundlage der Kenntnisse über die Rolle der polymorpdkernigen Granulozyten im Rahmen des Ischämie-Reperfusionsschadens, ergeben sich mehr und mehr Hinweise über mögliche synergistische Effekte von Leukozyten und Thrombozyten. Ob dabei der Endothel-Thrombozyten-PMN Interaktion, oder der Koaggregatbildung mehr Bedeutung beizumessen ist, ist bisher noch unklar. Lefer et al. zeigten an einem homologen Rattenmodell, welches die Interaktion von Thrombozyten, Leukozyten und Endothel erlaubt, eine P-Selektin abhängige kardiale Dysfunktion nach Ischämie und Reperfusion (Lefer et al. 1998). Ungeachtet der Vorgänge am Endothel, wurde in Blutproben von Patienten mit akutem Myokardinfarkt nach PTCA eine erhöhte Thrombozyten-Leukozyten Interaktion und eine gesteigerte Aktivierung der Plättchen tragenden Leukozyten gefunden (Neumann et al. 1999). Die Gabe des GPIIb/IIIa Antagonisten Abciximab konnte diesem Effekt entgegenwirken und verbesserte zusätzlich die mikrovaskuläre Perfusion und die Erholung der kontraktilen Myokardfunktion (Neumann et al. 1998).

Im Hinblick auf zuletzt genannte Ergebnisse, war es Ziel der vorliegenden Studie, die Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten im ischämischen Herzen von Meerschweinchen näher zu untersuchen. Dabei wurde mit Hilfe von Intravitalmikroskopie und FACS analysiert, ob Abciximab und LPM 19c, ein monoklonaler Antikörper gegen die Fibrinogenbindungsstelle von MAC-1, die Bildung von PMN-Thrombozyten Koaggregaten in den epikardialen Gefäßen beziehungsweise im koronaren Effluat reduziert. Weiterhin wurde der Einfluss der Fibrinogenrezeptorblockade auf die myokardiale Funktion, sowohl vor, als auch nach einer Ischämiezeit von 15 Minuten untersucht. Dafür wurden folgende Hypothesen überprüft:

- Durch Fibrinogen als Brückenmolekül zwischen GPIIb/IIIa und MAC-1 kommt es im reperfundierte Herzen zu einer gesteigerten Interaktion von Granulozyten (PMN) und Thrombozyten und zur Ausbildung von Koaggregaten.
- Die Ausbildung von PMN-Thrombozyten Koaggregaten trägt zum Reperfusionsschaden bei.

- Der GPIIb/IIIa Rezeptor Antagonist Abciximab (c7E3Fab) inhibiert die PMN-Thrombozyten Interaktion und vermindert dadurch den myokardialen Reperfusionsschaden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

Der magnetische CD15 Antikörper wurde von Miltenyi Biotech, der FITC markierte CD41 Antikörper (MCA 467), der phycoerythrin (PE)-markierte CD11b Antikörper (MCA 551) und die FITC und PE Isotypkontrollen (MCA 928F bzw. MCA 928PE) wurden von Serotec erworben. Der blockierende CD11b Antikörper LPM19c und der FITC-markierte Fibrinogen Antikörper F0111 stammen von Dako, c7E3Fab von Lilly, das Kalzium freie PBS (phosphat buffered saline) und die Tyrode Lösung von ccpro, und das humane Fibrinogen, sowie das Rhodamin 6G, 2'7'-bis-(carboxyethyl)-5-(6)-Carboyfluorescein Triacetoxymethyl Ester (BCECF-AM) und der F(ab)₂ Kontrollantikörper von Sigma.

2.2. Methoden

2.2.1. Herzisolierung und Präparation

Bis zu den jeweiligen Versuchen wurden die Meerschweinchen entsprechend der Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes (BGB vom 18.01.1986, Teil I) mit freiem Zugang zu Wasser und Trockenfutter unter konstanten Bedingungen bei 24°C, 50% Luftfeuchtigkeit und einem 12stündigen Tag-/Nachtrhythmus gehalten. Die Behandlung der Tiere sowie sämtliche experimentelle Prozeduren stehen im Einklang mit dem „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“.

Zu Beginn der Präpartion wurden die Meerschweinchen (männlich, 250-350 g) anästhesiert (20 mg Ketanest) und dekapiert. Nach Fixierung an einen Präparationstisch und Mobilisierung des Fells über Abdomen und Thorax, wurde die Brusthöhle am Xyphoid eröffnet, das Sternum längs durchtrennt und durch laterale, möglichst ansatznahe Schnittführung die Rippen sowie der übrige knöcherne Thorax entfernt. Unter ständiger Kühlung des Herzens mit 0.9% NaCl-Lösung erfolgte die möglichst rasche und vollständige hilusnahe Pulmektomie, um embolische Verschlüsse der Herzkratzgefäß durch Thromben aus der Lungenstrombahn zu

vermeiden. Mit zwei feinen Pinzetten wurde das Perikard abgezogen und die Aorta aus dem umliegenden zum Teil aus Thymus bestehenden Gewebe mobilisiert. Mit einer feinen Gefäßschere wurde die Aorta aszendens inzidiert, die Kanüle mit einer vorsichtigen Drehbewegung eingeführt und mit einem zuvor eingezogenen Faden an einer distal liegenden Nut fixiert. Über diese Kanüle wurde das Herz nun retrograd mit modifiziertem Krebs-Henseleit Puffer, begast mit 94,5% O₂ und 5,5% CO₂ bei 37°C und pH 7.40, perfundiert. Zur endgültigen Isolierung löste man das Herz mit einer feinen Schere aus seiner mediastinalen Verankerung entlang des linken Vorhofs, ohne allerdings diesen zu perforieren, und durchtrennte im nötigen Abstand die V. cava superior, V. cava inferior und die A. pulmonalis.

Die weitere Präparation richtete sich nach dem gewünschten Versuchsprotokoll (Abbildung 4). Für Versuche, die ausschließlich die Langendorff Perfusion (Habazettl et al. 1996) benötigten (Intravitalmikroskopie), wurden die V. cava, V.azygos, sowie die Pulmonalvenen ligiert und die A. pulmonalis kanüliert (Langendorff Präparation). Das Perfusat gelangte retrograd über die Aorta ascendens bei geschlossener Aortenklappe in die Koronararterien und floß aus dem Sinus coronarius, über den rechten Vorhof, den rechten Ventrikel und die A. pulmonalis wieder ab. Der linke Vorhof und der linke Ventrikel blieben dabei weitgehend leer.

Für Versuche am arbeitenden Herzen wurde zusätzlich zur Langendorff-Präparation der Eingang der Pulmonalvenen in den linken Vorhof für eine Kanüle verwendet, die eine antegrade Perfusion ermöglichte.

2.2.2. Präparation von humanen polymorphkernigen Granulozyten (PMN) und Thrombozyten

Da sich c7E3Fab gegen das Glykoprotein IIb/IIIa auf aktivierten menschlichen Thrombozyten richtet (Coller 1985), wurden während dieser Studie humane PMN und Thrombozyten verwendet.

Aus dem venösen Blut gesunder humaner Spender wurden die Granulozyten mithilfe magnetisch markierter Antikörper isoliert. Im Speziellen wurden 20 ml Blut entnommen, auf zwei 15 ml Falcon Tubes aufgeteilt und 5 min bei 2.000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde das plättchenreiche Plasma mit Hilfe einer Plastikpipette abgehoben und weiterverarbeitet (siehe unten). Die dem restlichen Zentrifugat aufgelagerte Trennschicht („Buffy Coat“), bestehend aus Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten, wurde mit 25 µl CD 15 Microbeat Antikörper (Miltenyi

Biotech) 40 Minuten inkubiert. Ließ man danach den Buffy Coat über eine in einem Magneten befindlichen speziellen Miltenyi-Säule tropfen, blieben selektiv die magnetisch markierten polymorphkernigen Granulozyten in der Säule zurück. Die PMN konnten nach Herausnehmen der Säule aus dem Magnetfeld mit 1,5 ml PBS-Lösung eluiert werden. Diese PMN-Suspension wurde bei 2000 U/min zentrifugiert, das Pellet in 3 ml Tyrode (pH 7.40) gelöst und im Coulter Counter gezählt. So gewonnene Zellen wurden flusszytometrisch analysiert (FACScan, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) und zeigten sich zu 99% als PMN. Falls indiziert, wurden die Granulozyten mit c7E3Fab (16,6 µg/ml), LPM19c (10 µg/ml) oder mit dem Kontrollantikörper MCA928 (10 µg/ml) für 10 Minuten inkubiert.

Eine weitere, gleichwertige Möglichkeit zur Granulozytenisolierung ist die Dichte-Gradienten-Zentrifugationsmethode. Die dazu verwendete Perkoll-Lösung (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden; Dichte 1.082 g/ml) besteht aus mikroskopisch kleinen Kugelchen, die, im Gegensatz zu Lymphozyten und Monozyten, von Granulozyten phagozytiert werden können. Dieser Unterschied wird dazu genutzt, durch Zentrifugation die Granulozyten von Lymphozyten und Monozyten zu trennen.

Im einzelnen wurde der Buffy Coat (siehe oben) in 5 ml PBS gelöst und auf zwei Falcons mit je 4 ml Perkoll verteilt. Aufgrund der unterschiedlichen Dichte kam es bei vorsichtigem Überschichten zu keiner Vermischung der beiden Flüssigkeiten. Nach 30 minütiger Zentrifugation bei 2300 U/min erhielt man eine charakteristische Phasenauf trennung (siehe Abbildung 3). Die unterste Phase, bestehend aus Erythrozyten und PMN, wurde mit 9 ml destillierten Wasser lysiert und nach circa 1 Minute mit 3 ml 2,7% NaCl retonisiert. Nach erneuter Zentrifugation erhielt man ein erythrozytenfreies Pellet bestehend aus mindestens 95% polymorphkernigen Granulozyten.

Thrombozyten wurden aus dem plättchenreichen Plasma der obigen Blutproben gewonnen. Nach Zentrifugation bei 2000 U/min für 5 min wurde das gewonnene Thrombozyten Pellet in PBS aufgelöst und erneut zentrifugiert. Nach Wiederholung des Waschvorgangs wurden die gewonnenen Zellen im Coulter Counter gezählt. Für einen Versuch entnahm man davon 400×10^6 Thrombozyten inkubierte diese gegebenenfalls mit c7E3Fab (16.6 µg/ml) oder F2883 (16.6 µg/ml) für 10 Minuten.

Zur Analyse heterotyper Aggregate wurden PMN mit Rhodamine 6G und Thrombozyten mit BCECF-AM markiert. Diese Markierung erhöhte spezifisch die

Fluoreszenz der PMN (von 13 auf 265 fU mean fluorescence) und die Fluoreszenz der Thrombozyten (von 10 auf 1355 fU mean fluorescence), ohne dabei die Zellen zu aktivieren.

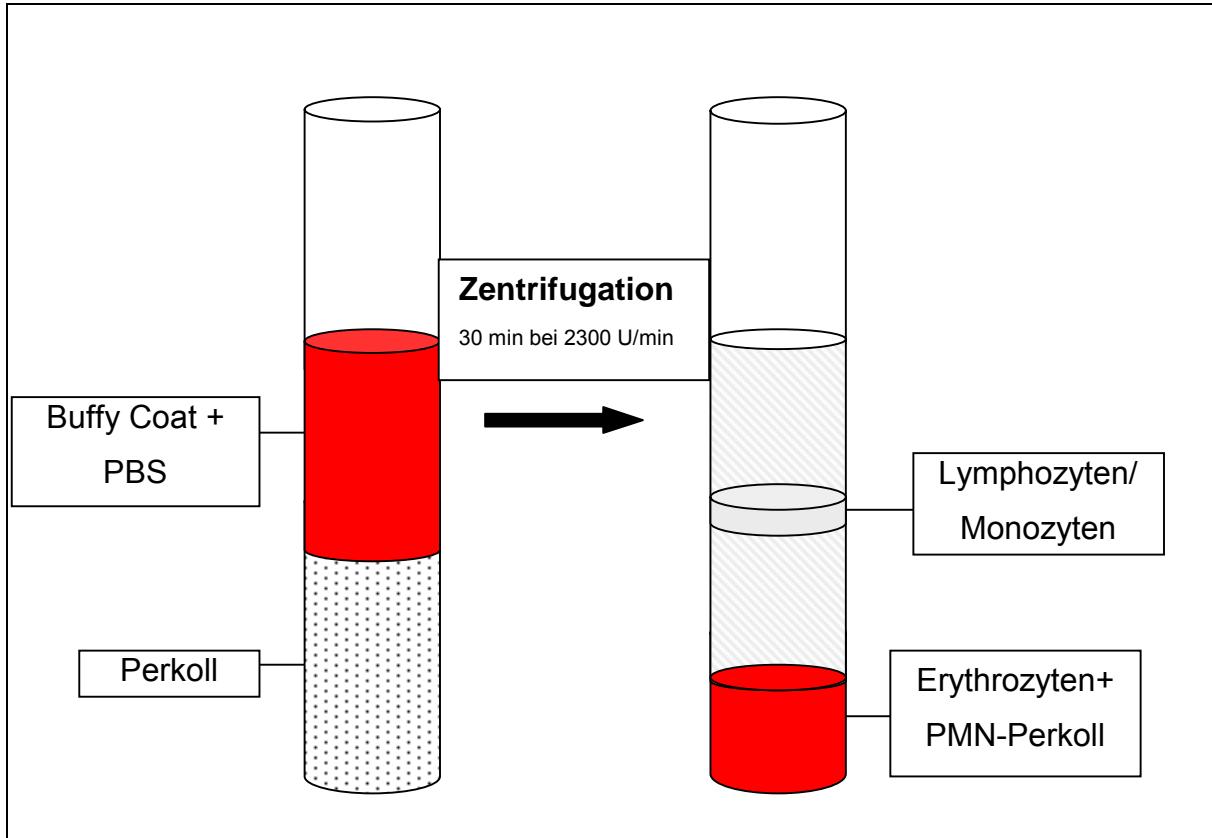


Abbildung 3

Granulozytenisolierung nach der Dichte-Gradienten-Zentrifugationsmethode. Linkes Bild: Perkoll-Lösung überschichtet mit in PBS gelösten Buffy Coat. Nach 30 Minuten Zentrifugation bei 2300 U/min charakteristische dichteabhängige Auftrennung (Bild rechts): Der Überstand, einschließlich der Lymphozyten und Monozyten, wird verworfen, die PMN durch Lyse und Zentrifugation von den Erythrozyten getrennt.

2.2.3 Prinzip der Perfusionsanlage

Die Perfusionsanlage besteht aus zwei getrennten Kreisläufen. Ein Wärmekreislauf stellt die konstante Temperierung der Perfusionslösung auf 37°C sicher. Der davon unabhängige Perfusionskreislauf ermöglicht eine volumenkonstante und eine druckkonstante Perfusion des isolierten Meerschweinchenherzens. Bei der volumenkonstanten Perfusion (Langendorff-Modus) füllt sich bei dichter Aortenklappe der rechte Ventrikel retrograd über die Koronarien. Anschließend fließt das Perfusat über den rechten Ventrikel und die A.pulmonalis wieder nach außen. Im druckkonstanten Perfusionsmodus wird die Perfusionslösung aktiv über den kanülierten linken Vorhof in den linken Ventrikel gepumpt. Von dort gelangt das Perfusat teils über die Aorta bei einem definierten Aortendruck von 60 mmHg (Afterload), teils über die Koronarien via rechten Vorhof, rechten Ventrikel und A. pulmonalis bei konstanten Füllungsdruck von 12 mmHg (Preload) wieder nach außen. Flusssensoren messen den dabei auftretenden Aortenfluss und Koronarfluss (Abbildung 4).

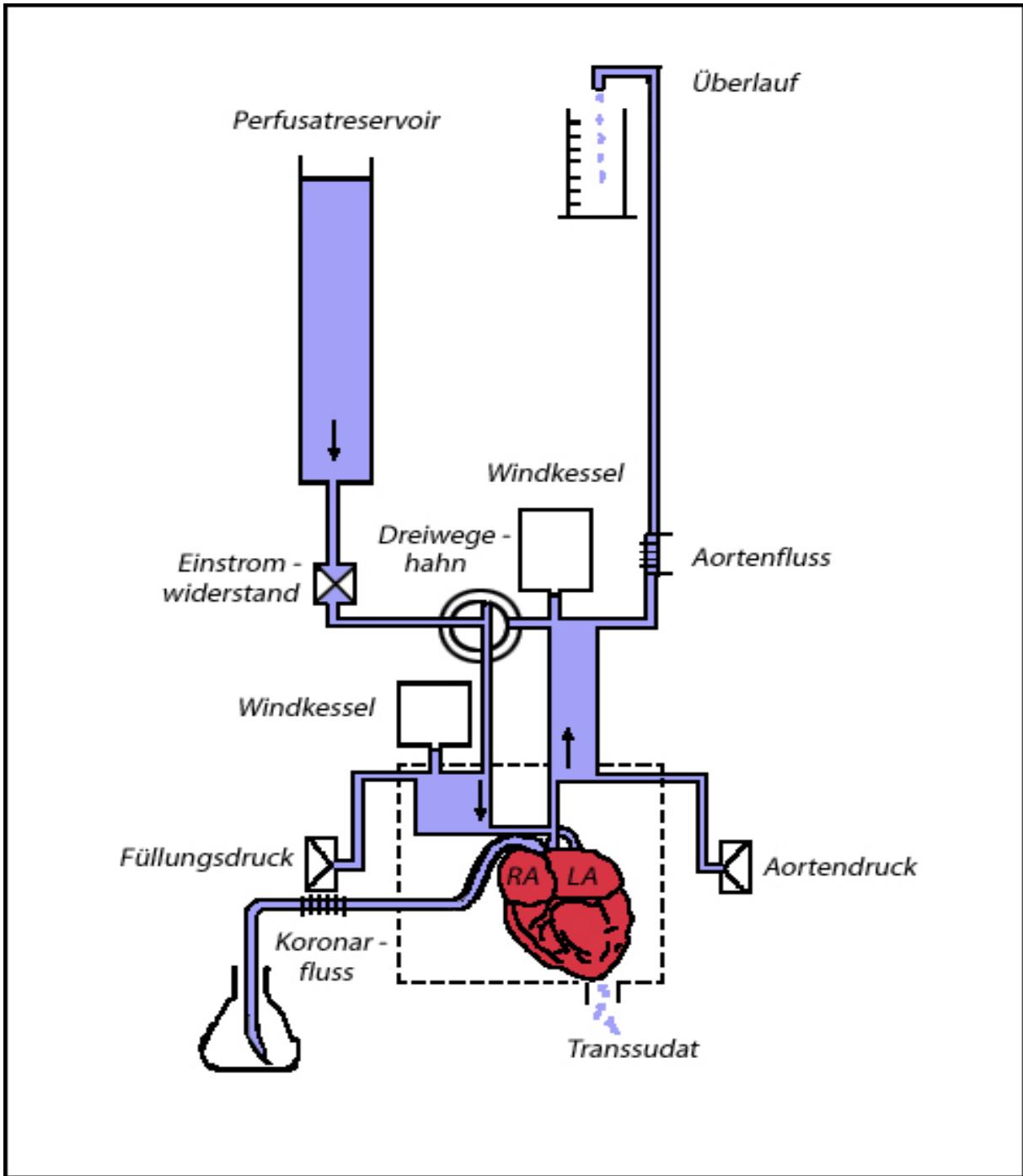


Abbildung 4

Schematische Darstellung der Perfusionsanlage im Working-heart-Modus. Bei konstanten Aortendruck (Afterload) von 60 mmHg und konstanten Füllungsdruck (Preload) von 12 mmHg messen Flusssensoren den resultierenden Aorten- und Koronarfluss. Die Perfusion des isolierten Herzens erfolgt über den kanülierten linken Vorhof. Durch aktive Herzarbeit pumpt der linke Ventrikel das Perfusat teils über die Aorta, teils über die Koronarien, rechten Vorhof, rechten Ventrikel und A.pulmonalis wieder nach außen.

2.2.4. Versuchsprotokoll

In der ersten Versuchsreihe wurde in 4 verschiedenen Gruppen (5 Herzen pro Gruppe) die Erholung der externen Herzarbeit untersucht, während die Messung der Expression von GPIIb/IIIa auf Thrombozyten, sowie von MAC-1 auf polymorphkernigen Granulozyten mit Hilfe von FACScan Analysen vor und nach der Koronarpassage in 3 Versuchgruppen (5 Herzen pro Gruppe) durchgeführt wurde (siehe Versuchsprotokoll, Abbildung 5A).

Eine weitere Versuchsreihe mit 7 Gruppen zu je 5 Herzen diente dem Nachweis von PMN-Thrombozyten Aggregaten im ischämischen Herzen mit Hilfe der Videofluoreszenzmikroskopie. Zusätzlich wurden im Rahmen dieser Experimente die Bildung von Aggregaten im koronaren Effluat im FACS untersucht (Abbildung 5B).

2.2.4.1. Messung der externen Herzarbeit

Das isolierte Herz verrichtete zunächst 20 Minuten Druck-Volumen Arbeit bei einem Preload von 12 cm Wassersäule und Afterload von 60 mmHg. Nach 10 Minuten volumenkonstanter Perfusion im Langendorff Modus erfolgte die Ischämiephase (15 Minuten bei 37°C). Zu Beginn der Reperfusion wurde zunächst das Perfusionssystem für zwei Minuten mit Fibrinogen gesättigt und anschließend zusammen mit Fibrinogen ein Bolus von 10×10^6 PMN und 400×10^6 Thrombozyten über drei Minuten, gegebenenfalls inkubiert mit Abciximab oder LPM19c, verabreicht. Nach 20 Minuten Reperfusion wurde wieder in den arbeitenden Modus übergegangen, um die postischämische Erholung der Herzarbeit zu messen. Diese ist definiert als das Verhältnis von postischämisch gemessener Herzarbeit geteilt durch präischämisch gemessene Herzarbeit, ausgedrückt in Prozent des präischämischen Wertes.

2.2.4.2. Flusszytometrie

Fluorescein-iso-thio-cyanat (FITC)- oder Phycoerythrin (PE)-markierte Isotypkontrolle mit nichtbindenden, fluoreszenzmarkierten Antikörpern (anti-Maus IgG1, MCA928F oder MCA928PE) dienten zur Feststellung unspezifischer Bindungen und Hintergrundfluoreszenz im Flusszytometer (FACScan, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Für die FACS-Analysen der Expression von MAC-1

auf PMN und GPIIb/IIIa auf Thrombozyten wurden Proben vor und nach der Koronarpassage des postischämischen Herzens gemessen. Dabei wurde CD11b von dem Antikörper MCA551 (Serotec) und GPIIb/IIIa (CD41) von MCA467 (Serotec) erkannt. Bei Versuchen, in denen die Granulozyten mit LPM19c inkubiert wurden, wurde CD11b von einem speziellen PE-markierten LPM19c-Antikörper (Dako) detektiert.

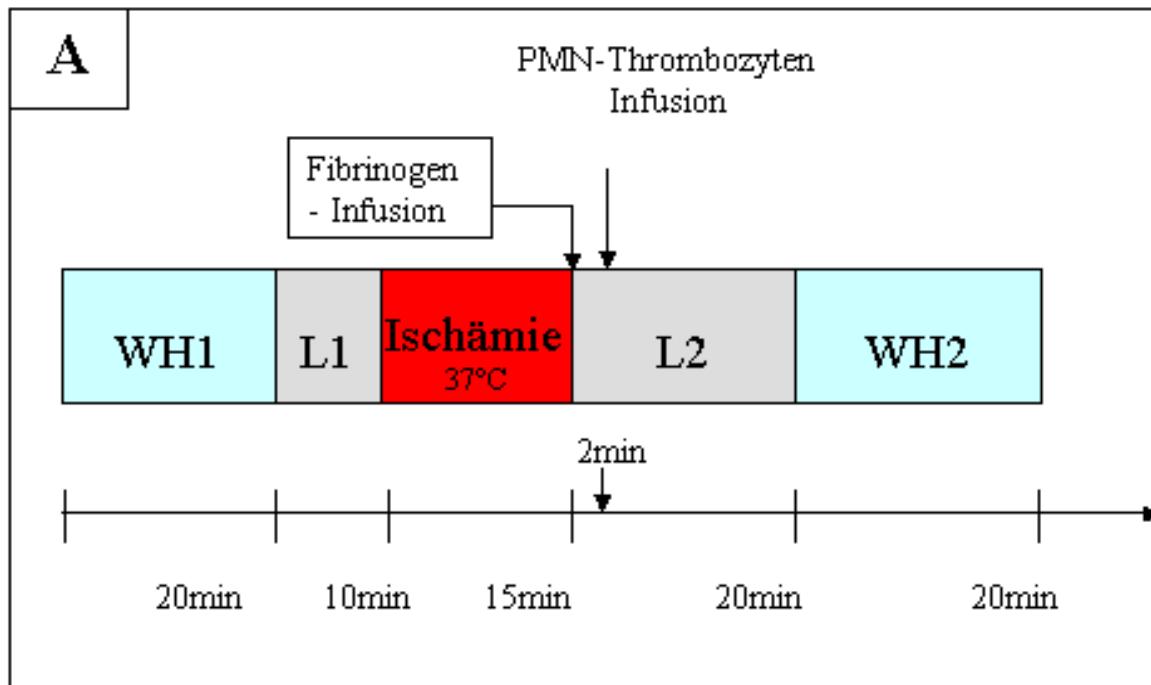
Ebenfalls mit Hilfe der Flusszytometrie wurde die Interaktion der mit Rhodamin 6G gefärbten PMN und der BCECF-AM markierten Thrombozyten im koronaren Effluat in den fluoreszenzmikroskopischen Experimenten untersucht. Die Datenanalyse von 10.000 Ereignissen wurden mit Lysis II Software auf einem Hewlett Packard Computer durchgeführt.

2.2.4.3. Fluoreszenzmikroskopie

Nach 15 Minuten Ischämiezeit, 5 Minuten Reperfusion und Infusion von PMN und Thrombozyten über 3 min wurden die Herzen zum Zwecke der *in situ* Mikroskopie mit kalter kardioplegischer Lösung (Potassium 28 mmol/l) ruhig gestellt. Anschließend wurden die Herzen auf einem speziell entworfenen Mikroskopiertisch so fixiert, dass die Oberfläche des linken Ventrikels zum 10-fach Objektiv (L10,0.22 Aperture, Leitz) des Mikroskops (Ploemopak, Leitz, Wetzlar, FRG) zeigte. Die mikroskopischen Bilder wurden mit Hilfe einer speziellen Kamera (COHU 4400, Prospective Measurements, San Diego, CA) auf einen Bildschirm übertragen und zur späteren Auswertung auf Band aufgenommen.

Die Verteilung der BCECF-AM markierten Thrombozyten wurde durch Epillumination mit einer H130 Quecksilber Lichtquelle und einem I_{2,3} Filterblock von Leitz analysiert. Für die Untersuchung der PMN-Verteilung wurde ein selektiver Rhodamin 6G N₂ Filterblock von Leitz verwendet.

Diese Methode erlaubte die quantitative Analyse der Retention von PMN-Thrombozyten-Koaggregaten in epikardialen Regionen des Myokards (0.5-1.5 mm Tiefe). Die PMN-Plättchen Interaktion wurde in Zellhaufen entdeckt, die sowohl PMN spezifische Rhodamin 6G, als auch Thrombozyten spezifische BCECF-AM Fluoreszenz enthielten. Diese Versuchsanordnung zeigte keine einzelnen Plättchen auf PMN, sondern heterotype Koaggregate bestehend aus zwei oder mehreren Plättchen auf ein oder mehreren PMN.

**Abbildung 5A**

WH1 = „working heart“-Phase 1: Das isolierte Herz verrichtet 20 Minuten Druck-Volumen Arbeit bei einem Preload von 12 cm Wassersäule und einem Afterload von 60 mmHg.

L1 = Langendorff Phase 1: Volumenkonstante Perfusion (5ml/min) des Herzens für 10 Minuten. L2 = Langendorff Phase 2: Beginn der Reperfusion im Langendorff-Modus (5ml/min) und Infusion von PMN und Thrombozyten (gegebenenfalls inkubiert mit Abciximab oder LPM19c) nach Sättigung des Perfusionssystems mit Fibrinogen für zwei Minuten. WH2 = „working heart“-Phase 2: Erneute Verrichtung von Druck-Volumen Arbeit und Messung der postischämischen Erholung der Herzarbeit.

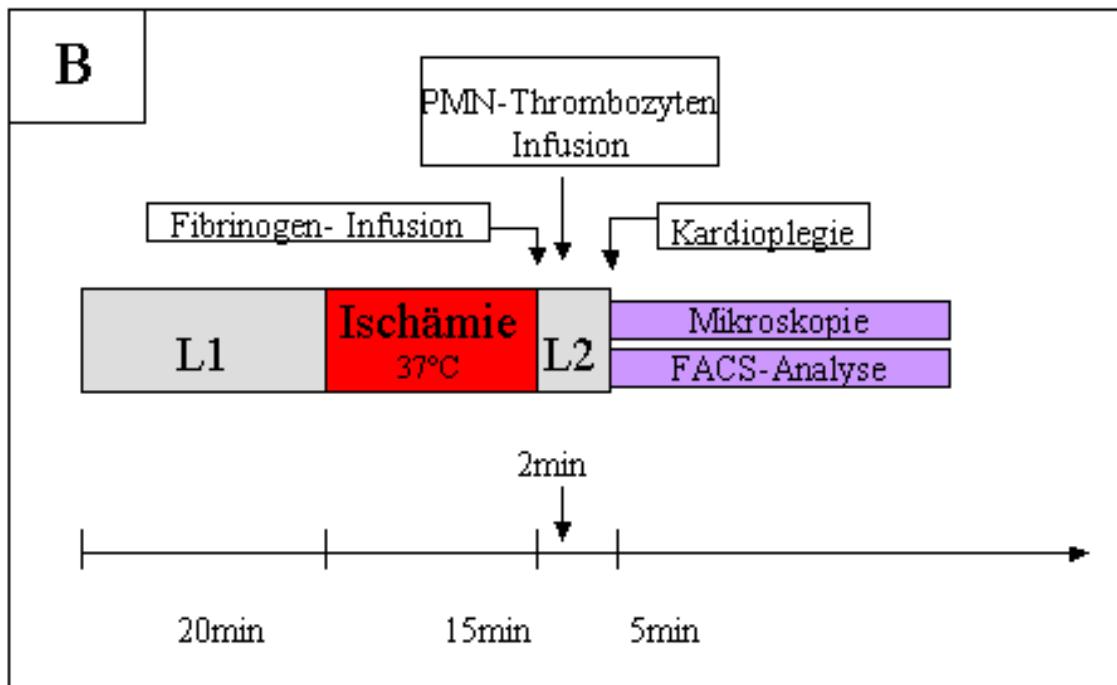


Abbildung 5B

L1 = Langendorff Phase 1: Stabilisierungsphase des Herzens im Langendorff Modus bei volumenkonstanter Perfusion (5ml/min). L2 = Langendorff Phase 2: Reperfusion nach 15 Minuten Ischämie (37°C) im Langendorff Modus (5ml/min) und Infusion von Rhodamin 6G gefärbten PMN und BCECF-AM gefärbten Thrombozyten über 3 Minuten (gegebenenfalls inkubiert mit Abciximab oder LPM19c) nach Sättigung des Perfusionssystems mit Fibrinogen für zwei Minuten. Anschließend Ruhigstellung des Herzens mit kalter Kardioplegie Lösung und Fixierung des Herzens auf einem speziellen Mikroskopiertisch zur Untersuchung der PMN-Thrombozyten-Interaktion im epikardialen Gewebe mit Hilfe der Videofluoreszenzmikroskopie. Zusätzlich flusszytometrische Analyse der Interaktion von PMN und Thrombozyten vor und nach Koronarpassage.

2.2.5. Statistische Auswertung

Die Daten wurden jeweils als Mittelwerte \pm SEM in den Abbildungen dargestellt. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte durch die Varianzanalyse (ANOVA). Zeigten sich mit ANOVA signifikante Effekte, wurden weitere Vergleichstest zwischen den einzelnen Gruppen mit Hilfe des Student Newman Keul Test (SPSS statistical software package) durchgeführt. Die Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen wurden als signifikant angesehen für $p < 0,05$.

3. Ergebnisse

3.1. Fibrinogen Rezeptor Expression auf Thrombozyten und polymorphkernigen Granulozyten

Eigene pharmakologische Studien ergaben, dass c7E3Fab dosisabhängig und kompetitiv mit dem GPIIb/IIIa Antikörper MCA 467 und Fibrinogen interagiert (Abbildung 6A). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass LPM19c dosisabhängig an sein Epitop MAC-1 bindet und sowohl c7E3Fab als auch LPM19c mit Fibrinogen um die Bindung an PMN konkurrieren (Abbildung 6B).

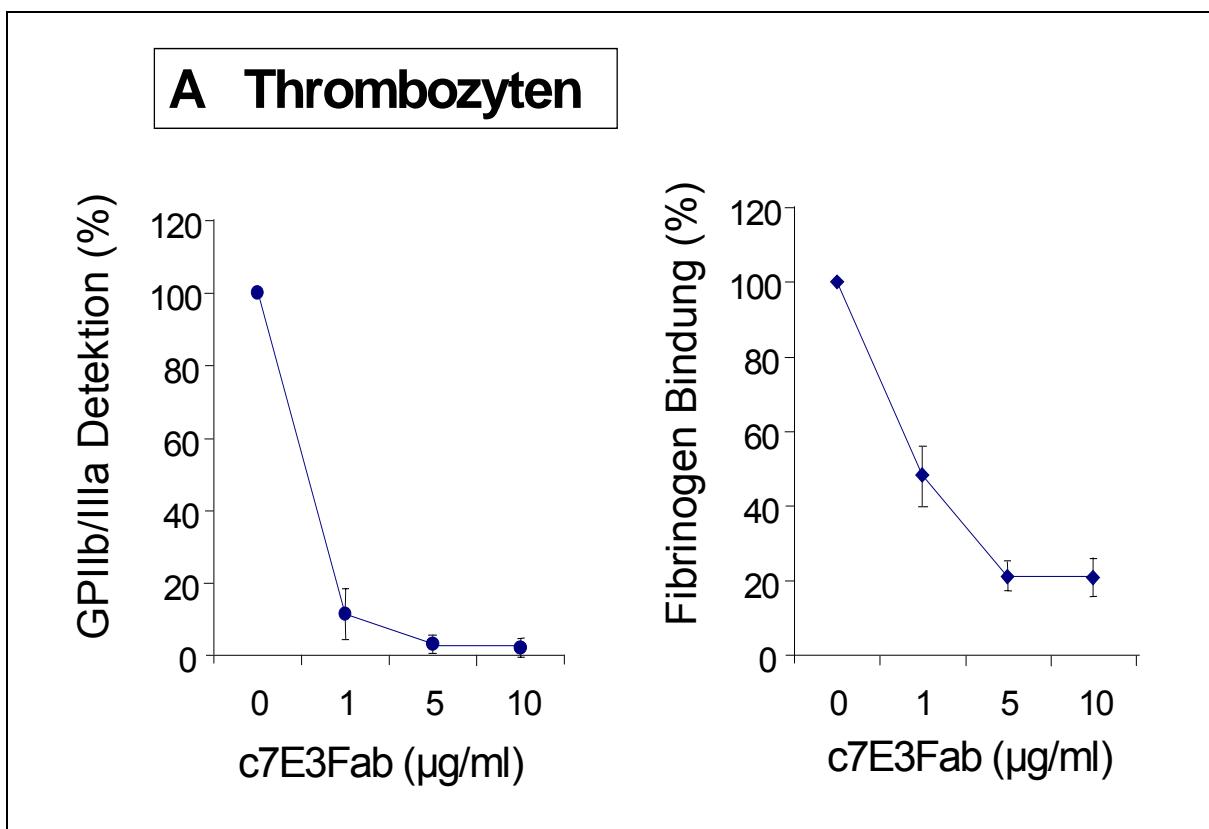


Abbildung 6A

Dosisabhängige GPIIb/IIIa-Inhibition (linkes Bild) und Verdrängung des Fibrinogens vom GPIIb/IIIa Rezeptor (rechtes Bild) durch c7E3Fab, analysiert im FACScan.

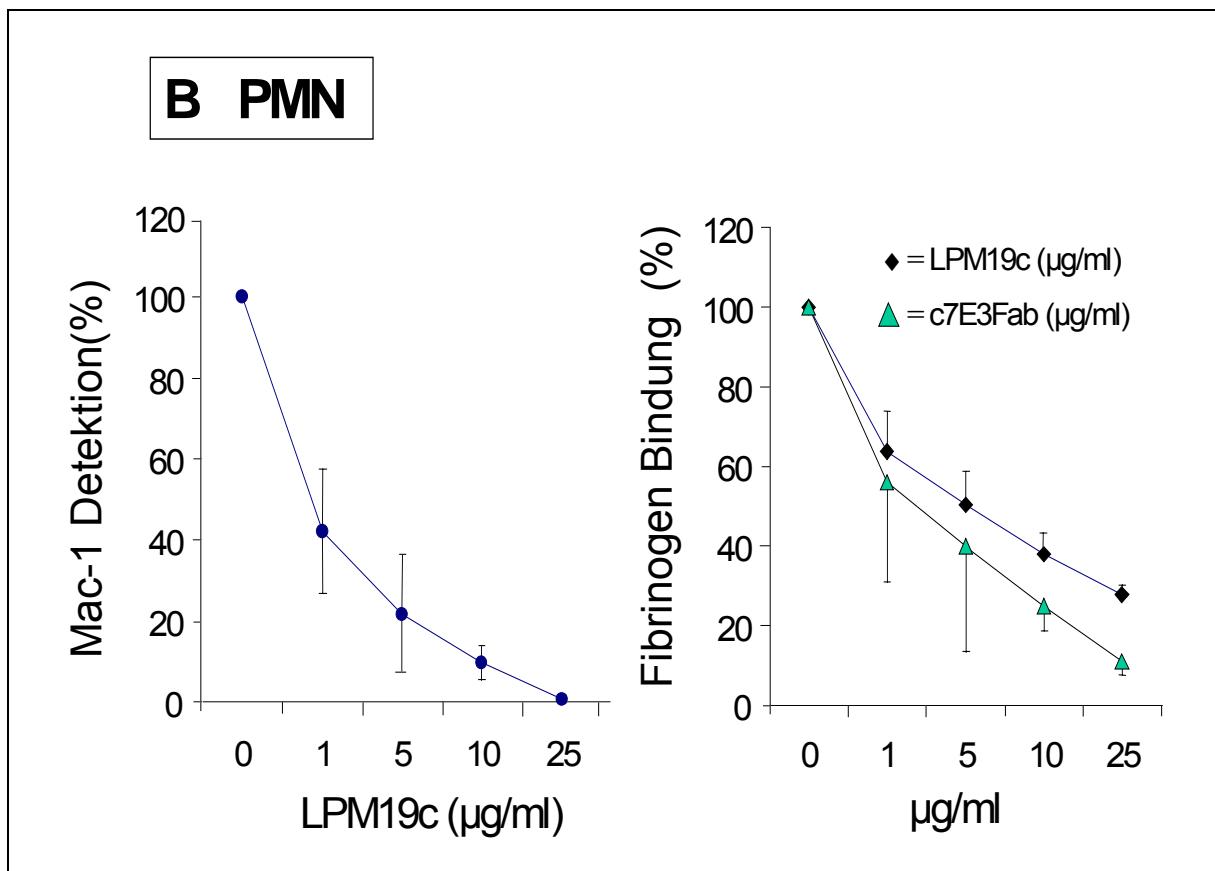


Abbildung 6B

Dosisabhängige MAC-1 Inhibition auf PMN durch LPM19c (linkes Bild) und kompetitive Verdrängung des Fibrinogens vom Rezeptor (MAC-1) durch LPM19c und c7F3Fab (rechtes Bild).

Im postischämischen Herzen der Kontrollgruppe erfuhr die Expression von GPIIb/IIIa durch die Koronarpassage keine signifikante Veränderung (238 ± 54 fU vor vs. 262 ± 52 fU nach Koronarpassage). Die wirkungsvolle Blockade des Fibrinogenrezeptors durch Inkubation der Thrombozyten mit c7E3Fab zeigte sich in einer Reduktion der GPIIb/IIIa Detektion durch den Antikörper MCA 467 von mehr als 90 %, welche durch die Koronarpassage nicht verändert wurde (12 ± 5 fU vor vs. 10 ± 4 fU nach Koronarpassage; Abbildung 7A).

Obwohl die Detektion von MAC-1 auf PMN durch den Antikörper MCA551 zwischen c7E3Fab-inkubierten und nicht inkubierten PMN keinen signifikanten Unterschied ergab, konnte der Anstieg der MAC-1 Expression auf PMN während

postischämischer Koronarpassage durch c7E3Fab verringert werden (Abbildung 7B). Die Applikation von LPM19c reduzierte die zu Verfügung stehende Anzahl von MAC-1-Molekülen auf PMN von 36.5 ± 3.1 auf 3.2 ± 1.7 fU (Abbildung 7B), was durch einen PE-markierten LPM19c Antikörper detektiert wurde. Im Gegensatz dazu blieben Thrombozyten, die vorab nicht mit LPM19c inkubiert wurden, in ihrer GPIIb/IIIa Expression unbeeinträchtigt (Abbildung 7A).

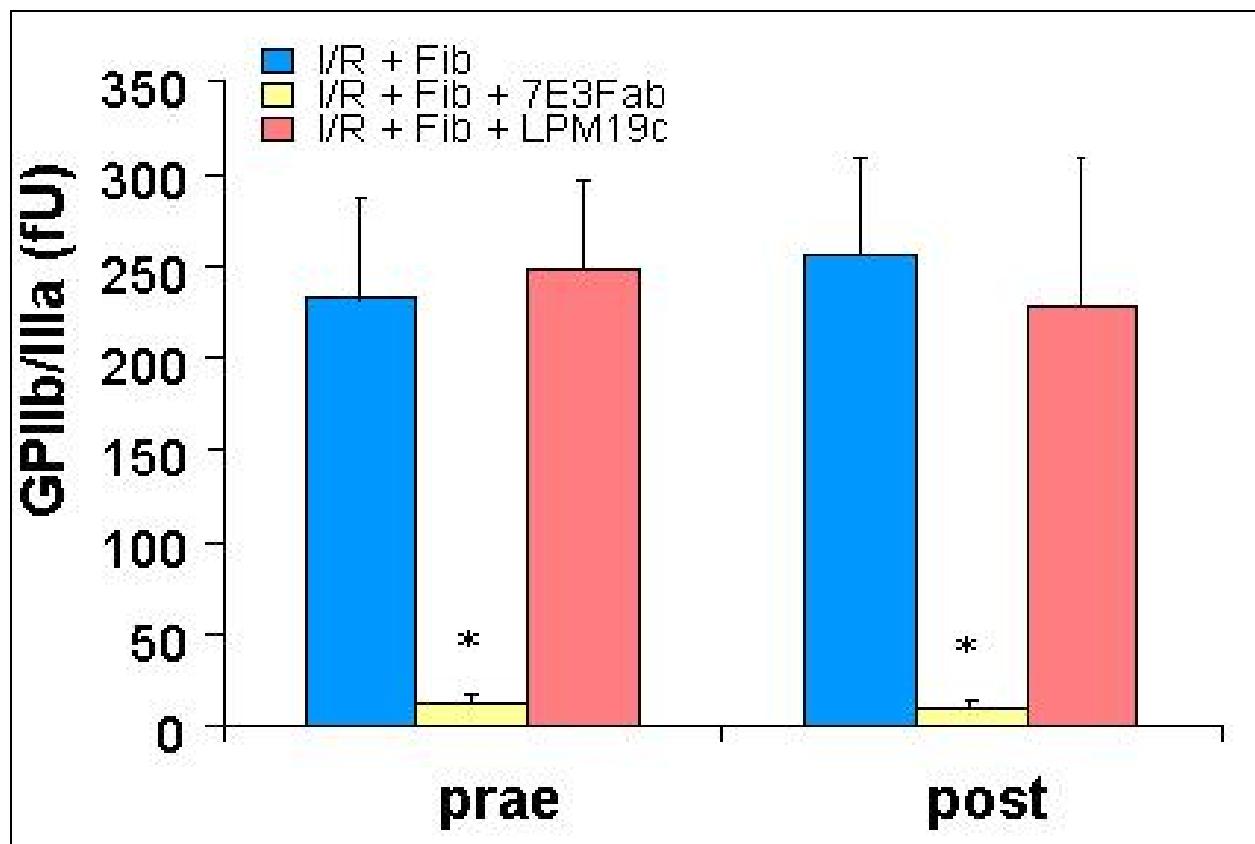
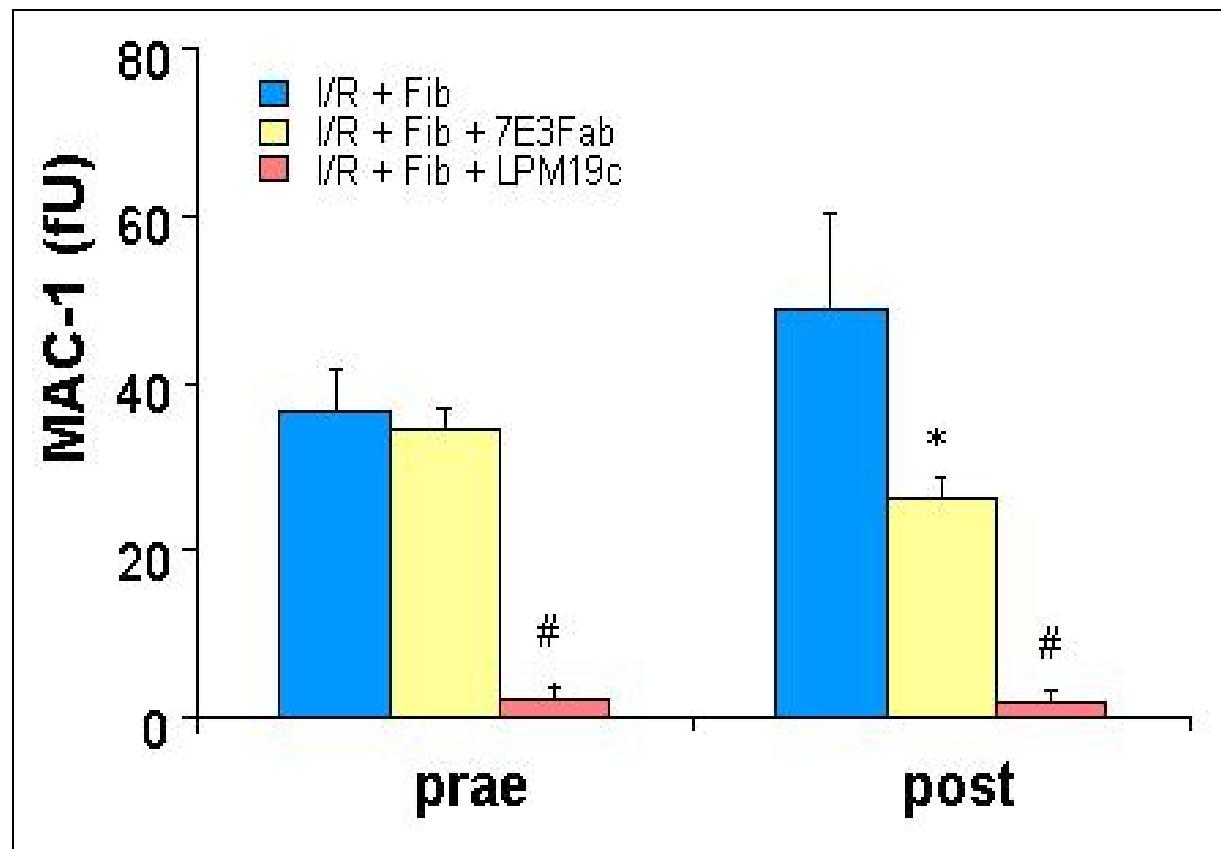


Abbildung 7A

Flusszytometrische Analysen der Expression von GPIIb/IIIa auf Thrombozyten und vor (prae) und nach (post) Koronarpassage durch ein postischämisches isoliertes Meerschweinchenherz, angegeben in Fluoreszenzunits (FU). * $P<0.005$ vs Ischämie/Reperfusion (I/R) + Fibrinogen (Fib) und I/R + Fib + LPM19c

**Abbildung 7B**

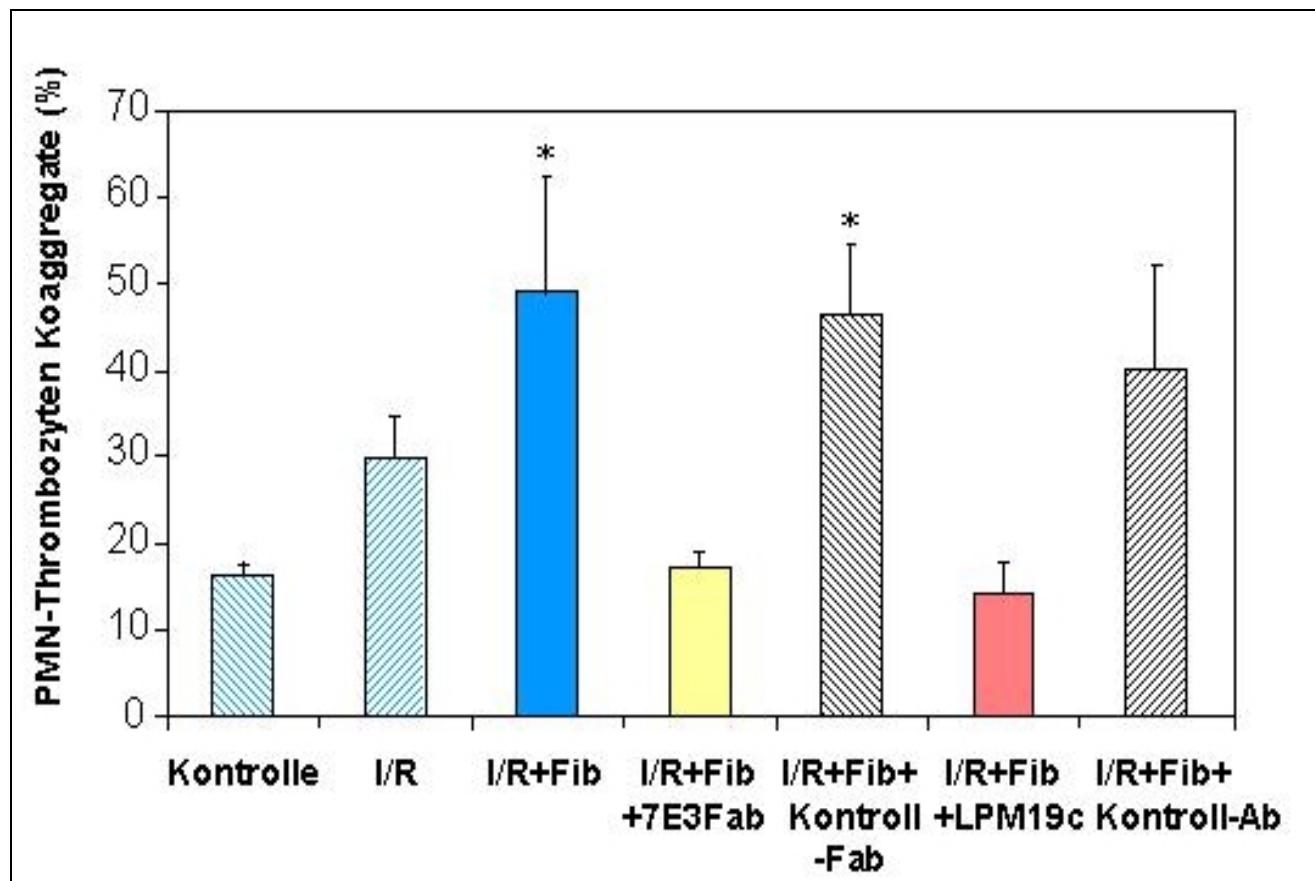
Flusszytometrische Analysen der Expression von MAC-1 auf PMN vor (prae) und nach (post) Koronarpassage durch ein postischämisches isoliertes Meerschweinchenherz, angegeben in Fluoreszenzunits (FU). * $P<0.005$ vs Ischämie/Reperfusion (I/R) + Fibrinogen (Fib) und I/R + Fib + LPM19c. # $P<0.005$ vs I/R + Fib und I/R + Fib+ c7E3Fab.

3.2. Postischämische Interaktion von Thrombozyten und PMN im koronaren Effluat

Zusätzlich zu den inhibitorischen Effekten auf die Expression von Adhäsionsmolekülen wurde die Fähigkeit von c7E3Fab, die Bildung von Koaggregaten zu vermindern, untersucht. Zu diesem Zwecke wurden PMN und Thrombozyten mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen, Rhodamin 6G und BCECF-AM, markiert, über Perfusoren mit oder ohne Fibrinogen in ein postischämisches Meerschweinchenherz infundiert und anschließend das koronare Effluat flusszytometrisch analysiert.

Verglichen mit Kontrollherzen ohne Ischämie, in denen $16\pm2\%$ der PMN mit Thrombozyten besetzt waren, verstärkte die Ischämiephase (15 Minuten bei 37°C) die PMN-Thrombozyten Interaktion, deren Ausmaß von der Anwesenheit von Fibrinogen abhängig war. So zeigten sich mit Fibrinogen $49\pm13\%$ der PMN besetzt mit Plättchen, im Gegensatz dazu nur $30\pm15\%$ ohne Fibrinogen (Abbildung 8A). Die Inhibition von GPIIb/IIIa durch c7E3Fab bzw. MAC-1 durch LPM19c reduzierte die PMN-Thrombozyten Interaktion auf Werte der Kontrollgruppe, während Versuche mit Kontroll-Antikörpern keinen Effekt zeigten.

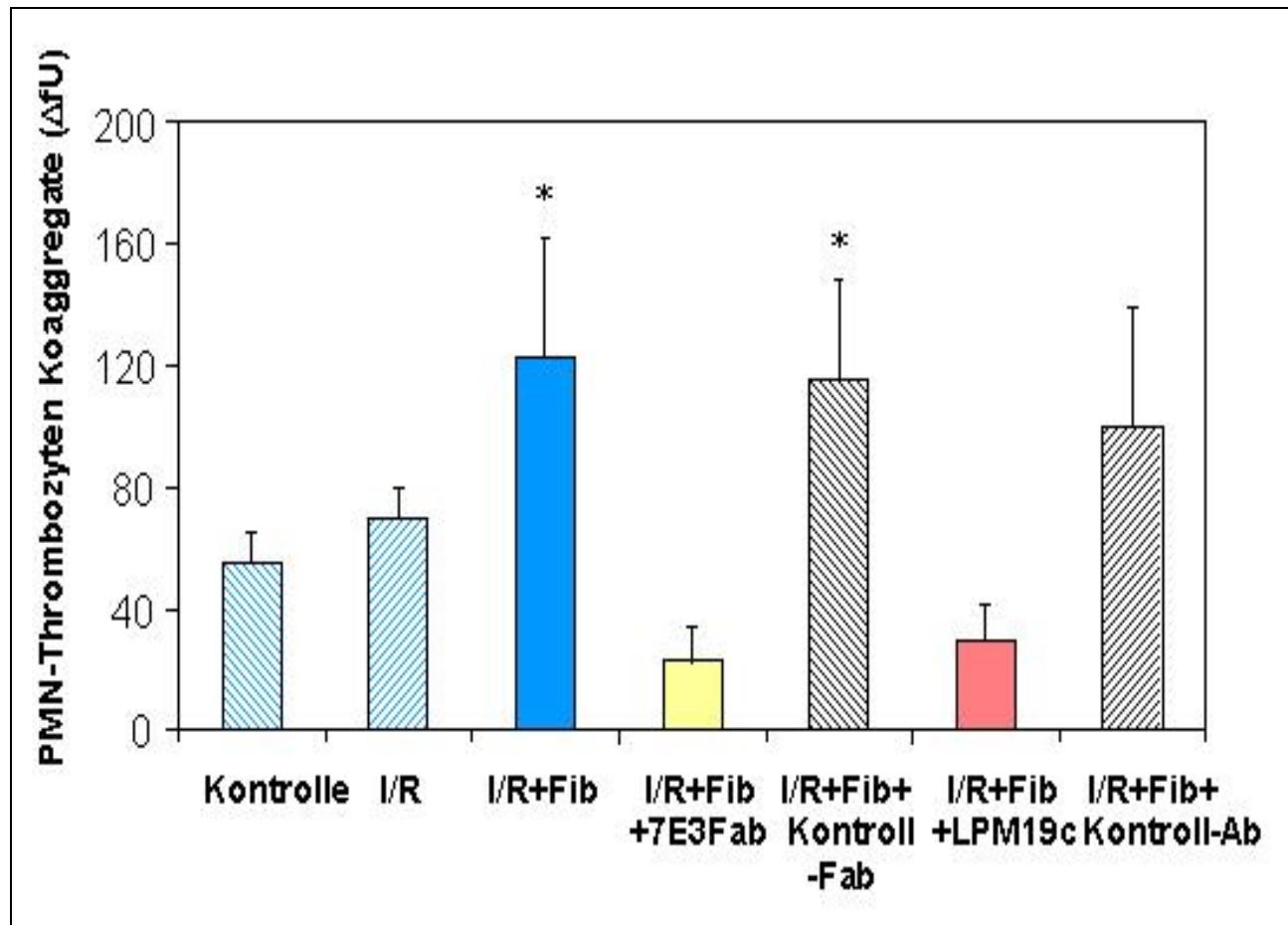
Zusätzlich zur Messung des Anteils der PMN-Thrombozyten-Aggregate an der Gesamtzahl der PMN (Abbildung 8A) wurde die Menge an Thrombozyten gemessen, die mit den einzelnen PMN interagieren, ausgedrückt als der Mittelwert der plättchenspezifischen Fluoreszenz auf polymorphkernigen Granulozyten. Die Ergebnisse korrelieren mit der Prozentzahl der Koaggregate, die in der PMN Population gefunden worden ist (Abbildung 8B).

**Abbildung 8A**

PMN –Thrombozyten Koaggregate im koronaren Efluat:

Kontrolle = ohne Ischämie, I/R = Ischämie (15 min) und Reperfusion, Fib = Fibrinogen (1mg/ml). 10^5 PMN wurden pro Experiment evaluiert, 5 Experimente pro Gruppe durchgeführt. PMN-Thrombozyten Koaggregate dargestellt in Prozent (%) der gesamten PMN-Zahl.

* = $p < 0.05$ vs. Kontrolle, I/R+Fib+c7E3Fab und I/R+Fib+LPM19c.

**Abbildung 8B**

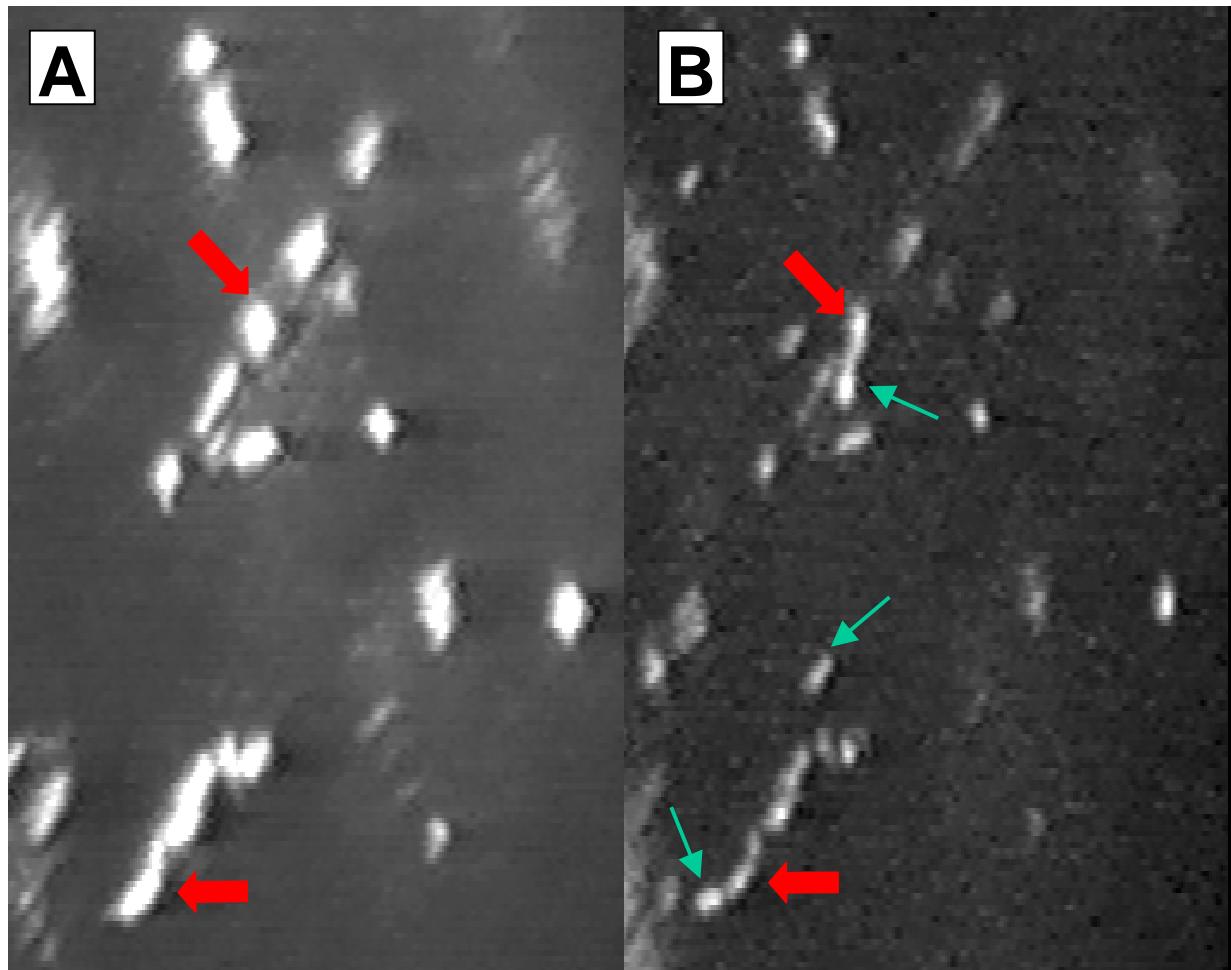
Thrombozytenadhäsion auf PMN:

Kontrolle = ohne Ischämie, I/R = Ischämie (15 min) und Reperfusion, Fib = Fibrinogen (1mg/ml). 10^5 PMN wurden pro Experiment evaluiert, 5 Experimente pro Gruppe durchgeführt. Thrombozytenadhäsion auf PMN, dargestellt als BCECF-AM-Fluoreszenzunits der Thrombozyten (Mittelwert von 10.000 Ereignissen).

* = $p < 0.05$ vs. Kontrolle, I/R+Fib+c7E3Fab und I/R+Fib+LPM19c.

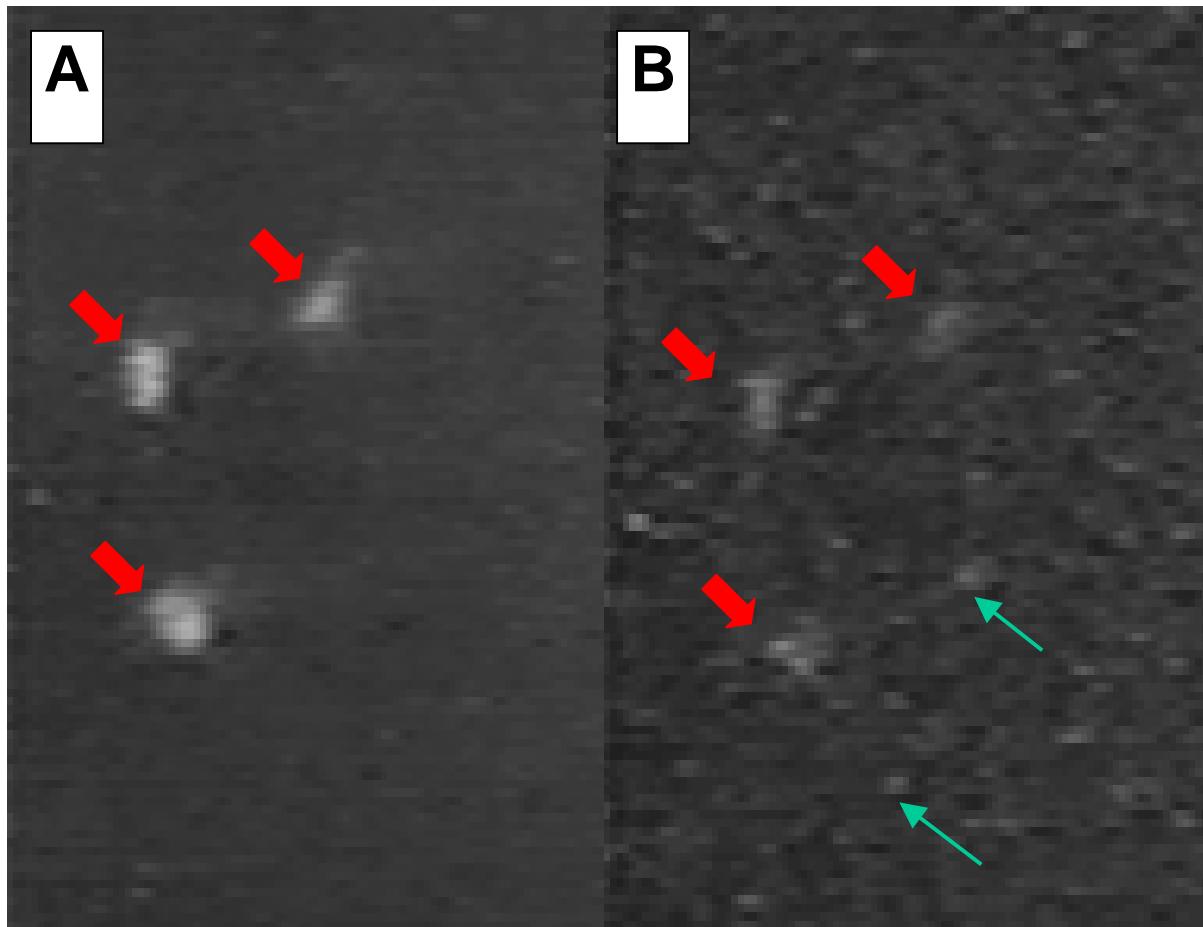
3.3. Retention von PMN-Thrombozyten Aggregaten im reperfundierten Herz

Mit Hilfe der Doppelfluoreszenzvideomikroskopie ex vivo wurde die Retention von PMN, Thrombozytenaggregaten und heterogenen PMN-Thrombozyten Aggregaten in der epikardialen Mikrozirkulation untersucht. Beispiele dieser Methode werden in Abbildung 9 und 10 gezeigt. Dabei sind auf Abbildung 9A nur die retenierten polymorphkernigen Granulozyten zu erkennen (roter Pfeil), aufgezeichnet mit einem Rhodamin spezifischen Fluoreszenzfilter. Nach Filterwechsel (Abbildung 9B) ist deren Fluoreszenz nur noch abgeschwächt zu sehen. Zusätzlich sind die BCECF-AM markierten Thrombozyten-Aggregate sichtbar (grüner Pfeil). Die enge räumliche Anordnung von PMN und Thrombozyten lässt auf Interaktion im Sinne von Koaggregatbildung schließen. Abbildung 10 zeigt ein exemplarisches Bild nach Inkubation der Granulozyten mit c7E3Fab. Links erkennt man drei deutlich angefärbte Granulozyten im Rhodaminfilter (Abbildung 10A), rechts im BCECF-AM Filter die durchscheinende Fluoreszenz der PMN und zusätzlich vereinzelte Thrombozytenaggregate (Abbildung 10B). Man beobachtet keine Ausbildung von Koaggregaten .

**Abbildung 9**

Repräsentatives Beispiel eines postischämischen Myokards nach Gabe von PMN, Thrombozyten und Fibrinogen in der Videofluoreszenzmikroskopie.

Polymorphkernige Granulozyten (rote Pfeile) im Rhodamin Filter (A) und deren korrespondierende abgeschwächte Fluoreszenzpunkte im BCECF-AM Filter (B). Zusätzlich auf dem rechten Bild erkennbare Thrombozytenaggregate (grüne Pfeile) und PMN-Thrombozyten-Koaggregate.

**Abbildung 10**

Repräsentatives Beispiel eines postischämischen Myokards in der Videofluoreszenzmikroskopie nach Infusion von c7E3Fab-inkubierten Granulozyten (rote Pfeile), Thrombozyten (grüne Pfeile) und Fibrinogen. A aufgenommen in PMN spezifischer Rhodamin Fluoreszenz, B in Thrombozyten spezifischer BCECF-AM Fluoreszenz.

Quantitative Analysen ergaben, dass die Retention von PMN-Thrombozyten Aggregaten durch die Anwesenheit von Fibrinogen von $1.7 \pm 0.2/\text{cm}^2$ (Kontrollen ohne bzw. mit Ischämie) auf $5.0 \pm 0.7/\text{cm}^2$ ansteigt (Abbildung 11). Diese Bildung von PMN-Thrombozyten Koaggregaten konnte, im Gegensatz zu unspezifischen Kontrollantikörpern (Ig-Fab und Ig-Fc), durch die Gabe von c7E3Fab und LPM19c auf Kontrollniveau reduziert werden (Abbildung 11).

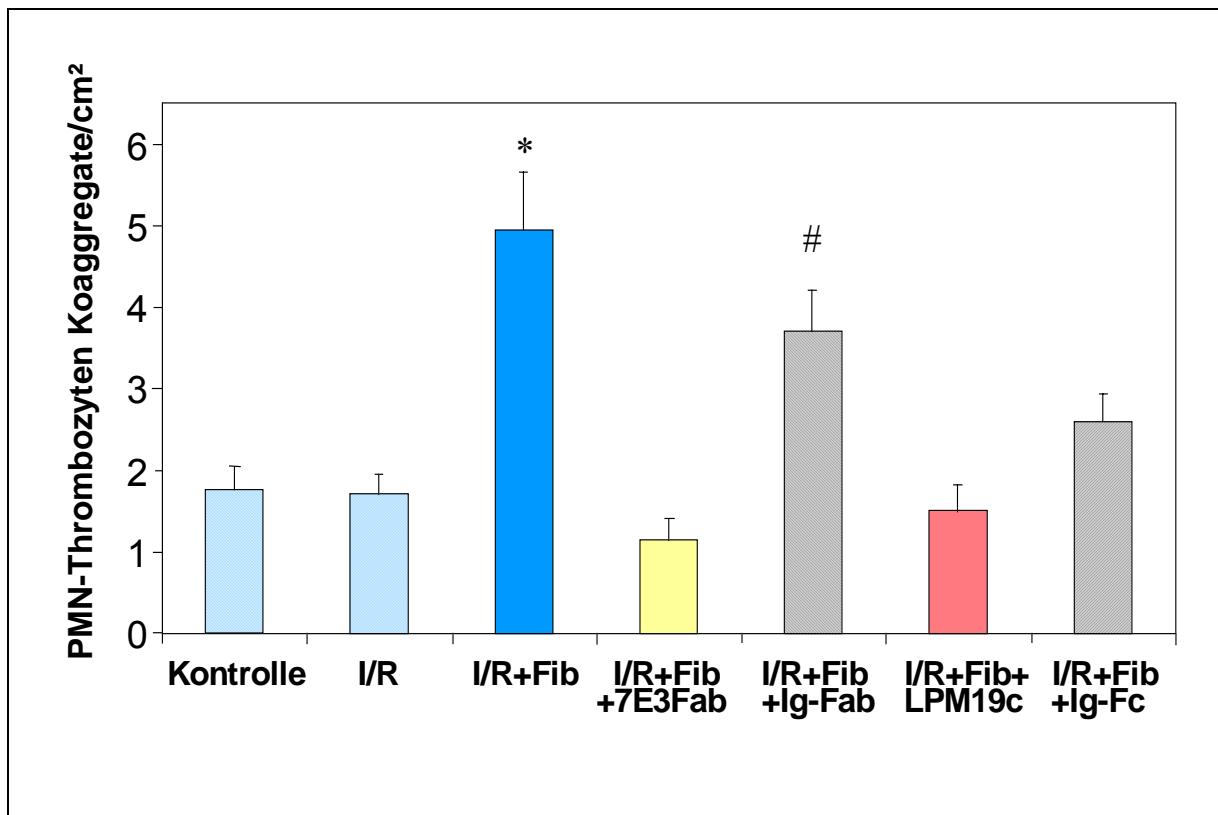
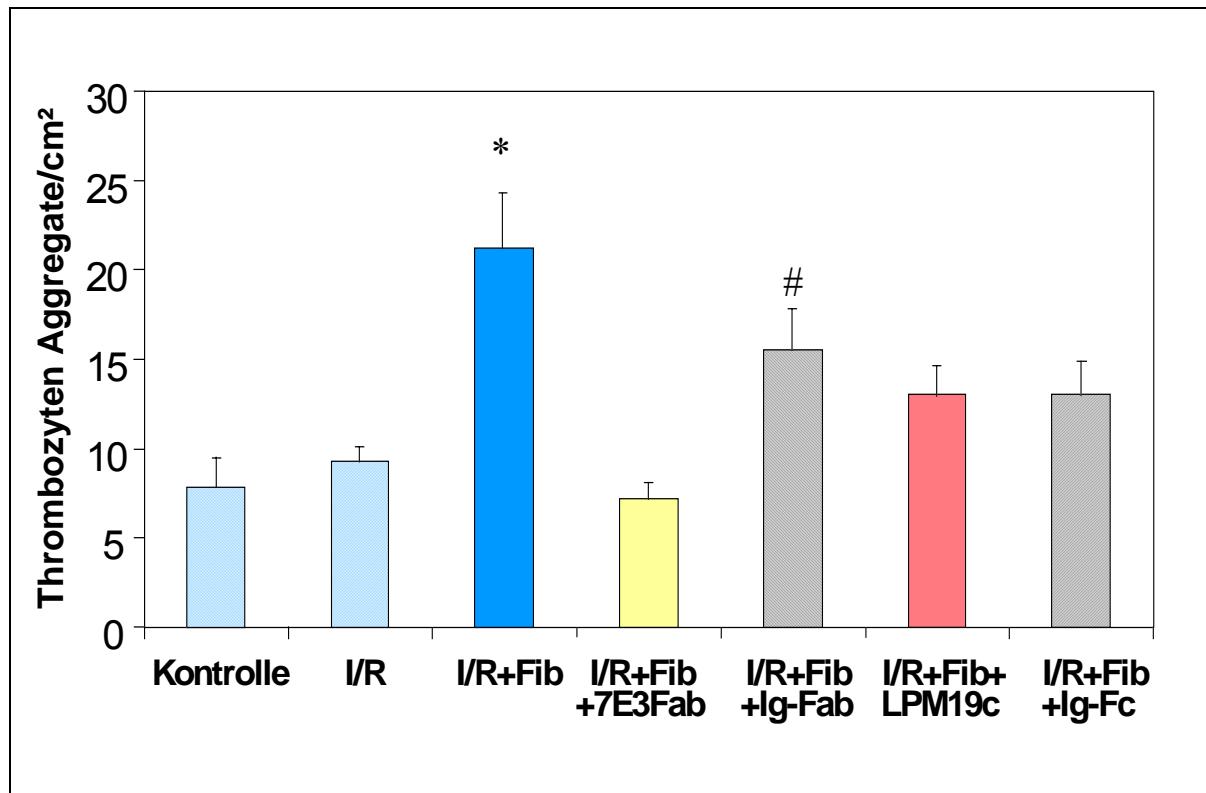


Abbildung 11

Quantitative Analyse der Retention von PMN-Thrombozyten Koaggregaten in der epikardialen Mikrozirkulation. Es wurden 5 Gesichtsfelder pro Herz ausgewertet, jeweils 5 Herzen pro Gruppe. Kontrolle = Normoxie, I/R = Ischämie (15 Minuten) und Reperfusion, Fib = Fibrinogen (1mg/ml).

* $P < 0.05$ vs allen anderen Gruppen, # $P < 0.05$ vs Kontrolle, I/R und I/R+Fib+c7E3Fab.

Die Analyse von homogenen Thrombozytenaggregaten zeigte einen mit der Bildung von PMN-Thrombozyten-Koaggregaten vergleichbaren Einfluss von Ischämie und Reperfusion, Fibrinogen, oder c7E3Fab Gabe auf die Verteilung in der epikardialen Mikrozirkulation. Die Inkubation mit c7E3Fab reduzierte die Retention von Thrombozytenaggregaten von $21 \pm 3/\text{cm}^2$ auf $7 \pm 1/\text{cm}^2$ (Abbildung 12), während LPM19c einen geringeren Effekt im Sinne eines unspezifischen Antikörpers zeigte ($13 \pm 2/\text{cm}^2$).

**Abbildung 12**

Quantitative Analyse der Retention von homogenen Thrombozyten Aggregaten in der epikardialen Mikrozirkulation. Es wurden 5 Gesichtsfelder pro Herz ausgewertet, jeweils 5 Herzen pro Gruppe. Kontrolle = Normoxie, I/R = Ischämie (15 Minuten) und Reperfusion, Fib = Fibrinogen (1mg/ml).

* $P<0.05$ vs allen anderen Gruppen, # $P<0.05$ vs Kontrolle, I/R und I/R+Fib+c7E3Fab.

3.4. Myokardiale Funktion

Bei einem konstanten Preload von 12 cm H₂O und einem Afterload von 60 mmHg verrichteten isolierte Meerschweinchenherzen eine externe Herzarbeit von 377 ± 37 mJ · min⁻¹ · g⁻¹. Nach Ischämie und Reperfusion ohne weitere Intervention sank die Herzarbeit auf 313 ± 34 mJ · min⁻¹ · g⁻¹. Dies entspricht einer postischämischen Erholung von 83 ± 6 %.

Die simultane Gabe von gewaschenen PMN, Thrombozyten und Fibrinogen während früher Reperfusion (2-5 Minuten) führte zu einem weiteren Abfall der externen Herzarbeit auf 46 ± 4 % vom präischämischen Ausgangswert. Dieser Effekt wurde durch die Verabreichung von c7E3Fab (74 ± 11 %) beziehungsweise LPM19c (71 ± 6 %) verhindert (Abbildung 13).

Diese Veränderungen in der Erholung der Herzfunktion sind nicht mit einer Veränderung der Herzfrequenz assoziiert. Folglich reagiert die postischämische Erholung der Herzarbeit empfindlich auf die Applikation eines PMN-Thrombozyten Bolus in der Anwesenheit von Fibrinogen, ein Phänomen, das durch die Gabe von c7E3Fab oder LPM19c verhindert werden kann.

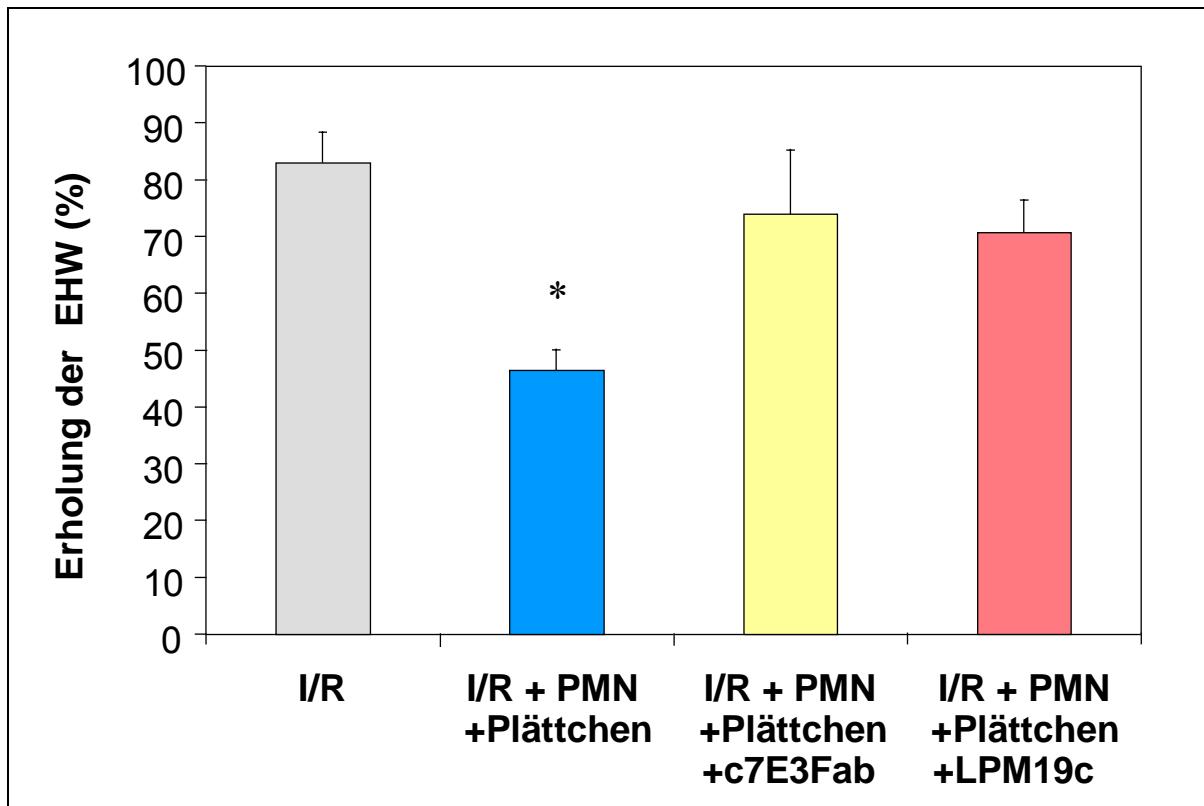


Abbildung 13

Die Erholung der externen Herzarbeit (EHW), als Prozentsatz der postischämischen Werte geteilt durch den präischämischen Ausgangswert, wurde bei jeweils 5 Herzen pro Gruppe untersucht. I/R = Ischämie und Reperfusion ohne Zellgabe. Bei allen Versuchen, in denen Zellen appliziert wurden, wurde Fibrinogen (1mg/ml) koinfundiert.

*P<0.05 vs allen anderen Gruppen.

4. Diskussion

In den vorliegenden experimentellen Studien konnten wir zeigen, dass die Interaktion von Leukozyten und Thrombozyten während Passage durch ein reperfundierte Koronarsystem zu einer heterotypischen Koaggregatbildung führt. An dieser Interaktion sind das leukozytäre MAC-1, Fibrinogen und der thrombozytäre Fibrinogen-Rezeptor GPIIb/IIIa beteiligt. Die Auswirkung dieser Interaktion auf den Koronarfluss (Abnahme der Koronarperfusion in der postischämischen Arbeitsphase W2) korrelierte mit einem Verlust an äußerer Herzarbeit in dieser Phase. Sowohl ein blockierender CD18-Antikörper (LPM19c) als auch der GPIIb/IIIa Antikörper Abciximab verringerten die Mikrozirkulations- und Funktionsstörung.

4.1. Interaktion von Thrombozyten und Granulozyten im reperfundierte Herzen

Obwohl die Beteiligung der Granulozyten am myokardialen Reperfusionsschaden bereits gezeigt wurde (Kupatt et al. 1997; Lefer et al. 1993; Lampugnani et al. 1990), ist die Analyse der Interaktion der Granulozyten und Thrombozyten erst in den letzten Jahren intensiviert worden.

Die zunehmende Kenntnis der Interaktionsmöglichkeiten der Adhäsionsmoleküle von Thrombozyten und Leukozyten hat vor allem zum verbesserten Verständnis und zu therapeutischen Interventionsmöglichkeiten geführt.

In diesem Zusammenhang gilt es als gesichert, dass aktivierte Thrombozyten, über eine Interaktion ihres Oberflächenmoleküls P-Selektin mit P-Selektin Liganden auf der Oberfläche von PMN und Monozyten binden können (Yeo et al. 1994; Diacovo et al. 1996; Kirchhofer et al. 1997). In einer Flußkammer-Studie wurde die Adhäsion von Leukozyten an Thrombozyten aus Vollblut untersucht. Nach Thrombozyten Adhäsion an Kollagen wurde die Prozentzahl an Leukozyten evaluiert, die sich an gebildeten Plättchenhromben abgelagert haben. Die Untersuchungen ergaben, dass die Leukozytenrekrutierung durch einen P-Selektin Antikörper um 70% verringert werden konnte. Durch zusätzliche Gabe eines GPIIb/IIIa Antagonisten konnte die Ablagerung von Leukozyten an den Thrombozyten komplett inhibiert werden (Yeo et al. 1994). Dieser Befund weist darauf hin, dass Thrombozyten in der

Lage sind, mit Hilfe von Fibrinogen, das als Brückenmolekül sowohl an GPIIb/IIIa auf Thrombozyten, als auch an aktivierte MAC-1 auf Leukozyten bindet, Leukozyten an den Ort von Gefäßverletzungen zu rekrutieren (Spangenberg et al. 1993).

Grundsätzlich gleicht die Interaktion von PMN mit aktivierte Thrombozyten der von PMN mit Endothelzellen (von Andrian et al. 1991), in der ein erster, reversibler Kontakt beider Zelltypen vorzugsweise durch Selektine vermittelt wird. Diesem Vorgang folgt nur dann die Ausbildung einer hochselektiven festen Adhäsion (Warnock et al 1998), wenn es zur Aktivierung von Integrinen kommt, zum Beispiel durch PAF(Plättchen aktivierender Faktor) (Weber et Springer 1997) oder durch Chemokine (Campbell et al. 1998). Die feste Adhäsion von Thrombozyten auf PMN involviert dabei vor allem die Integrine MAC-1 ($\alpha M\beta 2$, PMN) und GPIIb/IIIa ($\alpha IIb\beta 3$, Thrombozyten) und deren gemeinsamen Liganden Fibrinogen (Diacovo et al. 1996).

Eine Studie von A. Lefer und Mitarbeiter (1998) konzentrierte sich auf den ersten Schritt der PMN-Thrombozyten Interaktion und zeigte, dass die Blockade von P-Selektin und dessen Liganden (zum Beispiel PSGL-1) den von PMN und Thrombozyten abhängigen myokardialen Reperfusionschaden vermindert. Im Gegensatz dazu war der Ansatzpunkt der vorliegenden Studie, die Ausbildung einer festen Adhäsion zwischen Thrombozyten und Leukozyten zu verhindern. Die Integrinblockade durch Applikation von c7E3Fab oder LPM19c reduzierte die fibrinogenabhängige Ausbildung von PMN-Thrombozyten-Koaggregaten (Abbildung 8) und deren Retention im reperfundierte Myokard (Abbildung 11) und verbesserte die postischämische Erholung der Herzarbeit (Abbildung 13).

Jedoch müssen auch andere Mechanismen einer Interaktion zwischen Thrombozyten und Leukozyten in Erwägung gezogen werden, da die Bildung von Koaggregaten auch in Abwesenheit von Fibrinogen beobachtet wurde (Abbildung 8). Denkbar wäre zum Beispiel die Interaktion von ICAM-2 auf Thrombozyten und CD11a/CD18 auf PMN. Weber und Springer (1997) untersuchten in der Flusskammer die Wirkung einer ICAM-2 Blockade. Zwar hatte der Antikörper gegen ICAM-2 nur einen geringen und statistisch nicht signifikanten Effekt auf die PMN Akkumulation in diesem Modell, aber die „Anbindung“ der PMN, definiert als die adhesive Interaktion der PMN mit immobilen Thrombozyten, die länger als 3 Sekunden andauert, verringerte sich signifikant. Die Autoren schlußfolgerten, dass die Interaktion von ICAM-2 mit CD11a/CD18 den Übergang vom PMN-„rolling“ zur festen Adhäsion, vermittelt durch MAC-1, erleichtert.

Aufgrund der Verwendung von humanen Leukozyten, wurde eine Interaktion von PMN mit ICAM-1 des Endothels ausgeschlossen (nichtpublizierte Beobachtung von Habazettl/Kupatt). Deshalb ist der protektive Effekt von c7E3Fab und LPM19c auf die myokardiale Funktion (Abbildung 13) vor allem auf die Reduktion von Koaggregatbildung und unspezifischen „Plugging“ der PMN in Kapillaren zurückzuführen. Obwohl der letztere Effekt stärker in der Anwesenheit von LPM19c zu beobachten war, war die funktionelle Verbesserung in beiden Interventionsgruppen gleichermaßen ausgeprägt (Abbildung 13).

Zusammenfassend erscheint in unserem Modell die Ausbildung einer Fibrinogenbrücke zwischen PMN und Thrombozyten als entscheidender Schritt in der PMN-Thrombozyten-Koaggregatbildung und daraus resultierenden postischämischen funktionellen Schädigung. Insbesondere da LPM19c nur mit PMN und nicht mit dem Thrombozyten-Kompartiment inkubiert wurde, stellt die Inhibition der Fibrinogenbindung an PMN eine wirksame Methode zur Kardioprotektion in diesem Modell dar. Die fibrinogenabhängige Interaktion zwischen PMN und Thrombozyten bewirkt einerseits selbst eine Zellaktivierung durch Tyrosinkinasen (Brenner et al. 1996; Walzog et al. 1996; Evangelista et al 1999) und verringert andererseits durch Koaggregatbildung den Abstand für Aktivierungsfaktoren, gebildet von Thrombozyten, wie z.B. PAF (von Andrian et al. 1991) oder IL-1 (Gawaz et al 1998), zu ihren Rezeptoren auf PMN und trägt so zu einer zusätzlichen Aktivierung von Granulozyten bei (Neumann et al. 1997).

4.2. Interaktion von c7E3Fab mit MAC-1

Studien mit monoklonalen Antikörpern, die die Funktion von MAC-1 ($\alpha M\beta 2$) inhibierten, zeigten, dass der Rezeptor an einer Vielzahl von Vorgängen beteiligt ist: Er vermittelt sowohl die Adhäsion von Leukozyten an Endothelien, Epithelien und Oberflächen, die mit aktivierten Plättchen bedeckt sind, als auch die Transmigration über diese Strukturen. Zudem ist MAC-1 beteiligt an der Ausbildung von homogenen PMN Aggregaten, an neutrophiler Chemotaxis, an der Bindung und Phagozytose von opsonierten Partikeln und erleichtert die Bildung von Thrombin (Diamond et al. 1993; Winn et al. 1998; Altieri 1993).

Auch wenn in dem vorliegenden Modell die Leukozyten-Endothel-Interaktion aufgrund der Speziesdifferenz von Leukozyten und Endothel nicht adäquat

untersucht werden konnte, liess sich ein Teil der möglichen Interaktion, nämlich die von Leukozyten und Thrombozyten analysieren. Durch die Blockade von GPIIb/IIIa durch c7E3Fab beziehungsweise von MAC-1 durch LPM19c konnte eine signifikante Verringerung der Retention von PMN-Thrombozyten Koaggregaten im postischämischen Herzen (Abbildung 11) sowie im koronaren Effluat (Abbildung 8) nach Ischämie beobachtet werden. Gleichzeitig verbesserte sich durch die Intervention deutlich die postischämische Erholung der externen Herzarbeit (Abbildung 13).

Sind die positiven Ergebnisse durch die Gabe von c7E3Fab allein auf die Blockade von GPIIb/IIIa auf Thrombozyten zurückzuführen, oder hat c7E3Fab auch Wirkung auf MAC-1? Wir beobachteten, dass c7E3Fab zwar nicht direkt mit dem für die MAC-1 Detektion verwendeten Antikörper konkurrierte (Abbildung 7B), aber es interferierte mit der Hochregulation von MAC-1 (Abbildung 8B) und mit der Bindung von Fibrinogen an PMN (Abbildung 6B).

Bereits 1988 berichteten Altieri und Edgington, dass m7E3, der murine Stamm-Antikörper des chimärischen c7E3Fa, mit einer aktivierte Form von MAC-1 auf Monozyten und auf der Monozyten ähnlichen Zelllinie THP-1 reagiert. Die Aktivierung von MAC-1 wurde durch die Behandlung der Zellen mit fMLP oder ADP erreicht. Die Bindung von m7E3 konnte sogar ohne Zellaktivierung durch Gabe von Mn^{2+} -Ionen erreicht werden (Walzog et al. 1996). Unabhängig davon fanden Simon und Mitarbeiter (Simon et al. 1997) Hinweise für eine Kreuzreaktion von 7E3 und 7E3Fab mit dem Integrinrezeptor MAC-1. Sie untersuchten ebenfalls THP-1 Zellen und Zelllinien, die mit humanen MAC-1 transfiziert wurden (K562 und CHO Zellen), um eventuelle Kontamination mit Thrombozyten auszuschliessen. Die Experimente ergaben, dass mAb7E3 an K562 Zellen bindet, die mit der α -Untereinheit (CD11b) von MAC-1 transfiziert wurden, jedoch nicht an nichttransfizierten K562 Zellen, was eine direkte Interaktion zwischen 7E3 und MAC-1 bekräftigt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass mAb7E3 und c7E3Fab die Adhäsion von MAC-1 tragenden Zellen an Fibrinogen, ICAM-1 und die Bindung von löslichem Fibrinogen an humane periphere Blutmonozyten blockiert (Evangelista et al. 1999). In nachfolgenden Studien wurde versucht, die Bindungsstelle von 7E3 auf MAC-1 näher zu beschreiben. Sie konnte in der I Domäne von α M (Gly 127-Phe 150) lokalisiert werden (Plescia et al. 1998), welche ebenfalls für die Bindung von iC3b, ICAM-1 und

Fibrinogen eine wichtige Rolle zu spielen scheint (Campbell et al. 1998; Zhou et al. 1994).

Interessanterweise konnte in einem homologen Modell postischämischer Infusion von Thrombozyten und PMN in isolierten Rattenherzen ein 4-facher Abfall der PMN Retention durch c7E3Fab Inkubation gezeigt werden (Campbell et al. 1999), ein Effekt, der in einem derartigen Modell wohl auf eine Störung der Interaktion von MAC-1 und ICAM-1 zurückzuführen ist (Habazettl et al. 1999).

Im Gegensatz zu den obigen Berichten, konnten Mickelson und Mitarbeiter (1999) eine direkte Interaktion von 7E3 respektive c7E3Fab mit MAC-1 nicht bestätigen. Zwar beobachteten sie eine verringerte CD11b Expression auf Neutrophilen nach Inkubation von Vollblutproben von PTCA Patienten mit c7E3Fab, jedoch fand sich flusszytometrisch keine direkte Bindung von FITC markierten c7E3Fab an isolierte neutrophile Granulozyten oder an Neutrophile in Vollblutproben. Eine Erklärung für den Abfall der MAC-1 Detektion nach c7E3Fab Inkubation könnte sein, dass es durch die Blockade der fibrinogenabhängigen Interaktion der beiden Zellkompartimente zu einer verringerten Aktivierung der Leukozyten durch Thrombozyten kommt und damit weniger MAC-1 exprimiert wird.

Es werden weitere Untersuchungen nötig sein, um die bisherigen Ergebnisse zur Frage der c7E3Fab- Kreuzreaktion mit MAC-1 zu präzisieren und letztlich ihre physiologische Relevanz zu beurteilen.

4.3. Thrombozyten-Leukozyten Interaktion und ihre Relevanz im Rahmen perkutaner transluminaler Koronarangioplastie

Das Auftreten von Restenosen stellt bisher die größte Limitierung aller perkutanen koronaren Revaskularisierungsmaßnahmen dar und führt zu anhaltenden Angina pectoris Symptomen und zu wiederholten Interventionen in bis zu 40 % der Patienten innerhalb von 6 Monaten (Serruys et al. 1988; Kuntz et al. 1993). Die EPIC Studie (1994) hat gezeigt, dass ein Bolus und eine Infusion über 12 Stunden mit dem GPIIb/IIIa Inhibitor c7E3Fab die akuten ischämischen Komplikationen nach Koronarangioplastie um 35% senkt, ein Effekt, der vor allem auf die Fähigkeit von c7E3Fab zurückzuführen ist, die Thrombozytenaggregation durch Blockade der Fibrinogen-GPIIb/IIIa Interaktion zu inhibieren. Wie wir in der vorliegenden Studie gezeigt haben, verhindert c7E3Fab nicht nur die Thrombozytenaggregation

(Abbildung 12) und damit die Thrombusformation und die Entstehung von Restenosen, sondern inhibiert auch die fibrinogenabhängige Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten (Abbildung 8 und 11) und führt damit zu einer verringerten Aktivierung von MAC-1 auf PMN (Abbildung 7) und möglicherweise zu einer Abschwächung MAC-1 vermittelten Prozesse, wie z.B. Endotheladhäsion, Adhäsion an die extrazelluläre Matrix und Bindung von iC3b und Faktor X. Letzteres führt zu einer von Gewebefaktor und Faktor VII unabhängigen Aktivierung von Faktor X und damit zur raschen Bildung von Fibrin (Altieri et al. 1988). Interessanterweise konnte die Entstehung von Restenosen in Experimenten mit einem A. Carotis-Läsionsmodell durch Antikörper gegen MAC-1 verringert werden (Rogers et al. 1998).

Auch in klinischen Studien wurden bereits Zusammenhänge zwischen dem Auftreten von Restenosen und der Interaktion von PMN und Thrombozyten vermutet (Habazettl et al. 1999). Man fand darüber hinaus bei Patienten mit klinischen Komplikationen nach PTCA, sowohl vor als auch nach Angioplastie, höhere Werte für die Expression von CD11b auf Leukozyten und eine höhere Prozentzahl an Leukozyten/Plättchen Koaggregaten im Vergleich zu Patienten, die keine Komplikation erlitten (Mickelson et al. 1996). Die Behandlung von PTCA-Patienten mit c7E3Fab führte zu einer verringerten Zahl an Leukozyten mit gebundenen Thrombozyten und verringerte die CD11b Expression (Altieri 1993). Neumann und Mitarbeiter (1999) untersuchten die Wirkung von c7E3Fab bei Patienten mit akuten Myokardinfarkt. Nach 24 und 72 Stunden Reperfusion reduzierte Abciximab signifikant die Thrombozyten-Leukozyten Interaktion durch Verminderung der Plättchenmasse in den Koaggregaten, während die Prozentzahl von Leukozyten mit gebundenen Thrombozyten nicht verändert wurde. Zudem wurde in der Abciximab-Gruppe eine signifikante Verringerung der Oberflächenexpression von MAC-1 beobachtet. Dies könnte mit der verminderten Thrombozytenadhäsion an Leukozyten und der damit verbundenen reduzierten parakrinen oder direkten Rezeptorstimulation zusammenhängen (Hidari et al. 1997). Anders formuliert, bekräftigt diese Beobachtung die These, dass die Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten zur Hochregulation der MAC-1-Expression bei Patienten mit akuten Myokardinfarkt beiträgt. In einer früheren Studie konnte bereits gezeigt werden, dass Abciximab, im Vergleich zur Standard-Heparin-Behandlung, nach Stentimplantation bei Patienten mit akuten Myokardinfarkt die mikrovaskuläre Perfusion verbessert und damit zu

einer gesteigerten Erholung der kontraktilen Funktion des Infarktareals beiträgt (Neumann et al. 1999).

5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu zeigen, ob Fibrinogen im reperfundierte Herzen die Interaktion von Thrombozyten und polymorphekernigen Granulozyten (PMN), sowie die Ausbildung von Thrombozyten-PMN Koaggregaten verstärkt. Zudem war von Interesse, ob diese Koaggregate zum Reperfusionsschaden beitragen und inwieweit der GPIIb/IIIa Rezeptor Antagonist Abciximab (c7E3Fab) die PMN-Thrombozyten Interaktion inhibiert und dadurch den myokardialen Reperfusionsschaden verhindert.

Die Expression von MAC-1 auf PMN und GPIIb/IIIa auf Thrombozyten wurde mit Hilfe monoklonaler Antikörper gegen CD11b und CD41 im FACS gemessen. Die Versuche erfolgten vor und nach der Koronarpassage durch ein postischämisches isoliertes Meerschweinchenherz, sowie mit und ohne c7E3Fab/LPM19c Inkubation. PMN/Thrombozytenkoaggregate wurden im koronaren Effluat mittels Flusszytometrie und im koronaren Gefäßsystem durch Videofluoreszenzmikroskopie quantitativ und qualitativ untersucht. Die Erholung der externen Herzarbeit wurde an Herzen ohne Zellinfusion, mit Infusion von Thrombozyten und PMN, sowie mit zusätzlicher c7E3Fab beziehungsweise LPM19c Inkubation bestimmt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Reperfusion von ischämischem Myokard die fibrinogenabhängige Interaktion von PMN und Thrombozyten verstärkt. Über die Fibrinogenrezeptoren GPIIb/IIIa auf Thrombozyten und MAC-1 auf PMN kommt es zur Ausbildung von Koaggregaten. Die Analysen der epikardialen Mikrozirkulation mit Hilfe der Doppelfluoreszenzmikroskopie zeigten, dass sowohl homogene Thrombozytenaggregate, als auch heterogene PMN-Thrombozyten Koaggregate im Kapillarsystem reteniert werden. Der durch die PMN-Thrombozyten Interaktion verursachte funktionelle Schaden, konnte in Anwesenheit der Fibrinogenrezeptor Antikörper c7E3Fab (GPIIb/IIIa, Thrombozyten) und LPM19c (MAC-1, PMN) verhindert werden.

Die dargestellten Untersuchungen bestätigten die Beteiligung von Thrombozyten am Reperfusionsschaden. Im Mittelpunkt stand dabei die Bindung von GPIIb/IIIa auf Thrombozyten über Fibrinogen als Brückenmolekül an MAC-1 auf PMN. Allerdings wurde die Bildung von Koaggregaten auch in Abwesenheit von Fibrinogen beobachtet, was auf mögliche alternative Interaktionsmechanismen schließen lässt.

Weiterhin wurde beobachtet, dass c7E3Fab zwar nicht direkt mit dem für die MAC-1 Detektion verwendeten Antikörper konkurriert, aber die Hochregulation von MAC-1 nach Koronarpassage und die Bindung von Fibrinogen an PMN abschwächt. Eine Erklärung für den Abfall der MAC-1 Detektion nach c7E3Fab Inkubation könnte sein, dass es durch die Blockade der fibrinogenabhängigen Interaktion der beiden Zellkompartimente zu einer verringerten Aktivierung der Leukozyten durch Thrombozyten kommt und damit weniger MAC-1 exprimiert wird. c7E3Fab verhindert die Thrombozytenaggregation, inhibiert die fibrinogenabhängige Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten und trägt so möglicherweise zu einer verringerten Aktivierung von MAC-1 auf PMN bei.

6. Literaturverzeichnis

Altieri DC. Coagulation assembly on leukocytes in transmembrane signaling and cell adhesion. *Blood* 1993; 81(3):569-579.

Altieri DC, Edgington TS. A monoclonal antibody reacting with distinct adhesion molecules defines a transition in the functional state of the receptor CD11b/CD18 (Mac-1). *J Immunol* 1988; 141(8):2656-2660.

Altieri DC, Morrissey JH, Edgington TS. Adhesive receptor Mac-1 coordinates the activation of factor X on stimulated cells of monocytic and myeloid differentiation: an alternative initiation of the coagulation protease cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85(20):7462-7466.

Aziz KA, Cawley JC, Treweeke AT, Zuzel M. Sequential potentiation and inhibition of PMN reactivity by maximally stimulated platelets. *J Leukoc Biol* 1997; 61(3):322-328.

Barroso-Aranda J, Schmid-Schonbein GW. Transformation of neutrophils as indicator of irreversibility in hemorrhagic shock. *Am J Physiol* 1989; 257(3 Pt 2):H846-H852.

Bennett JS. Structural biology of glycoprotein IIb-IIIa. *Trends Cardiovasc Med* 1996;6:31-36

Bienvenu K, Granger DN. Molecular determinants of shear rate-dependent leukocyte adhesion in postcapillary venules. *Am J Physiol* 1993; 264(5 Pt 2):H1504-H1508.

Bolli R, Patel BS, Hartley CJ, Thornby JI, Jeroudi MO, Roberts R. Nonuniform transmural recovery of contractile function in stunned myocardium. *Am J Physiol* 1989; 257(2 Pt 2):H375-H385.

Braunwald E, Kloner RA. The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation* 1982; 66(6):1146-1149.

Brenner B, Gulbins E, Schlottmann K, Koppenhoefer U, Busch GL, Walzog B et al. L-selectin activates the Ras pathway via the tyrosine kinase p56lck. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(26):15376-15381.

Campbell JJ, Hedrick J, Zlotnik A, Siani MA, Thompson DA, Butcher EC. Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science* 1998; 279(5349):381-384.

Campbell B, Chuhran CM, Lefer DJ, Lefer AM. Cardioprotective effects of abciximab (ReoPro) in an isolated perfused rat heart model of ischemia and reperfusion. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1999; 21(8):529-534.

Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994; 84(7):2068-2101.

Carlos TM, Harlan JM. Membrane proteins involved in phagocyte adherence to endothelium. *Immunol Rev* 1990; 114:5-28.:5-28.

Chow TW, Hellums JD, Moake JL, Kroll MH. Shear stress-induced von Willebrand factor binding to platelet glycoprotein Ib initiates calcium influx associated with aggregation. *Blood* 1992; 80(1):113-120.

Coller BS, Peerschke EI, Scudder LE, Sullivan CA. A murine monoclonal antibody that completely blocks the binding of fibrinogen to platelets produces a thrombasthenic-like state in normal platelets and binds to glycoproteins IIb and/or IIIa. *J Clin Invest* 1983; 72(1):325-338.

Coller BS. A new murine monoclonal antibody reports an activation-dependent change in the conformation and/or microenvironment of the platelet glycoprotein IIb/IIIa complex. *J Clin Invest* 1985; 76(1):101-108.

Diacovo TG, Roth SJ, Buccola JM, Bainton DF, Springer TA. Neutrophil rolling, arrest, and transmigration across activated, surface-adherent platelets via se-

quential action of P-selectin and the beta 2-integrin CD11b/CD18. *Blood* 1996; 88(1):146-157.

Diamond MS, Garcia-Aguilar J, Bickford JK, Corbi AL, Springer TA. The I domain is a major recognition site on the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) for four distinct adhesion ligands. *J Cell Biol* 1993; 120(4):1031-1043.

Dormandy TL. Free-radical oxidation and antioxidants. *Lancet* 1978; 1(8065):647-650.

Dustin ML, Springer TA. Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells. *J Cell Biol* 1988; 107(1):321-331.

Engler RL, Schmid-Schonbein GW, Pavelec RS. Leukocyte capillary plugging in myocardial ischemia and reperfusion in the dog. *Am J Pathol* 1983; 111(1):98-111.

Engler RL, Dahlgren MD, Morris DD, Peterson MA, Schmid-Schonbein GW. Role of leukocytes in response to acute myocardial ischemia and reflow in dogs. *Am J Physiol* 1986; 251(2 Pt 2):H314-H323.

The EPIC Investigators. Use of a monoclonal antibody directed against the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor in high-risk coronary angioplasty. *N Engl J Med* 1994; 330:956-961.

Evangelista V, Piccardoni P, White JG, de Gaetano G, Cerletti C. Cathepsin G-dependent platelet stimulation by activated polymorphonuclear leukocytes and its inhibition by antiproteinases: role of P-selectin-mediated cell-cell adhesion. *Blood* 1993; 81(11):2947-2957.

Evangelista V, Manarini S, Rotondo S, Martelli N, Polischuk R, McGregor JL et al. Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction in dynamic conditions: evi-

dence of adhesion cascade and cross talk between P-selectin and the beta 2 integrin CD11b/CD18. *Blood* 1996; 88(11):4183-4194.

Evangelista V, Manarini S, Sideri R, Rotondo S, Martelli N, Piccoli A et al. Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction: P-selectin triggers protein-tyrosine phosphorylation-dependent CD11b/CD18 adhesion: role of PSGL-1 as a signaling molecule. *Blood* 1999; 93(3):876-885.

Fishbein MC, Maclean D, Maroko PR. The histopathologic evolution of myocardial infarction. *Chest* 1978; 73(6):843-849.

Gallatin WM, Weissman IL, Butcher EC. A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature* 1983; 304(5921):30-34.

Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Koch W, Laugwitz KL, Adelsberger H et al. Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation* 1998; 98(12):1164-1171.

Geng JG, Bevilacqua MP, Moore KL, McIntyre TM, Prescott SM, Kim JM et al. Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature* 1990; 343(6260):757-760.

Gerber BL, Rochitte CE, Melin JA, McVeigh ER, Bluemke DA, Wu KC et al. Microvascular obstruction and left ventricular remodeling early after acute myocardial infarction. *Circulation* 2000; 101(23):2734-2741.

Ginsberg MH, Loftus JC, Plow EF. Cytoadhesins, integrins, and platelets. *Thromb Haemost* 1988; 59(1):1-6.

Golino P, Ashton JH, McNatt J, Glas-Greenwalt P, Yao SK, O'Brien RA et al. Simultaneous administration of thromboxane A2- and serotonin S2-receptor antagonists markedly enhances thrombolysis and prevents or delays reocclusion after tissue-type plasminogen activator in a canine model of coronary thrombosis. *Circulation* 1989; 79(4):911-919.

Griffin JD, Spertini O, Ernst TJ, Belvin MP, Levine HB, Kanakura Y et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines regulate surface expression of the leukocyte adhesion molecule-1 on human neutrophils, monocytes, and their precursors. *J Immunol* 1990; 145(2):576-584.

Grines CL, Browne KF, Marco J, Rothbaum D, Stone GW, O'Keefe J et al. A comparison of immediate angioplasty with thrombolytic therapy for acute myocardial infarction. The Primary Angioplasty in Myocardial Infarction Study Group. *N Engl J Med* 1993; 328(10):673-679.

Habazettl H, Palmisano BW, Bosnjak ZJ, Stowe DF. Initial reperfusion with 2,3 butanedione monoxime is better than hyperkalemic reperfusion after cardioplegic arrest in isolated guinea pig hearts. *Eur J Cardiothorac Surg* 1996; 10(10):897-904.

Habazettl H, Kupatt C, Zahler S, Becker BF, Messmer K. Selectins and beta 2-integrins mediate post-ischaemic venular adhesion of polymorphonuclear leukocytes, but not capillary plugging, in isolated hearts. *Pflugers Arch* 1999; 438(4):479-485.

Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B. Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975; 72(8):2994-2998.

Harris AG, Skalak TC. Leukocyte cytoskeletal structure determines capillary plugging and network resistance. *Am J Physiol* 1993; 265(5 Pt 2):H1670-H1675.

Hidari KI, Weyrich AS, Zimmerman GA, McEver RP. Engagement of P-selectin glycoprotein ligand-1 enhances tyrosine phosphorylation and activates mitogen-activated protein kinases in human neutrophils. *J Biol Chem* 1997; 272(45):28750-28756.

Huber AR, Kunkel SL, Todd RF, III, Weiss SJ. Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science* 1991; 254(5028):99-102.

Jennings RB, Steenbergen C, Jr., Reimer KA. Myocardial ischemia and reperfusion. Monogr Pathol 1995; 37:47-80.:47-80.

Jolly SR, Kane WJ, Bailie MB, Abrams GD, Lucchesi BR. Canine myocardial reperfusion injury. Its reduction by the combined administration of superoxide dismutase and catalase. Circ Res 1984; 54(3):277-285.

Jolly SR, Kane WJ, Hook BG, Abrams GD, Kunkel SL, Lucchesi BR. Reduction of myocardial infarct size by neutrophil depletion: effect of duration of occlusion. Am Heart J 1986; 112(4):682-690.

Jung TM, Dailey MO. Rapid modulation of homing receptors (gp90MEL-14) induced by activators of protein kinase C. Receptor shedding due to accelerated proteolytic cleavage at the cell surface. J Immunol 1990; 144(8):3130-3136.

Jutila MA, Rott L, Berg EL, Butcher EC. Function and regulation of the neutrophil MEL-14 antigen in vivo: comparison with LFA-1 and MAC-1. J Immunol 1989; 143(10):3318-3324.

Kirchhofer D, Riederer MA, Baumgartner HR. Specific accumulation of circulating monocytes and polymorphonuclear leukocytes on platelet thrombi in a vascular injury model. Blood 1997; 89(4):1270-1278.

Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB. The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. J Clin Invest 1974; 54(6):1496-1508.

Kishimoto TK, Jutila MA, Berg EL, Butcher EC. Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. Science 1989; 245(4923):1238-1241.

Kuntz RE, Gibson CM, Nobuyoshi M, Baim DS. Generalized model of restenosis after conventional balloon angioplasty, stenting and directional atherectomy. J Am Coll Cardiol 1993; 21(1):15-25.

Kupatt C, Habazettl H, Zahler S, Weber C, Becker BF, Messmer K et al. ACE-inhibition prevents postischemic coronary leukocyte adhesion and leukocyte-dependent reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1997; 36(3):386-395.

Kupatt C, Weber C, Wolf DA, Becker BF, Smith TW, Kelly RA. Nitric oxide attenuates reoxygenation-induced ICAM-1 expression in coronary microvascular endothelium: role of NFkappaB. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29(10):2599-2609.

Lampugnani MG, Giorgi M, Gaboli M, Dejana E, Marchisio PC. Endothelial cell motility, integrin receptor clustering, and microfilament organization are inhibited by agents that increase intracellular cAMP. *Lab Invest* 1990; 63(4):521-531.

Languino LR, Plescia J, Duperray A, Brian AA, Plow EF, Geltosky JE et al. Fibrinogen mediates leukocyte adhesion to vascular endothelium through an ICAM-1-dependent pathway. *Cell* 1993; 73(7):1423-1434.

Lawrence MB, Springer TA. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* 1991; 65(5):859-873.

Lefer AM. Role of selectins in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 1995; 60(3):773-777.

Lefer AM, Campbell B, Scalia R, Lefer DJ. Synergism between platelets and neutrophils in provoking cardiac dysfunction after ischemia and reperfusion: role of selectins. *Circulation* 1998; 98(13):1322-1328.

Lefer DJ, Shandelya SM, Serrano CV, Jr., Becker LC, Kuppusamy P, Zweier JL. Cardioprotective actions of a monoclonal antibody against CD-18 in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 1993; 88(4 Pt 1):1779-1787.

Ley K, Tedder TF, Kansas GS. L-selectin can mediate leukocyte rolling in untreated mesenteric venules in vivo independent of E- or P-selectin. *Blood* 1993; 82(5):1632-1638.

Ley K, Gaehtgens P, Fennie C, Singer MS, Lasky LA, Rosen SD. Lectin-like cell adhesion molecule 1 mediates leukocyte rolling in mesenteric venules in vivo. *Blood* 1991; 77(12):2553-2555.

Lo SK, Janakidevi K, Lai L, Malik AB. Hydrogen peroxide-induced increase in endothelial adhesiveness is dependent on ICAM-1 activation. *Am J Physiol* 1993; 264(4 Pt 1):L406-L412.

Lorant DE, Patel KD, McIntyre TM, McEver RP, Prescott SM, Zimmerman GA. Coexpression of GMP-140 and PAF by endothelium stimulated by histamine or thrombin: a juxtacrine system for adhesion and activation of neutrophils. *J Cell Biol* 1991; 115(1):223-234.

Lucchesi BR. Complement, neutrophils and free radicals: mediators of reperfusion injury. *Arzneimittelforschung* 1994; 44(3A):420-432.

Ma XL, Tsao PS, Lefer AM. Antibody to CD-18 exerts endothelial and cardiac protective effects in myocardial ischemia and reperfusion. *J Clin Invest* 1991; 88(4):1237-1243.

Maes A, van de Werf F, Nuyts J, Bormans G, Desmet W, Mortelmanns L. Impaired myocardial tissue perfusion early after successful thrombolysis. *Circulation* 1995; 92:2072-2078.

Maugeri N, Evangelista V, Celardo A, Dell'Elba G, Martelli N, Piccardoni P et al. Polymorphonuclear leukocyte-platelet interaction: role of P-selection in thromboxane B2 and leukotriene C4 cooperative synthesis. *Thromb Haemost* 1994; 72(3):450-456.

Mayadas TN, Johnson RC, Rayburn H, Hynes RO, Wagner DD. Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice. *Cell* 1993; 74(3):541-554.

Mazzoni MC, Borgstrom P, Intaglietta M, Arfors KE. Lumenal narrowing and endothelial cell swelling in skeletal muscle capillaries during hemorrhagic shock. *Circ Shock* 1989; 29(1):27-39.

McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985; 312(3):159-163.

McEver RP. Leukocyte interactions mediated by selectins. *Thromb Haemost* 1991; 66(1):80-87.

Mickelson JK, Ali MN, Kleiman NS, Lakkis NM, Chow TW, Hughes BJ et al. Chimeric 7E3 Fab (ReoPro) decreases detectable CD11b on neutrophils from patients undergoing coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1999; 33(1):97-106.

Mickelson JK, Lakkis NM, Villarreal-Levy G, Hughes BJ, Smith CW. Leukocyte activation with platelet adhesion after coronary angioplasty: a mechanism for recurrent disease? *J Am Coll Cardiol* 1996; 28(2):345-353.

Neumann FJ, Ott I, Gawaz M, Richardt G, Holzapfel H, Jochum M et al. Cardiac release of cytokines and inflammatory responses in acute myocardial infarction. *Circulation* 1995; 92(4):748-755.

Neumann FJ, Marx N, Gawaz M, Brand K, Ott I, Rokitta C et al. Induction of cytokine expression in leukocytes by binding of thrombin-stimulated platelets. *Circulation* 1997; 95(10):2387-2394.

Neumann FJ, Zohlnhofer D, Fakhoury L, Ott I, Gawaz M, Schomig A. Effect of glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade on platelet-leukocyte interaction and surface expression of the leukocyte integrin Mac-1 in acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34(5):1420-1426.

Neumann FJ, Blasini R, Schmitt C, Alt E, Dirschinger J, Gawaz M et al. Effect of glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade on recovery of coronary flow and left ventricular function after the placement of coronary-artery stents in acute myocardial infarction. *Circulation* 1998; 98:2695-2701.

Opie LH. Role of calcium and other ions in reperfusion injury. *Cardiovasc Drugs Ther* 1991; 5 Suppl 2:237-47.:237-247.

Ott I, Neumann FJ, Gawaz M, Schmitt M, Schömig A. Increased neutrophil-platelet adhesion in patients with unstable angina. *Circulation* 1996; 94(6):1239-1246.

Palluy O, Morliere L, Gris JC, Bonne C, Modat G. Hypoxia/reoxygenation stimulates endothelium to promote neutrophil adhesion. *Free Radic Biol Med* 1992; 13(1):21-30.

Phillips DR, Charo IF, Parise LV, Fitzgerald LA. The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood* 1988; 71(4):831-843.

Piper HM, Balser C, Ladilov YV, Schafer M, Siegmund B, Ruiz-Meana M et al. The role of Na⁺/H⁺ exchange in ischemia-reperfusion. *Basic Res Cardiol* 1996; 91(3):191-202.

Piper HM, Siegmund B, Ladilov YV, Schluter KD. Myocardial protection during reperfusion. *Thorac Cardiovasc Surg* 1996; 44(1):15-19.

Plescia J, Conte MS, VanMeter G, Ambrosini G, Altieri DC. Molecular identification of the cross-reacting epitope on alphaM beta2 integrin I domain recognized by anti-alphaIIb beta3 monoclonal antibody 7E3 and its involvement in leukocyte adherence. *J Biol Chem* 1998; 273(32):20372-20377.

Rogers C, Edelman ER, Simon DI. A mAb to the beta2-leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) reduces intimal thickening after angioplasty or stent implantation in rabbits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(17):10134-10139.

Romson JL, Hook BG, Rigot VH, Schork MA, Swanson DP, Lucchesi BR. The effect of ibuprofen on accumulation of indium-111-labeled platelets and leukocytes in experimental myocardial infarction. *Circulation* 1982; 66(5):1002-1011.

Rot A. Endothelial cell binding of NAP-1/IL-8: role in neutrophil emigration. *Immunol Today* 1992; 13(8):291-294.

Schleiffenbaum B, Spertini O, Tedder TF. Soluble L-selectin is present in human plasma at high levels and retains functional activity. *J Cell Biol* 1992; 119(1):229-238.

Schmid-Schoenbein GW, Fung YC, Zweifach BW. Vascular endothelium-leukocyte interaction; sticking shear force in venules. *Circ Res* 1975; 36(1):173-184.

Seccombe JF, Schaff HV. Coronary artery endothelial function after myocardial ischemia and reperfusion. *Ann Thorac Surg* 1995; 60(3):778-788.

Sellak H, Franzini E, Hakim J, Pasquier C. Reactive oxygen species rapidly increase endothelial ICAM-1 ability to bind neutrophils without detectable upregulation. *Blood* 1994; 83(9):2669-2677.

Serruys PW, Luijten HE, Beatt KJ, Geuskens R, de Feyter PJ, van den BM et al. Incidence of restenosis after successful coronary angioplasty: a time-related phenomenon. A quantitative angiographic study in 342 consecutive patients at 1, 2, 3, and 4 months. *Circulation* 1988; 77(2):361-371.

Shen I, Verrier ED. Expression of E-selectin on coronary endothelium after myocardial ischemia and reperfusion. *J Card Surg* 1994; 9(3 Suppl):437-441.

Simon DI, Xu H, Ortlepp S, Rogers C, Rao NK. 7E3 monoclonal antibody directed against the platelet glycoprotein IIb/IIIa cross-reacts with the leukocyte integrin Mac-1 and blocks adhesion to fibrinogen and ICAM-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17(3):528-535.

Spangenberg P, Redlich H, Bergmann I, Losche W, Gotzrath M, Kehrel B. The platelet glycoprotein IIb/IIIa complex is involved in the adhesion of activated platelets to leukocytes. *Thromb Haemost* 1993; 70(3):514-521.

Stocks J, Gutteridge JM, Sharp RJ, Dormandy TL. The inhibition of lipid autoxidation by human serum and its relation to serum proteins and alpha-tocopherol. *Clin Sci Mol Med* 1974; 47(3):223-233.

Suryapranata H, van't Hof AW, Hoorntje JC, de Boer MJ, Zijlstra F. Randomized comparison of coronary stenting with balloon angioplasty in selected patients with acute myocardial infarction. *Circ* 1998; 97(25):2502-2505.

von Andrian UH, Chambers JD, McEvoy LM, Bargatze RF, Arfors KE, Butcher EC. 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 U S A* 1991; 88(17):7538-7542.

Walzog B, Offermanns S, Zakrzewicz A, Gaehtgens P, Ley K. Beta2 integrins mediate protein tyrosine phosphorylation in human neutrophils. *J Leukoc Biol* 1996; 59(5):747-753.

Warnock RA, Askari S, Butcher EC, von Andrian UH. Molecular mechanisms of lymphocyte homing to peripheral lymph nodes. *J Exp Med* 1998; 187(2):205-216.

Watson SR, Fennie C, Lasky LA. Neutrophil influx into an inflammatory site inhibited by a soluble homing receptor-IgG chimaera. *Nature* 1991; 349(6305):164-167.

Weber C, Springer TA. Neutrophil accumulation on activated, surface-adherent platelets in flow is mediated by interaction of Mac-1 with fibrinogen bound to $\alpha IIb\beta 3$ and stimulated by platelet-activating factor. *J Clin Invest* 1997; 100(8):2085-2093.

Winn R, Vedder N, Ramamoorthy C, Sharar S, Harlan J. Endothelial and leukocyte adhesion molecules in inflammation and disease. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1998; 9 Suppl 2:S17-23.:S17-S23.

Wright SD, Weitz JI, Huang AJ, Levin SM, Silverstein SC, Loike JD. Complement receptor type three (CD11b/CD18) of human polymorphonuclear leukocytes recognizes fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85(20):7734-7738.

Yeo EL, Sheppard JA, Feuerstein IA. 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* 1994; 83(9):2498-2507.

Zhou L, Lee DH, Plescia J, Lau CY, Altieri DC. Differential ligand binding specificities of recombinant CD11b/CD18 integrin I-domain. *J Biol Chem* 1994; 269(25):17075-17079.

Zijlstra F, de Boer MJ, Hoornje JC, Reiffers S, Reiber JH, Suryapranata H. A comparison of immediate coronary angioplasty with intravenous streptokinase in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 1993; 328(10):680-684.

Zimmerman GA, McIntyre TM, Mehra M, Prescott SM. Endothelial cell-associated platelet-activating factor: a novel mechanism for signaling intercellular adhesion. *J Cell Biol* 1990; 110(2):529-540.

Zweier JL, Fertmann J, Wei G. Nitric oxide and peroxynitrite in postischemic myocardium. *Antioxid Redox Signal* 2001; 3(1):11-22.

7. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der 1. Medizinischen Klinik des Klinikum Großhadern (Direktor Prof. Dr. med. G. Steinbeck) durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. med. P. Boekstegers danke ich für die Überlassung des Themas und für die Unterstützung, die ich in seiner Arbeitsgruppe erfuhr.

Herrn PD Dr. med. C. Kupatt danke ich für die engagierte Betreuung. Seine fachliche Kompetenz, seine ungebremste Motivation und die Geduld, die er mir entgegen gebracht hat, haben entscheidend zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. B.F. Becker danke ich für die Möglichkeit, die Laborräume im Physiologischen Institut der LMU für meine Arbeit zu nutzen sowie für die hilfreichen Anregungen und Diskussionen im Verlauf der Experimente.

Herrn Prof. Dr. med. H. Habazettl danke ich für die zu Verfügung gestellten Laborräume am Institut für Chirurgische Forschung der LMU, für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Versuche und insbesondere für die fachlich Kompetente und freundschaftliche Betreuung bei der Ausarbeitung meines Vortrags für die 3. Chirurgischen Forschungstage in Marburg.

Herrn Dr. med. R. Wichels danke ich für seine unermüdliche Einsatzbereitschaft und seinen Humor bei der Durchführung der Versuche.

Zuletzt möchte ich an dieser Stelle die Gelegenheit ergreifen und mich ganz herzlich bei meinen Eltern bedanken, die mir das Studium und die Durchführung dieser Promotion ermöglicht haben.

8. Curriculum Vitae

Persönliche Daten:

Name: Peter Daniel Hanusch
Geburtsdatum: 24.06.1975
Geburtsort: Wasserburg am Inn, Deutschland
Familie: Dr. med. Peter Hanusch (*1940)
Stanislava Hanusch (*1945)
Claus Hanusch (*1972)

Ausbildung:

Schulzeit:

1981 – 1985 Grundschule Edling
1985 – 1994 Gymnasium Wasserburg/Inn
1994 Allgemeine Hochschulreife

Universität:

1995 – 2001 Studium der Humanmedizin
Ludwig-Maximilians-Universität München

Berufliche Tätigkeit:

März 2002 – August 2003

Arzt im Praktikum, Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Ludwig-Maximilians-Universität München
(Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. K. Peter)

Seit September 2003

Assistensarzt, Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin,
Ludwig-Maximilians-Universität München
(Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. K. Peter)