

Aus dem Institut für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

**ANALYSE DES EINFLUSSES VON ANTITHROMBIN AUF DIE
MIKROVASKULÄRE THROMBOSE IN DER MAUS:
ANTI-INFLAMMATION ODER ANTIKOAGULATION?**



*Inauguraldissertation zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock*

vorgelegt von

Julius Hoffmann

aus Leipzig

Rostock, 14. August 2013

DEKAN: Herr Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

1. GUTACHTER: Frau Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar
Institut für Experimentelle Chirurgie und zentrale Versuchstierhaltung, Universität Rostock

2. GUTACHTER: Herr Prof. Dr. med. Johannes Hoffmann
Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationsmedizin, Universitätsklinikum Essen

3. GUTACHTER: Herr PD. Dr. med. habil. Jan-Patrick Roesner
Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Universitätsklinikum Rostock

Tag der Verteidigung: 08.04.2014

**Meiner Familie und Freunden gewidmet,
den Tieren zum Dank verpflichtet.**

„Res severa est verum gaudium“

Lucius Annaeus Seneca

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. EINLEITUNG	2
2.1. SEPSIS	2
2.1.1. PATHOPHYSIOLOGIE	3
2.1.2. INTERAKTION VON ENTZÜNDUNG UND GERINNUNG	4
2.1.3. AKTUELLE SEPSISTHERAPIE	6
2.2. ANTITHROMBIN	8
2.2.1. HISTORIE	8
2.2.2. WIRKMECHANISMEN	8
2.2.3. KLINISCHE RELEVANZ BEI SEPSIS	12
3. ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNG	14
4. MATERIAL UND METHODEN	15
4.1. VERSUCHSTIERE	15
4.2. CREMASTERMUSKELMODELL UND PRÄPARATION	15
4.3. UNTERSUCHUNGSTECHNIKEN	17
4.3.1. INTRAVITALMIKROSKOPIE	17
4.3.1.1. Fluoreszenzfarbstoffe	18
4.3.1.2. Intravitalmikroskopie des M. cremaster	18
4.3.1.3. Modell der Thrombose-Induktion	20
4.3.2. MIKROHÄMODYNAMISCHES MONITORING	21

4.3.2.1. Gefäßdurchmesser	21
4.3.2.2. Blutzellfließgeschwindigkeit	22
4.3.2.3. Wandscherrate	22
4.3.2.4. Thrombushöhe	22
4.3.2.5. Leukozyten-Endothelzell-Interaktion	23
4.4. IMMUNHISTOCHEMIE	23
4.5. HÄMATOLOGISCHE ANALYSEN	25
4.5.1. BLUTBILD	25
4.5.2. GERINNUNGSPARAMETER	25
4.5.3. PROSTAGLANDIN F1-ALPHA ELISA	26
4.6. EXPERIMENTELLES PROTOKOLL	26
4.6.1. VERSUCHSGRUPPEN	26
4.6.2. DOSIERUNGSREGIME	28
4.7. STATISTISCHE AUSWERTUNG	28
5. ERGEBNISSE	30
5.1. MIKROZIRKULATION UND THROMBOSE-INDUKTION IM CREMASTERMUSKEL DER MAUS	30
5.1.1. CHARAKTERISTIKA DER THROMBOGENESE	30
5.1.2. <i>PATENCY RATE</i>	32
5.2. KOMPLETTE GEFÄßOKKLUSION	33
5.3. MIKROHÄMODYNAMISCHES MONITORING	34
5.3.1. GEFÄßDURCHMESSER	35
5.3.2. BLUTZELLFLIEßGESCHWINDIGKEIT	36
5.3.3. WANDSCHERRATE	37
5.3.4. THROMBUSHÖHE	38
5.4. LEUKOZYTEN-ENDOTHELZELL-INTERAKTION	39
5.5. HÄMATOLOGISCHE ANALYSEN	41

5.5.1. BLUTBILD	41
5.5.2. GERINNUNGSPARAMETER	42
5.5.3. PROSTAGLANDIN F1-ALPHA	42
5.6. IMMUNHISTOCHEMIE	43
5.7. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	44
6. DISKUSSION	46
6.1. DISKUSSION VON MATERIAL UND METHODIK	46
6.1.1. DISKUSSION DES MODELLS ZUR THROMBOSE-INDUKTION	46
6.1.1.1 Cremastermuskelmodell	46
6.1.1.2. Methoden der Thrombose-Induktion	47
6.1.2. DISKUSSION DER UNTERSUCHUNGSTECHNIKEN	49
6.2. DISKUSSION DER ERGEBNISSE	50
6.3. ZUSAMMENFASSUNG UND KLINISCHE PERSPEKTIVEN	56
7. LITERATURVERZEICHNIS	59
DANKSAGUNG	VI
THESEN ZUR DISSERTATION	VII
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	X

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
γ	Wandscherrate
A.	<i>Arteria</i>
Abb.	Abbildung
APC	aktiviertes Protein C
AT	Antithrombin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CRP	C-reaktives Protein
d	Durchmesser
Da	Dalton
DIC	<i>dissiminated intravasal coagulation</i> , disseminierte intravasale Gerinnung,
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EPCR	endothelialer Protein C Rezeptor
et al.	et alii; und andere
FeCl ₃	Eisen(III)-Chlorid
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
GAG	Glykosaminoglykane

Hep	Heparin
IE	internationale Einheit
IFN	Interferon
IL	Interleukin
Indo	Indomethacin
kDa	Kilo Dalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
M	Mol
M.	<i>Musculus</i>
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol	Millimol
Mrd.	Milliarden
n	<i>Number, Anzahl</i>
NaCl	Natriumchlorid, 0,9%
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
p	statistisches Signifikanzniveau
PAI	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor

PAR	Protease-aktivierter Rezeptor
pCO ₂	Kohlenstoffdioxid-Partialdruck
PE	Polyethylen
pg	Pikogramm
PGI ₂	Prostazyklin
PTT	partielle Thromboplastinzeit
s	Sekunden
SEM	Standardabweichung
SIRS	<i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i>
Syn.	<i>Synonym</i>
Tab.	Tabelle
Temp.	Temperatur
TF	<i>Tissue</i> Faktor
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor-α
TrypAT	Tryptophan ⁴⁹ -blockiertes Antithrombin
U	Umdrehungen
u.a.	unter anderem
v	Geschwindigkeit
V.	<i>Vena</i>
vs.	<i>versus</i>
W	<i>Watt</i>
WBC	Leukozyten
z.B.	zum Beispiel

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Schematische Darstellung der Gerinnungskaskade.	9
Abbildung 2:	Schematische Darstellung der Modulation von Koagulation und Inflammation durch AT.	11
Abbildung 3:	Abbildung einer männlichen C57Bl/6J Maus.	15
Abbildung 4:	Fotographische Abbildung des ausgelagerten und präparierten M. cremaster der Maus.	17
Abbildung 5:	Fotographische Abbildung des Intravitalmikroskops.	19
Abbildung 6:	Intravitalmikroskopische Übersichtsaufnahme des Gefäßnetzwerkes im M. cremaster.	20
Abbildung 7:	Darstellung des experimentellen Versuchsablaufs.	28
Abbildung 8:	Intravitalmikroskopische Übersichtsaufnahmen eines mit FITC-Dextran (A) und mit Rhodamin 6G (B) angefärbten Gefäßabschnitts.	30
Abbildung 9:	Regressionsanalyse zwischen Fließgeschwindigkeit (mm/s) und Thrombushöhe (μm) in der Kontrollgruppe.	31
Abbildung 10:	Darstellung der <i>patency</i> Rate in einer kumulativen Überlebens-Kurve nach Thrombose-Induktion in Venolen des <i>M. cremaster</i> .	32
Abbildung 11:	Darstellung der Zeit (s) bis zur kompletten Gefäßokklusion nach Thrombose-Induktion in Venolen des <i>M. cremaster</i> .	34
Abbildung 12:	Repräsentative intravitalmikroskopische Abbildungen eines wachsenden Thrombus zu vier Untersuchungszeitpunkten in einer Venole des <i>M. cremaster</i> (FITC-Dextran Färbung).	35
Abbildung 13:	Darstellung der Fließgeschwindigkeit in den Venolen zu den Untersuchungszeiten nach Thrombose-Induktion.	36
Abbildung 14:	Darstellung der Wandscherrate in den Venolen zu den Untersuchungszeitpunkten nach Thrombose-Induktion.	37

Abbildung 15:	Darstellung der Thrombushöhe in den Venolen zu den Untersuchungszeitpunkten nach Thrombose-Induktion.	38
Abbildung 16:	Repräsentative intravitalmikroskopische Abbildungen eines wachsenden Thrombus zu vier Untersuchungszeitpunkten in einer Venole des <i>M. cremaster</i> (Rhodamin-6G Färbung).	39
Abbildung 17:	Darstellung der Fraktion rollender Leukozyten in den Venolen zu den Untersuchungszeitpunkten nach Thrombose-Induktion.	40
Abbildung 18:	Mikroskopische Bilder von drei Cremastermuskeln nach Färbung von Plasminogen Aktivator Inhibitor-1.	44
Abbildung 19:	Schematischer Überblick der Wirkmechanismen von AT, TrypAT und Heparin im mikrovaskulären System.	57
Tabelle 1:	Dosierungsregime für die sieben Versuchsgruppen.	27
Tabelle 2:	Systemisches Blutbild.	41
Tabelle 3:	Analyse der Gerinnungsparameter Fibrinogen, Quick und PTT im systemischen Blut.	42
Tabelle 4:	Quantitative Analyse von P-Selektin, E-Selektin und PAI-1 positiven Gefäßen.	43

1. ZUSAMMENFASSUNG

Die mikrovaskuläre Thrombose ist, beispielsweise bei Sepsis, von hoher klinischer Bedeutung. Der pathophysiologische Mechanismus ist jedoch noch nicht ausreichend verstanden. Antithrombin (AT) als intensiv erforschter endogener Mediator sowohl des koagulatorischen als auch inflammatorischen Systems wurde in der vorliegenden Studie verwendet, um die mikrovaskuläre Interaktion von Gerinnung und Entzündung genauer zu analysieren. Dabei stellte sich die Frage, ob AT über seinen antikoagulatorischen oder anti-inflammatorischen Wirkmechanismus die mikrovaskuläre Thrombose beeinflusst.

Unter Verwendung des Mikrozirkulationsmodells im *M. cremaster* der Maus wurde mittels Kombination der FeCl₃ Superfusion und dem *light-dye* Modell eine mikrovaskuläre Thrombose induziert. Als Hauptanalysemethode kam die Intravitalmikroskopie zum Einsatz, mit der verschiedene Parameter, wie die *patency* Rate und die komplette Okklusionsrate, erfasst wurden. Neben AT wurden Indomethacin, Heparin und Tryptophan⁴⁹-blockiertes AT (TrypAT) untersucht. TrypAT besitzt die Eigenschaft, keine Bindung mit endothelialen Glykosaminoglykanen (GAGs) eingehen zu können und somit die konsekutive Prostazyklinausschüttung aus den Endothelzellen zu verhindern. Auch Heparin inhibiert die Aktivierung der Endothelzellen. Indomethacin ist ein Inhibitor der Cyclooxygenase und verringert ebenfalls die systemische Prostazyklinkonzentration. Zur Analyse der Frage, inwiefern die antikoagulatorischen Effekte von AT von dessen anti-inflammatorischem Wirkpotential abhängen, wurden sieben Versuchsgruppen erstellt. Dabei kamen die erwähnten Substanzen, bzw. Kombinationen dieser, zum Einsatz.

Als Resultat der experimentellen Untersuchungen wurden signifikante Unterschiede in der anti-thrombogenen Wirkung von AT und den Versuchsgruppen, in denen die Prostazyklinausschüttung inhibiert wurde, festgestellt. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der antikoagulatorische Wirkeffekt von AT im mikrovaskulären System entscheidend von dessen anti-inflammatorischen Mechanismen der GAG-Interaktion samt konsekutiver Prostazyklinausschüttung abhängt. Diese Spezifizierung des Wirkprofils von AT charakterisiert weiterhin die enge Interaktion der antikoagulatorischen und anti-inflammatorischen Mechanismen im mikrovaskulären System.

2. EINLEITUNG

Die vorliegende tierexperimentelle Studie befasst sich mit der Interaktion von Inflammation und Koagulation im mikrovaskulären System. Diese Thematik ist von herausragender Bedeutung für das Verständnis und die Erforschung der Sepsis und damit assoziierten klinischen Syndromen, beispielsweise der disseminierten intravasalen Gerinnung (*DIC*).

2.1. SEPSIS

Sepsis ist die Bezeichnung für eine komplexe systemische Reaktion des Körpers auf eine Infektion. Hervorgerufen werden kann die Infektion durch den Befall eines Wirtsorganismus mit Bakterien, Viren, Pilzen, bzw. aufgrund der Exposition mit Toxinen. Dabei wird zwischen verschiedenen starken Ausprägungsformen und damit assoziierten Diagnosekriterien (entsprechend der ACCP/SCCM Konsensus Konferenz) der Erkrankung unterschieden (Reinhart et al., 2010):

Bakteriämie beschreibt das zeitweilige Vorhandensein von Bakterien im Blutsystem, ohne die Initiierung einer systemischen Immunantwort.

SIRS (*severe inflammatory response syndrome*) wird definiert als klinische Ausprägung von mindestens zwei der folgenden Kriterien:

Fieber (Temp. $>38^{\circ}\text{C}$) oder Hypothermie (Temp. $<36^{\circ}\text{C}$)

Tachykardie (Freq. $>90\text{ min}^{-1}$)

Tachypnoe (Freq. $>20\text{ min}^{-1}$) oder Hyperventilation ($\text{pCO}_2 <32\text{ mmHg}$)

Leukozytose ($>12 \times 10^9\text{ Zellen/l}$) oder Leukopenie ($<4 \times 10^9\text{ Zellen/l}$) oder $>10\%$ unreife neutrophile Granulozyten im Differentialblutbild.

Die notwendigen Kriterien für die Diagnose einer Sepsis sind der mikrobiologische oder klinische Nachweis einer Infektion zusammen mit der Diagnose eines SIRS. Aus einer Sepsiserkrankung kann sich über eine schwere Sepsis ein septischer Schock entwickeln. Gekennzeichnet ist eine schwere Sepsis durch den Nachweis der Infektion und des SIRS zusammen mit einer akuten Organdysfunktion. Der septische Schock ist die Kombination der Sepsiskriterien mit einem Schockgeschehen, bestehend aus Hypotension (arterieller systolischer Blutdruck $<90\text{ mmHg}$) für min-

destens eine Stunde, bzw. dem notwendigen Einsatz von Vasopressoren ohne anderweitig erklärbarer Ursache.

Die ätiologisch häufigsten Ursachen für septische Infektionen sind folgende Grunderkrankungen (Calandra & Cohen, 2005): Pneumonien, Infektionen intravaskulärer Katheter, Infektionen des Blutkreislaufs (z.B. infektiöse Endokarditis), intraabdominelle Infektionen, Urosepsis und chirurgische Wundinfektionen. Besonders gefährdet sind immunsupprimierte und ältere Patienten (Volk et al., 1996; Martin et al., 2006).

Die Sepsis ist sowohl epidemiologisch als auch wirtschaftlich für die Gesellschaft und das Gesundheitssystem von großer Bedeutung. Trotz intensiver klinischer und experimenteller Erforschung des septischen Krankheitsbildes und neuer Therapiemöglichkeiten ist die Inzidenz und Letalität unbefriedigend hoch. Sepsis und septischer Schock ist die dritthäufigste Todesursache nach akutem Myokardinfarkt und Herzinsuffizienz. In Deutschland werden jährlich über 150.000 Sepsiserkrankungen diagnostiziert, davon enden 60.000 Fälle letal. Die jährlichen Kosten der Behandlung schwerer Sepsis auf deutschen Intensivstationen betragen ca. 1,77 Mrd. Euro (Reinhart et al., 2006).

2.1.1. PATHOPHYSIOLOGIE

Die pathophysiologischen Mechanismen und Zusammenhänge des septischen Krankheitsbildes sind noch nicht vollständig erforscht. Dabei ist das detaillierte Verständnis der Krankheitsentstehung und -entwicklung die Voraussetzung zur Verbesserung der Therapieresultate. Einen eminenten Einfluss auf Entwicklung und Verlauf einer Sepsis haben erregerspezifische Faktoren wie Anzahl, Art, Pathogenität und Virulenz. Wichtiger scheint jedoch das individuelle Ausmaß der Immunreaktion des Organismus auf die Infektion zu sein (Volk et al., 1996; Bone et al., 1997; Holmes et al., 2003). So wird die Entwicklung von SIRS und Sepsis als Resultat einer inadäquaten Immunreaktion auf Infektionen betrachtet (Riedemann et al., 2003). Dabei kommt es zu Schädigungen von körpereigenen Zell- und Organsystemen (Sharif et al., 2007).

Am Anfang der Sepsiserkrankung kommt es als Reaktion auf die Infektion zur Aktivierung des Immunsystems, bestehend aus inflammatorischen und koagulatorischen Prozessen mit ihren zellulären und humoralen Komponenten. Die Bindung von (bakteriellen) Antigenen an Oberflächenrezeptoren von Monozyten und Makrophagen

initiiert über diverse Signaltransduktions-Kaskaden die Transkription und Liberation von pro-inflammatorischen Zytokinen. Dabei sind primär die Zytokine Tumor Nekrose Faktor (TNF)- α , Interleukin (IL)-1, IL-6, IL-8 und Interferon (IFN)- γ für die klinischen Symptome verantwortlich (Hesse et al., 1988; Spooner et al., 1992; Hotchkiss & Karl, 2003). Die lokalen Effekte umfassen u.a. Förderung der Phagozytose, Produktion von Sauerstoffradikalen und Entzündungsmediatoren, Vasokonstriktion und Vasodilatation sowie Erhöhung der Gefäßpermeabilität. Auch aktivieren die pro-inflammatorischen Mediatoren Leukozyten, welche über Rezeptoren mit dem Gefäßendothel interagieren, adhären und emigrieren und somit die spezifische Immunabwehr aktivieren.

Neben der Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen kommt es auch zur Produktion anti-inflammatorischer Zytokine (IL-10, TGF- β , IL-1RA) (Holmes et al., 2003), um der Immunantwort auf den Stimulus im Sinne einer Gegenreaktion zu begegnen (Kamimura et al., 2005). Durch den Verbrauch der pro-inflammatorischen Zytokine (Pugin, 2007), der Apoptose von Lymphozyten (Hotchkiss et al., 2005) und einem Übergewicht anti-inflammatorischer Mediatoren kann sich der initialen hyperinflammatorischen Phase eine hypo-inflammatorische Immunsuppression anschließen. Dabei besteht die Gefahr, dass der Organismus nicht mehr fähig ist adäquat auf Infektionen zu reagieren und hieraus konsekutiv ein septisches Multiorganversagen resultieren kann.

2.1.2. INTERAKTION VON ENTZÜNDUNG UND GERINNUNG

Die Aktivierung des Gerinnungssystems spielt bei der Sepsis eine wichtige Rolle. So können bei der Mehrheit der *SIRS* Patienten Anomalitäten des Gerinnungssystems beobachtet werden. Die Bandbreite der möglichen Gerinnungsstörungen ist sehr variabel und reicht von einer isolierten Thrombozytopenie bis zu hämorrhagischen Blutungen oder der Ausprägung des klinischen Syndroms einer disseminierten intravasalen Gerinnung (*DIC*) (Levi & Opal, 2006).

Bei inflammatorischen Prozessen kommt es zur Ausschüttung diverser Mediatoren, die neben ihrer Bedeutung für die Entzündungsreaktionen auch die Hämostase beeinflussen. Dazu zählt vor allem der *Tissue* Faktor (TF), dessen Synthese und Genexpression gesteigert wird, wenn sich die Konzentration von inflammatorischen Mediatoren, wie TNF- α , IL-6, C-reaktivem Protein (CRP) und Endotoxin erhöht (Cermak

et al., 1993; van der Poll et al., 1994; Lindmark et al., 2000). TF ist ein Faktor des extrinsischen Gerinnungssystems. Eine erhöhte Neubildung von Thrombozyten und *ultra-large* von-Willebrand-Faktoren resultiert aus der Existenz von IL-6, Histamin, TNF- α und IL-8 (Burstein, 1997; Bernardo et al., 2004). Auch die endotheliale Expression von Protease-aktivierten Rezeptoren (PAR), Protein C Rezeptoren (EPCR) und Glykosaminoglykanen (GAG) wird durch pro-inflammatorische Zytokine reguliert (Klein et al., 1992; Fukudome & Esmon, 1994). Zusätzlich werden die Plasmakonzentrationen der endogenen Antikoagulantien Antithrombin (AT) und Protein C (APC) bei Aktivierung von inflammatorischen Prozessen beeinflusst. Durch reduzierte Synthese, Degradation durch aktivierte neutrophile Granulozyten und erhöhten Verbrauch können deren plasmatische Konzentrationen auf unter 50% der Norm fallen (Levi et al., 2004).

Vice versa besitzen Mediatoren koagulatorischer Prozesse das Potential, pro-inflammatorische Effekte hervorzurufen. Aktivierte Thrombozyten exprimieren vermehrt CD40-Ligand, der die Konzentration von TF (Miller et al., 1998), IL-6 und IL-8 erhöht (Henn et al., 1998). Eine gesteigerte Synthese von Thrombin induziert die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen (Sower et al., 1995). *In vivo* konnte nachgewiesen werden, dass die Substitution von Faktor VIIa bei gesunden Menschen zur signifikanten Erhöhung der IL-6 und IL-8 Plasmakonzentrationen führt (de Jonge et al., 2003). Auch die Bindung von Thrombin an PAR-1,-3 und -4 induziert die Bildung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren (Wang et al., 2002). Ebenso sind Fibrin und Fibrinogen fähig, die Synthese der pro-inflammatorischen Mediatoren TNF- α , IL-1 β und des Chemoattraktor Protein-1 zu stimulieren (Szaba & Smiley, 2002). Erwähnt werden soll zudem das ausgeprägte anti-inflammatorische Potential der endogenen antikoagulatorischen Mediatoren APC (Taylor et al., 2000; White et al., 2000; Sturn et al., 2003) und AT (siehe 2.2.2.).

Ein klinisches Erscheinungsbild der inflammatorischen und koagulatorischen Interaktion bei Sepsis ist die *DIC*, ein erworbenes Syndrom, welches durch eine generalisierte systemische Gerinnungsaktivierung mit Fibrinablagerungen gekennzeichnet ist. Dabei kommt es aufgrund massiver Bildung hyaliner Thromben im mikrovaskulären Gefäßsystem zum Verbrauch von Gerinnungsfaktoren (Syn.: Verbrauchs-koagulopathie) und resultiert häufig in einem Schock, multiplen Organversagen und einer lebensbedrohlichen Kreislaufsituation. Neben diversen weiteren Erkrankungen zählt die bakterielle und virale Infektion zu den Hauptursachen für die Entwicklung

einer DIC (Taylor et al., 2001). Pathogenetisch ist die Ursache einer DIC eine Funktionsstörung der Gerinnungsregulation. So kommt es in Folge eines traumatischen Schockgeschehens mit Organschädigungen zur massiven Freisetzung von TF aus Endothelzellen und der damit einhergehenden Aktivierung der Gerinnungskaskade über den extrinsischen Pfad. Auch Endotoxine, Interleukine und weitere Entzündungsmediatoren führen zur Stimulation von Monozyten und konsekutiver Expression von TF (Osterud, 1998). Weiterhin kann eine Gerinnungsaktivierung durch die Aktivierung der Faktoren X und II durch proteolytische Enzyme eingeleitet werden, z. B. bei Schlangengiftintoxikation oder akuter Pankreatitis. Die Initiation der Gerinnungskaskade resultiert in der massiven Aktivierung von Prothrombin, was zur Produktion von hyalinen Mikrothromben und Mikroembolien führt. Dabei werden Gerinnungsfaktoren verbraucht, weshalb sich an die hyperkoagulatorische Phase eine Phase mit erhöhter Blutungsneigung anschließt (Holmes et al., 2003; Bauer, 2004). Zudem existiert bei einer DIC eine enge Korrelation zwischen der Blutgerinnung und inflammatorischen Mechanismen. Bei Gerinnungsaktivierung kommt es zur Modulation der Entzündung über spezifische Zellrezeptoren für Proteasen und Proteaseinhibitoren (Levi et al., 2004). Aufgrund dessen spielt die potentielle Substitution von antikoagulatorisch und anti-inflammatorisch wirksamen Mediatoren, wie Protein C und AT, bei der Behandlung einer DIC eine wichtige Rolle (Levi et al., 2004).

2.1.3. AKTUELLE SEPSISTHERAPIE

Die erfolgreiche Therapie eines unter Sepsis oder septischen Schocks leidenden Patienten ist aufgrund der multimodalen Ursachen und des sehr komplexen Krankheitsbildes eine große Herausforderung der Intensivmedizin. Als besonders wichtig für Behandlungserfolge hat sich die zeitnahe Diagnostik und der unverzügliche Beginn der angemessenen Therapie herausgestellt. Aber auch die Lokalisation des Primärherdes und die Art des pathogenen Keims sind entscheidend für den Verlauf einer Sepsiserkrankung (Engel et al., 2007; Dellinger et al., 2013). Neben supportiven und präventiven Maßnahmen wie Analgesie, Sedierung, Ernährungsmanagement, Thrombose- und Ulkusprophylaxe fußt die Sepsisbehandlung auf den Säulen Fokussanierung, antimikrobielle Therapie, supportive Maßnahmen und adjunktiver Therapie (Dellinger et al., 2013).

Die frühzeitige (Koperna & Schulz, 2000; van Ruler et al., 2007) chirurgische Fokus-

sanierung ist Voraussetzung für die erfolgreiche Behandlung der Sepsis und des septischen Schocks (Dellinger et al., 2013). Dazu gehört die Implantatentfernung, die Inzision bzw. Drainage von Abszessen, die Wunderöffnung, Nekrektomie, Amputation und die Behandlung von Peritonitis und Anastomoseninsuffizienzen. Auch eine adäquate antimikrobielle Therapie ist bei der Versorgung von Sepsiserkrankungen obligatorisch. Von besonderer Bedeutung für den Therapieerfolg sind dabei die Berücksichtigung der Erregerspezifitäten (z.B. Resistenzen) und ein möglichst frühzeitiger Beginn der kalkulierten oder gezielten Antibiotika-Therapie (Dellinger et al., 2013).

Supportive Therapien beinhalten Maßnahmen zur Stabilisierung der Körperfunktionen und Vermeidung von v.a. hypoxämischen Organschädigungen (Rivers et al., 2001). Zu den therapeutischen Möglichkeiten gehören Volumensubstitution, Therapie mit Inotropika und Vasopressoren, Maßnahmen zur Vermeidung eines akuten Nierenversagens und Management der Beatmung und Oxygenierung (Dellinger et al., 2013). Als adjunktiv werden Behandlungen bezeichnet, die gemeinsam mit und zusätzlich zu den kausalen und supportiven Therapien durchgeführt werden. Dazu zählte bis vor kurzem die Applikation von rekombinanten aktiviertem Protein C bei septischen Patienten mit hohem Sterberisiko (Multiorganversagen und/oder APACHE II Score >25 Punkte) (Bernard et al., 2001). Aufgrund der *PROWESS SHOCK* Studie (Ranieri et al., 2012) wurde die Behandlungsleitlinie jedoch geändert. Seitdem wird die APC-Applikation bei Sepsis nicht mehr empfohlen und das Medikament vom Markt genommen. Auch die Therapie mit Immunglobulinen als adjunktive Behandlung erwachsener Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock wird inzwischen nicht mehr empfohlen, wobei die Expertenmeinungen diesbezüglich unterschiedlich sind (Kreymann et al., 2007; Laupland et al., 2007) und weitere Studien gefordert werden (Dellinger et al., 2013). Nicht grundsätzlich vorgesehen ist die hochdosierte Glukokortikosteroid- und intensivierete Insulintherapie bei Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock (Bone et al., 1987; Brunkhorst et al., 2008). Auch AT gehörte zu den potentiell adjunktiven Therapieoptionen. Aufgrund der Ergebnisse der *KyberSept* Studie (Warren et al., 2001) wird die Applikation von AT jedoch ebenso nicht empfohlen (Dellinger et al., 2013). Aktuell wird bei schwerer Sepsis oder septischem Schock keine medikamentöse Behandlungsstrategie generell empfohlen, weshalb die adjunktiven Medikationen in der aktuellsten Veröffentlichung als andere supportive Maßnahmen aufgeführt werden (Dellinger et al., 2013).

2.2. ANTITHROMBIN

Antithrombin (AT) ist ein hepatisch synthetisiertes einkettiges Glykoprotein aus der Familie der Serpine, den Serinprotease-Inhibitoren und besitzt ein Molekulargewicht von 58 kD. Die Plasmakonzentration beträgt 0,13 mg/ml, was einer molaren Konzentration von 2,3 μ M und einer Plasmaaktivität von 80-120% (1IU = 100%) entspricht (Conard et al., 1983). Die Plasmahalbwertszeit beträgt 60-72 Stunden (Collen et al., 1977). Bei Männern ist der AT-Spiegel physiologischerweise signifikant höher als bei Frauen (Dolan et al., 1994). Frauen haben nach der Menopause die höchsten AT-Spiegel, bei Männern kommt es zum Abfall der AT-Level ab dem 45. Lebensjahr (Tait et al., 1993).

2.2.1. HISTORIE

Im Jahr 1905 entdeckte der deutsche Internist und Physiologe *Paul Morawitz* AT (Morawitz, 1905). Die gerinnungsinhibitorischen Eigenschaften von AT und dessen Beziehung zu Heparin erkannte *Quick* im Jahr 1938 (Kujath et al., 2002). Die *International Society of Thrombosis and Haemostasis* (ISTH) schlug vor, das wichtigste Protein III einfach als AT zu bezeichnen und die ursprüngliche Einteilung von *Seegers, Johnson* und *Fell* (Seegers et al., 1954) in Proteine I-IV aufgrund der größeren Komplexität der Gerinnungsinhibition fallen zu lassen (Kujath et al., 2002).

2.2.2. WIRKMECHANISMEN

AT ist der wichtigste Inhibitor des humanen Gerinnungssystems (Abb. 1). Es hemmt insbesondere die aktivierten Serinproteasen Thrombin, Faktor IX und X (Rosenberg et al., 1975), aber auch die Faktoren XIa, XIIa (Stead et al., 1976) sowie Plasmin, Kallikrein, Komplementfaktor C1 und den TF-VIIa-Komplex (Buller & ten Cate, 1989; Rao et al., 1995). Seine wichtigste antikoagulatorische Wirkung ist die Kontrolle der Plasmaaktivität von Thrombin (Olds et al., 1994). AT zeigt sich dabei für 80% der Thrombin-Inhibition verantwortlich (Perry, 1994). Die physiologische Bedeutung von AT für den menschlichen Organismus wird mit dem Anstieg des Risikos thromboembolischer Ereignisse bei partiell vererbten, heterozygoten AT-Mangel deutlich.

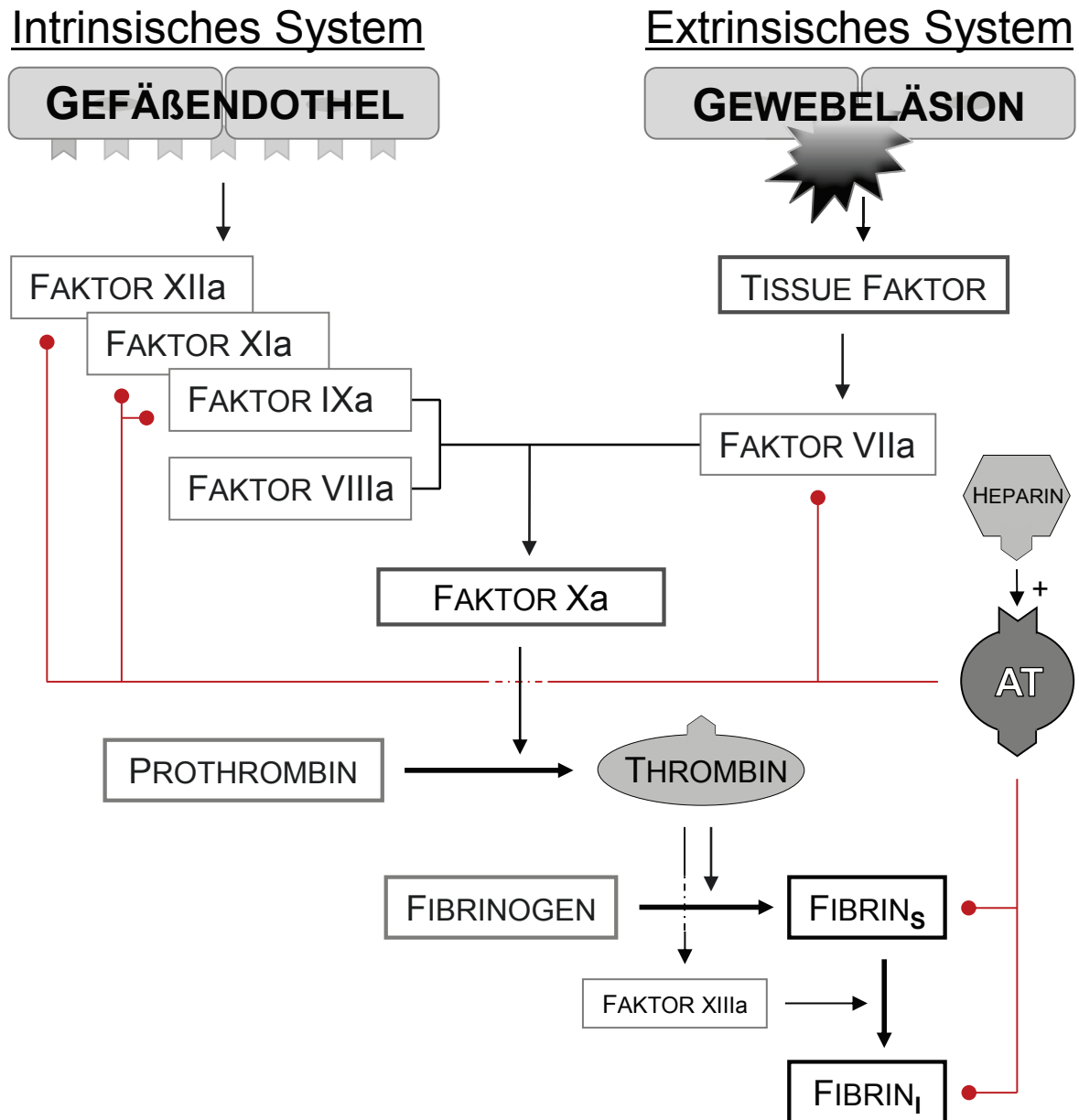


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Gerinnungskaskade. Sowohl die Aktivierung des intrinsischen (intravaskulären) als auch extrinsischen (extravaskulären) Systems führt zur proteolytischen Spaltung des Faktors X zu Faktor Xa. Über die Aktivierung von Thrombin wird lösliches Fibrin (Fibrin_S) und unlösliches Fibrin (Fibrin_I) gebildet. Zusätzlich aufgeführt ist der regulative Einfluss von AT auf das Gerinnungssystem und dessen Wirkungsverstärkung durch Heparin. Abbildung modifiziert nach (Sorg, 2006).

Die Inhibition der Serinproteasen resultiert aus einer Bindung zwischen dem aktiven Zentrum der Serinproteasen und AT. Die Gerinnungsproteasen erkennen AT als Substrat und interagieren mit dessen spezifischer Peptid-Bindung zwischen den Aminosäuren Arginin und Serin (Olson & Bjork, 1994). Es folgt eine irreversible Bin-

dung von AT an die Proteasen (Schreuder et al., 1994). Die Bindungsstelle der Protease ist somit durch AT blockiert und nicht mehr für andere Enzyme der Gerinnungskaskade zugänglich. AT wird durch den Vorgang inaktiviert und die gebildeten AT-Proteasen-Komplexe werden über das Retikulo-Endotheliale System abgebaut (Carrell et al., 1994; Olds et al., 1994). Das Mukopolysaccharid Heparin besitzt die Kompetenz, durch Bindung an AT eine Konformationsänderung von AT hervorzurufen. Dadurch wird ein wesentlich besserer Zugang der Serinproteasen an AT realisiert, was die Interaktion zwischen AT und den Gerinnungsproteasen ca. 1000fach beschleunigt (Rosenberg, 1989; Mammen, 1998).

Neben seinen antikoagulatorisch wirksamen Eigenschaften besitzt AT auch anti-inflammatorisch wirksames Potential, welches auf unterschiedlichen Mechanismen beruht: Die anti-inflammatorischen Wirkungen resultieren zunächst direkt aus der Hemmung von Faktoren der Gerinnungskaskade. So ist bekannt, dass inflammatorische Zustände durch aktivierte Gerinnungsfaktoren, wie Thrombin und Faktor Xa, begünstigt werden. Ursache ist die stimulierende Wirkung der Faktoren auf pro-inflammatorische Zytokine und deren aktivierender Einfluss auf die Chemotaxis von Leukozyten (Senden et al., 1998; Ludwicka-Bradley et al., 2000; Kaur et al., 2001). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass AT auch anti-inflammatorisches Potential besitzt, welches nicht auf der Hemmung von Gerinnungsfaktoren, sondern der Interaktion mit dem Gefäßendothel beruht (Okajima & Uchiba, 1998; Hoffmann et al., 2000; Souter et al., 2001; Yamashiro et al., 2001; Hoffmann et al., 2002b; Oelschlager et al., 2002) (Abb. 2). So beschrieb Okajima, dass AT die Leukozyten-Aktivierung in einem Modell der pulmonalen Endotoxin-induzierten Lungengefäßschädigung inhibiert (Okajima, 1998). Das anti-inflammatorische Potential ist zurückzuführen auf die Fähigkeit von AT, eine Bindung mit endothelständigen Heparin-ähnlichen Glykosaminoglykanen (GAGs) eingehen zu können (Horie et al., 1990; Okajima & Uchiba, 1998). An den GAGs erfolgt die Bindung von AT an Syndecan-4 Rezeptoren, deren Aktivierung die Migration neutrophiler Granulozyten und die Chemotaxis von Monozyten und Lymphozyten reguliert (Kaneider et al., 2001; Kaneider et al., 2002). Auch konnte nachgewiesen werden, dass die GAG-AT Interaktion in einer Prostazyklinfreisetzung aus den Endothelzellen resultiert (Yamauchi et al., 1989; Horie et al., 1990). Prostazyklin ist eine sehr potente antikoagulatorisch und anti-inflammatorisch wirksame Substanz (Longo & Harrison, 2012).

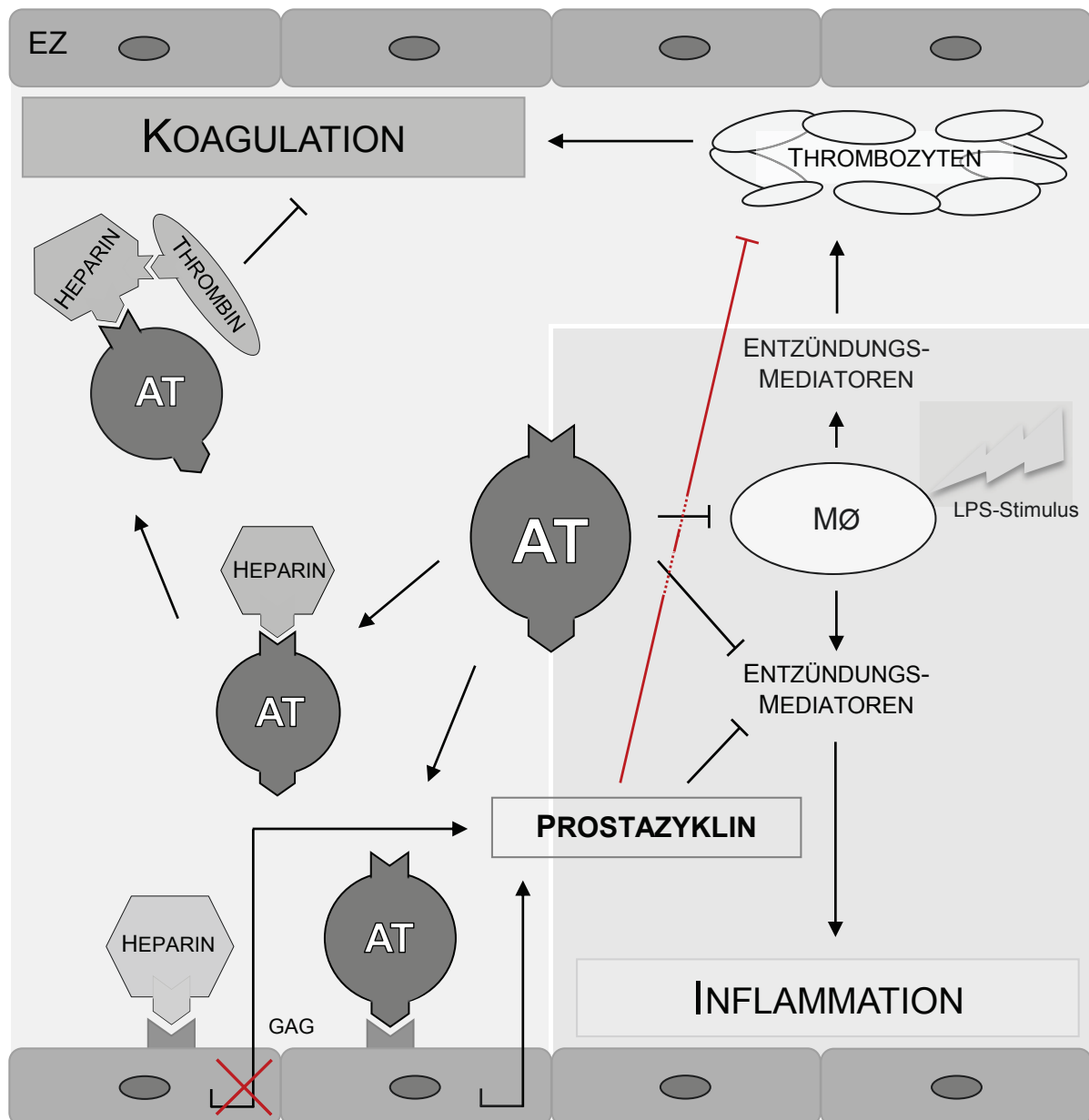


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Modulation von Koagulation und Inflammation durch AT im mikrovaskulären Gefäßsystem. Bedeutend für beide Effekte ist die Freisetzung von Prostazyklin nach der Bindung von AT an endothelständige Glykosaminoglykane (GAG). MØ = Monozyten/Makrophagen; EZ = Endothelzelle; → = Aktivierung; —| = Inhibierung

Auch in *in-vivo* Untersuchungen von Hoffmann et al. konnte nach AT Applikation eine signifikante Verminderung der arteriölen und venulären Leukozytenadhärenz bei Endotoxinämie nachgewiesen werden. Dieser Effekt blieb nach Vorbehandlung der Tiere mit Indomethacin aus, was auf eine Verminderung der Prostazyklinfreisetzung durch die nicht-selektive Cyclooxygenase-Inhibition zurückzuführen ist (Hoffmann et al., 2000). Somit scheint die endotheliale Prostazyklinfreisetzung bei der Erklärung

der anti-inflammatorischen Effekte von AT von entscheidender Bedeutung zu sein. In einer weiteren Studie von Hoffmann et al. kam ein Tryptophan⁴⁹-blockiertes AT (TrypAT) zum Einsatz, welches im Gegensatz zum normalen AT nicht in der Lage ist, endotheliale GAGs zu binden. Dessen GAG-Bindungsstelle ist mittels chemischer Modifikation blockiert, wodurch eine konsekutive Prostazyklinfreisetzung verhindert wird. Das antikoagulatorische Potential von TrypAT durch Thrombin-Inhibition wird als unverändert beschrieben (Hoffmann et al., 2002b). Nach der Behandlung von endotoxämischen Tieren mit TrypAT konnte keine anti-inflammatorische Protektion beobachtet werden. Somit scheint der anti-inflammatorische Effekt von AT wesentlich auf der Prostazyklin-Freisetzung nach AT-GAG-Bindung zu beruhen (Hoffmann et al., 2002b).

2.2.3. KLINISCHE RELEVANZ BEI SEPSIS

Zur Überprüfung des klinischen Potentials von AT wurde die *KyberSept* Studie mit einer Gesamtzahl von 2314 septischen Patienten durchgeführt (Warren et al., 2001). Dabei wurde festgestellt, dass die Therapie mit AT in der Gesamtgruppe zu keinem signifikanten Unterschied hinsichtlich der 28 Tage-Mortalität im Vergleich mit der Kontrollgruppe führte (38,9% AT vs. 38,7% Plazebo). Auch in der 56 Tage- und 90 Tage-Mortalität zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Jedoch fiel in der *post-hoc* Analyse auf, dass es in der Subgruppe von Patienten, die keine simultane Heparintherapie zur Thromboseprophylaxe erhielten, zu einer signifikanten Verbesserung der 90 Tage-Mortalität im Vergleich zur Kontrollgruppe kam (44,9 % AT (ohne Heparin) vs. 52,5 % Plazebo). Daraus wurde geschlossen, dass es Interaktionen zwischen den prinzipiell agonistisch wirkenden Substanzen AT und Heparin zu geben scheint (Warren et al., 2001; Hoffmann et al., 2006; Kienast et al., 2006). Dieser negative Effekt von Heparin auf AT wurde intensiv bearbeitet, wobei die Rolle des Endothels mit den GAGs und der konsekutiven Prostazyklinfreisetzung nach AT-GAG Interaktion in den Fokus traten (Hoffmann et al., 2002a; Hoffmann et al., 2002b). Somit schien eine Re-Analyse des positiven Potentials von AT bei Sepsis ohne die simultane Heparintherapie erforderlich (Jilma, 2006). Dabei stellte sich die Frage nach der ausreichenden Antikoagulation septischer Patienten, wenn auf den Einsatz von Heparin verzichtet werden würde. Von Sorg et al. konnte in einer experimentellen Analyse nachgewiesen werden, dass die Applikation von AT ohne die zusätzliche

Verabreichung von Heparin eine effektive Möglichkeit darstellen könnte, mikrovaskuläre Thrombosen zu inhibieren (Sorg et al., 2006). Die Effektivität von AT (25 IE pro kg/KG) in der Thrombose-Inhibition war äquivalent mit der von Heparin und Hirudin. Bei höheren AT Konzentrationen (50, 100 und 250 IE pro kg/KG) konnte die Effektivität von Heparin sogar übertroffen werden (Sorg et al., 2006). Zusätzlich wurden diese Effekte auch in einem *Escherichia coli*-Lipopolysaccharid (LPS)-induzierten Endotoxinämie-Modell untersucht. Hierbei konnte ein positiver Effekt von AT auf die phototoxisch-induzierte, mikrovaskuläre Thrombose bei Endotoxinämie im Vergleich mit Heparin und Hirudin nachgewiesen werden (Sorg et al., 2007a).

In der Leitlinie zur Therapie von Sepsis und septischen Schock ist die Applikation von AT nicht vorgesehen (Dellinger et al., 2013). Aufgrund der negativen Ergebnisse der *KyberSept* Studie hat sich der Fokus der adjunktiven Therapeutika von AT entfernt. Die Schwerpunkte aktueller klinischer und experimenteller Studien in der Erforschung adjunktiver Sepsistherapien liegen bei aktivierten Protein C (Ranieri et al., 2012) und Protein Z (Butschkau et al., 2013).

3. ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNG

Ziel der vorliegenden Studie war es, die Interaktionen zwischen den inflammatorischen und den koagulatorischen Mechanismen im mikrovaskulären Gefäßsystem zu analysieren. Diese Interaktionen sind vor allem für das Verständnis und die Therapie von Sepsis und den mit Sepsis assoziierten koagulatorischen Komplikationen von erheblicher klinischer Relevanz. Zur Realisierung dieser Fragestellung wurde die Substanz AT eingesetzt, obwohl diese in der aktuellen Sepsis Therapie keine wesentliche Rolle mehr spielt. Nach der Erforschung des anti-inflammatorischen Potentials von AT durch Hoffmann et al. (Hoffmann et al., 2000; Hoffmann et al., 2002b) und der Darstellung der antikoagulatorischen Potenz von AT durch unsere Arbeitsgruppe (Sorg et al., 2006; Sorg et al., 2007a) stellt sich in der vorliegenden Arbeit die Frage nach dem Zusammenhang dieser beiden Mechanismen. Aufgrund der intensiven Erforschung von AT und dessen doppelten Wirkprofil ist AT ein idealer anti-inflammatorisch und antikoagulatorisch wirkender Mediator, mit dessen Einsatz die Verknüpfungen der mikrovaskulären Gerinnungs- und Entzündungsprozesse spezifiziert werden können. Weiterhin ist AT attraktiv, weil die Möglichkeit besteht, dessen Wirkmechanismen selektiv zu inhibieren. Anhand dieser Ausgangslage ergeben sich folgende Fragestellungen:

1. Ist das angewandte Modell im *M. cremaster* geeignet, eine mikrovaskuläre Thrombogenese zu induzieren und die Thrombose zu analysieren?
2. Inwieweit sind die bekannten Wirkeffekte von AT im mikrovaskulären System in Bezug auf Antikoagulation und Anti-Inflammation getrennt voneinander zu betrachtende Mechanismen? Sind direkte Abhängigkeiten der Mechanismen voneinander vorhanden?
3. Welchen Einfluss haben die applizierten Studienmedikamente TrypAT, Heparin und Indomethacin auf die Koagulation im mikrovaskulären System? Inwieweit wird der antikoagulatorische Wirkeffekt von AT durch Kombination mit Heparin und Indomethacin beeinflusst?
4. Kommt es unter den Dosierungen zu messbaren Veränderungen mikrohämodynamischer, hämatologischer oder immunhistochemischer Parameter?

4. MATERIAL UND METHODEN

4.1. VERSUCHSTIERE

Für die Durchführung der Akutversuche wurden männliche, 10 bis 12 Wochen alte C57Bl/6J Mäuse (Abb. 3) aus eigener Zucht (Versuchstierhaltung des Instituts für Experimentelle Chirurgie, Universität Rostock) mit einem Gewicht von 20 bis 30 g verwendet.



Abbildung 3: Abbildung einer männlichen C57Bl/6J Maus.

Die Tiere unterlagen einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus und hatten Zugang zu Wasser und Nahrung (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) *ad libitum*. Gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz § 8 (1) wurden die Versuche genehmigt und protokolliert.

4.2. CREMASTERMUSKELMODELL UND PRÄPARATION

Für die Bearbeitung der experimentellen Fragestellung wurde das Mikrozirkulationsmodell im *Cremastermuskel* der Maus verwendet. Entwickelt wurde das Modell an

Ratten zur intravitalmikroskopischen Untersuchung des Gefäßsystems (Baez, 1973). Es ist ein in unserer Arbeitsgruppe etabliertes experimentelles Verfahren zur Untersuchung verschiedenster Fragestellungen zur mikrovaskulären Zell-Zell-Interaktion in Mäusen (Vollmar et al., 2001; Lindenblatt et al., 2004; Sorg et al., 2006; Lindenblatt et al., 2007; Donndorf et al., 2012).

Nach intraperitonealer Applikation der Narkose, bestehend aus 90 mg/kg KG Ketamin (Ketamin[®], Betapharm GmbH & CO, Vechta, Deutschland) und 25 mg/kg KG Xylazin (Rompun[®], Bayer Vital GmbH, Bayer HealthCare, Leverkusen, Deutschland), wurde die Haut des Halses, des Abdomens, der Inguinalregion sowie des Skrotums der Maus rasiert. Anschließend erfolgte die Lagerung des Tieres auf einer 37,5°C erwärmten Heizplatte (Fa. Effenberger, Pfaffing, Deutschland). Die chirurgische Präparation erfolgte unter Zuhilfenahme eines Stereomikroskops (Leica M651/M655, Leica Microsystems AG, Heerbrugg, Schweiz) und mikrochirurgischen Instrumentariums.

Der erste Schritt bestand aus der Einführung eines Polyethylen-Katheters (PE 10, SIMS Portex Ltd, UK) in die rechte Vena jugularis externa zur Applikation der Studienmedikamente und der Fluoreszenzfarbstoffe. Anschließend erfolgte die mikrochirurgische Präparation des Cremastermuskels. Mittels paramedianen Hautschnitt vom Skrotum zur mittleren Inguinalfalte wurde der *M. cremaster* freigelegt, vom umliegenden Gewebe gelöst und mobilisiert. Das distale Ende des Muskels wurde mit einem 5-0 Faden (Prolene[®] 5-0, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) fixiert und auf einer speziellen Präparationsbühne ausgelagert. Durch einen medialen Längsschnitt erfolgte, unter größtmöglicher Schonung der intramuskulären Gefäße, die Eröffnung des sackförmigen Cremastermuskels. Die freigelegten Hodenorgane *Testis*, *Epididymidis* und *Ductus deferens* wurden vorsichtig herausgelöst und ausgelagert. Mit zwei weiteren 5-0 Fäden wurde der axial gestielte Muskel aufgefächert und fixiert (Abb. 4).

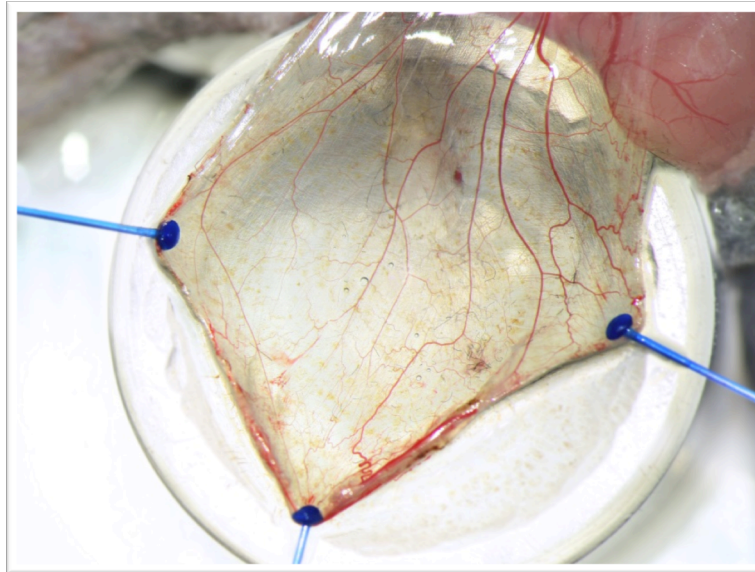


Abbildung 4: Fotografische Abbildung des ausgelagerten und präparierten *M. cremaster* der Maus. Deutlich erkennbar sind zentral verlaufende Arteriolen und Venolen. 12-fache Vergrößerung.

Während des Experiments erfolgte eine Superfusion des Muskels mit 37,5°C warmer physiologischer Kochsalzlösung, um eine Beeinflussung der Perfusion durch Austrocknung des Muskelpräparats zu verhindern.

4.3. UNTERSUCHUNGSTECHNIKEN

Im Anschluss an die Präparation erfolgten die Experimente unter Nutzung der Intravitalmikroskopie. Nach diesen *in vivo* Untersuchungen wurden die auf Video aufgezeichneten Mikroskopaufnahmen am PC ausgewertet und die *in vitro* Diagnostik durchgeführt.

4.3.1. INTRAVITALMIKROSKOPIE

Die intravitale Multifluoreszenzmikroskopie ist ein etabliertes Verfahren zur Untersuchung der Mikrozirkulation im lebenden Organismus. Dabei regt Licht mit einer spezifischen Wellenlänge (Exzitation) die applizierten Fluoreszenzfarbstoffe zu einer Emission von Licht einer anderen spezifischen Wellenlänge an. Durch Filterung des Lichts der entsprechenden Wellenlängen werden somit Fluoreszenzfarbstoffmarkierte Strukturen sowie Plasma vor dunklem Hintergrund visualisiert.

4.3.1.1. FLUORESZENZFARBSTOFFE

In dieser Studie wurde ein Gemisch von je 0,1 ml der Fluoreszenzfarbstoffe FITC-Dextran und Rhodamin-6G über den Jugulariskatheter appliziert. FITC-Dextran (Fluoresceinisothiocyanat-markiertes Dextran, 5%, MG 150.000 Da, Sigma-Chemical Deisenhofen, Deutschland) ist ein Farbstoff, der sich aufgrund seines hohen Molekulargewichts vornehmlich intravasal anreichert. Somit kann eine deutliche Kontrastierung zwischen dem Intra- und Extravasalraum erreicht werden. Unter Nutzung eines Blaufilters liegt das Exzitationsmaximum bei einer Wellenlänge von $\lambda = 450-490$ nm, das Emissionsmaximum bei $\lambda > 512$ nm. Rhodamin-6G (2%, MG 476 Da, Sigma-Chemical) akkumuliert selektiv in den alpha-Granula leukozytärer Mitochondrien. Somit erfolgt eine Anfärbung der im Gefäßsystem zirkulierenden und am Endothel rollenden bzw. adhärenen Leukozyten. Mit dem Grünfilter resultiert, durch Anregung mit Licht einer Wellenlänge von $\lambda = 530-560$ nm, eine Emissionswellenlänge von $\lambda > 580$ nm.

4.3.1.2. INTRAVITALMIKROSKOPIE DES *M. CREMASTER*

Die Intravitalmikroskopie des *M. cremaster* erfolgte mit einem hochauflösenden Multifluoreszenzmikroskop (AxioTech vario, Zeiss, Jena, Deutschland) (Abb. 5). Das Licht wurde von einer stufenlos regelbaren 100 W Quecksilberdampf-Lampe emittiert, deren Helligkeit mit der Belichtungssteuerung dosiert werden konnte.

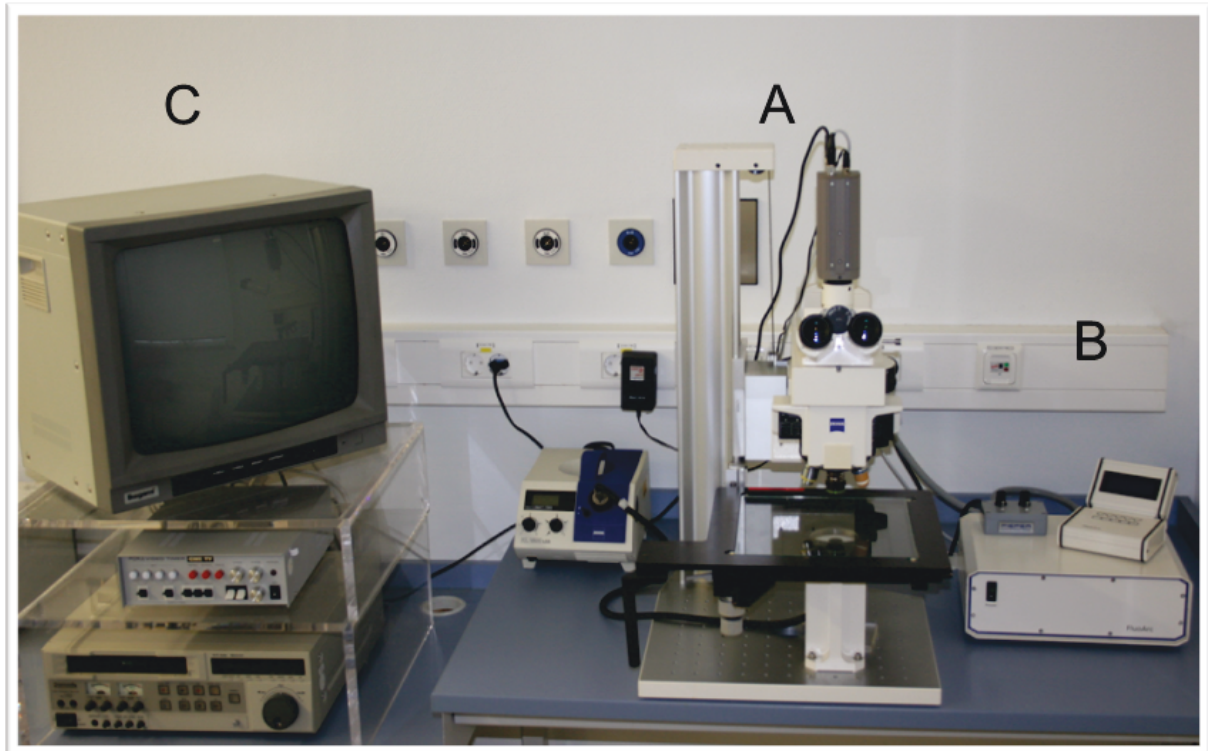


Abbildung 5: Fotografische Abbildung des verwendeten Intravitalmikroskops mit CCD-Kamera, Okular, Objektivrevolver und Fluoreszenzfiltern (A), der Belichtungssteuerung (B) und dem Monitor, Videozeitgenerator und Videorekorder (C).

Die Übersichtsaufnahmen wurden mit 5-fach bzw. 20-fach vergrößernden Objektiven (Plan-Neofluar 5x/0,16 bzw. 20x/0,50, Zeiss) durchgeführt (Abb. 6). Für die Thrombose-Induktion und Erfassung der Studienparameter erfolgte der Wechsel in ein 63-fach vergrößerndes Wasser-Immersionsobjektiv (Achromplan 63x/0.95W, Zeiss). Mithilfe einer CCD-Kamera (FK 6990A-IQ, Pieper, Berlin, Deutschland) wurde das mikroskopische Bild auf einen Bildschirm und den Videorekorder (S-VHS Panasonic AG 7350-E, Matsushita, Tokio, Japan) übertragen. Zur Zeitmessung und Nummerierung wurde zusätzlich ein Videozeitgenerator (VTG-33, Fora company limited, Japan) zwischengeschaltet. Im Anschluss an das *in vivo* Experiment wurden die Videoaufzeichnungen computerassistent mit der Software CapImage[®] (Version 7.4, Dr. Zeintl Software, Heidelberg, Deutschland) ausgewertet.

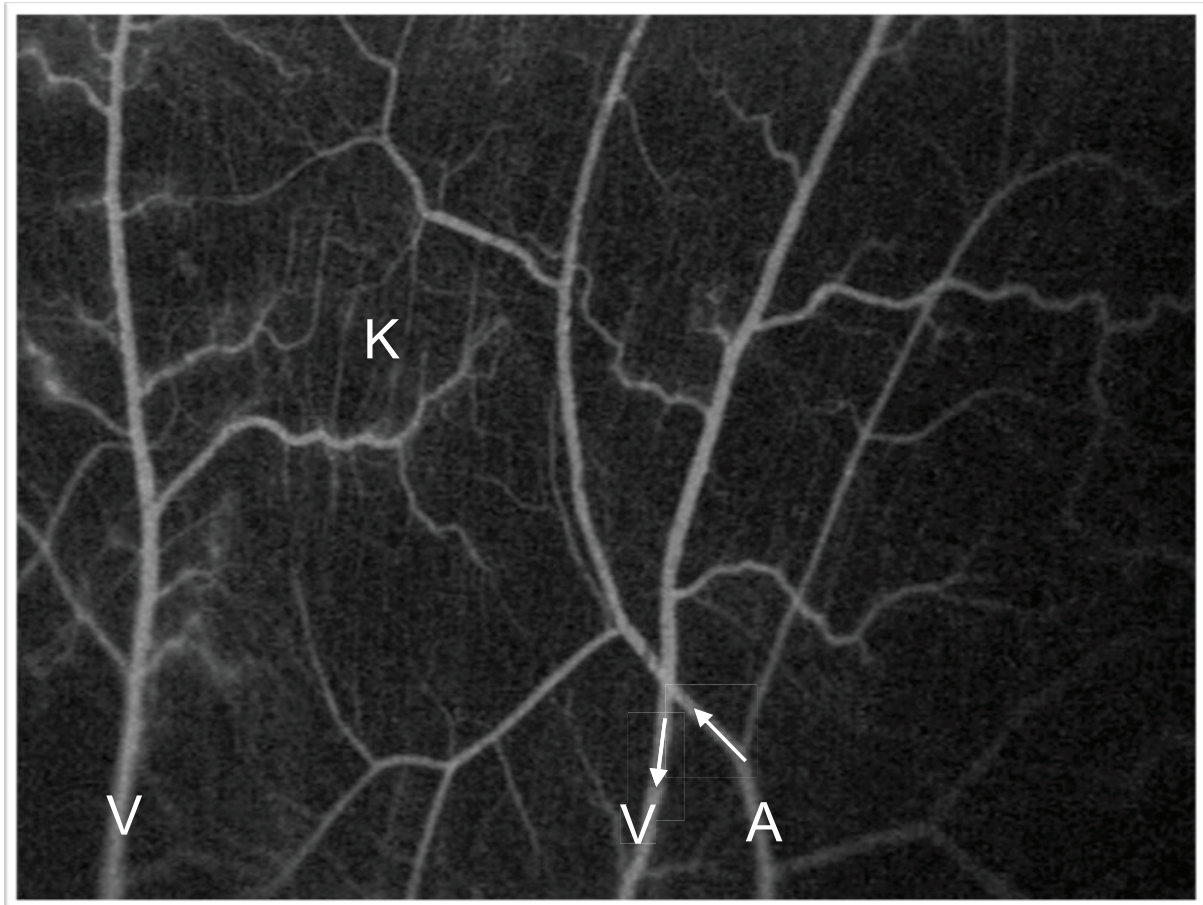


Abbildung 6: Repräsentative intravitalmikroskopische Übersichtsaufnahme des Gefäßnetzwerkes im *M. cremaster* der Maus. Zentral sichtbar ist ein Gefäßbündel bestehend aus Arteriole (A) und Venole (V). Das Kapillarsystem ist mit (K) markiert und die Pfeile verdeutlichen die Fließrichtung des Blutes. 50-fache Vergrößerung.

4.3.1.3. MODELL DER THROMBOSE-INDUKTION

Die Durchführung der Thrombose-Induktion erfolgte unter Verwendung eines kombinierten photo-chemischen Modells. Dabei wurde die phototoxische Thrombose-Induktion des *light-dye* Modells mit der Superfusion von Eisen (III)-Chlorid kombiniert. Beim *light-dye* Modell entsteht ein lokaler Gefäßendothelschaden aufgrund der Freisetzung von Sauerstoffradikalen. Gebildet werden diese, wenn der Fluoreszenzfarbstoff FITC-Dextran dem gefilterten Blau-Licht exponiert wird (Saniabadi et al., 1995). Die wiederholte Superfusion des Muskels mit 25 μ l Eisen (III)-Chlorid Lösung (FeCl_3 12,5 mmol/l; Sigma-Chemical, Deisenhofen, Germany) alle 60 Sekunden führt zusätzlich zur Schädigung des Gefäßendothels. Der Effekt beruht auf chemischer Oxidation, hervorgerufen durch freie Eisen-Ionen (Wang & Xu, 2005). Beide

Modelle verursachen eine Dysfunktion des Endothels mit Freilegung subendothelialer Strukturen, wodurch es zur erhöhten Thrombozyten- und Leukozytenadhäsion und -aggregation sowie Aktivierung endogener Gerinnungsfaktoren kommt (Denis et al., 1998; Lindenblatt et al., 2004; Surin et al., 2010).

Nach intravenöser Applikation des Fluoreszenzfarbstoffgemisches (0,2ml) erfolgte unter dem Intravitalmikroskop das Aufsuchen eines venösen Gefäßes in der 50-fachen Vergrößerung. Anschließend wurde mit dem 63er Wasserimmersionsobjektiv eine Aufnahme in der FITC-Dextran- und Rhodamin-6G Färbung für die Ausgangswertmessung durchgeführt. Danach begann die minütliche Superfusion mit 25 µl FeCl₃ und der Beginn der Zeitmessung. Die Erhebung der Messwerte erfolgte vor Beginn der Thrombose-Induktion (0 s), sowie nach 60 s, 180 s, 300 s, 600 s, 900 s und 1200 s, beziehungsweise endete mit dem Zeitpunkt der kompletten Gefäßokklusion. Zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten wurde für 15 s vom Blau- in den Grünfilter gewechselt, um die Rhodamin-6G markierten Leukozyten zu erfassen. Während der Durchführung der intravitalem Multifluoreszenzmikroskopie wurde zunächst die Zeitdauer vom Beginn der photo-chemischen Thrombose-Induktion bis zur kompletten, irreversiblen Gefäßokklusion erfasst. Ein Gefäß galt als komplett verschlossen, wenn der Blutstrom für mindestens 45 Sekunden stagnierte oder sich die Flußrichtung im beobachteten Gefäß umkehrte. Nach der vollständigen Okklusion des untersuchten Gefäßes war der Versuch unter dem Intravitalmikroskop beendet.

4.3.2. MIKROHÄMODYNAMISCHES MONITORING

Während der Untersuchung unter dem Intravitalmikroskop wurden Videoaufzeichnungen angefertigt, mit deren Hilfe die folgenden mikrohämodynamischen Parameter evaluiert werden konnten:

4.3.2.1. GEFÄßDURCHMESSER

Die Gefäßdurchmesser der beobachteten Venolen wurden computerassistent quantifiziert. Aus den Werten von fünf Messungen der maximalen Gefäßbreite erfolgte die Berechnung des durchschnittlichen Gefäßdurchmessers.

4.3.2.2. BLUTZELLFLIEßGESCHWINDIGKEIT

Die Blutzellfließgeschwindigkeit wurde mittels der dynamischen Line-Shift-Diagramm Methode des CapImage® Programms (Klyscz et al., 1997) ermittelt. Innerhalb des mit FITC-Dextran kontrastierten Gefäßlumens wurde eine in Flussrichtung liegende Messlinie definiert. Anschließend erfolgte das Abspielen der Aufzeichnung für 12 s in Echtzeit. Dabei wurde automatisch entlang der definierten Messlinie fortlaufend für jedes Halbbild ein Grauwertprofil erstellt. Die unterschiedlichen Grauwerte entstehen durch die unterschiedliche Färbung des Intravasalraums. Das Plasma ist nahezu vollständig mit FITC-Dextran vermischt und erscheint als sehr heller Grauwert. Korpuskuläre Blutbestandteile sind dagegen von der FITC-Dextran Färbung abgrenzbar und erhalten einen dunkleren Grauwert. Durch Aneinanderreihung dieser Grauwertprofile wird ein Line-Shift-Diagramm erstellt, bei dem nebeneinander liegende dunkle und helle Linien die Fortbewegung der kontrastlosen, korpuskulären Blutbestandteile im kontrastierten Plasma darstellen. Durch wiederholte Messung des Anstiegs dieser dunklen Linien kann das arithmetische Mittel der Blutzellfließgeschwindigkeit (mm/s) ermittelt werden (Klyscz et al., 1997).

4.3.2.3. WANDSCHERRATE

An den Gefäßinnenwänden auftretende Scherkräfte üben einen wichtigen Einfluss auf die Interaktionen der Leukozyten und Thrombozyten mit dem Gefäßendothel aus. Berechnet wird die Wandscherrate γ (in s^{-1}) unter Annahme einer zylindrischen Gefäßgeometrie und unter Verwendung des Poiseuille'schen Gesetzes für Newtonsche Flüssigkeiten wie folgt:

$$\gamma = \left(\frac{v}{d}\right) \times 8$$

Dabei repräsentiert v die Geschwindigkeit des Blutstroms und d den inneren Gefäßdurchmesser.

4.3.2.4. THROMBUSHÖHE

Als weiterer Parameter wurde die Höhe (in μm) des sich entwickelnden Thrombus zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt ermittelt. Aufgrund hämodynamischer Kräfte des Blutstroms war der Thrombus meist wenige μm stromabwärts der photo-toxisch induzierten Endothelzellschädigung lokalisiert. Der in das Gefäßlumen ragende

Thombus wurde von seinem *Punktum maximum* bis zum Übergang zum Gefäßendothel am Videostandbild gemessen.

4.3.2.5. LEUKOZYTEN-ENDOTHELZELL-INTERAKTION

Repräsentativ für die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion wurde in der vorliegenden Studie der Anteil der rollenden Leukozyten von allen im Gefäßsystem vorhandenen Leukozyten ermittelt. Die Leukozyten sind aufgrund ihrer Färbung mit Rhodamin-6G mit Hilfe des Grünfilters deutlich visualisierbar. Rollende Leukozyten befinden sich in einem losen Kontakt mit dem Endothel, d.h. sie bewegen sich mit dem Blutstrom in reduzierter Geschwindigkeit entlang der Gefäßinnenwand. Zur quantitativen Erfassung der Leukozyten wurde die Anzahl der durch das Gesichtsfeld wandernden Leukozyten über eine Zeit von 15 s gezählt. Durch Vervierfachung des Werts errechnet sich die Anzahl der Leukozyten pro Minute. Auf diese Weise wurden die Gesamtanzahl aller im Blutstrom befindlichen Leukozyten und der am Endothel entlang rollenden Leukozyten (Roller) erfasst. Anschließend wurde die Fraktion der rollenden Leukozyten in Prozent der Gesamtleukozyten errechnet.

4.4. IMMUNHISTOCHEMIE

Nach Abschluss des *in vivo* Experiments wurde der untersuchte *M. cremaster* exziiert, in 4 % Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Mit einem Mikrotom (Leica RM 2145, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) wurden 4 µm dicke Feingewebsschnitte von den Paraffinblöcken angefertigt. Nach Entparaffinierung und Rehydrierung wurden die Präparate auf poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger aufgebracht. Durch Erhitzen der Zitrat gepufferten (0,01 M, pH 6,0) Präparate bei 700 W in einer Mikrowelle konnte eine Proteindemaskierung und Freilegung antigener Epitope erreicht werden. Anschließend erfolgte die Behandlung mit Wasserstoffperoxid (3 %) und Inkubation mit einer Lösung (ProteinBlock, DakoCytomation, Hamburg, Deutschland). Darauf folgte eine 12-stündige Inkubation des Präparates mit einem Primärantikörper. Nach Spülen und Anwendung des Sekundärantikörpers wurden die Chromogene zugegeben. Nach Gegenfärbung der Zellkerne mit Mayer's Hämalaun erfolgte die Konservierung der Präparate unter einem Deckgläschen.

In dieser Studie wurden die Adhäsionsmoleküle E-Selektin und P-Selektin sowie die Serinproteinase Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (PAI-1) evaluiert.

E-Selektin und P-Selektin sind Zelloberflächenproteine, die eine zelluläre Interaktion zwischen Leukozyten und aktivierten Endothelzellen (E-Selektin) oder Thrombozyten (P-Selektin) vermitteln (Tedder et al., 1995). Zur immunhistochemischen Darstellung der Selektine diente die Verwendung des *goat anti-mouse* anti-E-Selektin Antikörpers (M-20: sc-6939, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA) in 1:500 Verdünnung und des *mouse anti-human* anti-P-Selektin Antikörpers (CTB201: sc-8419, Santa Cruz Biotechnology Inc.) in 1:100 Verdünnung. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper LSAB[®]2 System-HRP-Kit (Dako GmbH, Hamburg, Deutschland) und die Anfärbung mittels DAB[®] (Dako GmbH) Chromogen. PAI-1 wird physiologisch außer von Thrombozyten auch von Endothel- und Lipidzellen synthetisiert und besitzt die Fähigkeit, die Fibrinolyse durch Hemmung des gewebespezifischen Plasminogenaktivators (t-PA) sowie der Urokinase zu verhindern. Durch Freisetzung von PAI-1 aus aktivierten Thrombozyten verhindern diese somit die vorzeitige Lyse des gebildeten Thrombus. Für die Durchführung des immunhistochemischen Nachweises wurde der *rabbit anti-human* anti-PAI-1 Antikörper (H-135: sc-8979, Santa Cruz Biotechnology Inc.) in 1:100 Verdünnung eingesetzt. Als Sekundärantikörper diente *donkey anti-goat IgG* (sc-2020 Santa Cruz Biotechnology Inc.) in 1:200 Verdünnung. Die rötlich-lila Anfärbung wurde mit dem Chromogen DAB[®] (Dako GmbH) erzielt.

Zur Evaluation der immunhistochemischen Präparate wurde die Intensität der Gefäßfärbung semiquantitativ mittels eines Scores von 0 bis 3 erfasst: 0 keine Anfärbung, 1 geringe Anfärbung, 2 moderate Anfärbung und 3 starke Anfärbung. Anhand dieser Kriterien wurde an einem Lichtmikroskop (Zeiss-Axioskop 40, Jena, Deutschland) für jedes sichtbare Gefäß ein Zahlenwert definiert und registriert. Die Unterscheidung von Arteriolen und Venolen spielte in der immunhistochemischen Beurteilung keine Rolle (Lindenblatt et al., 2006b). Neben der Erfassung des semiquantitativen Scores durch Bildung des arithmetischen Mittelwertes aus den Zahlen zwischen 0 und 3 wurde der Prozentanteil der angefärbten Gefäße zur Gesamtzahl aller sichtbaren Gefäßquerschnitte bestimmt.

4.5. HÄMATOLOGISCHE ANALYSEN

Nach Abschluss der Intravitalmikroskopie wurde nach Vertiefung der Narkose und medianer Laparotomie Blut aus der V. cava inferior entnommen. Dabei konnte 0,8 - 1 ml Blut gewonnen werden, das in EDTA- (0,5 ml) und Citrat- (0,2 ml) Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt wurde. Anschließend erfolgte die Auswertung des Blutbildes und Zentrifugation des Blutes für 10 min bei 3500 U/min (GS15 Zentrifuge Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland). Das gewonnene Plasma wurde in Eppendorfgefäße abpipettiert und bei -20°C eingelagert.

4.5.1. BLUTBILD

Die Auswertung des Blutbildes aus dem EDTA-Plasma wurde mit einem Zellzähler (Sysmex KX21, Sysmex GmbH, Norderstedt, Germany) durchgeführt. Dabei wurden Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten quantitativ analysiert.

4.5.2. GERINNUNGSPARAMETER

Die Analyse der Gerinnungsparameter Fibrinogen, Quick und partiellen Thromboplastinzeit (PTT) erfolgte nach dem opto-mechanischen Messprinzip mit dem BFT* II Analyzer (Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Deutschland).

Die quantitative Bestimmung von Fibrinogen erfolgte durch Aktivierung der Gerinnung in Citrat-Plasma mit großem Überschuss an Thrombin. Die Gerinnungszeit hängt dabei vom Fibrinogengehalt der Probe ab.

Die Analyse der Thromboplastinzeit nach Quick diente der Aktivitätsbestimmung der exogenen Gerinnungsfaktoren II, V, VII und X. Dabei wurde das Citrat-Plasma mit Thromboplastin und Calcium inkubiert und somit der Gerinnungsvorgang ausgelöst. Gemessen wurde die Zeit bis zur Bildung eines Fibringerinnsels, anschließend erfolgte die Umrechnung in Prozent der Norm.

Die Bestimmung von PTT diente der Analyse des endogenen Gerinnungssystems, speziell der Faktoren VIII und IX. Dazu wurde Citrat-Plasma mit Phospholipiden und einem Oberflächenaktivator inkubiert und durch Zugabe von Calcium der Gerinnungsvorgang ausgelöst. Gemessen wird die Zeit bis zur Entstehung eines Fibringerinnsels.

4.5.3. PROSTAGLANDIN F1-ALPHA ELISA

Zur Bestimmung der Prostazyklinkonzentration (PGI_2) wurde dessen stabiler Metabolit Prostaglandin F1-alpha ($\text{PGF1-}\alpha$) gemessen. Dabei wurde die $\text{PGF1-}\alpha$ Konzentrationen im EDTA Plasma unter Anwendung des kommerziellen Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-kits für Mäuse (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA) analysiert. Die Grenze der messbaren Konzentration für $\text{PGF1-}\alpha$ lag bei 15pg/ml.

4.6. EXPERIMENTELLES PROTOKOLL

Die chirurgische Präparation, Thrombose-Induktion und Auswertung der Einfachblindstudie wurde von einer Person standardisiert durchgeführt.

4.6.1. VERSUCHSGRUPPEN

Die vorliegende experimentelle Studie bestand aus folgenden sieben Versuchsgruppen (vgl. Tab. 1):

Die Kontrollgruppe beinhaltete Tiere, die mit 0,9% Natrium-Chlorid-Lösung (0,1 ml/kg KG; B. Braun, Melsungen AG, Deutschland) behandelt wurden.

In der AT-Gruppe erfolgte die Applikation von AT (250 IU/kg KG; Kybernin HS 500[®], CSL Behring, Marburg, Deutschland) zur Darstellung des anti-thrombotischen und anti-inflammatorischen Potentials von AT.

TrypAT bezeichnet die Gruppe von Versuchstieren, die eine Behandlung mit Tryptophan⁴⁹-blockiertem Antithrombin (250 IU/kg KG; CSL Behring, Marburg Germany) erhielt. TrypAT ist nicht fähig, mit endothelialen GAGs zu interagieren. Somit lässt sich auf den Einfluss der AT-GAG Interaktion auf koagulatorische Prozesse schlussfolgern.

Tiere der Indo-Gruppe wurden einer Therapie mit Indomethacin (5 mg/kg KG; Liometacen[®], Promedica, Parma, Italien) unterzogen. Indomethacin ist ein äußerst potenter Inhibitor der Cyclooxygenase. Durch Inhibition dieses Enzyms kann die Bildung von PGI_2 im Gefäßendothel inhibiert werden.

In der Hep-Gruppe wurde den Tieren Heparin (100 IU/kg KG; Liquemin N[®], Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) verabreicht. Heparin ist ein Standardantikoagulans, dessen Wirkeffekt auf der Aktivierung von AT beruht.

Zusätzlich gab es zwei Gruppen, in denen AT jeweils mit Indomethacin bzw. Heparin kombiniert wurde (Indo+AT-Gruppe und Hep+AT-Gruppe). Diese Medikation wurde gewählt, um zu evaluieren, inwieweit die Wirkung von AT durch Indomethacin bzw. Heparin beeinflusst wird.

Tabelle 1: Dosierungsregime mit Applikationsart und Konzentration der Substanzen (je 0,5 ml) für die sieben Versuchsgruppen (n=8-16).

Applikation Gruppen	1. Dosis subkutan	2. Dosis intravenös	3. Dosis intravenös
Kontrolle	NaCl (0,9%)	NaCl (0,9%)	NaCl (0,9%)
AT	NaCl (0,9%)	NaCl (0,9%)	Antithrombin (250 IU/kg)
TrypAT	NaCl (0,9%)	NaCl (0,9%)	Tryp ⁴⁹ -AT (250 IU/kg)
Indo	Indomethacin (5 mg/kg)	NaCl (0,9%)	NaCl (0,9%)
Indo+AT	Indomethacin (5 mg/kg)	NaCl (0,9%)	Antithrombin (250 IU/kg)
Hep	NaCl (0,9%)	Heparin (100 IU/kg)	NaCl (0,9%)
Hep+AT	NaCl (0,9%)	Heparin (100 IU/kg)	Antithrombin (250 IU/kg)

Drei Versuchsgruppen, nämlich die Kontrollgruppe, AT-Gruppe und die Indo+AT-Gruppe beinhalten je n=16 Tiere. Die übrigen Gruppen bestehen aus je neun (n=9) (Tryp-AT, Indo und Hep) beziehungsweise acht (n=8) Tieren (Hep+AT). Insgesamt wurden 83 Versuchstiere behandelt und untersucht.

4.6.2. DOSIERUNGSREGIME

Jedem Tier wurden drei Studiensubstanzen zu drei Zeitpunkten appliziert. Im Anschluss an die Narkotisierung und Lagerung der Tiere erfolgte die intraperitoneale Injektion der ersten Dosis. Nach Platzierung des intravenösen Jugulariskatheters wurde die zweite Dosis der Studienmedikation intravenös verabreicht. Die dritte Dosis erhielt das Tier ebenfalls intravenös während der chirurgischen Präparation, das heißt 20 min vor Beginn der Intravitalmikroskopie und Thrombose-Induktion (Abb. 7). Abgeschlossen wurden die Versuche mit der Blutentnahme und Euthanasierung der Tiere.

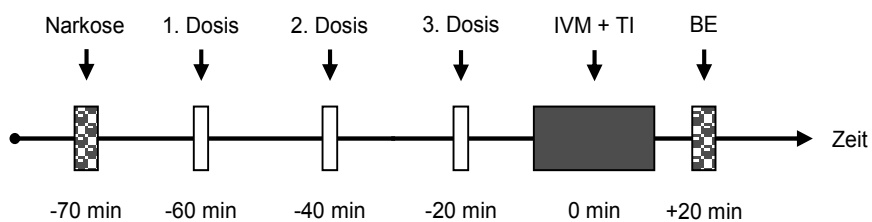


Abbildung 7: Darstellung des experimentellen Versuchsablaufs. Nach Narkotisierung der Versuchstiere folgte die Applikation der Studienmedikationen zu den aufgeführten Zeitpunkten. Es schlossen sich die intravitalmikroskopische Untersuchung (IVM) mit Thrombose-Induktion (TI) und der Abschluss des Experiments durch die Blutentnahme (BE) und Gewebeasservierung an.

4.7. STATISTISCHE AUSWERTUNG

Alle Daten wurden als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwertes ($MW \pm SEM$) angegeben. Die Mittelwerte der erfassten Parameter rekrutierten sich dabei aus den Einzelwerten der untersuchten Tiere pro Versuchsgruppe.

Bei einer Normalverteilung der Werte erfolgte der Vergleich zwischen den Gruppen mittels *one way analysis of variance* (ANOVA) gefolgt vom *Student's-t* Test für den unverbundenen Paarvergleich. Signifikante Unterschiede von Werten innerhalb einer Gruppe wurden mit Hilfe des gepaarten *Student's-t*-test und Korrektur des alpha-Fehlers nach Bonferroni für wiederholte Messungen geprüft.

Falls die Normalverteilung der Werte nicht gegeben war, erfolgte der Gruppenvergleich mittels der Kruskal-Wallis Varianzanalyse und der paarweise Vergleich mit dem Mann-Whitney Rang Summen Test. Entsprechend wurden signifikante Unterschiede innerhalb einer Gruppe durch die Friedman Rangvarianz Analyse, gefolgt

vom Wilcoxon Paar Test mit Korrektur des alpha-Fehlers bei Messwiederholungen bestimmt. Die Überlebensanalyse wurde unter Anwendung des Gehan-Breslow Tests durchgeführt.

Die Durchführung sämtlicher statistischer Testungen erfolgte unter Verwendung der Software SigmaStat[®] 3.0 (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA). Bei der Prüfung wurden Unterschiede von $p < 0.05$ als signifikant angesehen. Unter Verwendung der Software SigmaPlot[®] 10.0 (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) wurden die Ergebnisse in Säulen- und Streudiagrammen bzw. einer Kaplan-Meier-Kurve graphisch dargestellt.

5. ERGEBNISSE

5.1. MIKROZIRKULATION UND THROMBOSE-INDUKTION IM CREMASTERMUSKEL DER MAUS

Die Mikrozirkulation des *M. cremaster* wurde nach vollendeter Präparation mittels intravenöser Applikation des Fluoreszenzfarbstoffs FITC-Dextran (Abb. 8A) dargestellt. Aufgrund der langsamen Elimination aus dem Blutkreislauf und der geringen Extravasation ist eine kontrastreiche Visualisierung der Gefäße unter dem Multifluoreszenzmikroskop während der gesamten Untersuchungszeit möglich. Die Visualisierung der Leukozyten und deren Interaktion mit dem Gefäßendothel wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin-6G ermöglicht (Abb. 8B).

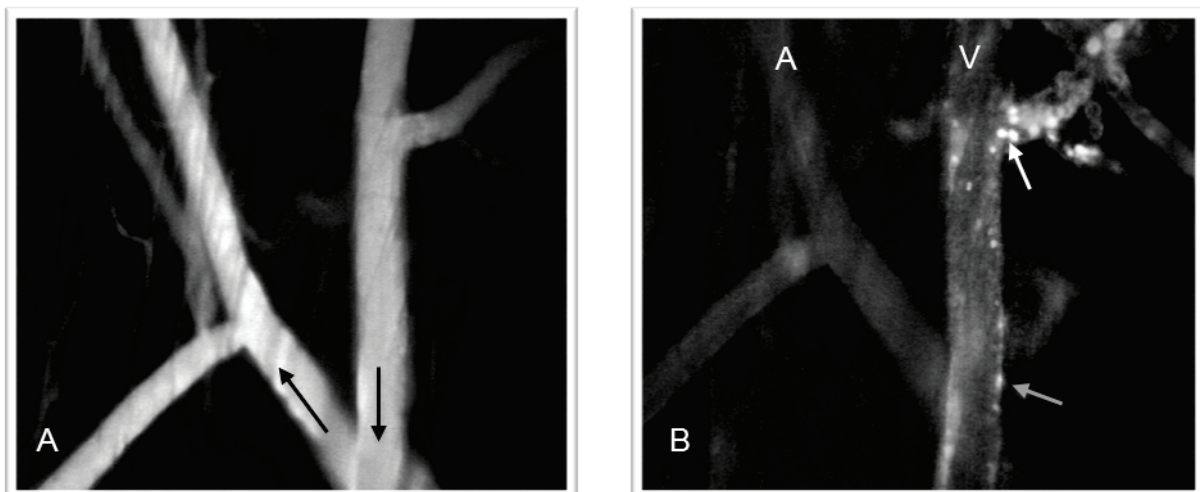


Abbildung 8: Repräsentative intravitalmikroskopische Übersichtsaufnahmen eines mit FITC-Dextran (A) und mit Rhodamin 6G (B) angefärbten Gefäßabschnitts. Die schwarzen Pfeile in Aufnahme (A) verdeutlichen die Fließrichtung. In Aufnahme (B) sind neben der Arteriole A und Venole V auch rollende (weißer Pfeil) und adhärenente (grauer Pfeil) Leukozyten zu sehen. 200-fache Vergrößerung.

5.1.1. CHARAKTERISTIKA DER THROMBOGENESE

Die Superfusion des *M. cremaster* mit FeCl_3 in Kombination mit der hochenergetischen Lichtexposition des Gefäßes führte in allen untersuchten Tieren zu einer venösen Thrombusformation. Unter Kontrollbedingungen erfolgte der durchschnittliche

Gefäßverschluss bei 430 s nach Beginn der Thrombose-Induktion. In Abb. 9 ist der Zusammenhang zwischen der Thrombushöhe (μm) und der Fließgeschwindigkeit (mm/s) der Kontrollgruppe (NaCl 0,9% behandelte Tiere) graphisch dargestellt. Mit zunehmender Belichtungsdauer und FeCl_3 Superfusion kam es zu einem progredienten Zuwachs der Thrombushöhe und damit einhergehend zu einer Abnahme der Fließgeschwindigkeit. Vor Thrombose-Induktion (Thrombushöhe $0 \mu\text{m}$) stellte sich die Fließgeschwindigkeit mit Messwerten von $0,6$ bis $1,3 \text{ mm/s}$ als sehr variabel dar. Der lineare Zusammenhang von zunehmendem Anstieg der Thrombushöhe und der kontinuierlichen Abnahme der Fließgeschwindigkeit wird in der Regressionsgeraden verdeutlicht.

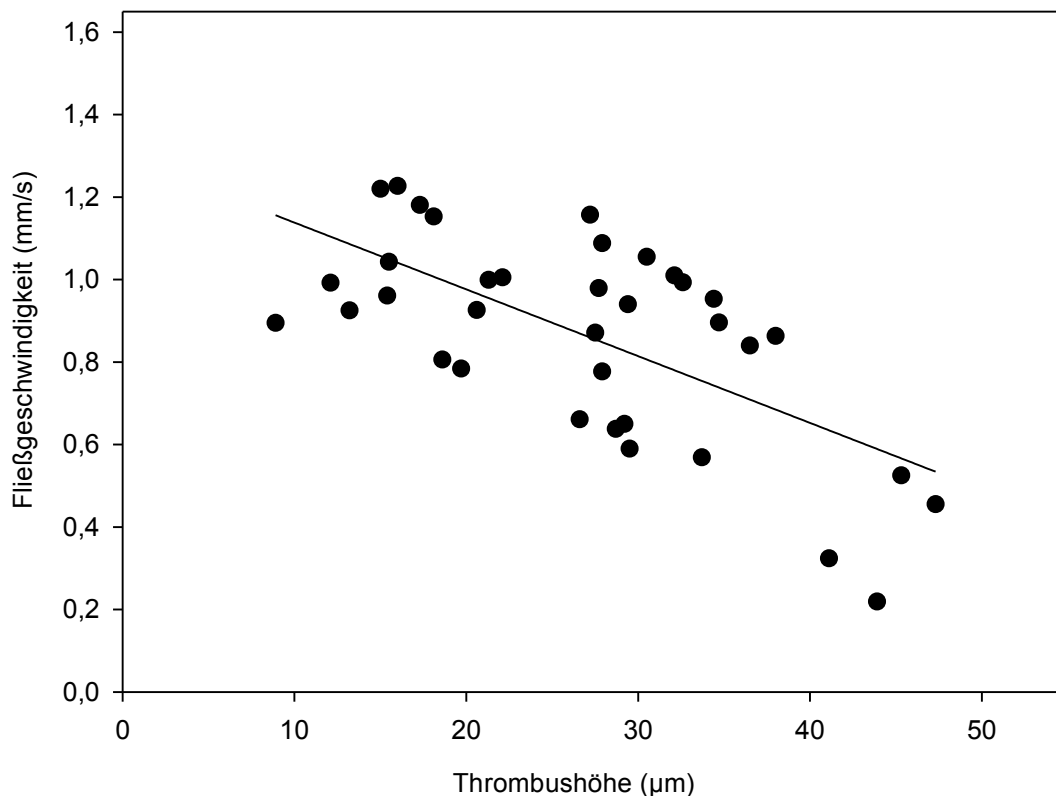


Abbildung 9: Regressionsanalyse zwischen der Fließgeschwindigkeit (mm/s) und der Thrombushöhe (μm) in der Kontrollgruppe (NaCl) ($n=36$) im Untersuchungszeitraum von 60s - 1200s . Angegeben sind Einzelwerte. Lineare Funktion $y = -0,02x + 1,3$; $r = 0,65$; $p < 0,05$.

5.1.2. PATENCY RATE

Als *patency Rate* wurde der prozentuale Anteil der durchgängigen Gefäße zu einem bestimmten Untersuchungszeitpunkt bezeichnet. Durch Vorbehandlung mit den verschiedenen Studiensubstanzen waren deutliche Unterschiede in der *patency Rate* zwischen den Gruppen erkennbar (Abb. 10).

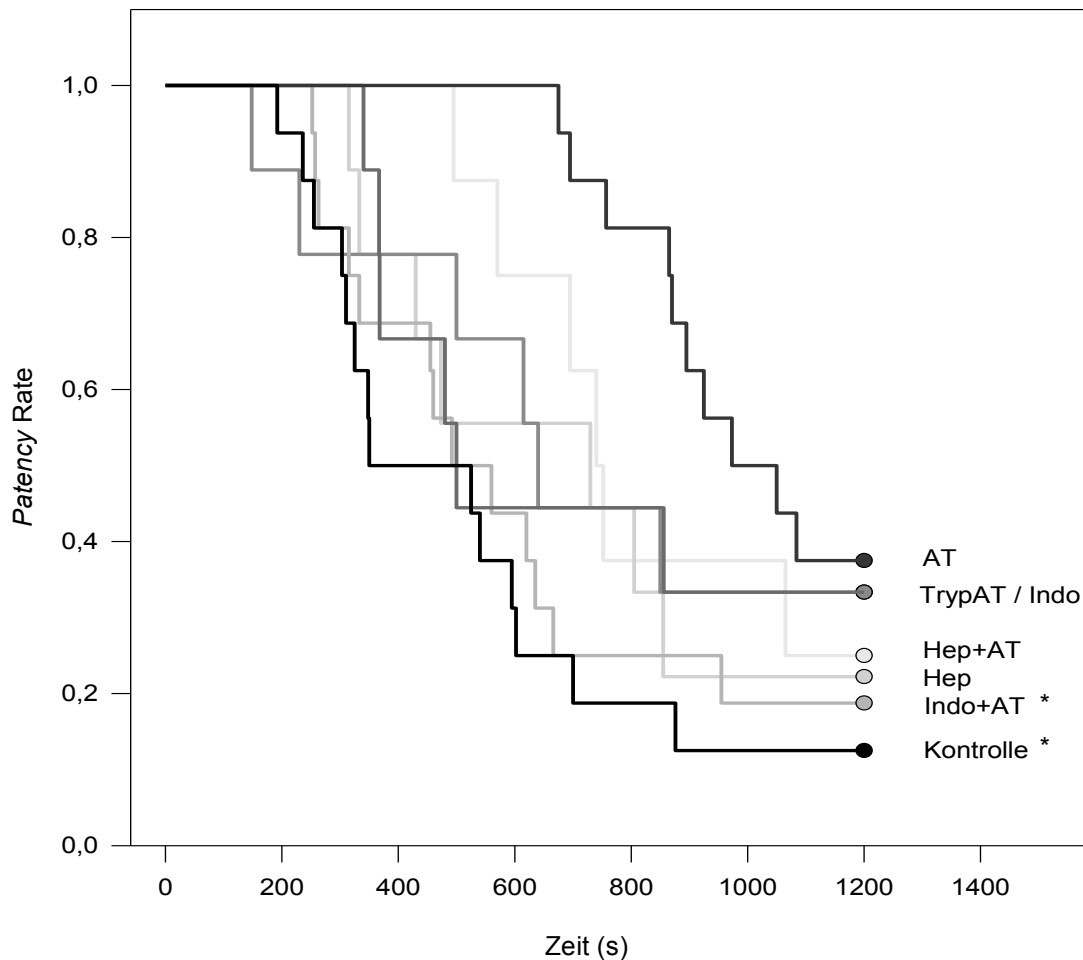


Abbildung 10: Darstellung der *patency Rate* in einer kumulativen Kaplan-Meier-Kurve nach Thrombose-Induktion in Venolen des *M. cremaster*. Gezeigt wird der Anteil offener Gefäße zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt. Sieben Versuchsgruppen ($n=8-16$) wurden untersucht: Kontrolle (Behandlung mit NaCl), AT (Behandlung mit Antithrombin), TrypAT (Behandlung mit Tryptophan⁴⁹-blockiertem Antithrombin), Indo (Behandlung mit Indomethacin), Indo+AT (Behandlung mit Indomethacin und AT), Hep (Behandlung mit Heparin), Hep+AT (Behandlung mit Heparin und AT). Angegeben sind Einzelwerte; Kaplan-Meier-Analyse (Gehan-Breslow Test); * $p < 0,05$ vs AT

In der Kontrollgruppe kam es innerhalb des Untersuchungszeitraum von 1200 s in 87% der beobachteten Venolen zur Okklusion bzw. waren 13% der Gefäße als noch durchgängig einzustufen. Die Behandlung mit AT führt dagegen zu einer deutlichen Verzögerung des Gefäßverschlusses. Nach 600 s waren noch 100% der untersuchten Venolen offen. Während der kontinuierlichen Thrombose-Induktion über 1200 s führte die AT-Behandlung nur zu einem Verschluss von 62% der Gefäße, das heißt einer *patency* Rate von 38%. Vorbehandlung mit den Studiensubstanzen TrypAT und Indomethacin führte im Vergleich zur Kontrollgruppe zu *patency* Rate von 33% nach 1200 s. Heparin allein und in Verbindung mit AT- bzw. Indomethacin plus AT-Therapie führte nach 1200 s zu *patency* Raten um 20%.

5.2. KOMPLETTE GEFÄßOKKLUSION

Die komplette Gefäßokklusion beinhaltete alle innerhalb von 1200 s okkludierten Gefäße und beschreibt die durchschnittlich notwendige Zeit bis zur irreversiblen Thrombosierung des Gefäßlumens (Abb. 11). In den Venolen der Kontrolltiere konnte nach durchschnittlich $440 \text{ s} \pm 54 \text{ s}$ eine komplette Gefäßokklusion beobachtet werden. Durch Vorbehandlung der Tiere mit AT verzögerte sich die durchschnittliche Zeit bis zum kompletten Verschluss signifikant auf $964 \text{ s} \pm 69 \text{ s}$ ($p < 0,05$ vs. Kontrolle).

Um den möglichen Einfluss der endothelialen GAG-Bindungen auf die anti-thrombotischen Prozesse zu erfassen, wurde TrypAT verwendet. Die Anwendung von TrypAT resultierte in einer signifikant kürzeren Okklusionszeit als in der AT-Gruppe ($p < 0,05$ vs. AT). Die durchschnittlich benötigte Zeit bis zum kompletten Gefäßverschluss lag mit $485 \text{ s} \pm 79 \text{ s}$ im Bereich von Werten, wie sie in der Kontrollgruppe gemessen wurden.

Die Okklusionszeiten nach Applikation von Indomethacin ($497 \text{ s} \pm 108 \text{ s}$) und Indomethacin kombiniert mit AT ($482 \text{ s} \pm 57 \text{ s}$) sind ebenfalls mit der Kontrollgruppe vergleichbar. Auch hier besteht ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur AT-Behandlung ($p < 0,05$ vs AT; Abb. 11).

Die Kombination der Studiensubstanzen Heparin und AT führte mit $790 \text{ s} \pm 98 \text{ s}$ zu einer im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant verlängerten Okklusionszeit ($p < 0,05$ vs. Kontrolle). Leicht prolongierte Okklusionsraten ($563 \text{ s} \pm 86 \text{ s}$) waren unter der alleinigen Applikation von Heparin zu beobachten (Abb. 11).

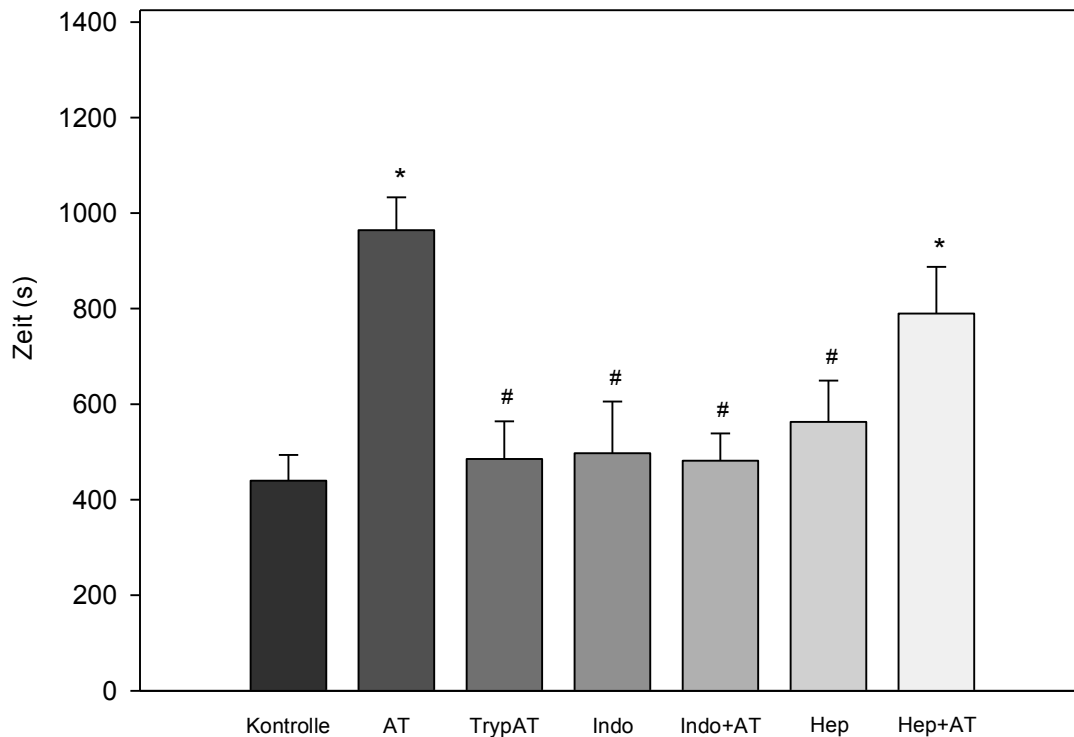


Abbildung 11: Darstellung der Zeit (s) bis zur kompletten Gefäßokklusion nach Thrombose-Induktion in Venolen des *M. cremaster*. Sieben Versuchsgruppen ($n=6-14$) wurden untersucht: Kontrolle (Behandlung mit NaCl), AT (Behandlung mit Antithrombin), TrypAT (Behandlung mit Tryptophan⁴⁹-blockiertem Antithrombin), Indo (Behandlung mit Indomethacin), Indo+AT (Behandlung mit Indomethacin und AT), Hep (Behandlung mit Heparin), Hep+AT (Behandlung mit Heparin und AT). Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM; ANOVA, post-hoc Vergleich; * $p < 0.05$ vs. Kontrolle; # $p < 0.05$ vs. AT

5.3. MIKROHÄMODYNAMISCHES MONITORING

Die Messungen und Berechnungen der mikrohämodynamischen Parameter wurden in mit Hilfe von FITC-Dextran visualisierten Gefäßabschnitten durchgeführt. Zur Veranschaulichung ist in Abb. 12 ein wachsender Thrombus in Blaulicht- Epi-Illumination nach Gabe von FITC-Dextran dargestellt.

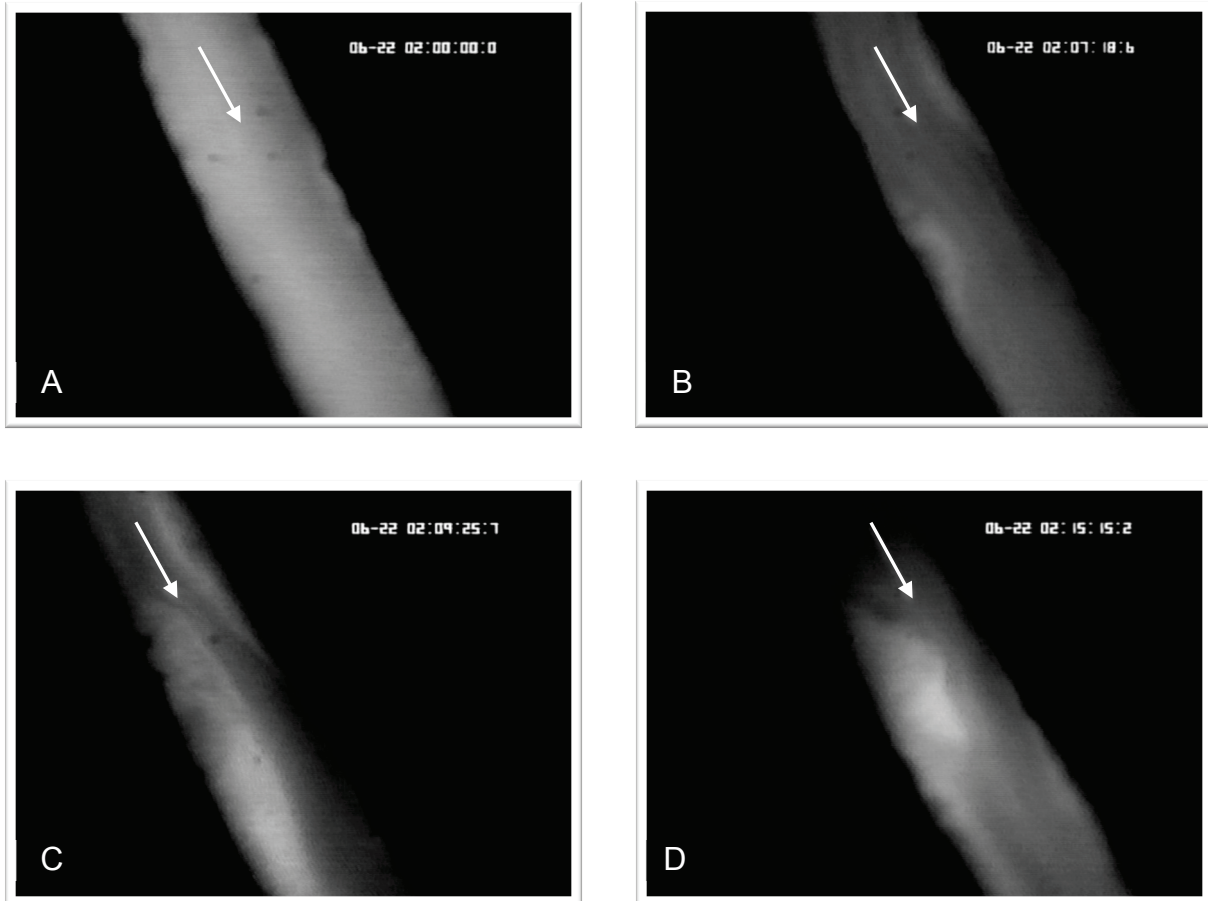


Abbildung 12: Repräsentative intravitalmikroskopische Abbildungen eines wachsenden Thrombus zu vier Untersuchungszeitpunkten (A= 0s; B= 438s; C= 565s; D= 915s) in einer Venole des *M. cremaster* der Maus. Das Gefäßlumen ist durch Färbung des Plasmas mit FITC-Dextran gut visualisierbar. Die Thrombose-Induktion erfolgte mittels Superfusion von 25 μ l Eisen(III)-Chlorid pro Minute. Die Pfeile verdeutlichen die Richtung des Blutflusses. 630-fache Vergrößerung.

5.3.1. GEFÄßDURCHMESSER

Die gemessenen durchschnittlichen Gefäßdurchmesser lagen in den Untersuchungsgruppen in einem Bereich von 45,5 μ m bis 50,9 μ m. Statistisch signifikante Unterschiede existierten nicht.

5.3.2. BLUTZELLFLIEßGESCHWINDIGKEIT

Die Blutzellfließgeschwindigkeit (Abb. 13) lag in allen Untersuchungsgruppen vor Thrombose-Induktion bei einem Wert von $\sim 1,0$ mm/s. Im fortschreitenden Studienverlauf zeigte sich die Tendenz zur Abnahme der Fließgeschwindigkeit in den Venolen des M. cremaster ohne statistisch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

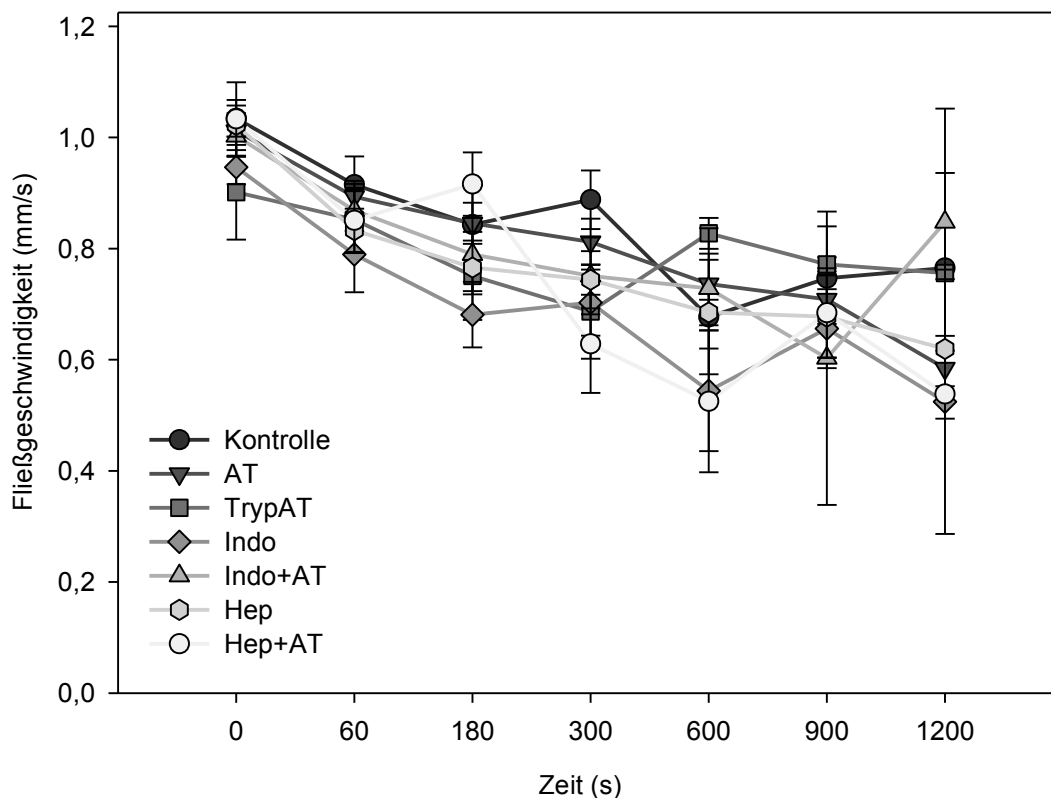


Abbildung 13: Darstellung der Fließgeschwindigkeit (mm/s) in den Venolen zu den Untersuchungszeitpunkten nach Thrombose-Induktion. Sieben Versuchsgruppen ($n=8-16$) wurden untersucht: Kontrolle (Behandlung mit NaCl), AT (Behandlung mit Antithrombin), TrypAT (Behandlung mit Tryptophan⁴⁹-blockiertem Antithrombin), Indo (Behandlung mit Indomethacin), Indo+AT (Behandlung mit Indomethacin und AT), Hep (Behandlung mit Heparin), Hep+AT (Behandlung mit Heparin und AT). Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM; Es gibt zwischen den einzelnen Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede.

5.3.3. WANDSCHERRATE

Bei Betrachtung der Wandscherrate (s^{-1}) (Abb. 14) ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen.

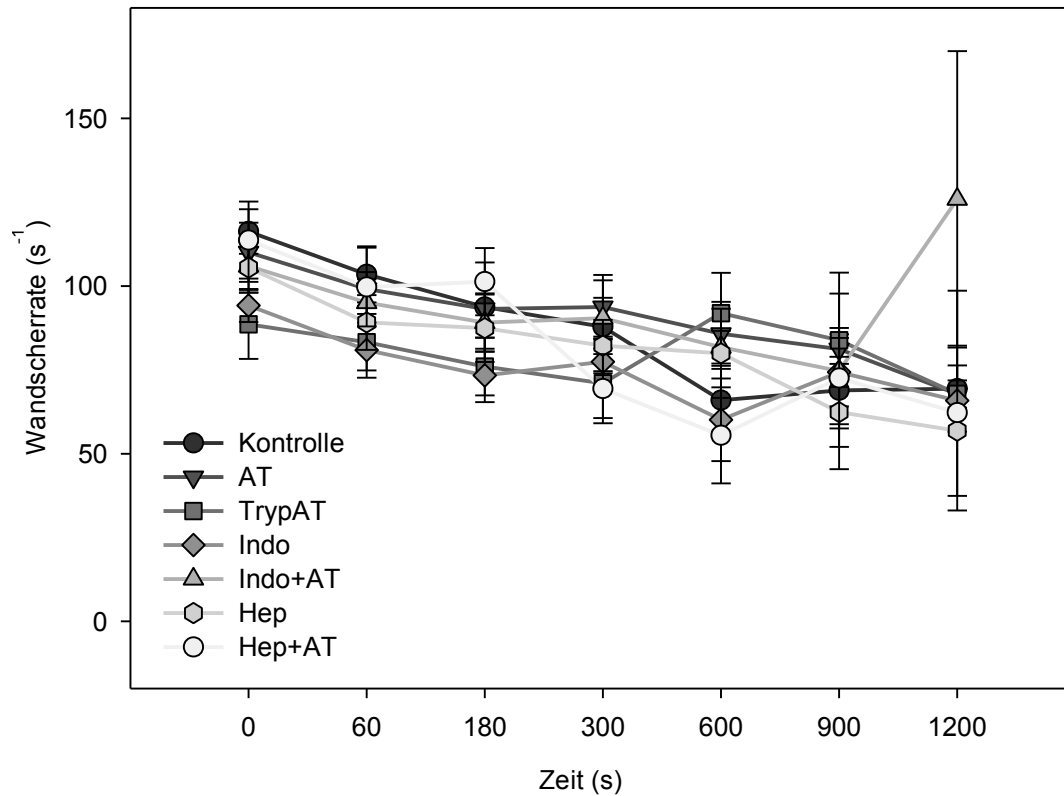


Abbildung 14: Darstellung der Wandscherrate (s^{-1}) in den Venolen zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten nach Thrombose-Induktion. Sieben Versuchsgruppen ($n=8-16$) wurden untersucht: Kontrolle (Behandlung mit NaCl), AT (Behandlung mit Antithrombin), TrypAT (Behandlung mit Tryptophan⁴⁹-blockiertem Antithrombin), Indo (Behandlung mit Indomethacin), Indo+AT (Behandlung mit Indomethacin und AT), Hep (Behandlung mit Heparin), Hep+AT (Behandlung mit Heparin und AT). Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM; Es gibt zwischen den einzelnen Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede.

5.3.4. THROMBUSHÖHE

Nach Thrombose-Induktion kam es zu einer kontinuierlichen Zunahme der Thrombushöhe auf im Mittel 32 μm nach 1200 s (Abb. 15) Es zeigten sich zwischen den einzelnen Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede.

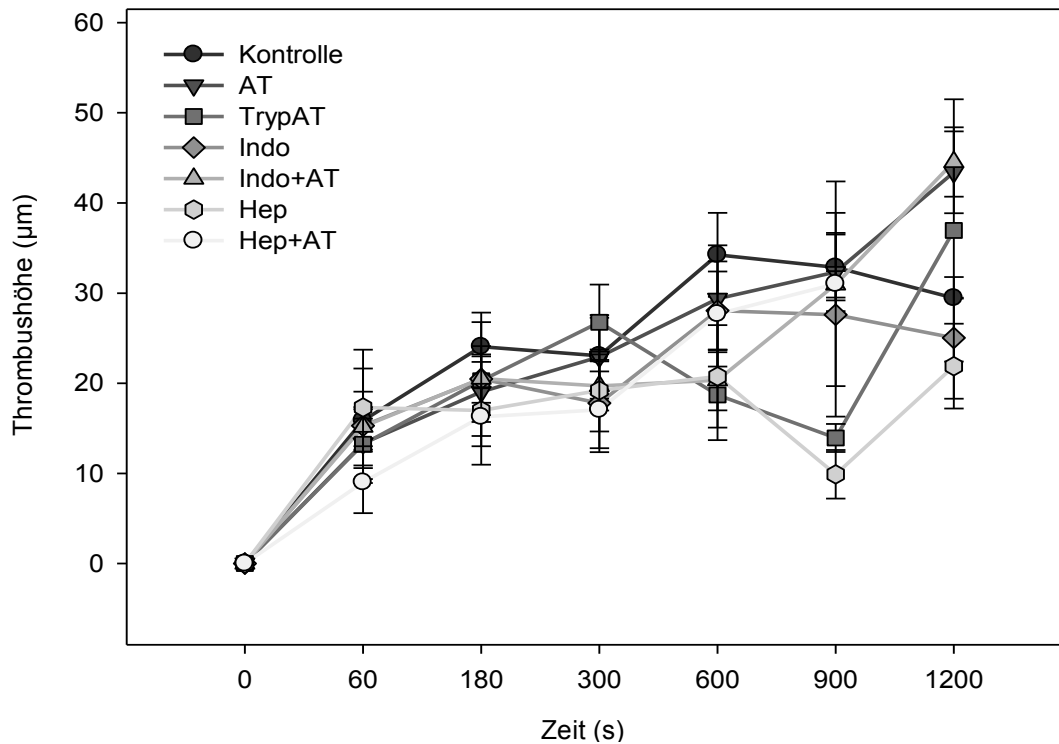


Abbildung 15: Darstellung der Thrombushöhe (μm) in den untersuchten Venolen nach Thrombose-Induktion zu den entsprechenden Untersuchungszeitpunkten. Sieben Versuchsgruppen ($n=8-16$) wurden untersucht: Kontrolle (Behandlung mit NaCl), AT (Behandlung mit Antithrombin), TrypAT (Behandlung mit Tryptophan⁴⁹-blockiertem Antithrombin), Indo (Behandlung mit Indomethacin), Indo+AT (Behandlung mit Indomethacin und AT), Hep (Behandlung mit Heparin), Hep+AT (Behandlung mit Heparin und AT). Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM; Es gibt zwischen den einzelnen Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede.

5.4. LEUKOZYTEN-ENDOTHELZELL-INTERAKTION

Zur Visualisierung der Leukozyten wurde den Versuchstieren der Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin-6G appliziert. In Abb. 16 ist ein untersuchter Gefäßabschnitt zu verschiedenen Zeitpunkten während einer Thrombose-Induktion dargestellt.

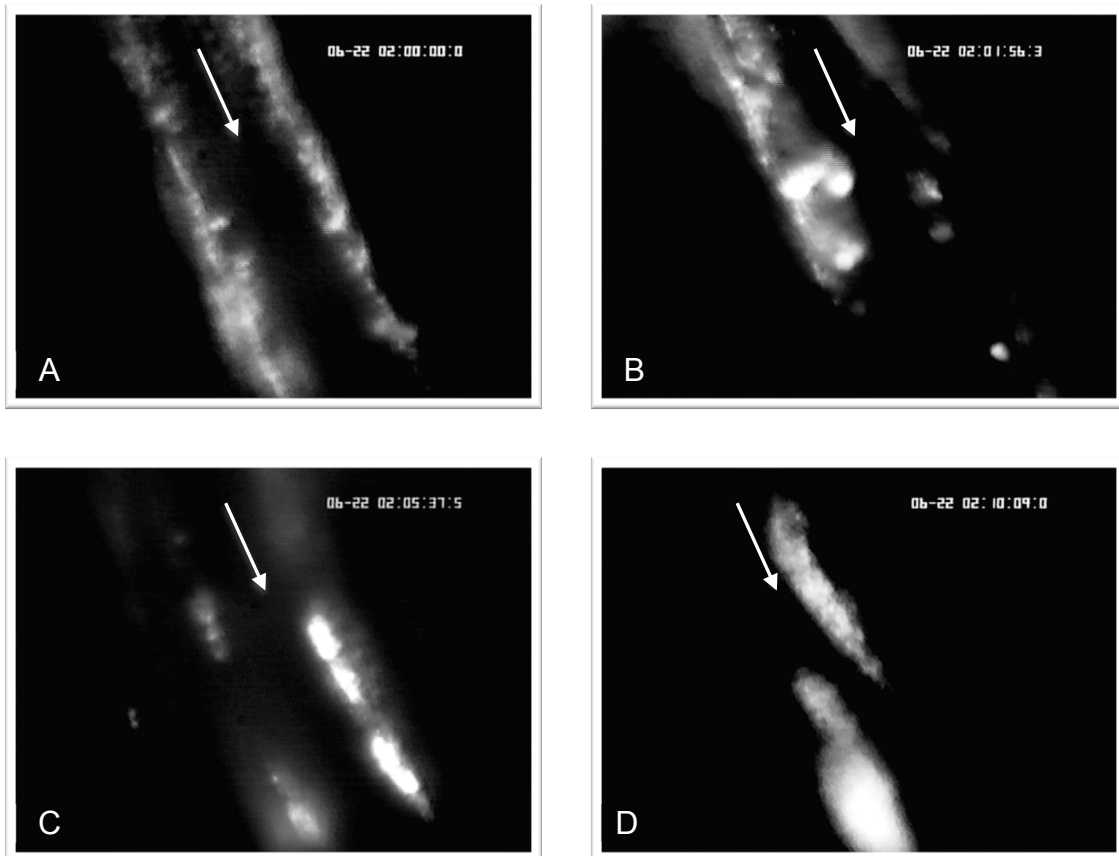


Abbildung 16: Repräsentative intravitalmikroskopische Abbildungen eines wachsenden Thrombus zu vier Untersuchungszeitpunkten (A= 0s; B= 116s; C= 337s; D= 609s) in einer Venole des *M. cremaster* in der Maus. Zu sehen sind wandadhärente Leukozyten, die zuvor mit Rhodamin-6G markiert wurden. Die Thrombose-Induktion erfolgte mittels Superfusion von 25 μ l Eisen(III)-Chlorid pro Minute. Die Pfeile verdeutlichen die Richtung des Blutflusses. 630-fache Vergrößerung.

Beispielhaft für die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion wurde in Abb. 17 die Fraktion rollender Leukozyten graphisch dargestellt. Über den Zeitverlauf der Thrombose-Induktion zeigte sich keine Zunahme der Fraktion rollender Leukozyten. Sie lag im Mittel bei 35 % ohne statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

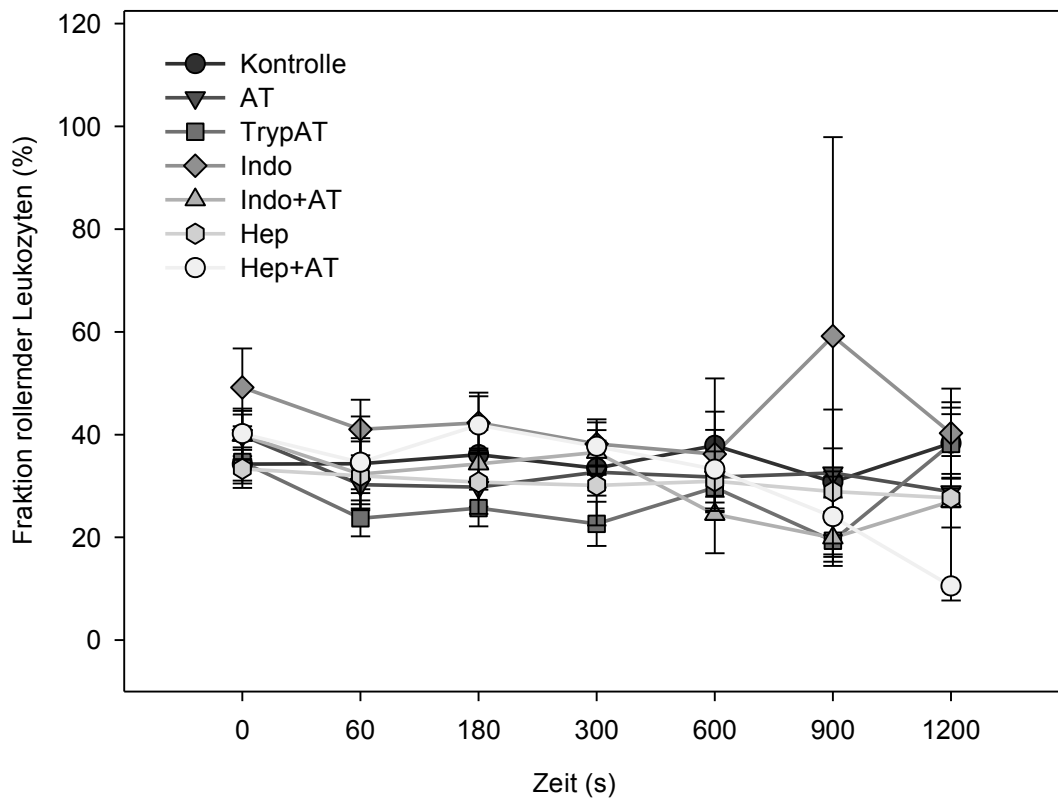


Abbildung 17: Darstellung der Fraktion rollender Leukozyten (%) zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten in den Venolen nach Thrombose-Induktion. Sieben Versuchsgruppen ($n=8-16$) wurden untersucht: Kontrolle (Behandlung mit NaCl), AT (Behandlung mit Antithrombin), TrypAT (Behandlung mit Tryptophan⁴⁹-blockiertem Antithrombin), Indo (Behandlung mit Indomethacin), Indo+AT (Behandlung mit Indomethacin und AT), Hep (Behandlung mit Heparin), Hep+AT (Behandlung mit Heparin und AT). Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM; Es gibt zwischen den einzelnen Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede.

5.5. HÄMATOLOGISCHE ANALYSEN

5.5.1. BLUTBILD

Die Analyse des Blutbildes (Tab. 2) zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe in den Gruppen Indo, Hep und Hep+AT eine signifikant niedrigere Anzahl an Erythrozyten. Im Vergleich zur AT-Gruppe wurde in der TrypAT- und Indo+AT-Gruppe eine signifikant niedrigere Anzahl an Leukozyten gemessen.

Tabelle 2: Systemisches Blutbild. Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM; ANOVA, post-hoc Vergleich; * $p < 0.05$ vs. Kontrolle, # $p < 0.05$ vs. AT; § $p < 0.05$ vs. Hep+AT

Parameter Gruppen	Erythrozyten ($\times 10^{12}/l$)	Leukozyten ($\times 10^9/l$)	Thrombozyten ($\times 10^9/l$)
Kontrolle	8,10 \pm 0,11	6,34 \pm 0,43	935 \pm 62
AT	7,91 \pm 0,15	6,98 \pm 0,52	1029 \pm 84
TrypAT	7,52 \pm 0,11	4,34 \pm 0,41 ^{#§}	957 \pm 20
Indo	7,16 \pm 0,10 ^{*#}	6,19 \pm 0,81	913 \pm 54
Indo+AT	7,66 \pm 0,16	4,79 \pm 0,36 ^{#§}	1028 \pm 32
Hep	7,36 \pm 0,14 [*]	5,85 \pm 0,60	1034 \pm 44
Hep+AT	7,16 \pm 0,19 ^{*#}	7,30 \pm 0,73	1132 \pm 48

5.5.2. GERINNUNGSPARAMETER

Die Gerinnungsparameter Fibrinogen und Quick wurden durch die verwendeten Studiensubstanzen im Vergleich zu der Kontrollgruppe nicht signifikant beeinflusst (Tab. 3). Die PTT war in der Indo+AT-Gruppe verglichen mit dem Wert der AT-Gruppe signifikant erniedrigt.

Tabelle 3: Analyse der Gerinnungsparameter Fibrinogen, Quick und PTT im systemischen Blut. Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM; ANOVA post-hoc Vergleich; * $p < 0.05$ vs. AT

Parameter Gruppen	Fibrinogen (g/l)	Quick (%)	PTT (s)
Kontrolle	0,78 \pm 0,08	125 \pm 18	41,2 \pm 3,5
AT	0,93 \pm 0,08	131 \pm 11	64,2 \pm 8,6
TrypAT	0,80 \pm 0,03	95 \pm 17	37,9 \pm 4,9
Indo	1,36 \pm 0,40	111 \pm 11	43,5 \pm 5,5
Indo+AT	0,96 \pm 0,12	115 \pm 34	35,2 \pm 2,4 *
Hep	0,76 \pm 0,09	108 \pm 10	keine Daten
Hep+AT	0,80 \pm 0,11	103 \pm 11	keine Daten

5.5.3. PROSTAGLANDIN F1-ALPHA

Die Messung des stabilen Prostazyklin Metaboliten PGF1- α mittels ELISA ergab für die Kontrollgruppe einen Wert von 1,37 ng/ml \pm 0,12 ng/ml. Für die AT-Gruppe wurde ein Wert von 1,43 ng/ml \pm 0,18 ng/ml ermittelt. Dagegen war die PGF1- α Konzentrationen in der Indo+AT-Gruppe mit 0,69 ng/ml \pm 0,16 ng/ml gegenüber der Kontroll- und der AT-Gruppe signifikant erniedrigt.

5.6. IMMUNHISTOCHEMIE

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse (Tab. 4) ergaben keine signifikanten Unterschiede. Bei den Parametern P-Selektin und E-Selektin zeigten sich weder im Prozentanteil der angefärbten Gefäße noch in den Scorewerten signifikante Unterschiede im Vergleich der Behandlungsgruppen. Die Analyse der prozentualen Anteile an PAI-1 positiven Gefäßen ergab einen signifikanten Unterschied zwischen der Indomethacin Behandlung verglichen mit der Heparin Behandlung. Bei der statistischen Analyse des semiquantitativen Scores von PAI-1 gibt es keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 4: Quantitative Analyse von P-Selektin, E-Selektin und PAI-1 positiven Gefäßen sowie Analyse der Färbeintensität anhand eines semiquantitativen Scores. Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM; ANOVA post-hoc Vergleich; * $p < 0.05$ vs. Indo

Färbung Gruppen	P-Selektin		E-Selektin		PAI-1	
	(%)	(Score)	(%)	(Score)	(%)	(Score)
Kontrolle	96 \pm 2	2,0 \pm 0,1	76 \pm 3	1,7 \pm 0,1	91 \pm 3	1,7 \pm 0,1
AT	94 \pm 1	2,1 \pm 0,1	83 \pm 2	1,9 \pm 0,1	89 \pm 3	1,7 \pm 0,2
TrypAT	94 \pm 3	1,7 \pm 0,0	75 \pm 3	2,0 \pm 0,2	91 \pm 3	1,5 \pm 0,3
Indo	89 \pm 4	1,7 \pm 0,1	58 \pm 12	1,4 \pm 0,2	75 \pm 6	1,8 \pm 0,1
Indo+AT	94 \pm 2	1,9 \pm 0,1	77 \pm 3	1,8 \pm 0,0	83 \pm 5	1,7 \pm 0,1
Hep	96 \pm 1	2,0 \pm 0,1	74 \pm 2	1,6 \pm 0,2	96 \pm 1 *	1,9 \pm 0,1
Hep+AT	94 \pm 2	1,8 \pm 0,0	75 \pm 3	1,9 \pm 0,1	85 \pm 4	1,8 \pm 0,1

Repräsentativ sind in Abb. 18 drei immunhistochemische Bilder dargestellt. Zwischen der Intensität der Anfärbung und dem Prozentsatz der angefärbten Gefäßlumina gab es keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.

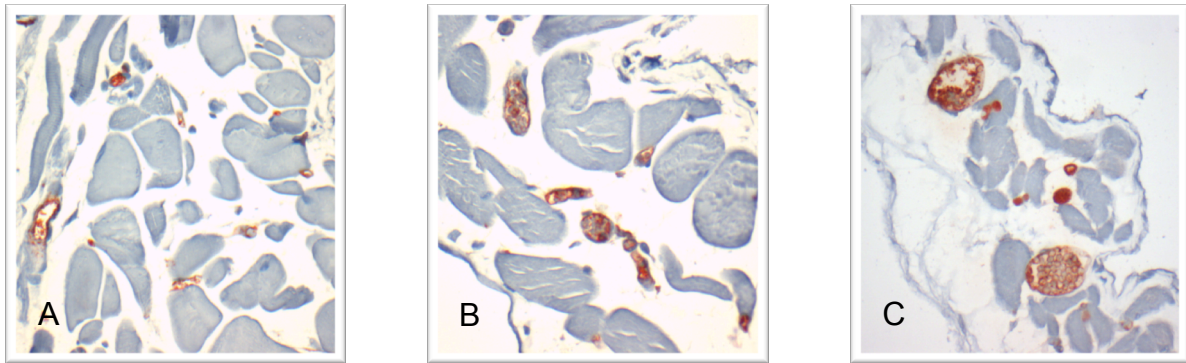


Abbildung 18: Repäsentative mikroskopische Bilder von drei Cremastermuskeln nach Färbung von Plasminogen Aktivator Inhibitor-1. Kontrolle (A), Antithrombin (B), Indomethacin (C). 400-fache Vergrößerung.

5.7. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

Anhand der vorliegenden experimentellen *in vivo* Studie war es möglich, den Einfluss verschiedener antikoagulativer Substanzen auf die akute mikrovaskuläre Thrombose zu untersuchen. Zusammenfassend können folgende Ergebnisse dargestellt werden:

1. Mit der gewählten Methode der Thrombose-Induktion konnte in allen untersuchten Tieren eine mikrovaskuläre Thrombose hervorgerufen werden.
2. Die Daten der kompletten Gefäßokklusion zeigten, dass die alleinige Applikation von AT zu einer statistisch signifikanten Verlängerung der Zeit bis zum vollständigen Gefäßverschluss führt. Die Therapie mit der Kombination von AT und Heparin bewirkte ebenfalls eine signifikante Verlängerung der Zeit bis zur Gefäßokklusion. In den Gruppen, in denen der anti-inflammatorische Wirkmechanismus von AT inhibiert wurde, zeigten sich Zeiten bis zur kompletten Gefäßokklusion, die vergleichbar mit den Werten der Kontrollgruppe waren. Dies erlaubt den Rückschluss, dass die anti-

koagulatorische Wirkung von AT im mikrovaskulären Gefäßsystem im Wesentlichen von dessen anti-inflammatorischer Potenz abhängt.

3. Trotz der deutlichen Unterschiede in den Daten der kompletten Gefäßokklusion weisen andere mikrohämodynamische Parameter der Thrombose unter den verwendeten Dosierungsregimen keine wesentlichen Unterschiede auf. Das bedeutet, dass die in den Gruppen unterschiedliche Thrombose nicht auf Unterschiede in mikrohämodynamischen Parametern zurückzuführen ist.

4. Auch der Vergleich der hämatologischen und immunhistochemischen Parameter ergab keine wesentlichen Unterschiede zwischen den untersuchten Studiensubstanzen.

6. DISKUSSION

6.1. DISKUSSION VON MATERIAL UND METHODIK

6.1.1. DISKUSSION DES MODELLS ZUR THROMBOSE-INDUKTION

6.1.1.1 CREMASTERMUSKELMODELL

Das in dieser Studie verwendete Tiermodell der *M. cremaster*-Präparation in der Maus ist ein etabliertes Verfahren zur experimentellen Untersuchung von Mikrozirkulation und Thrombose. Alternative Modelle zur Analyse der Thrombose sind beispielsweise die Präparation der Wangentasche des Hamsters (Kovacs et al., 1975), die Retina (Wilson & Hatchell, 1991) und das kraniale Gefäßbett (Ishikawa et al., 2002). In unserer Arbeitsgruppe etablierte *in vivo* Modelle zur Untersuchung der Mikrozirkulation sind das Ohr der haarlosen Maus (Sorg et al., 2006), die Rückenhautkammerpräparation (Menger et al., 2002; Sorg et al., 2007b; Grambow et al., 2013) sowie die Präparation des Cremastermuskels in der Ratte (Lindenblatt et al., 2004) und der Maus (Sorg et al., 2007a).

In der vorliegenden Studie wurde der akute Einfluss verschiedener Antikoagulantien auf die Mikrozirkulation und Leukozyten-Endothelzell-Interaktion im Cremastermuskel der Maus untersucht. Die Verwendung eines chronischen Tiermodells war daher nicht notwendig. Ein Unterschied der Cremastermuskelpräparation zu den oben beschriebenen Modellen besteht in der zentralen Lage des Muskels und dessen direkten Anschluss an das zentrale Gefäßsystem. Versorgt wird der *M. cremaster* von der *A. spermatica externa*, welche sich aus dem *Truncus pudis-epigastricus* der *A. iliaca externa* speist (Meininger et al., 1987). Der venöse Abfluss erfolgt über die *V. spermatica externa* in die *V. cava inferior*. Daher entspricht das mikrovaskuläre Gefäßbett des Cremastermuskels im Vergleich zur Untersuchung in der Haut oder dem Ohr eher dem eines zentral liegenden Organsystems. Somit handelt es sich um ein geeignetes Modell zur Analyse der akuten mikrovaskulären Thrombusformation, auch im Hinblick auf deren Bedeutung im Rahmen septischer Situationen (Sorg et al., 2007a). Ein Nachteil der Untersuchung im Cremastermuskel ist die aufwendige

und anspruchsvolle chirurgische Präparation, die mit einem nicht unerheblichen Gewebetrauma und einer damit verbundenen pro-inflammatorischen Antwort des Organismus einhergeht. Diese Reaktion kann die Thrombusformation und andere mikro-hämodynamische Parameter, wie Gefäßdurchmesser und Blutfluss, verändern (Fiebig et al., 1991). Zur Minimierung dieses Traumas wurde die Präparation mit größtmöglicher Sorgfalt und unter Schonung des umliegenden Gewebes durchgeführt (Bagher & Segal, 2011).

Die chirurgische Präparation und intravitalmikroskopische Untersuchung der Tiere erforderte eine Narkose, welche mit Ketamin und Xylazin durchgeführt wurde. Die Applikation von Ketamin führt über die Blockade des NMDA-Rezeptors zu effektiver Analgesie und Anästhesie des Tieres, wobei ein leicht stimulierender Effekt auf das Herz-Kreislaufsystem beobachtet wird. Der α -2-Rezeptorantagonist Xylazin führt zu einer allgemeinen Muskelrelaxation und Analgesie. Die Kombination dieser Narkotika ist ein etabliertes Standard-Anästhesieverfahren bei Kleintierexperimenten (Erhardt et al., 1984).

6.1.1.2. METHODEN DER THROMBOSE-INDUKTION

Zur *in vivo* Induktion einer Thrombose kann auf vielfältige Techniken zurückgegriffen werden. Die dabei verwendeten Methoden haben sehr unterschiedliche Herangehensweisen (Rumbaut et al., 2005). Hierzu gehören die Gefäßtransektion (Hugues, 1953), die endotheliale Denudation mittels Ballonkatheter (Lee & Lee, 1975), die Induktion einer Ischämie (Massberg et al., 1999), die Elektro-Stimulation (Callahan et al., 1960), der Einsatz von Laserstrahlung (Kochen & Baez, 1965) oder die Applikation inflammatorischer Stimuli (Cerwinka et al., 2002). In der vorliegenden Studie wurden zwei Methoden zur Induktion einer mikrovaskulären Thrombose kombiniert, nämlich das Modell der phototoxischen Thrombose-Induktion mit dem chemischen Modell der FeCl_3 Superfusion. Dieser Ansatz wurde gewählt, um zwei Bedingungen zu erfüllen: Erstens wurden durch die systemisch auf den Muskel applizierte FeCl_3 Superfusion die spezifischen koagulatorischen und inflammatorischen Gegebenheiten einer DIC in einem Organsystem nachempfunden. Dieses Modell wurde ursprünglich zur Untersuchung von arteriellen Thrombosen in Ratten entwickelt (Kurz et al., 1990), ist aber auch ein etabliertes Modell zur Analyse mikrovaskulärer Thrombose in der Maus (Chauhan et al., 2007). Durch chemische Oxidation der Eisenionen

(Wang & Xu, 2005) kommt es bei Verwendung von FeCl_3 im gesamten Cremastermuskulatur zur Denudation des Gefäßendothels (Ni et al., 2000). Das FeCl_3 Modell ist ein etabliertes Modell zur Erforschung mikrovaskulärer Thrombusformationen in der Maus. So konnte mit Hilfe des FeCl_3 Modells ein anti-thrombotisches Potential von Schwefelwasserstoff nachgewiesen werden (Grambow et al., 2013).

Um die lokale Entstehung des Thrombus direkt verfolgen, aufzeichnen und dessen Effekte in Bezug auf die mikrovaskuläre Perfusion auswerten zu können, wurde zusätzlich das *light-dye* Modell eingesetzt. Aufgrund der lokalen Begrenzung der Reaktion auf den Lichtkegel des Blaulichts in FITC markierten Gefäßen wird gewährleistet, dass die Thrombusformation im Sichtfeld der beobachteten Venole entsteht. Nur die Kombination aus spezifischem Farbstoff und entsprechender Epi-Illumination kann hier zu einer Thromboseformation führen. Die Komponenten einzeln angewendet führen zu keiner Reaktion. Die erste phototoxische Thrombose-Induktion erfolgte in mikrovaskulären Gefäßen der Pia Mater der Maus nach Injektion von Natrium-Fluorescein (Rosenblum & El-Sabban, 1977). Der Effekt beruht auf der Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies, die durch Anregung des Fluorchromogens FITC mit dem emittierten Licht einer Wellenlänge von 490 nm gebildet werden (Saniabadi et al., 1995). Beide verwendeten Modelle resultieren in einem lokal limitierten und regionalen Endothelzellschaden (Sato & Ohshima, 1984; Rumbaut et al., 2004), der wiederum mit einer erhöhten Freisetzung von TF einhergeht. Die Freisetzung von TF spielt im Rahmen der DIC bei Sepsis eine entscheidende Rolle (Drake et al., 1993; Engelmann et al., 2003), weshalb das kombinierte Modell zur Thrombose-Induktion eine sehr geeignete Methode zur Untersuchung der mikrovaskulären Thromboseformation darstellt.

Die Durchführung der Studie erforderte die Applikation von verschiedenen Substanzen. Gewählt wurden die Antikoagulantien AT, TrypAT und Heparin. Indomethacin wurde verwendet, um den Einfluss der Inflammation auf die Koagulation zu beurteilen. Die Wirkung von Indomethacin konnte durch Messung des stabilen Prostazyklin Metaboliten $\text{PGF1-}\alpha$ im ELISA verifiziert werden. Während die Kontrollgruppe und AT-Gruppe Mittelwerte um 1,4 ng/ml von $\text{PGF1-}\alpha$ aufwiesen, kam es unter Behandlung mit Indomethacin zu einer signifikanten Hemmung der Cyclooxygenase und somit einer Reduktion von $\text{PGF1-}\alpha$ um ca. die Hälfte (0,7 ng/ml).

In der vorliegenden Studie sind Medikamente in der Maus verwendet worden, die für den humanen Gebrauch hergestellt und freigegeben wurden. Beispielsweise wird das verwendete AT aus humanem Plasma gewonnen. Dies wirft die Frage auf, inwiefern die für den humanen Einsatz vorgesehenen Substanzen vergleichbare Wirkungen im Tiermodell aufweisen. Diese Substanzen wurden jedoch mehrfach in verschiedenen Tiermodellen angewendet und sind daher etabliert (Hoffmann et al., 2002a; Hoffmann et al., 2002b; Sorg et al., 2006; Sorg et al., 2007a). Auch konnte erst mit Hilfe verschiedener *in vivo* Modelle das therapeutische Potential vieler dieser Substanzen belegt werden (Leadley et al., 2000). Auch die grundsätzliche Wirkung von AT auf Gerinnung und Entzündung im murinen Tiermodell konnte hinreichend nachgewiesen werden (Dickneite, 1998; Hoffmann et al., 2002b; Sorg et al., 2007a).

6.1.2. DISKUSSION DER UNTERSUCHUNGSTECHNIKEN

Für die vorliegende Studie kam als primäre Untersuchungstechnik die intravitale Fluoreszenzmikroskopie zum Einsatz. Dabei handelt es sich um ein Verfahren, mit dem die Analyse der Mikrozirkulation und Thrombosekinetik möglich ist. Alternative Verfahren zur Erforschung mikrozirkulatorischer Mechanismen sind Messungen des Sauerstoffpartialdrucks (Vollmar et al., 1992), die Mikrosphären-Technik (Zwissler et al., 1991) oder die Laser-Doppler-Flowmetrie (Vollmar et al., 1994). Der Nachteil der alternativen Methoden besteht jedoch darin, nur indirekt Aussagen über die Mikrozirkulation treffen zu können. Durch Nutzung der Multifluoreszenzmikroskopie war es möglich, die untersuchten Gefäßabschnitte über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg direkt am Ort der Thromboseentstehung zu analysieren. Die Intravitalmikroskopie wurde erstmals 1945 zur pathophysiologischen Untersuchung von mit Malaria infizierten Affen angewendet (Knisely et al., 1945). Die Modifizierung des Modells mit Epi-Illuminationstechnik (Sherman & Fisher, 1986) eröffnete dann neue Anwendungsmöglichkeiten bei nicht transilluminierbaren Organen. Inzwischen ist die Intravitalmikroskopie eine weit verbreitete und zuverlässige Methode und kommt bei der Erforschung diverser Fragestellungen zum Einsatz. Beispielhaft zu erwähnen sind Untersuchungen an der Leber (Vollmar et al., 1997), zur Tumorentstehung (Klenke et al., 2005), bei Ischämie und Reperfusion des Muskels (Schoen et al., 2007), bei Inflammation (Hoffmann et al., 2004b), sowie zur mikrovaskulären Thrombose (Lindenblatt et al., 2007; Sorg et al., 2007a; Puschel et al., 2012) und Wund-

heilung (Sorg et al., 2009a; Sorg et al., 2009b).

Insgesamt ist die Intravitalmikroskopie eine ideale experimentelle Methode, um *in vitro* gewonnene Ergebnisse mit dem Ausblick auf klinische Studien *in vivo* zu verifizieren (Vollmar & Menger, 1998; Menger et al., 1999). Die pathophysiologischen Prozesse und Mechanismen von Gerinnung und Entzündung sind jedoch äußerst komplex. Mit tierexperimentellen Modellen ist grundsätzlich nur eine limitierte Betrachtung des Geschehens möglich (Marshall et al., 2005). Somit ist der Rückschluss von Ergebnissen aus Grundlagenexperimenten auf klinische Therapien mit entsprechender Vorsicht zu bewerten. Nichtsdestotrotz stellen sie die Grundlage für weiterführende Analysen und klinische Studien dar.

6.2. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Im Rahmen einer Sepsis fällt der mikrovaskulären Thrombose eine pathophysiologische Schlüsselstellung zu. Die Ursache liegt in der engen Interaktion von Koagulation und Inflammation (Amaral et al., 2004). Die Grundlage für die Thrombogenese bildet die Virchow'sche Trias mit Endothelschaden, Strömungsstörung und veränderter Blutzusammensetzung. Der septische Patient hat ein hohes Risiko, eine *DIC* oder thrombotische Komplikationen zu entwickeln und profitiert von einer antikoagulatorisch wirksamen Prophylaxe (Dellinger et al., 2013). Die detaillierte Analyse der mikrovaskulären Thrombusformation ist notwendig, um genaue Einblicke und ein tieferes Verständnis der komplexen Interaktionen von Entzündungs- und Gerinnungsmechanismen zu gewinnen und eine Optimierung der therapeutischen Versorgung zu erreichen. Das Ziel der vorliegenden Studie war es daher, die Interaktionen von Mechanismen der Gerinnungs- und Entzündungskaskade im mikrovaskulären System zu analysieren. Zum Einsatz kam dabei AT als endogener Mediator, der die Fähigkeit besitzt, sowohl die Gerinnung (Blatt et al., 1978; Blauhut et al., 1985) als auch die Entzündung (Inthorn et al., 1997, 1998; Hoffmann et al., 2004a; Fertmann et al., 2006) positiv zu beeinflussen und dessen Wirkungen sowohl experimentell als auch klinisch sehr intensiv erforscht wurden.

Die mikrovaskuläre Thrombose weist generell mikrohämodynamische Spezifika auf, welche auch in der vorliegenden Studie nachgewiesen werden konnten. Typisch ist hierbei der zu beobachtende Zusammenhang zwischen der Thrombushöhe und der Fließgeschwindigkeit entsprechend der Virchow'schen Trias. Je langsamer das Blut

fließt, desto schneller und häufiger kommt es zur Zunahme der Thrombushöhe und *vice versa*, was beispielhaft mittels Regressionsanalyse der Kontrollgruppe veranschaulicht wurde (Abb. 9). Somit kann verdeutlicht werden, dass mit dem verwendeten Modell prinzipielle mikrohämodynamische Abhängigkeiten während der Thrombusformation hervorgerufen werden können. Veränderungen der Hämorrheologie sind laut Virchow einer der drei Faktoren, die zu einer Thrombose führen (Chung & Lip, 2003). Unter Ausgangsbedingungen, das heißt vor Thromboseinduktion, liegen die Fließgeschwindigkeiten zwischen 0,6 und 1,3 mm/s. Dieser große Geschwindigkeitsunterschied beruht auf den Gefäßgrößen, welche in der Kontrollgruppe in einem Bereich von 25 µm bis 66 µm lagen. Die gemessenen Geschwindigkeiten sind mit veröffentlichten Daten anderer Studien sowie der eigenen Arbeitsgruppe gut vergleichbar (Kim & Sarelius, 2004; Lindenblatt et al., 2005).

Eine Stase des Blutes im Gefäßsystem führt zum Ausbleiben der Sauerstoffversorgung und damit zur Gewebshypoxie, welche eine Freisetzung von gerinnungsaktivierenden Substanzen, wie ADP, Serotonin, vWF und Kalzium aus Thrombozyten und Endothelzellen bewirkt (Hathcock, 2006). Die Stase führt zudem zu einer Reduktion der Transportgeschwindigkeit, über die pro- und anti-thrombogene Faktoren, wie FXI, FXa und AT, (Contino et al., 1994) zu einem bestimmten Gefäßabschnitt gelangen bzw. entfernt werden (Hathcock et al., 2005). So kann es zu einem lokalen Überschuss an pro- bzw. einem Mangel an anti-thrombogenen Mediatoren kommen. Konsekutiv resultiert daraus eine Verschiebung des hämostatischen Gleichgewichts hin zur Blutgerinnung.

Mithilfe der Kaplan-Meier-Kurve zur Darstellung der *patency* Rate (Abb. 10) konnten die spezifischen Unterschiede der Versuchsgruppen in Bezug auf den Anteil der durchgängigen venösen Gefäße zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt gut visualisiert werden. Signifikante Unterschiede sind zwischen der Kontroll- bzw. Indo+AT-Gruppe und der AT-Gruppe vorhanden. Während nach 20 Minuten in der Kontrollgruppe nur noch 12,5% der Gefäße durchgängig waren, konnte in der AT-Gruppe eine Offenheitsrate von 37,5% festgestellt werden. Damit waren in der AT-Gruppe mehr als doppelt so viele Gefäße unter kontinuierlich weiterlaufender Thromboseinduktion durchgängig wie in der Kontrollgruppe. Dieser signifikante Unterschied resultiert aus der Applikation von AT und belegt dessen anti-thrombogenes Potential. Der signifikante Unterschied zwischen Indo+AT im Vergleich zu der alleinigen AT-Behandlung muss folglich auf die Wirkung von Indomethacin zurückzuführen sein.

Erklärt werden kann dieses Ergebnis mit der Inhibierung des Cyclooxygenase *pathways* durch Indomethacin und der daraus resultierenden verminderten Freisetzung von Prostazyklin (siehe unten).

In der TrypAT- und Indo-Gruppe liegt der Anteil offener Gefäße nach 20 Minuten mit 33,3% im Bereich der AT-Gruppe, die statistische Analyse ergab jedoch keine signifikanten Unterschiede zu anderen Versuchsgruppen. Über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg betrachtet liegt die Offenheitsrate dieser beiden Gruppen näher an der Kontrollgruppe als an der AT-Gruppe. Entsprechend bewirken die Substanzen TrypAT bzw. Indo keinen signifikanten Einfluss auf die *patency* Rate über den gesamten Untersuchungszeitraum. Auch der zeitliche Verlauf der Daten der Hep-Gruppe liegt im Bereich der Kontrollgruppe, woraus zu folgern ist, dass die alleinige Heparin-Behandlung keinen signifikanten Einfluss auf die Offenheitsrate ausübt. Einzig bei Betrachtung des Verlaufs der Ergebnisse der Hep+AT-Gruppe kann man eine tendenzielle nicht-signifikante Annäherung an die AT-Gruppe erkennen. Dieser Effekt ist auf die Kombination von AT mit Hep zurückzuführen und kann mit der hemmenden Wirkinteraktion von Heparin auf AT erklärt werden (siehe Gefäßokklusion).

Die deutlich höhere Offenheitsrate in AT-behandelten Tieren zeigte sich zudem in einem deutlich verzögerten Beginn der Thromboseentstehung. Während in der Kontrollgruppe die ersten Gefäße bereits nach 200 s okkludierten, setzte dieser Effekt in der AT-Gruppe erst nach 675 s ein, was einem mehr als dreifach so langem Intervall mit einer *patency* Rate von 100% zu diesem Zeitpunkt entspricht. Konsekutiv führte sich der anti-thrombogene Effekt von AT bis zur kompletten Gefäßokklusion fort. In der Indo-Gruppe begannen dagegen die Gefäße schon nach 148 s und somit vor dem Beginn der Kontrollgruppe zu okkludieren, was möglicherweise auf die Verminderung der Endproduktsynthese von Prostazyklin zurückgeführt werden kann.

Im Gegensatz zur AT-Gruppe zeigen die Tiere der TrypAT-Gruppe jedoch keine Verlängerung der Zeiten bis zur kompletten Gefäßokklusion. Während beschrieben wurde, dass TrypAT im Vergleich zu AT ein unverändertes antikoagulatorisches Potential besäße (Hoffmann et al., 2002b), kann dies anhand der Ergebnisse der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden. Die chemische Modifikation von AT zu TrypAT verhindert die Bindung an endothelständige mikrovaskuläre GAGs. GAGs sind saure Polysaccharide und Bestandteil diverser biologischer Makromoleküle, wie beispielsweise Heparin und Heparansulfat (Iozzo, 1998). Auf der Endotheloberfläche lokali-

sierte GAGs beinhalten auch Heparansulfate und Heparin-ähnliche Strukturen, die den gleichen aktivierenden Effekt auf den antikoagulatorisch wirksamen Serinprotease-Inhibitor AT ausüben, wie Heparin im Blut (Marcum & Rosenberg, 1984; Roemisch et al., 2002). Zudem ist die Dichte an GAGs im mikrovaskulären Gefäßsystem zehnfach höher als im makrovaskulären Bereich, weshalb das mikrovaskuläre Gefäßsystem der Hauptwirkort für die AT Aktivität zu sein scheint (Bombeli et al., 1997).

Bei TrypAT ist die Bindungsstelle des ATs, im Gegensatz zu normalem AT, in der Lage weder Heparin noch endotheliale GAGs zu binden und diese zu aktivieren, weil die auf der Position 49 lokalisierte Aminosäure Tryptophan mittels chemischer Modifikation blockiert wurde (Blackburn et al., 1984; Hoffmann et al., 2002b). Blackburn beschrieb dabei, dass durch Blockade der Tryptophan⁴⁹-Aminosäure die Heparin Bindungsstelle des ATs inaktiviert wird. Nicht beeinflusst wird jedoch die Bindungsstelle für die Serinproteasen, beispielsweise Thrombin (Blackburn & Sibley, 1980). Somit ist die Fähigkeit der Inaktivierung von Serinproteasen intakt und die antikoagulatorische Wirkung von TrypAT *in vitro* bzw. makrovaskulär nachvollziehbar. Unsere Daten im mikrovaskulären System zeigen jedoch auf, dass TrypAT keine antikoagulatorisch wirksame Potenz besitzt. Dies erlaubt die Schlussfolgerung, dass das mikrovaskuläre Gefäßendothel mit den dort befindlichen GAGs eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung der mikrovaskulären Thrombose besitzt. Die Aktivierung der GAGs durch die AT-Bindung ist somit ein entscheidender Faktor für die Initiierung des Cyclooxygenase *pathways* und der konsekutiven Ausschüttung von Prostazyklin aus dem Gefäßendothel im mikrovaskulären System (Yamauchi et al., 1989; Horie et al., 1990).

Prostazyklin ist bekannt als ein sehr starker, über einen cAMP-abhängigen Prozess wirkender, antikoagulatorischer und anti-inflammatorischer Mediator (Longo & Harrison, 2012). Somit kann angenommen werden, dass die Prostazyklinausschüttung, neben der Modulation anti-inflammatorischer Prozesse (Hoffmann et al., 2002b), einen wichtigen Beitrag zu der Modulation von antikoagulatorischen Prozessen im mikrovaskulären Stromgebiet leistet. Durch Applikation des Cyclooxygenase Inhibitors Indomethacin in den Gruppen Indo und Indo+AT konnte diese Annahme überprüft werden. Die Daten für die komplette Gefäßokklusion der Indo-Gruppen bestätigen das Fehlen eines protektiven antikoagulatorischen Effekts von AT bei gleichzeitiger Inhibierung der Prostazyklin-Synthese. Beachtenswerterweise war

auch die nach Gabe von Indomethacin erfolgte Applikation von AT nicht in der Lage, das Resultat der antikoagulatorischen Defizienz aufzuheben (siehe Indo+AT-Gruppe). Die erhöhte Synthese von Prostazyklin nach Bindung von AT an die GAGs kann die Verzögerung der mikrovaskulären Thrombose-Induktion in dieser Versuchsgruppe erklären. So ist der positive Einfluss von Prostazyklin nach AT-Applikation auf die Mikrozirkulation der Leber nach Ischämie und Reperfusion bekannt (Harada et al., 1999). Auch Endotoxin-induzierte Mikrozirkulationsstörungen in der Rückenhautkammer des Hamsters werden von AT hauptsächlich durch die Freisetzung von Prostazyklin aus dem Gefäßendothel moduliert (Hoffmann et al., 2002b).

Auch im Blut zirkulierendes Heparin besitzt die Fähigkeit, an die endothelialen GAGs zu binden. Es besteht jedoch die Vermutung, dass Heparin nicht in der Lage ist, die Prostazyklin-Freisetzung aus den Endothelzellen zu aktivieren (Hoffmann et al., 2002a). Der Beobachtung, dass eine Kombination von Heparin und AT gegenüber der Kontrollgruppe eine signifikant verlängerte, im Vergleich zur AT-Gruppe jedoch eine deutlich kürzere komplette Okklusionszeit aufweist, kann somit folgende Ursache zugrunde liegen: Heparin bindet an die GAGs, ohne über diese eine Prostazyklinausschüttung zu aktivieren. Jedoch sind die GAGs nun für die Bindung von AT blockiert (Hoffmann et al., 2002a). Ist Heparin systemisch vorhanden, wird damit die Freisetzung von Prostazyklin vermindert, da AT und Heparin um die notwendigen GAG-Bindungsstellen konkurrieren. Die gemessene Gefäßokklusionszeit von 790 s in der Hep+AT-Gruppe liegt zwischen den Zeiten der AT-Gruppe und Heparin- bzw. Kontroll-Gruppe, und bestätigt diese Schlussfolgerung. Zudem untermauern die Ergebnisse der hier vorgelegten Studie in Bezug auf die Interaktion von AT und Heparin die bereits in der *KyberSept* Studie und deren Folgeanalysen getätigten Hypothesen einer direkten und negativen Interaktion von AT mit Heparin (Warren et al., 2001; Hoffmann et al., 2006; Jilma, 2006; Wiedermann et al., 2006). Weiterhin wird mit der Inhibierung der Prostazyklinfreisetzung dessen eminent wichtiger Beitrag zu dem Hauptwirkeffekt von AT im mikrovaskulären System deutlich. Mit dem Fehlen des antikoagulatorisch wirksamen Prostazyklins lassen sich die im Vergleich zur AT-Gruppe signifikant verkürzten Okklusionszeiten der TrypAT-, Indo+AT aber auch der Hep+AT-Gruppe erklären.

Die in der vorliegenden Studie ermittelten durchschnittlichen Venolendurchmesser der sieben Untersuchungsgruppen lagen in einem Bereich von 45,5 µm bis 50,9 µm.

In Referenzstudien wurden ähnliche venöse Durchmesser (40-80 μm) ermittelt (Lindenblatt et al., 2006a), jedoch wurde teilweise auch mit kleineren Gefäßen (18-46 μm) gearbeitet (Kim & Sarelius, 2004). Bei Betrachtung der Blutzellfließgeschwindigkeit (Abb. 13) und der Wandscherrate (Abb. 14) zeigen sich für beide Parameter während der Thrombose-Induktion abnehmende Mittelwerte in allen Versuchsgruppen. Dabei gibt es zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlich behandelten Gruppen. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die verschiedenen Studienmedikationen keinen nachweisbaren Einfluss auf die Fließgeschwindigkeit und Wandscherrate ausüben. Die unterschiedlichen Messzeitpunkte wurden nicht miteinander verglichen, da die Gruppenstärke mit der fortlaufenden photo-chemischen Thrombose-Induktion und damit auftretender kompletter Gefäßokklusion kontinuierlich abnahm. Zum Untersuchungszeitpunkt 1200 s bestanden die Gruppen teilweise nur noch aus einem oder zwei Versuchstieren, wodurch die fehlende bzw. große Standardabweichung vom Mittelwert erklärt werden kann. Die Messwerte der Blutzellfließgeschwindigkeit und der Wandscherrate können in der Literatur, unter Berücksichtigung individueller Unterschiede wie Gefäßdurchmesser und Messtechnik, bestätigt werden (Kim & Sarelius, 2004; Lindenblatt et al., 2005; Lindenblatt et al., 2006a). Die Daten der Thrombushöhe über die Zeit (Abb. 15) zeigen das Wachstum der Thromben aller Untersuchungsgruppen über den Zeitraum der Thrombose-Induktion. Durch die Thrombose-Induktion entwickeln sich Thromben, die im zeitlichen Verlauf nahezu linear anwachsen, um das Gefäß final zu okkludieren. Hier bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, so dass die verschiedenen Studiensubstanzen keinen erkennbaren Einfluss auf die Art des Thrombuswachstums ausüben. Auch bei der Betrachtung der Leukozyten–Endothelzell-Interaktion zeigen sich keine Effekte der applizierten Substanzen. In Abb. 17 ist beispielhaft für die Leukozyten Aktivierung und deren Interaktion mit dem Gefäßendothel die Fraktion rollender Leukozyten dargestellt. Dabei zeigen sich zu den Untersuchungszeitpunkten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen. Ebenso führt die lokal beschränkte Thrombose-Induktion zu keinem messbaren Effekt auf die systemische Leukozytenzahl. Analog dazu sind die Ergebnisse der hämatologischen Untersuchung, Gerinnungsfaktoranalyse und der Immunhistochemie zu diskutieren. Zu berücksichtigen ist bei der Analyse der hämatologischen Parameter und Gerinnungsfaktoren, dass die Werte systemisch erfasst wurden, diese jedoch auf der lokalen,

auf den Cremastermuskel beschränkten photo-chemischen Thrombose-Induktion beruhen. Es stellt sich daher die Frage, ob die lokale Thrombose-Induktion im M. cremaster überhaupt in der Lage ist, systemisch messbare Veränderungen hervorzurufen. Auch die immunhistochemischen Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Applikation der verschiedenen Studiensubstanzen keinen signifikant nachweisbaren Einfluss auf die Expression von P-Selektin, E-Selektin und PAI-1 zu haben scheint.

6.3. ZUSAMMENFASSUNG UND KLINISCHE PERSPEKTIVEN

Bei Patienten mit Trauma, Sepsis und Schock ist eine verminderte AT-Aktivität nachweisbar. Grund dafür ist der erhöhte Verbrauch durch Komplexbildung mit Gerinnungsfaktoren und einer damit verbundenen enzymatischen Degradation (Cohen et al., 1990). In den letzten 30 Jahren entwickelte sich AT zu einem erfolgreich eingesetzten Medikament bei der Behandlung der *DIC* bei AT-Plasmalevel von <80% (Blatt et al., 1978; Blauhut et al., 1985). Darüber hinaus haben viele experimentelle und klinische Studien nachgewiesen, dass die AT Substitution auch anti-inflammatorische Effekte ausüben kann (Inthorn et al., 1997, 1998; Hoffmann et al., 2004a; Fertmann et al., 2006). Belegt ist jedoch auch, dass Heparin dieses anti-inflammatorische Potential inhibiert (Pulletz et al., 2000; Hoffmann et al., 2002a; Roemisch et al., 2002). Diese negative Wirkungsinteraktion wurde bei der Auswertung der Ergebnisse der *KyberSept* Studie festgestellt (Warren et al., 2001; Hoffmann et al., 2006; Kienast et al., 2006; Wiedermann et al., 2006). Dabei führte die Substitution von hoch dosiertem AT bei Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock zu keiner signifikanten Verbesserung der 28 Tage-Mortalität. Als Konsequenz wurde vorgeschlagen, die AT-Behandlung bei schwerer Sepsis ohne simultane Heparintherapie durchzuführen (Jilma, 2006). Aktuell ist die medikamentöse Therapie mit AT bei Sepsis jedoch nicht in den allgemeinen Therapieleitlinien verankert (Dellinger et al., 2013).

Die vorliegende Studie hatte das Ziel, die Interaktionen von Gerinnung und Inflammation und den Einfluss des Gefäßendothels unter Nutzung von AT zu evaluieren. Während die anti-inflammatorische Aktivität von AT unabhängig von dessen antikoagulatorischer Funktion zu sein scheint (Hoffmann et al., 2002b), legen die Daten der hier vorliegenden Studie nahe, dass die antikoagulatorische Wirkung von AT im mikrovaskulären Gefäßsystem entscheidend von dessen anti-inflammatorischer

Wirksamkeit abhängt. Bei Inhibierung des anti-inflammatorischen Wirkmechanismus, durch Blockade der Prostazyklinproduktion durch Gabe von Indomethacin oder Blockade der GAG-Bindung durch TrypAT oder Heparin, sind die Ergebnisse der Gefäßokklusion vergleichbar mit denen der Kontrollgruppe. TrypAT besitzt keine anti-inflammatorischen Eigenschaften, da dessen Bindungsstelle mit Heparin und den GAGs blockiert worden ist (Blackburn et al., 1984; Pratt & Church, 1991; Hoffmann et al., 2002b). Die Applikation von TrypAT ermöglicht somit die Diskriminierung zwischen GAG-assoziierten und GAG-unabhängigen antikoagulatorischen Effekten von AT. Damit wird die entscheidende Rolle der endothelialen AT-GAG-Interaktion im Gesamtbild der mikrovaskulären Thrombose deutlich. Von wichtiger klinischer Bedeutung ist dabei die Konkurrenzsituation zwischen Heparin und AT um die endothelialen GAGs. Aufgrund der Blockade dieser durch freies Heparin ist AT nicht fähig die GAG-vermittelte Prostazyklinausschüttung zu aktivieren (Abb. 19).

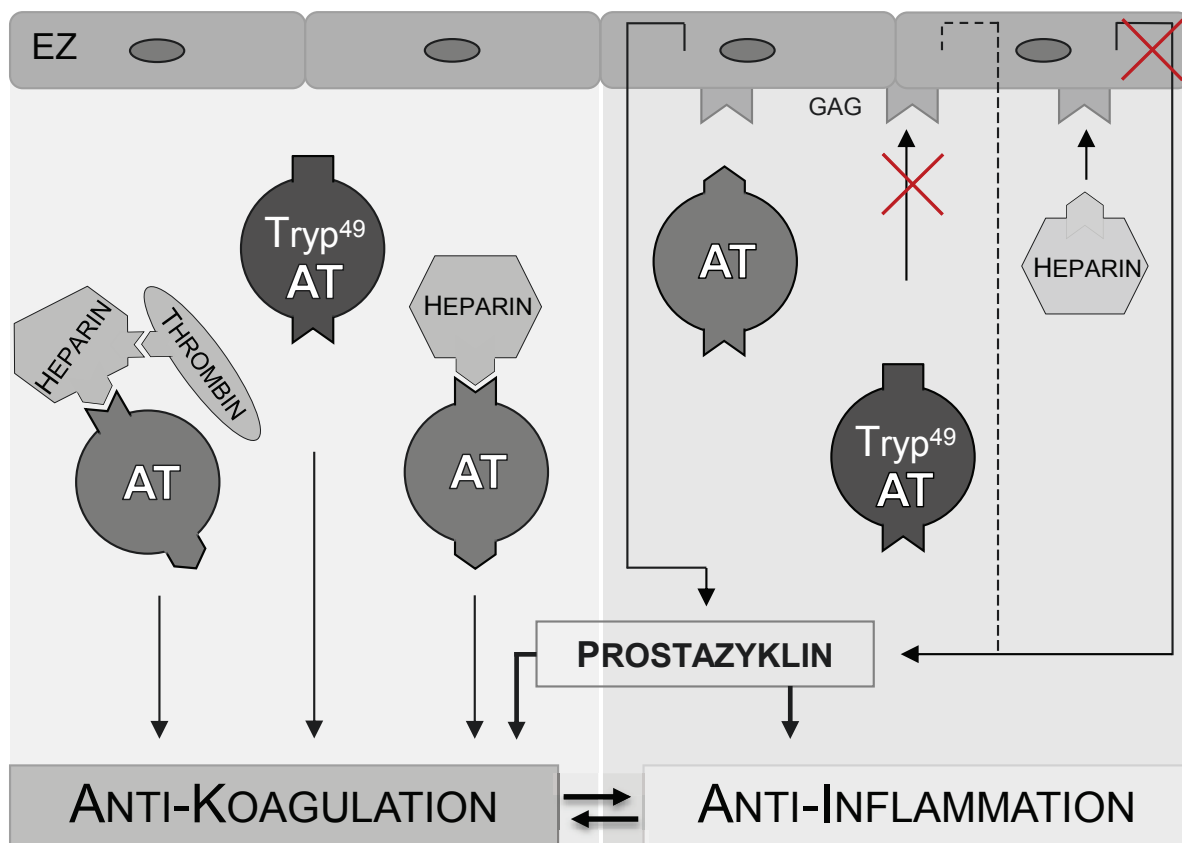


Abbildung 19: Schematischer Überblick der Wirkmechanismen von AT, Tryp⁴⁹AT und Heparin im mikrovaskulären System. Dargestellt sind die antikoagulatorischen Wirkungen sowie die Einflussnahme dieser Substanzen auf die Anti-Inflammation über die Freisetzung von Prostazyklin nach Bindung an endothelständige Glykosaminoglykane (GAG). EZ = Endothelzelle, Tryp⁴⁹AT = Tryptophan⁴⁹-blockiertes Antithrombin

Bei Betrachtung der Studienergebnisse in Bezug auf Gerinnung und Entzündung und dem Einfluss der verschiedenen Mediatoren zeigt sich, dass beide Kaskaden nicht unabhängig voneinander ablaufende Mechanismen darstellen. Vielmehr zeigen sich komplexe Interaktionen zwischen der Gerinnungskaskade, der Entzündungskaskade und den lokalen Gegebenheiten des Gefäßendothels. Das anti-inflammatorische Potential von AT scheint im mikrovaskulären System direkt mit dem Cyclooxygenase *pathway* verbunden zu sein, da im Endotoxinämiemodell die Vorbehandlung mit Indomethacin die protektiven Effekte von AT in Bezug auf Leukozyten-Endothelzell-Interaktion und Perfusionsversagen komplett aufhob (Hoffmann et al., 2002b). Aufgrund der in der vorliegenden Studie erzielten Ergebnisse in den Indo-Gruppen konnte nachgewiesen werden, dass der Cyclooxygenase *pathway* auch für die antikoagulatorischen Fähigkeiten von AT von entscheidender Bedeutung zu sein scheint. Die Verhinderung der Prostazyklinsynthese im Cyclooxygenase *pathway* durch Vorbehandlung der Tiere mit Indomethacin führte zu einem Ausbleiben des protektiven Effekts von AT und Heparin in der mikrovaskulären Thrombusformation.

Zusammenfassend war es möglich, eine Charakterisierung des antikoagulatorischen und anti-inflammatorischen Wirkprofils von AT im murinen mikrovaskulären Thrombosemodell durchzuführen. Die erhobenen Daten weisen darauf hin, dass die anti-inflammatorischen Mechanismen, im dargestellten Fall insbesondere die Prostazyklinfreisetzung, die Voraussetzung für einen adäquaten antikoagulatorischen Effekt im mikrovaskulären System zu sein scheinen. Analog können ähnlich ablaufende Mechanismen bei anderen adjunktiven medikamentösen Sepsistherapien vermutet werden. Diese Ergebnisse sind von Relevanz für das Verständnis und die Erarbeitung von Therapieoptionen des septischen Krankheitsbildes und den damit assoziierten komplexen klinischen Syndromen, speziell der mikrovaskulären Thromboseformation.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Amaral, Opal und Vincent, (2004). "Coagulation in sepsis." Intensive Care Med **30**(6): 1032-1040.
- Baez, (1973). "An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by in vivo microscopy." Microvasc Res **5**(3): 384-394.
- Bagher & Segal, (2011). "The mouse cremaster muscle preparation for intravital imaging of the microcirculation." J Vis Exp(52).
- Bauer, (2004). "[Molecular mechanisms of microcirculatory failure]." Dtsch Med Wochenschr **129**(48): 2594-2596.
- Bernard, Vincent, Laterre, Larosa, Dhainaut, Lopez-Rodriguez, ..., Fisher, (2001). "Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis." N Engl J Med **344**(10): 699-709.
- Bernardo, Ball, Nolasco, Moake und Dong, (2004). "Effects of inflammatory cytokines on the release and cleavage of the endothelial cell-derived ultralarge von Willebrand factor multimers under flow." Blood **104**(1): 100-106.
- Blackburn & Sibley, (1980). "The heparin binding site of antithrombin III. Evidence for a critical tryptophan residue." J Biol Chem **255**(3): 824-826.
- Blackburn, Smith, Carson und Sibley, (1984). "The heparin-binding site of antithrombin III. Identification of a critical tryptophan in the amino acid sequence." J Biol Chem **259**(2): 939-941.
- Blatt, White, Goldsmith und Roberts, (1978). "Antithrombin-III transfusion in disseminated intravascular coagulation." Lancet **1**(8075): 1212.
- Blauhut, Kramar, Vinazzer und Bergmann, (1985). "Substitution of antithrombin III in shock and DIC: a randomized study." Thromb Res **39**(1): 81-89.
- Bombeli, Mueller und Haeberli, (1997). "Anticoagulant properties of the vascular endothelium." Thromb Haemost **77**(3): 408-423.
- Bone, Fisher, Clemmer, Slotman, Metz und Balk, (1987). "A controlled clinical trial of high-dose methylprednisolone in the treatment of severe sepsis and septic shock." N Engl J Med **317**(11): 653-658.
- Bone, Grodzin und Balk, (1997). "Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process." Chest **112**(1): 235-243.
- Brunckhorst, Engel, Bloos, Meier-Hellmann, Ragaller, Weiler, ..., Reinhart, (2008). "Intensive insulin therapy and pentastarch resuscitation in severe sepsis." N Engl J Med **358**(2): 125-139.
- Buller & Ten Cate, (1989). "Acquired antithrombin III deficiency: laboratory diagnosis, incidence, clinical implications, and treatment with antithrombin III concentrate." Am J Med **87**(3B): 44S-48S.
- Burstein, (1997). "Cytokines, platelet production and hemostasis." Platelets **8**(2-3): 93-104.
- Butschkau, Nagel, Grambow, Zechner, Broze und Vollmar, (2013). "Contribution of protein Z and protein Z-dependent protease inhibitor in generalized Shwartzman reaction." Crit Care Med (): accepted for publication.
- Calandra & Cohen, (2005). "The international sepsis forum consensus conference on definitions of infection in the intensive care unit." Crit Care Med **33**(7): 1538-1548.
- Callahan, Lutz, Fulton und Degelman, (1960). "Smooth muscle and thrombus thresholds to unipolar stimulation of small blood vessels." Angiology **11**: 35-39.
- Carrell, Stein, Fermi und Wardell, (1994). "Biological implications of a 3 A structure of dimeric antithrombin." Structure **2**(4): 257-270.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Cermak, Key, Bach, Balla, Jacob und Vercellotti, (1993). "C-reactive protein induces human peripheral blood monocytes to synthesize tissue factor." Blood **82**(2): 513-520.
- Cerwinka, Cooper, Krieglstein, Feelisch und Granger, (2002). "Nitric oxide modulates endotoxin-induced platelet-endothelial cell adhesion in intestinal venules." Am J Physiol Heart Circ Physiol **282**(3): H1111-1117.
- Chauhan, Kisucka, Lamb, Bergmeier und Wagner, (2007). "von Willebrand factor and factor VIII are independently required to form stable occlusive thrombi in injured veins." Blood **109**(6): 2424-2429.
- Chung & Lip, (2003). "Virchow's triad revisited: blood constituents." Pathophysiol Haemost Thromb **33**(5-6): 449-454.
- Cohen, Sarfati, Birnbaum, Benacquista und Wise, (1990). "The inactivation of antithrombin III by serum elastase in patients with surgical infections." Am Surg **56**(11): 665-667.
- Collen, Schetz, De Cock, Holmer und Verstraete, (1977). "Metabolism of antithrombin III (heparin cofactor) in man: effects of venous thrombosis and of heparin administration." Eur J Clin Invest **7**(1): 27-35.
- Conard, Brosstad, Lie Larsen, Samama und Abildgaard, (1983). "Molar antithrombin concentration in normal human plasma." Haemostasis **13**(6): 363-368.
- Contino, Andree und Nemerson, (1994). "Flow dependence of factor X activation by tissue factor-factor VIIa." J Physiol Pharmacol **45**(1): 81-90.
- De Jonge, Friederich, Vlasuk, Rote, Vroom, Levi und Van Der Poll, (2003). "Activation of coagulation by administration of recombinant factor VIIa elicits interleukin 6 (IL-6) and IL-8 release in healthy human subjects." Clin Diagn Lab Immunol **10**(3): 495-497.
- Dellinger, Levy, Rhodes, Annane, Gerlach, Opal, ..., Moreno, (2013). "Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012." Crit Care Med **41**(2): 580-637.
- Denis, Methia, Frenette, Rayburn, Ullman-Cullere, Hynes und Wagner, (1998). "A mouse model of severe von Willebrand disease: defects in hemostasis and thrombosis." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(16): 9524-9529.
- Dickneite, (1998). "Antithrombin III in animal models of sepsis and organ failure." Semin Thromb Hemost **24**(1): 61-69.
- Dolan, Neal, Cooper, Brown und Preston, (1994). "Protein C, antithrombin III and plasminogen: effect of age, sex and blood group." Br J Haematol **86**(4): 798-803.
- Donndorf, Useini, Lux, Vollmar, Delyagina, Laupheimer, ..., Steinhoff, (2012). "Analysing migratory properties of human CD 133(+) stem cells in vivo after intraoperative sternal bone marrow isolation." Cell Transplant.
- Drake, Cheng, Chang und Taylor, (1993). "Expression of tissue factor, thrombomodulin, and E-selectin in baboons with lethal Escherichia coli sepsis." Am J Pathol **142**(5): 1458-1470.
- Engel, Brunkhorst, Bone, Brunkhorst, Gerlach, Grond, ..., Reinhart, (2007). "Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study." Intensive Care Med **33**(4): 606-618.
- Engelmann, Luther und Muller, (2003). "Intravascular tissue factor pathway--a model for rapid initiation of coagulation within the blood vessel." Thromb Haemost **89**(1): 3-8.
- Erhardt, Hebestedt, Aschenbrenner, Pichotka und Blumel, (1984). "A comparative study with various anesthetics in mice (pentobarbitone, ketamine-xylazine, carfentanyl-etomidate)." Res Exp Med (Berl) **184**(3): 159-169.
- Fertmann, Wimmer, Arbogast, Illner, Tarabichi, Calasan, ..., Hoffmann, (2006). "Single-shot antithrombin in human pancreas-kidney transplantation: reduction of reperfusion pancreatitis and prevention of graft thrombosis." Transpl Int **19**(6): 458-465.
- Fiebig, Ley und Arfors, (1991). "Rapid leukocyte accumulation by "spontaneous" rolling and adhesion in the exteriorized rabbit mesentery." Int J Microcirc Clin Exp **10**(2): 127-144.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Fukudome & Esmon, (1994). "Identification, cloning, and regulation of a novel endothelial cell protein C/activated protein C receptor." *J Biol Chem* **269**(42): 26486-26491.
- Grambow, Mueller-Graf, Delyagina, Frank, Kuhla und Vollmar, (2013). "Effect of the hydrogen sulfide donor GYY4137 on platelet activation and microvascular thrombus formation in mice." *Platelets*.
- Harada, Okajima, Kushimoto, Isobe und Tanaka, (1999). "Antithrombin reduces ischemia/reperfusion injury of rat liver by increasing the hepatic level of prostacyclin." *Blood* **93**(1): 157-164.
- Hathcock, (2006). "Flow effects on coagulation and thrombosis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**(8): 1729-1737.
- Hathcock, Rusinova, Gentry, Andree und Nemerson, (2005). "Phospholipid regulates the activation of factor X by tissue factor/factor VIIa (TF/VIIa) via substrate and product interactions." *Biochemistry* **44**(22): 8187-8197.
- Henn, Slupsky, Grafe, Anagnostopoulos, Forster, Muller-Berghaus und Kroczeck, (1998). "CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells." *Nature* **391**(6667): 591-594.
- Hesse, Tracey, Fong, Manogue, Palladino, Cerami, ..., Lowry, (1988). "Cytokine appearance in human endotoxemia and primate bacteremia." *Surg Gynecol Obstet* **166**(2): 147-153.
- Hoffmann, Muhlhaber, Jochum und Inthorn, (2004a). "Effect of long-term and high-dose antithrombin supplementation on coagulation and fibrinolysis in patients with severe sepsis." *Crit Care Med* **32**(9): 1851-1859.
- Hoffmann, Vollmar, Inthorn, Schildberg und Menger, (2000). "Antithrombin reduces leukocyte adhesion during chronic endotoxemia by modulation of the cyclooxygenase pathway." *Am J Physiol Cell Physiol* **279**(1): C98-C107.
- Hoffmann, Vollmar, Laschke, Inthorn, Fertmann, Schildberg und Menger, (2004b). "Microhemodynamic and cellular mechanisms of activated protein C action during endotoxemia." *Crit Care Med* **32**(4): 1011-1017.
- Hoffmann, Vollmar, Laschke, Inthorn, Kaneider, Dunzendorfer, ..., Menger, (2002a). "Adverse effect of heparin on antithrombin action during endotoxemia: microhemodynamic and cellular mechanisms." *Thromb Haemost* **88**(2): 242-252.
- Hoffmann, Vollmar, Romisch, Inthorn, Schildberg und Menger, (2002b). "Antithrombin effects on endotoxin-induced microcirculatory disorders are mediated mainly by its interaction with microvascular endothelium." *Crit Care Med* **30**(1): 218-225.
- Hoffmann, Wiedermann, Juers, Ostermann, Kienast, Briegel, ..., Opal, (2006). "Benefit/risk profile of high-dose antithrombin in patients with severe sepsis treated with and without concomitant heparin." *Thromb Haemost* **95**(5): 850-856.
- Holmes, Russell und Walley, (2003). "Genetic polymorphisms in sepsis and septic shock: role in prognosis and potential for therapy." *Chest* **124**(3): 1103-1115.
- Horie, Ishii und Kazama, (1990). "Heparin-like glycosaminoglycan is a receptor for antithrombin III-dependent but not for thrombin-dependent prostacyclin production in human endothelial cells." *Thromb Res* **59**(6): 895-904.
- Hotchkiss, Coopersmith und Karl, (2005). "Prevention of lymphocyte apoptosis--a potential treatment of sepsis?" *Clin Infect Dis* **41 Suppl 7**: S465-469.
- Hotchkiss & Karl, (2003). "The pathophysiology and treatment of sepsis." *N Engl J Med* **348**(2): 138-150.
- Huges, (1953). "[Contribution to the study of vascular and blood factors in spontaneous hemostasis]." *Arch Int Physiol* **61**(4): 565-711.
- Inthorn, Hoffmann, Hartl, Muhlhaber und Jochum, (1997). "Antithrombin III supplementation in severe sepsis: beneficial effects on organ dysfunction." *Shock* **8**(5): 328-334.
- Inthorn, Hoffmann, Hartl, Muhlhaber und Jochum, (1998). "Effect of antithrombin III supplementation on inflammatory response in patients with severe sepsis." *Shock* **10**(2): 90-96.

- Iozzo, (1998). "Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function." Annu Rev Biochem **67**: 609-652.
- Ishikawa, Sekizuka, Oshio, Sato, Yamaguchi, Terao, ..., Kawase, (2002). "Platelet adhesion and arteriolar dilation in the photothrombosis: observation with the rat closed cranial and spinal windows." J Neurol Sci **194**(1): 59-69.
- Jilma, (2006). "Antithrombin for severe sepsis? Try it again, but without heparin!" Thromb Haemost **95**(5): 755.
- Kamimura, Viedt, Dalpke, Rosenfeld, Mackman, Cohen, ..., Bea, (2005). "Interleukin-10 suppresses tissue factor expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages via inhibition of Egr-1 and a serum response element/MEK-ERK1/2 pathway." Circ Res **97**(4): 305-313.
- Kaneider, Egger, Dunzendorfer und Wiedermann, (2001). "Syndecan-4 as antithrombin receptor of human neutrophils." Biochem Biophys Res Commun **287**(1): 42-46.
- Kaneider, Reinisch, Dunzendorfer, Romisch und Wiedermann, (2002). "Syndecan-4 mediates antithrombin-induced chemotaxis of human peripheral blood lymphocytes and monocytes." J Cell Sci **115**(Pt 1): 227-236.
- Kaur, Woodman, Ostrovsky und Kubes, (2001). "Selective recruitment of neutrophils and lymphocytes by thrombin: a role for NF-kappaB." Am J Physiol Heart Circ Physiol **281**(2): H784-795.
- Kienast, Juers, Wiedermann, Hoffmann, Ostermann, Strauss, ..., Opal, (2006). "Treatment effects of high-dose antithrombin without concomitant heparin in patients with severe sepsis with or without disseminated intravascular coagulation." J Thromb Haemost **4**(1): 90-97.
- Kim & Sarelius, (2004). "Regulation of leukocyte recruitment by local wall shear rate and leukocyte delivery." Microcirculation **11**(1): 55-67.
- Klein, Shennan, Heyderman und Levin, (1992). "Alteration in glycosaminoglycan metabolism and surface charge on human umbilical vein endothelial cells induced by cytokines, endotoxin and neutrophils." J Cell Sci **102** (Pt 4): 821-832.
- Klenke, Merkle, Fellenberg, Abdollahi, Huber, Gebhard, ..., Sckell, (2005). "A novel model for the investigation of orthotopically growing primary and secondary bone tumours using intravital microscopy." Lab Anim **39**(4): 377-383.
- Klyscz, Junger, Jung und Zeintl, (1997). "[Cap image--a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy]." Biomed Tech (Berl) **42**(6): 168-175.
- Knisely, Stratman-Thomas und Et Al., (1945). "Knowlesi malaria in monkeys; microscopic pathological circulatory physiology of rhesus monkeys during acute Plasmodium knowlesi malaria." J Natl Malar Soc **4**: 285-300.
- Kochen & Baez, (1965). "Laser-Induced Microvascular Thrombosis, Embolization, and Recanalization in the Rat." Ann N Y Acad Sci **122**: 728-737.
- Koperna & Schulz, (2000). "Relaparotomy in peritonitis: prognosis and treatment of patients with persisting intraabdominal infection." World J Surg **24**(1): 32-37.
- Kovacs, Tigyi-Sebes, Trombitas und Gorog, (1975). "Evans blue: an ideal energy-absorbing material to produce intravascular microinjury by HE-NE gas laser." Microvasc Res **10**(1): 107-124.
- Kreymann, De Heer, Nierhaus und Kluge, (2007). "Use of polyclonal immunoglobulins as adjunctive therapy for sepsis or septic shock." Crit Care Med **35**(12): 2677-2685.
- Kujath, Bouchard, Shekarriz und Eckmann, (2002). "[Anticoagulation in the treatment of sepsis. Correction of microcirculation: a new approach manipulating endothelial cell function]." Chirurg **73**(11): 1093-1099.
- Kurz, Main und Sandusky, (1990). "Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride." Thromb Res **60**(4): 269-280.
- Laupland, Kirkpatrick und Delaney, (2007). "Polyclonal intravenous immunoglobulin for the treatment of severe sepsis and septic shock in critically ill adults: a systematic review and meta-analysis." Crit Care Med **35**(12): 2686-2692.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Leadley, Chi, Rebello und Gagnon, (2000). "Contribution of in vivo models of thrombosis to the discovery and development of novel antithrombotic agents." J Pharmacol Toxicol Methods **43**(2): 101-116.
- Lee & Lee, (1975). "Advanced coronary atherosclerosis in swine produced by combination of balloon-catheter injury and cholesterol feeding." Exp Mol Pathol **23**(3): 491-499.
- Levi & Opal, (2006). "Coagulation abnormalities in critically ill patients." Crit Care **10**(4): 222.
- Levi, Van Der Poll und Buller, (2004). "Bidirectional relation between inflammation and coagulation." Circulation **109**(22): 2698-2704.
- Lindenblatt, Bordel, Schareck, Menger und Vollmar, (2004). "Vascular heme oxygenase-1 induction suppresses microvascular thrombus formation in vivo." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(3): 601-606.
- Lindenblatt, Braun, Menger, Klar und Vollmar, (2006a). "C-peptide exerts antithrombotic effects that are repressed by insulin in normal and diabetic mice." Diabetologia **49**(4): 792-800.
- Lindenblatt, Menger, Klar und Vollmar, (2005). "Sustained hypothermia accelerates microvascular thrombus formation in mice." Am J Physiol Heart Circ Physiol **289**(6): H2680-2687.
- Lindenblatt, Menger, Klar und Vollmar, (2006b). "Systemic hypothermia increases PAI-1 expression and accelerates microvascular thrombus formation in endotoxemic mice." Crit Care **10**(5): R148.
- Lindenblatt, Menger, Klar und Vollmar, (2007). "Darbepoetin-alpha does not promote microvascular thrombus formation in mice: role of eNOS-dependent protection through platelet and endothelial cell deactivation." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(5): 1191-1198.
- Lindmark, Tenno und Siegbahn, (2000). "Role of platelet P-selectin and CD40 ligand in the induction of monocytic tissue factor expression." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(10): 2322-2328.
- Longo & Harrison (2012). Harrison's principles of internal medicine. New York, NY [u.a.], McGraw-Hill Medical.
- Ludwicka-Bradley, Tourkina, Suzuki, Tyson, Bonner, Fenton, ..., Silver, (2000). "Thrombin upregulates interleukin-8 in lung fibroblasts via cleavage of proteolytically activated receptor-I and protein kinase C-gamma activation." Am J Respir Cell Mol Biol **22**(2): 235-243.
- Mammen, (1998). "Antithrombin: its physiological importance and role in DIC." Semin Thromb Hemost **24**(1): 19-25.
- Marcum & Rosenberg, (1984). "Anticoagulant active heparin-like molecules from vascular tissue." Biochemistry **23**(8): 1730-1737.
- Marshall, Deitch, Moldawer, Opal, Redl und Van Der Poll, (2005). "Preclinical models of shock and sepsis: what can they tell us?" Shock **24** Suppl 1: 1-6.
- Martin, Mannino und Moss, (2006). "The effect of age on the development and outcome of adult sepsis." Crit Care Med **34**(1): 15-21.
- Massberg, Enders, Matos, Tomic, Leiderer, Eisenmenger, ..., Krombach, (1999). "Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo." Blood **94**(11): 3829-3838.
- Meininger, Fehr und Yates, (1987). "Anatomic and hemodynamic characteristics of the blood vessels feeding the cremaster skeletal muscle in the rat." Microvasc Res **33**(1): 81-97.
- Menger, Laschke und Vollmar, (2002). "Viewing the microcirculation through the window: some twenty years experience with the hamster dorsal skinfold chamber." Eur Surg Res **34**(1-2): 83-91.
- Menger, Richter, Yamauchi und Vollmar, (1999). "Intravital microscopy for the study of the microcirculation in various disease states." Ann Acad Med Singapore **28**(4): 542-556.
- Miller, Yaron und Yellin, (1998). "CD40L-CD40 interactions regulate endothelial cell surface tissue factor and thrombomodulin expression." J Leukoc Biol **63**(3): 373-379.
- Morawitz, (1905). "Die Chemie der Blutgerinnung. Ergebnisse der Physiologie, biologischen Chemie und experimentellen Pharmakologie." Ergebn Physiol **4**: 307-322.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Ni, Denis, Subbarao, Degen, Sato, Hynes und Wagner, (2000). "Persistence of platelet thrombus formation in arterioles of mice lacking both von Willebrand factor and fibrinogen." J Clin Invest **106**(3): 385-392.
- Oelschlager, Romisch, Staubitz, Stauss, Leithauser, Tillmanns und Holschermann, (2002). "Antithrombin III inhibits nuclear factor kappaB activation in human monocytes and vascular endothelial cells." Blood **99**(11): 4015-4020.
- Okajima, (1998). "Antithrombin prevents endotoxin-induced pulmonary vascular injury by inhibiting leukocyte activation." Blood Coagul Fibrinolysis **9 Suppl 2**: S25-37.
- Okajima & Uchiba, (1998). "The anti-inflammatory properties of antithrombin III: new therapeutic implications." Semin Thromb Hemost **24**(1): 27-32.
- Olds, Lane, Mille, Chowdhury und Thein, (1994). "Antithrombin: the principal inhibitor of thrombin." Semin Thromb Hemost **20**(4): 353-372.
- Olson & Bjork, (1994). "Regulation of thrombin activity by antithrombin and heparin." Semin Thromb Hemost **20**(4): 373-409.
- Osterud, (1998). "Tissue factor expression by monocytes: regulation and pathophysiological roles." Blood Coagul Fibrinolysis **9 Suppl 1**: S9-14.
- Perry, (1994). "Antithrombin and its inherited deficiencies." Blood Rev **8**(1): 37-55.
- Pratt & Church, (1991). "Antithrombin: structure and function." Semin Hematol **28**(1): 3-9.
- Pugin, (2007). "Immunostimulation is a rational therapeutic strategy in sepsis." Novartis Found Symp **280**: 21-27; discussion 27-36, 160-164.
- Pulletz, Lehmann, Volk, Schmutzler, Ziemer, Kox und Scherer, (2000). "Influence of heparin and hirudin on endothelial binding of antithrombin in experimental thrombinemia." Crit Care Med **28**(8): 2881-2886.
- Puschel, Lindenblatt, Katzfuss, Vollmar und Klar, (2012). "Immunosuppressants accelerate microvascular thrombus formation in vivo: role of endothelial cell activation." Surgery **151**(1): 26-36.
- Ranieri, Thompson, Barie, Dhainaut, Douglas, Finfer, ..., Williams, (2012). "Drotrecogin alfa (activated) in adults with septic shock." N Engl J Med **366**(22): 2055-2064.
- Rao, Nordfang, Hoang und Pendurthi, (1995). "Mechanism of antithrombin III inhibition of factor VIIa/tissue factor activity on cell surfaces. Comparison with tissue factor pathway inhibitor/factor Xa-induced inhibition of factor VIIa/tissue factor activity." Blood **85**(1): 121-129.
- Reinhart, Brunkhorst, Bone, Bardutzky, Dempfle, Forst, ..., Welte, (2010). "Prevention, diagnosis, therapy and follow-up care of sepsis: 1st revision of S-2k guidelines of the German Sepsis Society (Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG)) and the German Interdisciplinary Association of Intensive Care and Emergency Medicine (Deutsche Interdisziplinäre Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI))." Ger Med Sci **8**: Doc14.
- Reinhart, Brunkhorst, Bone, Gerlach, Grundling, Kreymann, ..., Werdan, (2006). "[Diagnosis and therapy of sepsis: guidelines of the German Sepsis Society Inc. and the German Interdisciplinary Society for Intensive and Emergency Medicine]." Anaesthesist **55 Suppl 1**: 43-56.
- Riedemann, Guo und Ward, (2003). "Novel strategies for the treatment of sepsis." Nat Med **9**(5): 517-524.
- Rivers, Nguyen, Havstad, Ressler, Muzzin, Knoblich, ..., Tomlanovich, (2001). "Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock." N Engl J Med **345**(19): 1368-1377.
- Roemisch, Gray, Hoffmann und Wiedermann, (2002). "Antithrombin: a new look at the actions of a serine protease inhibitor." Blood Coagul Fibrinolysis **13**(8): 657-670.
- Rosenberg, (1989). "Biochemistry of heparin antithrombin interactions, and the physiologic role of this natural anticoagulant mechanism." Am J Med **87**(3B): 2S-9S.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Rosenberg, Mckenna und Rosenberg, (1975). "Inhibition of human factor IXa by human antithrombin." J Biol Chem **250**(23): 8883-8888.
- Rosenblum & El-Sabban, (1977). "Platelet aggregation in the cerebral microcirculation: effect of aspirin and other agents." Circ Res **40**(3): 320-328.
- Rumbaut, Randhawa, Smith und Burns, (2004). "Mouse cremaster venules are predisposed to light/dye-induced thrombosis independent of wall shear rate, CD18, ICAM-1, or P-selectin." Microcirculation **11**(3): 239-247.
- Rumbaut, Slaff und Burns, (2005). "Microvascular thrombosis models in venules and arterioles in vivo." Microcirculation **12**(3): 259-274.
- Saniabadi, Umemura, Matsumoto, Sakuma und Nakashima, (1995). "Vessel wall injury and arterial thrombosis induced by a photochemical reaction." Thromb Haemost **73**(5): 868-872.
- Sato & Ohshima, (1984). "Platelet thrombus induced in vivo by filtered light and fluorescent dye in mesenteric microvessels of the rat." Thromb Res **35**(3): 319-334.
- Schoen, Rotter, Gierer, Gradl, Strauss, Jonas, ..., Vollmar, (2007). "Ischemic preconditioning prevents skeletal muscle tissue injury, but not nerve lesion upon tourniquet-induced ischemia." J Trauma **63**(4): 788-797.
- Schreuder, De Boer, Dijkema, Mulders, Theunissen, Grootenhuis und Hol, (1994). "The intact and cleaved human antithrombin III complex as a model for serpin-proteinase interactions." Nat Struct Biol **1**(1): 48-54.
- Seegers, Johnson und Fell, (1954). "An antithrombin reaction to prothrombin activation." Am J Physiol **176**(1): 97-103.
- Senden, Jeunhomme, Heemskerk, Wagenvoord, Van't Veer, Hemker und Buurman, (1998). "Factor Xa induces cytokine production and expression of adhesion molecules by human umbilical vein endothelial cells." J Immunol **161**(8): 4318-4324.
- Sharif, Bolshakov, Raines, Newham und Perkins, (2007). "Transcriptional profiling of the LPS induced NF-kappaB response in macrophages." BMC Immunol **8**: 1.
- Sherman & Fisher, (1986). "Hepatic transport of fluorescent molecules: in vivo studies using intravital TV microscopy." Hepatology **6**(3): 444-449.
- Sorg (2006). Analyse der antithrombotischen Potenz einer Antithrombin-Monotherapie zur Prophylaxe der mikrovaskulären Thrombose in der Maus. Dissertationsschrift, Universität Rostock.
- Sorg, Hoffmann, Menger, Lindenblatt, Goehring und Vollmar, (2006). "Antithrombin is as effective as heparin and hirudin to prevent formation of microvascular thrombosis in a murine model." Thromb Haemost **96**(3): 371-377.
- Sorg, Hoffmann, Rumbaut, Menger, Lindenblatt und Vollmar, (2007a). "Efficacy of antithrombin in the prevention of microvascular thrombosis during endotoxemia: an intravital microscopic study." Thromb Res **121**(2): 241-248.
- Sorg, Krueger, Schulz, Menger, Schmitz und Vollmar, (2009a). "Effects of erythropoietin in skin wound healing are dose related." FASEB J **23**(9): 3049-3058.
- Sorg, Krueger und Vollmar, (2007b). "Intravital insights in skin wound healing using the mouse dorsal skin fold chamber." J Anat **211**(6): 810-818.
- Sorg, Schulz, Krueger und Vollmar, (2009b). "Consequences of surgical stress on the kinetics of skin wound healing: partial hepatectomy delays and functionally alters dermal repair." Wound Repair Regen **17**(3): 367-377.
- Souter, Thomas, Hubbard, Poole, Romisch und Gray, (2001). "Antithrombin inhibits lipopolysaccharide-induced tissue factor and interleukin-6 production by mononuclear cells, human umbilical vein endothelial cells, and whole blood." Crit Care Med **29**(1): 134-139.
- Sower, Froelich, Carney, Fenton und Klimpel, (1995). "Thrombin induces IL-6 production in fibroblasts and epithelial cells. Evidence for the involvement of the seven-transmembrane domain (STD) receptor for alpha-thrombin." J Immunol **155**(2): 895-901.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Spooner, Markowitz und Saravolatz, (1992). "The role of tumor necrosis factor in sepsis." Clin Immunol Immunopathol **62**(1 Pt 2): S11-17.
- Stead, Kaplan und Rosenberg, (1976). "Inhibition of activated factor XII by antithrombin-heparin cofactor." J Biol Chem **251**(21): 6481-6488.
- Sturn, Kaneider, Feistritzer, Djanani, Fukudome und Wiedermann, (2003). "Expression and function of the endothelial protein C receptor in human neutrophils." Blood **102**(4): 1499-1505.
- Surin, Prakash, Barthwal und Dikshit, (2010). "Optimization of ferric chloride induced thrombosis model in rats: effect of anti-platelet and anti-coagulant drugs." J Pharmacol Toxicol Methods **61**(3): 287-291.
- Szaba & Smiley, (2002). "Roles for thrombin and fibrin(ogen) in cytokine/chemokine production and macrophage adhesion in vivo." Blood **99**(3): 1053-1059.
- Tait, Walker, Islam, McCall, Conkie, Mitchell und Davidson, (1993). "Influence of demographic factors on antithrombin III activity in a healthy population." Br J Haematol **84**(3): 476-480.
- Taylor, Stearns-Kurosawa, Kurosawa, Ferrell, Chang, Laszik, ..., Esmon, (2000). "The endothelial cell protein C receptor aids in host defense against Escherichia coli sepsis." Blood **95**(5): 1680-1686.
- Taylor, Toh, Hoots, Wada und Levi, (2001). "Towards definition, clinical and laboratory criteria, and a scoring system for disseminated intravascular coagulation." Thromb Haemost **86**(5): 1327-1330.
- Tedder, Steeber, Chen und Engel, (1995). "The selectins: vascular adhesion molecules." FASEB J **9**(10): 866-873.
- Van Der Poll, Levi, Hack, Ten Cate, Van Deventer, Eerenberg, ..., Et Al., (1994). "Elimination of interleukin 6 attenuates coagulation activation in experimental endotoxemia in chimpanzees." J Exp Med **179**(4): 1253-1259.
- Van Ruler, Lamme, Gouma, Reitsma und Boermeester, (2007). "Variables associated with positive findings at relaparotomy in patients with secondary peritonitis." Crit Care Med **35**(2): 468-476.
- Volk, Reinke, Krausch, Zuckermann, Asadullah, Muller, ..., Kox, (1996). "Monocyte deactivation--rationale for a new therapeutic strategy in sepsis." Intensive Care Med **22 Suppl 4**: S474-481.
- Vollmar, Conzen, Kerner, Habazettl, Vierl, Waldner und Peter, (1992). "Blood flow and tissue oxygen pressures of liver and pancreas in rats: effects of volatile anesthetics and of hemorrhage." Anesth Analg **75**(3): 421-430.
- Vollmar, Glasz, Leiderer, Post und Menger, (1994). "Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion." Am J Pathol **145**(6): 1421-1431.
- Vollmar & Menger, (1998). "The use of intravital microscopy in surgical research. 26-years of experience analyzed by studies presented at the Surgical Forum of the Annual Congress of the German Society of Surgery." Langenbecks Arch Surg **383**(3-4): 282-285.
- Vollmar, Messner, Wanner, Hartung und Menger, (1997). "Immunomodulatory action of G-CSF in a rat model of endotoxin-induced liver injury: an intravital microscopic analysis of Kupffer cell and leukocyte response." J Leukoc Biol **62**(6): 710-718.
- Vollmar, Schmits, Kunz und Menger, (2001). "Lack of in vivo function of CD31 in vascular thrombosis." Thromb Haemost **85**(1): 160-164.
- Wang, Ubl und Reiser, (2002). "Four subtypes of protease-activated receptors, co-expressed in rat astrocytes, evoke different physiological signaling." Glia **37**(1): 53-63.
- Wang & Xu, (2005). "An optimized murine model of ferric chloride-induced arterial thrombosis for thrombosis research." Thromb Res **115**(1-2): 95-100.
- Warren, Eid, Singer, Pillay, Carl, Novak, ..., Opal, (2001). "Caring for the critically ill patient. High-dose antithrombin III in severe sepsis: a randomized controlled trial." JAMA **286**(15): 1869-1878.
- White, Schmidt, Murphy, Livingstone, O'toole, Lawler, ..., Smith, (2000). "Activated protein C inhibits lipopolysaccharide-induced nuclear translocation of nuclear factor kappaB (NF-kappaB) and

7. LITERATURVERZEICHNIS

- tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) production in the THP-1 monocytic cell line." Br J Haematol **110**(1): 130-134.
- Wiedermann, Hoffmann, Juers, Ostermann, Kienast, Briegel, ..., Opal, (2006). "High-dose antithrombin III in the treatment of severe sepsis in patients with a high risk of death: efficacy and safety." Crit Care Med **34**(2): 285-292.
- Wilson & Hatchell, (1991). "Photodynamic retinal vascular thrombosis. Rate and duration of vascular occlusion." Invest Ophthalmol Vis Sci **32**(8): 2357-2365.
- Yamashiro, Kiryu, Tsujikawa, Honjo, Nonaka, Miyamoto, ..., Ogura, (2001). "Inhibitory effects of antithrombin III against leukocyte rolling and infiltration during endotoxin-induced uveitis in rats." Invest Ophthalmol Vis Sci **42**(7): 1553-1560.
- Yamauchi, Umeda, Inoguchi und Nawata, (1989). "Antithrombin III stimulates prostacyclin production by cultured aortic endothelial cells." Biochem Biophys Res Commun **163**(3): 1404-1411.
- Zwissler, Schosser, Weiss, Iber, Weiss, Schwickert, ..., Messmer, (1991). "Methodological error and spatial variability of organ blood flow measurements using radiolabeled microspheres." Res Exp Med (Berl) **191**(1): 47-63.

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die mir auf dem Weg zum „Dr. med.“ hilfreich zur Seite standen und mich mit viel Rat und Kraft unterstützt haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar, Direktorin des Instituts für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock. Ohne ihre außerordentliche Kompetenz, konstruktive Kritik und bewundernswerte Geduld wäre diese Arbeit nicht entstanden. Auch die gelegentlichen fachfernen Gespräche empfand ich immer als sehr inspirierend und nachhaltig prägend. Durch die Zusammenarbeit mit Frau Prof. Vollmar habe ich erfahren, wie anspruchsvoll, aber auch spannend und erfüllend medizinische Forschung ist. Ich bin überaus dankbar unter ihrer Leitung gearbeitet haben zu können.

Ebenso gebührt ein herzlichstes Dankeschön meinem Betreuer Dr. med. Heiko Sorg. Mit außerordentlichem Engagement und viel Begeisterung für die Forschung führte er mich in die Experimentelle Chirurgie ein. Auch in schwierigen Phasen der Arbeit stand er mir mit uneingeschränkter Hilfsbereitschaft zur Seite und schaffte es mit sinnvoller Kritik und gelegentlichem Lob meine Motivation und Leistung aufrecht zu erhalten.

Weiterhin möchte ich mich auf das herzlichste bei Frau Berit Blendow, Doris Butzlaff, Dorothea Franz und Maren Nerowski für deren exzellente technische Unterstützung bedanken. Auch ihren großen Anteil an der freundlichen Atmosphäre im Institut für Experimentelle Chirurgie empfand ich als sehr wohltuend. Desgleichen bin ich Frau Anja Gellert für ihre Ratschläge, ihr Engagement und aufmunternden Worte sehr dankbar. Den wissenschaftlichen Mitarbeitern Kerstin Abshagen, Ann-Kathrin Behrendt, Antje Butschkau, Berit Genz, Sabine Kischkel, Angela Kuhla, Katja Leppin und Dietmar Zechner gebührt ebenfalls ein großes Dankeschön. Bei Fragen oder Problemen bin ich jederzeit auf ein offenes Ohr und eine helfende Hand gestoßen. Nicht zuletzt möchte ich auch den Tierpflegern, Kommilitonen und nicht namentlich erwähnten Mitarbeitern am Institut für Experimentelle Chirurgie für ihre Arbeit und Unterstützung danken.

THESEN ZUR DISSERTATION

ANALYSE DES EINFLUSSES VON ANTITHROMBIN AUF DIE MIKROVASKULÄRE THROMBOSE IN DER MAUS: ANTI-INFLAMMATION ODER ANTIKOAGULATION?

1. Sepsis ist eine häufig vorkommende Erkrankung, dessen Behandlung – trotz großer Bemühungen – noch nicht zufriedenstellend gewährleistet werden kann.
2. Die Sepsis und deren Folgeerscheinungen, beispielsweise die disseminierte intravasale Gerinnung, stellen komplexe und dynamische Krankheitsbilder dar, die durch eine enge Interaktion von Gerinnung und Entzündung charakterisiert sind.
3. Für das Zusammenspiel von Gerinnungs- und Entzündungsmechanismen ist das mikrovaskuläre System von besonderer Bedeutung. Auch das septische Krankheitsbild wird durch Störungen des hämostatischen Gleichgewichts in der Mikrozirkulation in Erscheinung einer disseminierten intravasalen Gerinnung charakterisiert.
4. Die Erforschung adjunktiver Sepsistherapien ist von großer Bedeutung, wobei eine positive Beeinflussung sowohl des Gerinnungs- als auch Entzündungssystems angestrebt wurde.
5. Der endogene Serinoprotease-Inhibitor Antithrombin (AT) besitzt ein sowohl antikoagulatorisches als auch anti-inflammatorisches Wirkprofil.
6. Aufgrund der positiven experimentellen Ergebnisse wurde der Einsatz von AT bei schwerer Sepsis und septischem Schock in einer randomisierten kontrollierten klinischen Studie (*KyberSept* Studie) untersucht. Als Resultat konnte keine signifikante Verbesserung der 28 Tage-Mortalität festgestellt werden.

7. In der *post-hoc* Analyse wurde jedoch festgestellt, dass es in der Subgruppe von Patienten, die keine simultane Heparintherapie zur Thromboseprophylaxe erhielten, zu einer signifikanten Verbesserung der 90 Tage-Mortalität im Vergleich zur Kontrollgruppe kam.
8. Daraufhin wurde die gegenseitige Beeinflussung von Heparin und AT näher untersucht, wobei die Interaktion dieser Substanzen mit den endothelständigen Glykosaminoglykanen (GAGs) in den Fokus trat. Nach Bindung von AT an GAGs wird aus den Endothelzellen Prostazyklin freigesetzt. Eine Heparin-GAG Interaktion vermag diese Prostazyklinausschüttung nicht zu aktivieren.
9. Dieser Zusammenhang resultierte in der Forderung nach einer AT-Therapie septischer Patienten ohne simultane Heparinisierung.
10. Auf dieser Forderung aufbauend konnte nachgewiesen werden, dass die Applikation von AT ohne die zusätzliche Verabreichung von Heparin eine effektive Möglichkeit darstellt, mikrovaskuläre Thrombosen zu inhibieren.
11. Die detaillierte Interaktion zwischen Inflammation und Koagulation ist noch nicht ausreichend verstanden. Aufgrund des doppelten Wirkprofils von AT eignet sich der Einsatz von AT ideal, die Verknüpfungen der mikrovaskulären Gerinnungs- und Entzündungsprozesse zu analysieren.
12. Unter Verwendung des Cremastermuskelmodells in der Maus konnte die Analyse der mikrovaskulären Thrombose mithilfe der intravitalen Multifluoreszenzmikroskopie durchgeführt werden. Die Induktion der mikrovaskulären Thrombose erfolgte mittels Kombination der Methode der FeCl₃ Superfusion und dem *light-dye* Modell.
13. Es wurden sieben Versuchsgruppen erstellt. Neben der Anwendung von AT kamen Indomethacin, Heparin und Tryptophan⁴⁹-blockiertes AT (TrypAT) zum Einsatz. TrypAT besitzt die Eigenschaft, keine Bindung mit endothelialen GAGs eingehen zu können und somit die konsekutive Prostazyklinausschüttung aus den Endothelzellen zu verhindern. Indomethacin ist ein Inhibitor der Cyclooxygenase und verringert ebenfalls die systemische Prostazyklinfreisetzung.

14. Die Daten der kompletten Gefäßokklusion zeigten, dass die Applikation von AT zu einer signifikanten Verlängerung der Zeit bis zum vollständigen Gefäßverschluss führte. In den Gruppen, in denen die Prostazyklinausschüttung inhibiert wurde, zeigten sich Zeiten bis zur kompletten Gefäßokklusion, die vergleichbar mit den Werten der Kontrollgruppe waren.
15. Die Ausschüttung des anti-inflammatorisch und antikoagulatorisch wirksamen Prostazyklins scheint somit ein wichtiger Faktor des Wirkeffekts von AT im mikrovaskulären System zu sein.
16. Dies erlaubt den Rückschluss, dass die antikoagulatorische Wirkung von AT im mikrovaskulären Gefäßsystem im Wesentlichen auf der anti-inflammatorischen Potenz von AT beruht.
17. Andere mikrohämodynamische, hämatologische oder immunhistochemische Parameter weisen unter den verwendeten Dosierungsregimen keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Gruppen auf.
18. In der vorliegenden experimentellen Studie konnte eine Charakterisierung des antikoagulatorischen Wirkprofils von AT durchgeführt werden. Die Daten weisen darauf hin, dass die antikoagulatorische Potenz von AT entscheidend auf dessen anti-inflammatorisch wirksamer Interaktion mit dem mikrovaskulären Endothel beruht.
19. Die Analyse der Verbindung von Gerinnung und Entzündung sowie die spezifizierende Charakterisierung von AT sind für die Therapie des septischen Krankheitsbilds von bedeutender Relevanz.

EIDESSTÄTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, Julius Hoffmann, an Eides statt, die vorliegende Dissertationsarbeit mit dem Titel:

„Analyse des Einflusses von Antithrombin auf die mikrovaskuläre Thrombose in der Maus: Anti-Inflammation oder Antikoagulation?“

selbstständig und nur unter Nutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt zu haben. Wörtliche oder inhaltliche Aussagen verwendeter Werke sind als solche kenntlich gemacht.

Weiterhin versichere ich diese Arbeit nicht vorher oder gleichzeitig bei einer anderen als der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock zur Eröffnung eines Promotionsverfahrens eingereicht zu haben.

Rostock, 14. August 2013