

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin
(Direktor Univ.-Prof. Dr. med. M. Wendt)
der Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

**Der Einfluss von Argatroban auf die Leukozyten-Endothel-Interaktion und die
intestinale Kapillarperfusion während experimentell induzierter Sepsis**

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin
(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität

Greifswald

2011

vorgelegt von: Christian Fuchs
geboren am: 17.05.1983
in: Anklam

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Heyo K. Kroemer
1. Gutachter: Prof. Dr. med. Ch. Lehmann
2. Gutachter: Prof. Dr. med. A. Junger
Ort, Raum: Greifswald, Seminarraum der Klinik für Anästhesiologie und
Intensivmedizin
Tag der Disputation: 16.12.2011

1.	<u>EINLEITUNG</u>	<u>- 4 -</u>
2.	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	<u>- 8 -</u>
3.	<u>ERGEBNISSE</u>	<u>- 10 -</u>
3.1.	HÄMODYNAMIK	- 10 -
3.2.	KÖRPERKERNTEMPERATUR	- 10 -
3.3.	KAPILLARPERFUSION	- 11 -
3.4.	LEUKOZYTEN-ENDOTHEL-INTERAKTION.....	- 13 -
3.5.	BLUTGASANALYSEN.....	- 16 -
4.	<u>DISKUSSION.....</u>	<u>- 17 -</u>
5.	<u>LITERATURLISTE</u>	<u>- 20 -</u>
6.	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>- 24 -</u>
7.	<u>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....</u>	<u>- 25 -</u>
8.	<u>DANKSAGUNG.....</u>	<u>- 26 -</u>
9.	<u>PUBLIKATION</u>	<u>- 27 -</u>

1. Einleitung

Die Sepsis und das systemic inflammatory response syndrome (SIRS) sind Erkrankungen mit hoher Prävalenz und Mortalität auf Intensivstationen. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass 28% aller Infektionen auf Intensivstationen mit einer Sepsis einhergingen, 24% dieser Infektionen mit schwerer Sepsis und 30% mit einem septischen Schock. Die 28-Tage-Mortalität stieg entsprechend der Schwere an: SIRS mit 10%, Sepsis mit 20%, 20-40% bei schwerer Sepsis und 40-60% bei septischem Schock. Auch bei Patienten, die eine Sepsis überlebten, wurde eine 50%ige Reduktion der 5-Jahres-Überlebenschancen festgestellt [1, 2].

Nach einer deutschen Studie von Moerer *et al.* (2002) sind septische Patienten ein wesentlicher ‚Kostenfaktor‘ auf Intensivstationen. Im Gegensatz zu nicht septischen Patienten, die durchschnittlich vier Tage auf der Intensivstation verblieben und Kosten von 3404€ verursachten, mussten septische Patienten 12,6 Tage auf einer Intensivstationen behandelt werden. Dabei entfielen auf überlebende Sepsispatienten Therapiegesamtkosten von 21.984€ und 25.446€ auf nichtüberlebenden Sepsispatienten [3]. Zusätzlich ist die Inzidenz der Sepsis in den letzten Jahren gestiegen. So hat sich in den USA in einem Beobachtungszeitraum von 1993 bis 2003 die Inzidenz der schweren Sepsis von 25,6% auf 43,8% nahezu verdoppelt [4].

Das SIRS und die Sepsis, mit ihren verschiedenen Stadien, sind systemische, überschießende Immunantworten auf interne oder externe pathogene Faktoren. Für das SIRS sind verschiedene Ursachen bekannt. Neben Polytraumata, Verbrennungen, Pankreatitis und hämorrhagischem Schock gibt es noch eine Vielzahl weiterer auslösender Faktoren. Bei der Sepsis liegt eine vermutete oder nachgewiesene Infektion als Auslöser vor.

Klinisch und paraklinisch manifestieren sich beide Erkrankungen durch mindestens zwei der folgenden Symptome: Hyper- ($\geq 38^{\circ}\text{C}$) oder Hypothermie ($\leq 36^{\circ}\text{C}$), Tachykardie (Herzfrequenz $\geq 90/\text{min}$), Tachypnoe (Atemfrequenz $\geq 20/\text{min}$, $p_a\text{CO}_2 \leq 32 \text{ mmHg}$) und/oder Veränderungen der Leukozytenzahl im Blutbild (Leukozytose $\geq 12.000/\text{mm}^3$, Leukopenie $\leq 4000/\text{mm}^3$ oder $\geq 10\%$ unreife neutrophile Granulozyten).

Die schwere Sepsis ist zusätzlich durch mindestens ein Organversagen oder eine Gewebhypoperfusion gekennzeichnet, die durch die Sepsis verursacht wurden. Das Organversagen und die Gewebhypoperfusion können sich unter anderem als akute Enzephalopathie, Thrombozytopenie, arterielle Hypoxämie, Oligurie und Laktatazidose äußern. Der septische Schock weist eine durch die Sepsis verursachte Hypotension trotz adäquater Volumentherapie auf. Die Sepsis induzierte Hypotension ist definiert als

systolischer Blutdruck unter 90 mmHg beziehungsweise die Abnahme des mittleren arteriellen Blutdrucks unter 65 mmHg über einen Zeitraum von mindestens 60 Minuten, oder der notwendige Einsatz von Vasopressoren um einen adäquaten Blutdruck zu erhalten. Andere Ursachen der Hypotension wie kardiogener Schock müssen ausgeschlossen sein [5, 6].

Im Rahmen einer Sepsis werden Toxine, wie zum Beispiel bakterielle Endotoxine, durch verschiedene Rezeptoren, darunter den toll like receptors, des Endothels, der Monozyten und anderen Zellen erkannt. Die dadurch vermittelte Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden führen zu einer NF- κ B vermittelten Genaktivierung mit Expression verschiedener proinflammatorischer Mediatoren, wie Interleukin-1 β und TNF- α , aber auch zur Expression von Interleukin-10 und Interleukin-4 als antiinflammatorische Zytokine. Zusätzlich setzen die Endothelzellen verschiedene gerinnungsaktive Substanzen frei. Die Expression des tissue factors (TF) mit nachfolgender Aktivierung der Gerinnungskaskade, führt über die massive Thrombinbildung zur Thrombinämie. Die endotheliale Expression des von-Willebrand-Faktors trägt mit zur Thrombozytenaktivierung bei [7, 8].

Gleichzeitig sind antikoagulatorische, endothelgebundene Regelkreise, vor allem das Protein C- und das Antithrombinsystem durch proinflammatorische Zytokine blockiert. Thrombin bindet an den endothelialen Protease-aktivierenden Faktor 1 (PAR-1). Dieser Rezeptor führt zu einer weiteren Induktion der endothelialen Expression proinflammatorischer Zytokine und Chemokine [9]. Bindet aber aktiviertes Protein C im Komplex mit dem endothelialen Protein C-Rezeptor (EPCR) an diesen Rezeptor so führt dies über die Blockade von NF- κ B zu einer antiinflammatorischen Beeinflussung des Endothels. Durch die Aktivierung der Expression endothelialer Rezeptoren, darunter das endotheliale Adhäsionsmolekül P-Selektin und das interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1), und durch die Freisetzung von Thrombozyten aktivierenden Faktoren ist Thrombin an der Inflammation durch Zellrekrutierung von Leukozyten und Thrombozyten beteiligt. Die endothelialen Adhäsionsmoleküle vermitteln die Leukozyten-Endothel-Interaktion mit anfänglichem gesteigerten Leukozyten-Endothel-Kontakt zur Adhärenz der Leukozyten am Endothel. Dies führt zur zusätzlichen Leukozytenaktivierung mit Freisetzung von Proteasen und Oxidantien, die zu weiterer Endothelschädigung führen. Schließlich akkumulieren die Leukozyten im Organ durch transendotheliale Migration [10-14].

Für die Pathogenese der Sepsis ist zusammenfassend das Zusammenspiel von Infektion, Inflammation und Gerinnung wesentlich. Das Gerinnungs- und Immunsystem sind durch Thrombin eng miteinander verknüpft. Thrombin scheint deshalb auch eines der wichtigsten

Gerinnungsenzyme zu sein, welches die inflammatorische mikrovaskuläre Dysfunktion beeinflusst [15].

Mehrere Studien konnten dementsprechend zeigen, dass gerinnungshemmende Substanzen wie Heparin und rekombinantes, humanes aktiviertes Protein C (rhAPC) besonders über die Thrombininhibierung zu einer Minderung der Leukozyten-Endothel-Interaktion und Leukozytenaggregation bei Sepsis führen. Auch Argatroban zeigte diese antiinflammatorischen Eigenschaften [16-20].

Argatroban ist ein synthetisches L-Argininderivat und bindet als univalenter, selektiver und direkter Thrombininhibitor, reversibel an das katalytische Zentrum des Thrombin. Dabei wird sowohl gelöstes als auch gebundenes Thrombin inhibiert. Im Gegensatz zum Heparin werden keine weiteren Cofaktoren zur Thrombininhibition benötigt und durch Argatroban wird keine Antikörperbildung induziert. Es gibt Hinweise dafür, dass Argatroban eine stärkere Thrombin- und Thrombozyteninhibierung aufweist als Heparin. Argatroban ist in Deutschland zur Therapie und Prophylaxe der Heparin-induzierten Thrombozytopenie (HIT) Typ 2 zugelassen [21-23]. Bei vorhersagbarer Dosis-Wirkungs-Beziehung besitzt Argatroban einen konstanten und schnellen pharmakologischen Effekt [24, 25]. Aufgrund der Reversibilität der Bindung werden die regulatorischen Funktionen des Thrombins, zum Beispiel die Aktivierung von Protein C über Thrombomodulin und dessen antiinflammatorische Eigenschaften nicht beeinflusst [26] und es wird vermutet, dass Argatroban die Thrombin-vermittelte Vasokonstriktion beeinflusst und reduziert [27, 28].

In den aktuellen Leitlinien zur adjunktiven Therapie bei Sepsis wird allerdings nur rhAPC empfohlen [29]. Die ersten klinischen Studien mit rhAPC wiesen einen statistisch signifikanten Überlebensvorteil bei Patienten mit schwerer Sepsis und hohem Mortalitätsrisiko auf. Bei Patienten mit geringem Mortalitätsrisiko ist hingegen kein Überlebensvorteil nachzuweisen. Bei dieser Gruppe scheinen die Risiken, vor allem Blutungskomplikationen, den Überlebensvorteil sogar aufzuheben [30, 31]. Eine Studie wurde sogar im Verlauf abgebrochen, da keine Mortalitätsenkung bei Patienten mit schwerer Sepsis und geringem Mortalitätsrisiko nachgewiesen werden konnte. Besonders gefährdet für Blutungskomplikationen sind Patienten, die bis zu 30 Tage vor dem Beginn der Therapie mit rhAPC operiert wurden und nur ein Organversagen aufweisen. Zusätzlich wiesen diese Patienten eine erhöhte Mortalität auf. Der Einsatz antikoagulatorischer Substanzen bleibt deshalb umstritten [32]. Es liegen aber noch keine Aussagen zur antiinflammatorischen Wirkung und Komplikationen von Argatroban während einer Sepsis vor.

Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung des direkten, reversiblen Thrombininhibitors Argatroban auf die intestinale Kapillarperfusion und die Leukozyten-Endothel-Interaktion während einer experimentell induzierten Sepsis zu untersuchen.

2. Material und Methoden

Die verwendeten Methoden wurden ausführlich in der Veröffentlichung beschrieben [33].

Zur Induktion einer Sepsis wurde das Colon-ascendens-Stent-Peritonitis-Modell (CASP) nach Zantl *et al.* (1998) verwendet. Dieses Modell einer induzierbaren abdominalen Sepsis beruht auf der Bildung einer artifiziellen, kontinuierlichen Fistel zwischen Darmlumen und Peritonealhöhle, vergleichbar mit einer postoperativen intestinalen Anastomoseninsuffizienz mit Ausbildung einer kotigen Peritonitis [34]. Es wurden 40 männliche Lewis Ratten mit einem Gewicht von 235-350g in 4 Gruppen à 10 Tiere randomisiert: Schein-Operation (SHAM), SHAM mit Argatroban-Gabe (SHAM+ARG), CASP-Gruppe (CASP) und CASP-Gruppe mit Argatroban-Gabe (CASP+ARG).

Vor Beginn des Experiments wurden die Ratten mit Pentobarbital (Dosis: 60 mg/kg intraperitoneal) anästhesiert. Durch eine mediane Laparotomie erfolgte der Zugang zur Peritonealhöhle, so dass das Caecum und Colon ascendens ausgelagert werden konnten. Eine circa 5 mm lange Kanüle (G16) wurde als Stent 2 cm distal der Ileozökalklappe antimesenterial in das Colon ascendens eingeführt und durch Nähte (7/0 Polyethylenterephthalat) fixiert. Hierdurch wurde die kontinuierliche artifizielle Fistel zwischen Darmlumen und Peritonealhöhle geschaffen. Durch Ausstreichen des Caecums wurde der Stent mit Faeces gefüllt. Anschließend wurden alle Schichten der Bauchwand wieder verschlossen. Für die Schein-Operation wurde der Stent dem Darm aufgenäht, so dass keine Penetration der Darmwand vorlag.

16 Stunden nach der Implantation des Stents erfolgte die Vorbereitung zur Intravitalmikroskopie. Die Tiere wurden nach erneuter Pentobarbitalgabe (Dosis: 60 mg/kg intraperitoneal für SHAM und SHAM+ARG; 45 mg/kg intraperitoneal für CASP und CASP+ARG) tracheotomiert, sowie über die Arteria carotis communis ein arterieller Zugang und über die Vena jugularis interna ein zentralvenöser Zugang geschaffen. Durch intermittierende Pentobarbitalboli alle 30 min (Dosis: 20 mg/kg intravenös) wurde die Narkose aufrechterhalten. Über den arteriellen Zugang erfolgte die kontinuierliche Registrierung des mittleren arteriellen Druckes und der Herzfrequenz. Rektal wurde kontinuierlich die Körperkerntemperatur gemessen. Unmittelbar vor der Argatroban-Gabe erfolgte die Abnahme der arteriellen Blutprobe zur Bestimmung des Lactat- und Glukosespiegels und Bestimmung des arteriellen Sauerstoff- (p_aO_2) und Kohlenstoffdioxid- (p_aCO_2) Partialdrucks (1. Messung). Die Tiere der Argatroban-Gruppen (SHAM+ARG und CASP+ARG) erhielten als Bolus 2 mg/kg Argatroban intravenös, die Tiere der SHAM- und

CASP-Gruppen erhielten eine volumenäquivalente Gabe von isotonischer 0,9% Natriumchloridlösung über den zentralvenösen Zugang.

Anschließend wurde nach 60 Minuten die Intravitalmikroskopie durchgeführt. Mit Hilfe einer Markierung mit 0,01% Rhodamin 6G (Dosis: 1,5 ml/kg intravenös) erfolgte die Zählung der Leukozyten in den submukösen Venolen des terminalen Ileums. Die submukösen Venolen wurden in 2 Gruppen unterteilt: (Sammel-)Venolen 1° (V1; Durchmesser 50-80 µm) und (postkapilläre) Venolen 3° (V3; Durchmesser 30-50µm). Mittels 5% bovinem Fluoreszein-Isothiozyanat-Albumin (Dosis: 1,0 ml/kg intravenös) erfolgte die Untersuchung der Perfusion der Kapillaren in der Darmmuskulatur und der Mukosa. Für die Untersuchung der Mukosa wurde mit Hilfe einer Mikrokauterschere das Darmlumen antimesenterial eröffnet und mittels isotonischer 0,9% Natriumchloridlösung der vorhandene Faezes herausgespült. Es wurden jeweils 5 Videosequenzen à 30 Sekunden aufgenommen. Vor Beendigung des Experiments erfolgte die erneute Abnahme einer arteriellen Blutprobe (2. Messung).

Die Auswertung der gespeicherten Videosequenzen wurde von einem hinsichtlich der Gruppeneinteilung der Tiere verblindeten Untersucher vorgenommen. Es wurden die folgenden Parameter bestimmt: Flow der Leukozyten (Anzahl der Leukozyten, die sich innerhalb von 30 Sekunden durch einen ausgewählten Gefäßabschnitt bewegen, **Leukozyten-Flow** = *Zahl der Zellen/min*), adhärenente Leukozyten (Anzahl der Leukozyten, die innerhalb von 30 Sekunden an einem ausgewählten Gefäßabschnitt dauerhaft am Gefäßendothel anhaften, **adhärenente Leukozyten** = *Anzahl der Zellen/mm²*), functional capillary density (Länge der Kapillaren mit kontinuierlich beobachtbarer Erythrozytenperfusion über 30 Sekunden im Verhältnis zu einem vorgegebenen rechteckigen Feld, **FCD** = *cm/cm² = cm⁻¹*) und dys-functional capillary density (Länge der Kapillaren ohne kontinuierliche Erythrozytenperfusion über 30 Sekunden im Verhältnis zu einem vorgegebenen rechteckigen Feld, **dFCD** = *cm/cm² = cm⁻¹*).

Alle Daten wurden mit Sigma Stat/Plot analysiert. Nach Prüfung der Normalverteilung mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test wurden die Differenzen innerhalb einer Gruppe mit einer one-way ANOVA oder einer ANOVA on ranks analysiert. Anschließend erfolgte ein post-hoc Test nach Student-Newman-Keuls. Die Parameter der Hämodynamik wurden mit einer two-way-ANOVA und mit einem post-hoc Test nach Student-Newman-Keuls analysiert. Wahrscheinlichkeiten mit $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant deklariert.

3. Ergebnisse

3.1. Hämodynamik

Der mittlere arterielle Druck war bei Tieren, die einen CASP-Eingriff erhielten, statistisch signifikant im Vergleich zu den Tieren der SHAM-Gruppen reduziert. Die Gabe von Argatroban führte zu keiner Beeinträchtigung der Hämodynamik, das heißt die Herzfrequenz und der mittlere arterielle Blutdruck wurden nicht beeinflusst (siehe Abbildung 1).

Abbildung 1: Kreislaufparameter

	Zeitpunkt	SHAM	CASP	CASP+ARG	SHAM+ARG
MAP [mmHg]	-15 min	129 (±11) #	103 (±16)	118 (±7) #	135 (±25) #§
	0 min	126 (±13) #§	98 (±13)	105 (±9)	119 (±7) #§
	15 min	115 (±22) #§	92 (±18)	99 (±17)	120 (±18) #§
	45 min	114 (±19) #§	95 (±15)	98 (±9)	115 (±10) #§
	75 min	145 (±21) §	134 (±8)	113 (±16) #	153 (±10) #§
	105 min	140 (±14) #§	121 (±12)	123 (±11)	143 (±7) #§
HF [min ⁻¹]	-15 min	487 (±41)	481 (±56)	463 (±37)	479 (±43)
	0 min	496 (±44) §	484 (±48)	447 (±28)	477 (±24)
	15 min	477 (±37)	479 (±46)	479 (±33)	448 (±42)
	45 min	473 (±34)	499 (±53)	451 (±48)	469 (±34)
	75 min	488 (±38)	516 (±35)	500 (±65)	479 (±50)
	105 min	536 (±27)	521 (±50)	513 (±50)	501 (±29)

Hämodynamik: mittlerer arterieller Blutdruck (**MAP**) und Herzfrequenz (**HF**); Mittelwert±Standardabweichung; 0 min ist der Zeitpunkt der Argatrobangabe; # $p < 0,05$ vs. CASP; § $p < 0,05$ vs. CASP+ARG

3.2. Körperkerntemperatur

Obwohl die Gruppen zu Beginn der Intravitalmikroskopie keinen statistisch signifikanten Unterschied aufwiesen, konnte am Ende des Experiments ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen mit SHAM- und CASP-Eingriff nachgewiesen werden (siehe Abbildung 2).

Abbildung 2: Temperatur

	Zeitpunkt	SHAM	CASP	CASP+ARG	SHAM+ARG
T [°C]	-15 min	39,1 (±0,86)	38,6 (±1,11)	38,2 (±0,46)	38,8 (±0,27)
	0 min	39,1 (±0,78)	38,7 (±0,95)	38,5 (±0,28)	38,9 (±0,38)
	15 min	38,9 (±0,52)	38,9 (±0,71)	38,7 (±0,34)	38,9 (±0,27)
	45 min	38,9 (±0,59)	39,3 (±0,74)	39,0 (±0,44)	39,0 (±0,55)
	75 min	38,0 (±1,24)	39,0 (±0,65)	38,6 (±0,76)	38,1 (±0,95)
	105 min	37,4 (±0,86) #§	38,5 (±1,00)	38,4 (±1,13)	37,1 (±1,34) #§

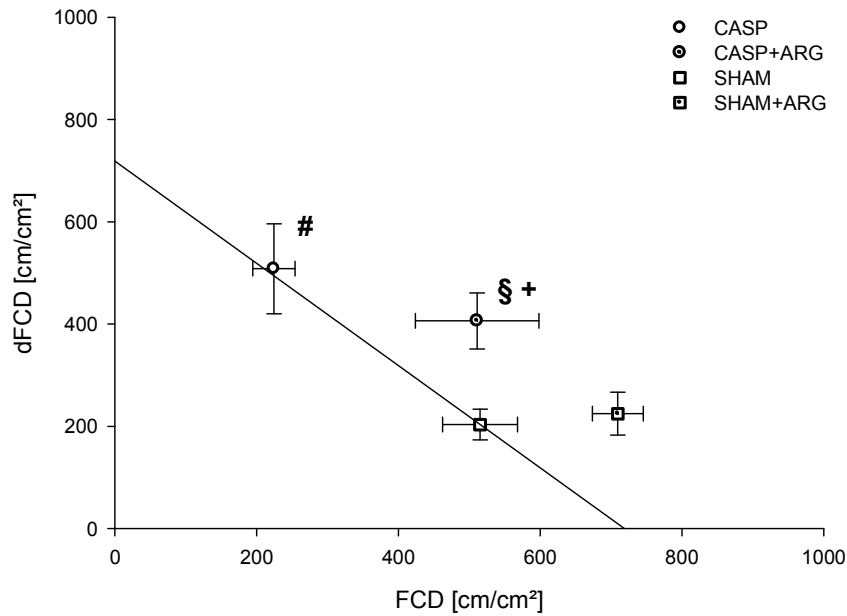
Temperatur (**T**); Mittelwert±Standardabweichung; 0 min ist der Zeitpunkt der Argatrobangabe; # $p < 0,05$ vs. CASP; § $p < 0,05$ vs. CASP+ARG

3.3. Kapillarperfusion

Tiere mit einer induzierten Sepsis wiesen eine beeinträchtigte intestinale Kapillarperfusion auf. Die functional capillary density (FCD) nahm zugunsten der dys-functional capillary density (dFCD) ab. Dieser Effekt war besonders in der Mukosa ausgeprägt.

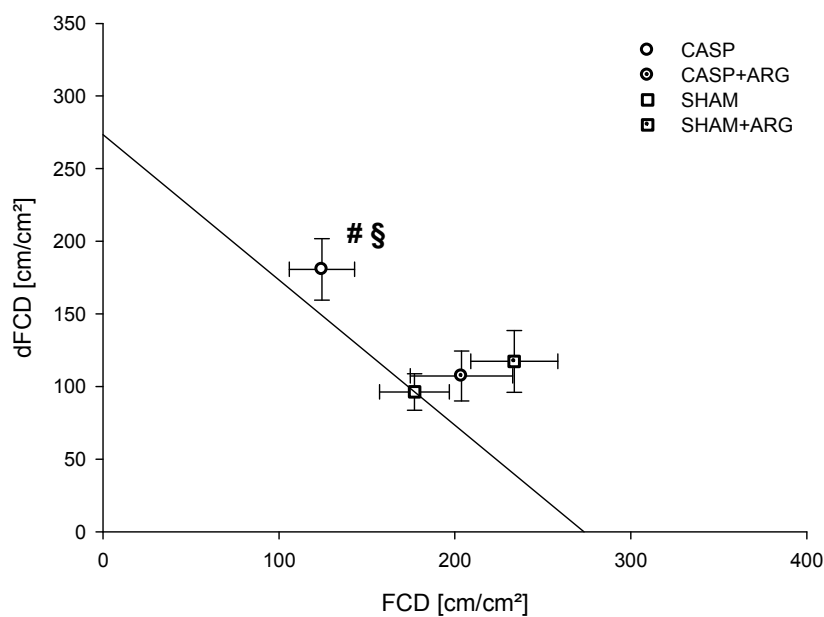
Die kapillare Perfusion des terminalen Ileums wurde bei septischen Tieren durch die Argatroban Gabe statistisch signifikant im Vergleich zu den Kontrollgruppen verbessert. Die Anzahl der dysfunktionalen Kapillaren nahm ab und im Gegenzug erhöhte sich die Anzahl der funktionalen Kapillaren. Am deutlichsten war dieser Effekt wiederum in der Mukosa ausgeprägt. Septische Tiere, die Argatroban erhielten, wiesen eine erhöhte Anzahl perfundierter Kapillaren auf. Die Summe von FCD und dFCD war bei diesen Tieren erhöht und wies die höchsten Werte sogar im Vergleich zu den SHAM-Tieren auf (siehe Abbildungen 3-5).

Abbildung 3: Kapillarperfusion Mukosa



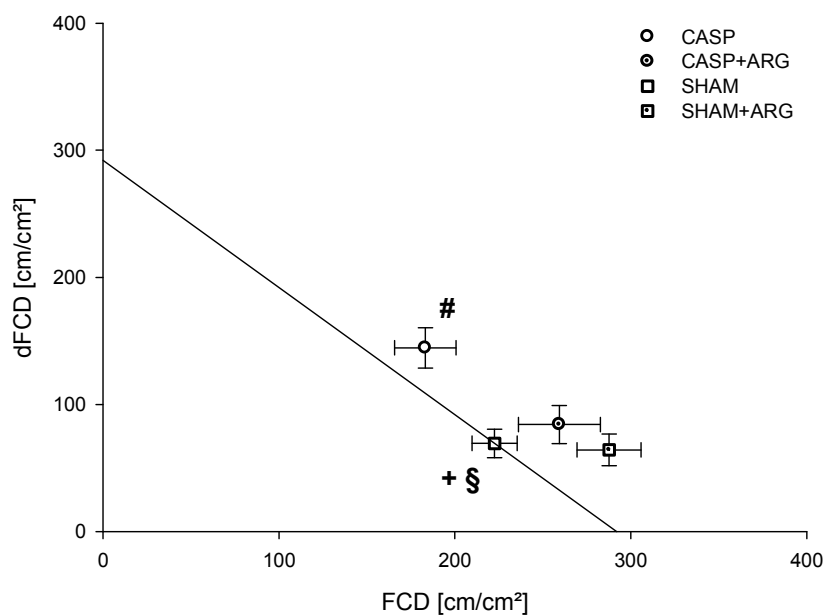
Functional capillary density (FCD) vs. dys-functional capillary density (dFCD) der Mukosa des terminalen Ileums; Mittelwert±Standardfehler; Gerade: Summe von FCD und dFCD der SHAM-Tiere; # $p < 0,05$ (FCD und dFCD) CASP vs. SHAM und SHAM+ARG; § $p < 0,05$ (dFCD) CASP+ARG vs. SHAM und SHAM+ARG; + $p < 0,05$ (FCD) CASP+ARG vs. CASP; Messpunkte oberhalb der Gerade: vergrößerte Anzahl perfundierter Kapillaren im Vergleich zu SHAM-Tieren

Abbildung 4: Kapillarperfusion Muscularis circularis



Functional capillary density (FCD) vs. dys-functional capillary density (dFCD) der Muscularis circularis des terminalen Ileum; Mittelwert±Standardfehler; Gerade: Summe von FCD und dFCD der SHAM-Tiere; # $p < 0,05$ (FCD) CASP vs. SHAM+ARG; § $p < 0,05$ (dFCD) CASP vs. SHAM und CASP+ARG; Messpunkte oberhalb der Gerade: vergrößerte Anzahl perfundierter Kapillaren im Vergleich zu SHAM-Tieren

Abbildung 5: Kapillarperfusion Muscularis longitudinalis

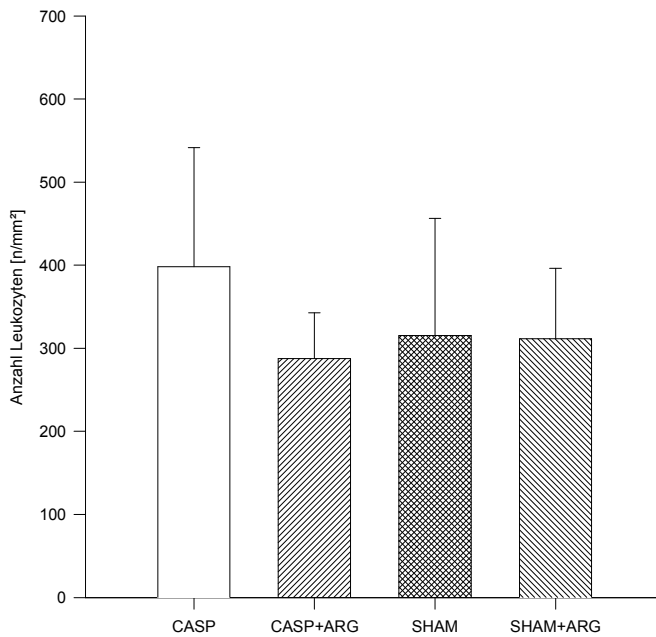


Functional capillary density (FCD) vs. dys-functional capillary density (dFCD) der Muscularis longitudinalis des terminalen Ileums; Mittelwert±Standardfehler; Gerade: Summe von FCD und dFCD der SHAM-Tiere; # $p < 0,05$ (FCD und dFCD) CASP vs. SHAM+ARG und CASP+ARG; § $p < 0,05$ (dFCD) SHAM vs. CASP; + $p < 0,05$ (FCD) SHAM vs. SHAM+ARG; Messpunkte oberhalb der Gerade: vergrößerte Anzahl perfundierter Kapillaren im Vergleich zu SHAM-Tieren

3.4. Leukozyten-Endothel-Interaktion

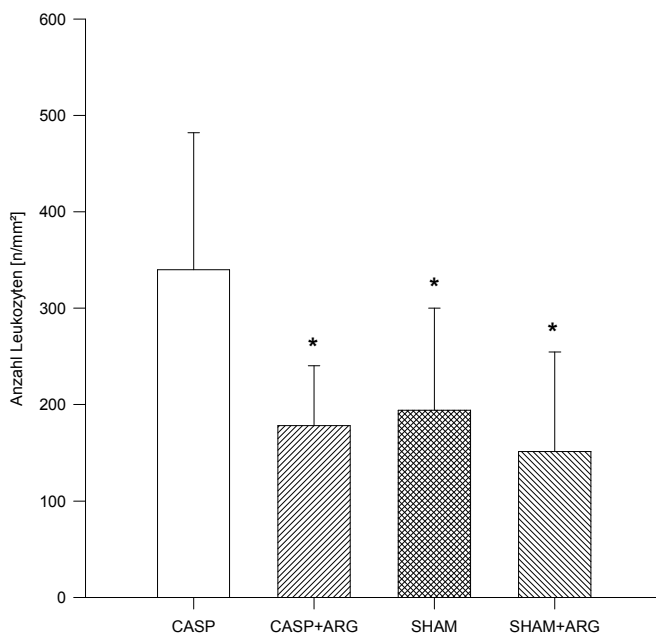
Tiere der CASP-Gruppe wiesen eine erhöhte Anzahl adhärenter Leukozyten im Vergleich zu Tieren, die eine SHAM-OP erhielten, auf. Durch die Gabe von Argatroban wurde die Anzahl der adhärenter Leukozyten bei septischen Tieren verringert. Diese Effekte waren aber nur in den Venolen 1° statistisch signifikant (siehe Abbildungen 6 und 7).

Abbildung 6: adhärenente Leukozyten in Venolen 3°



*Anzahl der **adhärenente Leukozyten** in Venolen 3°; Mittelwert±Standardabweichung*

Abbildung 7: adhärenente Leukozyten in Venolen 1°



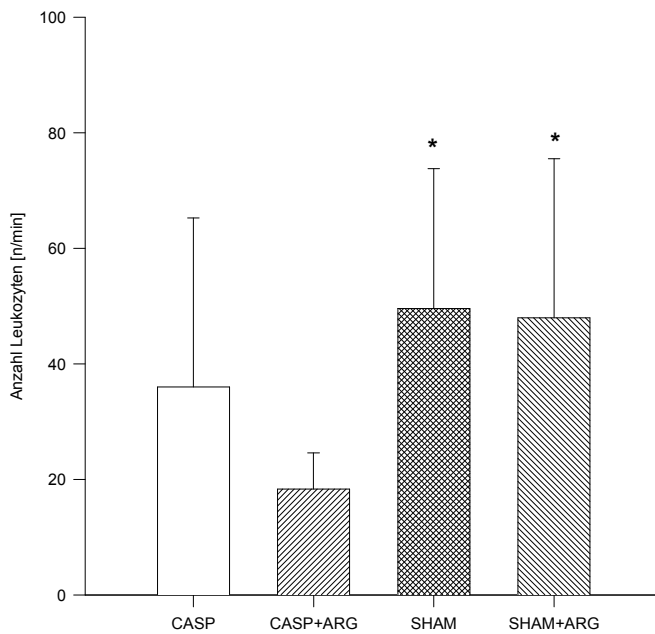
*Anzahl der **adhärenente Leukozyten** in Venolen 1°; Mittelwert±Standardabweichung;*

** $p < 0,05$ vs. CASP*

Die Tiere der SHAM und SHAM+ARG Gruppen wiesen in Venolen 3° einen statistisch signifikant erhöhten Leukozyten-Flow auf. Die CASP+ARG Gruppe zeigt eine deutliche

numerische Reduzierung des Leukozyten-Flows ohne aber in Venolen 1° und 3° statistisch signifikant zu sein (siehe Abbildungen 8 und 9).

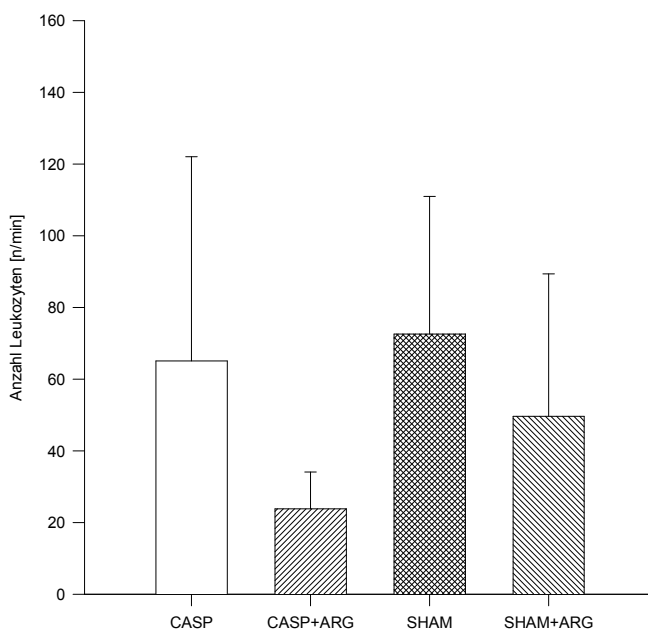
Abbildung 8: Leukozyten-Flow in Venolen 3°



Leukozyten-Flow in Venolen 3°; Mittelwert±Standardabweichung;

** $p < 0,05$ vs. CASP+ARG*

Abbildung 9: Leukozyten-Flow in Venolen 1°



Leukozyten-Flow in Venolen 1°; Mittelwert±Standardabweichung

3.5. Blutgasanalysen

Der arterielle Laktatspiegel wies sowohl zum 1. als auch zum 2. Messzeitpunkt keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen auf. Es kam im Verlauf des Experiments in allen Gruppen zu einem Anstieg des arteriellen Laktatspiegels.

Der arterielle Glukosespiegel war zum Zeitpunkt der 1. Messung bei allen Gruppen nahezu gleich. Auffällig waren zum 2. Messzeitpunkt ein stark erhöhter Glukosespiegel der SHAM+ARG Gruppe.

Die arteriellen Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdrücke zeigten zur 1. Messung nur geringe Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen. Zum 2. Messpunkt ließ sich im Gegensatz zu den anderen Gruppen in der SHAM Gruppe ein verstärkter Anstieg des Sauerstoffpartialdruckes und ein verstärkter Abfall des Kohlendioxidpartialdruckes belegen.

Abbildung 10: Blutgasanalysen

	Zeitpunkt	SHAM	CASP	CASP+ARG	SHAM+ARG
Laktat [mmol/l]	1. Messung	1,4 (±0,30)	2,4 (±1,27)	1,4 (±0,13)	1,6 (±0,27)
	2. Messung	3,3 (±1,22) ^{1§}	2,6 (±0,98)	2,7 (±1,35) ^{1§}	2,5 (±1,24) ^{1§}
p_aCO₂ [mmHg]	1. Messung	31,2 (±4,89)	30,3 (±6,08)	36,1 (±1,97)	32,1 (±4,28)
	2. Messung	25,2 (±5,64) ^{1§}	31,9 (±6,14) #	29,6 (±3,53) ^{1§}	34,0 (±1,27) #
p_aO₂ [mmHg]	1. Messung	93,4 (±18,44)	96,2 (±13,03)	93,9 (±19,31)	97,6 (±15,73)
	2. Messung	126,4 (±17,89) ^{1§}	97,2 (±22,10) #	102,7 (±21,42) #	104,4 (±25,95) #
Glukose [mmol/l]	1. Messung	6,9 (±0,36)	7,3 (±0,68)	6,6 (±0,78)	6,7 (±0,60)
	2. Messung	7,2 (±0,91) \$	6,8 (±0,45) \$	6,2 (±0,51) #§	7,9 (±1,08) ^{1§}

Arterielle Blutgasanalyse: Laktatspiegel (**Laktat**); Glukosespiegel (**Glukose**); arterieller Kohlendioxidpartialdruck (**p_aCO₂**) und arterieller Sauerstoffpartialdruck (**p_aO₂**); Mittelwert±Standardabweichung; #*p*<0,05 vs. SHAM; §*p*<0,05 vs. SHAM+ARG; §*p*<0,05 1. Messung vs. 2. Messung

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Argatroban bei experimentell induzierter Sepsis die intestinale Kapillarperfusion verbessert und durch die Reduktion der Anzahl aktivierter Leukozyten antiinflammatorische Effekte aufweist.

Die Beeinträchtigung der Mikrozirkulation während einer Sepsis wird durch verschiedene Pathomechanismen verursacht: eine erhöhte Anzahl aktivierter (adhärenter) neutrophiler Granulozyten, verminderte Verformbarkeit von Erythrozyten, eine Aktivierung der Gerinnungskaskade und Bildung von Mikrothromben, eine Vasoplegie und eine Öffnung arteriovenöser Shunts [35]. Argatroban weist verschiedene Angriffswege gegen die aufgeführten Pathomechanismen auf, die dementsprechend die beobachteten Effekte erklären können.

Ein wesentlicher Wirkungsmechanismus könnte in der von Miyahara *et al.* (2003) in der Retina beobachteten verminderten Expression der mRNA von P-Selektin- und ICAM-I-Adhäsionsmolekülen nach transienter retinaler Ischämie und Gabe von Argatroban liegen. Dies führte sowohl zu einer verminderten Leukozyteninteraktion mit dem Gefäßendothel, aber auch zu einer verminderten Thrombozyten-Endothel-Interaktion [36]. Diese Ergebnisse zeigen, dass Argatroban nicht nur das Gerinnungssystem inhibiert, sondern auch die inflammatorische Kettenreaktion beeinflusst, die durch akkumulierende Leukozyten und Thrombozyten vermittelt wird. Gerade P-Selektin, das aktivierte Gerinnungssystem und die Adhäsion der Thrombozyten am Gefäßendothel führen zu einer Verschlechterung der intestinalen Mikrozirkulation während einer Sepsis [37, 38].

Das Intestinum ist eine wichtige Quelle für (sekundäre) systemische bakterielle Infektionen [39]. Die Minderperfusion des Splanchnicusgebietes während einer Sepsis führt durch die beeinträchtigte Permeabilität und die geschwächte Immunantwort zu einem Zusammenbruch der Darmbarriere. Daraus resultiert eine Translokation von Bakterien und Toxinen aus dem intestinalen Lumen in den systemischen Blutkreislauf. Vor allem die Mikrovilli des Intestinums reagieren sensibel auf die Hypoxie bei einer Hypoperfusion. Zusätzlich führen Endotoxine zu einer direkten Schädigung der Mukosa durch erhöhte Freisetzung von Sauerstoffradikalen, der Hemmung des mitochondrialen Stoffwechsels der Enterozyten und durch ihre vasoaktiven Eigenschaften zu einer zusätzlichen Minderperfusion [40, 41]. Eine frühe Verbesserung der intestinalen Mikrozirkulation ist deshalb ein wichtiges therapeutisches Ziel in der Sepsistherapie [42]. Die Gabe von Argatroban führte in den durchgeführten Experimenten bereits nach 60 Minuten bei septischen Raten besonders zu einer Verbesserung

der Kapillarperfusion der intestinalen Mukosa. Durch Verbesserung der Gewebeoxygenierung könnte Argatroban deshalb zu einer Verminderung endothelialer Schäden und zu einer verminderten Translokation von Bakterien führen.

In den vorliegenden Experimenten reduzierte die Gabe von Argatroban statistisch signifikant die Anzahl am Endothel adhärenter Leukozyten und den Leukozyten-Flow gegenüber den unbehandelten Tieren. Adhärente Leukozyten, vor allem neutrophile Granulozyten, und Thrombozyten gelten als wichtigste Auslöser der mikrovaskulären Dysfunktion in der schweren Sepsis [43]. Argatroban reduziert aber nicht nur die Leukozyten-Endothel-Interaktion, sondern ist auch ein potenter Inhibitor der Thrombozyten-Endothel-Interaktion [36]. Thrombozyten werden nicht nur durch Akute-Phase-Proteine, darunter Interleukin-6 und das Komplementsystem, aktiviert. Während einer Sepsis sind sie hyperaggreabel, hyperaktiv und ihre Produktion ist erhöht. Sie bilden vasoaktive und chemotaktische Substanzen, wie zum Beispiel Arachnoidonsäuremetabolite, die an inflammatorischen Prozessen beteiligt sind. Des Weiteren sind die Thrombozyten während einer Sepsis sensitiver für Thrombin. Die erhöhte Thrombozyten-Leukozyten- und Thrombozyten-Endothel-Interaktion sind durch die hierdurch verursacht Mikrozirkulationsstörung Hauptursachen für das Eintreten eines Organversagens. Thrombozyten, die am Endothel adhären sind, fördern die Leukozytenakkumulation und die daraus folgende Inflammation [13, 44].

Ein ausreichender hoher Blutdruck und eine adäquate Herzfrequenz sind nötig, um der Gewebhypoxie während einer Sepsis entgegenzutreten [45]. Durch die Gabe von Argatroban blieben diese Parameter in den hier durchgeführten Experimenten unverändert. Vielmehr wurde die Anzahl durchbluteter Kapillaren bei septischen Tieren, die Argatroban erhielten, erhöht. Argatroban scheint zu einer Öffnung von Kapillaren oder einem Schließen von arteriovenösen Shunts zu führen. Winn *et al.* (1993) konnten belegen, dass Argatroban die durch Thrombin vermittelte Vasokonstriktion reduzieren kann [27]. Dies könnte zusätzlich die verbesserte Kapillarzirkulation durch Argatroban erklären.

Die septische Thrombinämie führt zur massiven Aktivierung der Gerinnungskaskade mit Ausbildung von Mikrothrombi, die maßgeblich an der Pathogenese des Organversagens, der Koagulopathie und Mortalität der schweren Sepsis beiträgt [46]. Argatroban als kompetenter Thrombininhibitor könnte dem effektiv entgegen wirken.

Ueshima *et al.* (2000) stellten zusätzlich die These auf, dass Argatroban auch direkt über einen unbekanntes Mechanismus mit den Thrombinrezeptor der Endothelzellen interagiert [47].

Der direkte und selektive Thrombininhibitor Argatroban bietet, wie das bereits therapeutisch verwendete rhAPC, verschiedene Angriffspunkte während einer Sepsis. Einige Autoren betrachten gerade Substanzen, wie rhAPC, die die Mikrozirkulation und die Koagulopathie über verschiedene Angriffspunkte beeinflussen, als vorteilhaft in der Therapie der Sepsis [48]. Die Thrombininhibition führte in den hier durchgeführten Experimenten zu einer Reduzierung der Anzahl aktivierter Leukozyten, und könnte auch der Aktivierung von Endothelzellen und Thrombozyten entgegenwirken und damit die überschießende Immunreaktion, Gerinnungsstörungen und die intestinale Mikrozirkulation positiv beeinflussen.

Die Ergebnisse und Aussagen dieser Studie sind auf das CASP-Modell beschränkt. Dieses standardisierte, reproduzierbare Modell einer induzierten abdominalen Sepsis ist jedoch der humanen Sepsis sehr ähnlich [34, 49, 50].

Die Hauptnebenwirkung einer antikoagulativen Therapie mit Argatroban beziehungsweise rhAPC sind das Auftreten von Blutungskomplikationen. Argatroban besitzt aber kein größeres Blutungsrisiko als andere Antikoagulantien [25, 51]. In der Studien von Hursting *et al.* (2008) wurden 269 Patienten unter Argatrobantherapie bei HIT und 30 Tage im Anschluss an die Therapie beobachtet. Bei 20 Patienten (7,4%) traten schwerwiegende Blutungskomplikationen auf. Bei einem Patienten kam es zu einer intracerebralen Blutung. Das Blutungsrisiko unter Argatrobantherapie wurde nicht durch Alter, Geschlecht, Thrombozytenzahl, Dauer der Therapie oder renale und hepatische Komorbiditäten bestimmt, sondern statistisch signifikante Risikofaktoren waren das Vorhandensein HIT-assoziiertes Thrombosen, pulmonale Beeinträchtigungen und die maximale aktivierte partielle Thromboplastinzeit. Hauptblutungsquellen sind gastrointestinale und genitourethrale Blutungen, sowie seltener disseminierte intravasale Gerinnung (DIC) [52]. Es existiert für Argatroban kein spezifisches Antidot. Yee *et al.* (2006) berichtet aber über die Therapiemöglichkeit mit gerinnungsaktiven Plasma nach Überdosierung mit Argatroban [53]. Ferner besteht die Möglichkeit über den rekombinanten, aktivierten Faktor VIIa die gerinnungshemmenden Wirkung von Argatroban bei Blutung effektiv aufzuheben [54].

Schlussfolgernd besitzt Argatroban neben den gerinnungshemmenden auch antiinflammatorische Eigenschaften, die therapeutisch während einer Sepsis genutzt werden könnten. Argatroban kann dennoch nur ein Bestandteil einer komplexen Sepsistherapie entsprechend den Leitlinien sein. Der sofortige Beginn einer effektiven Antibiose, die Fokussanierung, eine adäquate Volumentherapie und wenn nötig der Einsatz von Vasopressoren sind mit einem verbesserten Outcome assoziiert [55].

5. Literaturliste

1. C. Brun-Buisson: The epidemiology of the systemic inflammatory response, *Intensive Care Medicine*, 26 Suppl 1, 2000: S. S64-74.
2. J. R. Le Gall, C. Alberti, C. Brun Buisson: Epidemiology of infection and sepsis in intensive care unit patients, *Bulletin de l'Academie nationale de medecine*, 188(7), 2004: S. 1115-1125.
3. O. Moerer, A. Schmid, M. Hofmann, A. Herklotz, K. Reinhart, K. Werdan, H. Schneider, H. Burchardi: Direct costs of severe sepsis in three german intensive care units based on retrospective electronic patient record analysis of resource use, *Intensive Care Medicine*, 28(10), 2002: S. 1440-1446.
4. V. Y. Dombrovskiy, A. A. Martin, J. Sunderram, H. L. Paz: Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the united states: A trend analysis from 1993 to 2003, *Critical Care Medicine*, 35(5), 2007: S. 1244-1250.
5. R. C. Bone, R. A. Balk, F. B. Cerra, R. P. Dellinger, A. M. Fein, W. A. Knaus, R. M. Schein, W. J. Sibbald: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM consensus conference committee. American college of chest physicians/society of critical care medicine, *Chest*, 101(6), 1992: S. 1644-1655.
6. M. M. Levy, M. P. Fink, J. C. Marshall, E. Abraham, D. Angus, D. Cook, J. Cohen, S. M. Opal, J. L. Vincent, G. Ramsay: 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS international sepsis definitions conference, *Critical Care Medicine*, 31(4), 2003: S. 1250-1256.
7. P. Knoebl: Blood coagulation disorders in septic patients, *Wiener medizinische Wochenschrift*, 160(5-6), 2010: S. 129-138.
8. H. Ait-Oufella, E. Maury, S. Lehoux, B. Guidet, G. Offenstadt: The endothelium: Physiological functions and role in microcirculatory failure during severe sepsis, *Intensive Care Medicine*, 36(8), 2010: S. 1286-1298.
9. M. Levi: The coagulant response in sepsis and inflammation, *Hämostaseologie*, 30, 2010: S. 10-12, 14-16.
10. A. R. Rezaie: The occupancy of endothelial protein C receptor by its ligand modulates the par-1 dependent signaling specificity of coagulation proteases, *IUBMB life*, 63(6), 2011: S. 390-396
11. H. Weiler: Regulation of inflammation by the protein C system, *Critical Care Medicine*, 38(2 Suppl), 2010: S. 18-25.
12. C. T. Esmon: Role of coagulation inhibitors in inflammation, *Thrombosis and Haemostasis*, 86(1), 2001: S. 51-56.
13. C. T. Esmon: Interactions between the innate immune and blood coagulation systems, *Trends in Immunology*, 25(10), 2004: S. 536-542.
14. J. W. Fenton, 2nd, F. A. Ofofu, D. V. Brezniak, H. I. Hassouna: Thrombin and antithrombotics, *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 24(2), 1998: S. 87-91.
15. B. Leithauser, M. Fassbender, M. Eickhoff, M. Elg, G. Eichner, F. R. Matthias: The direct thrombin inhibitor melagatran counteracts endotoxin-induced endothelial leukocyte adherence and microvascular leakage in the rat mesentery. Rationale for the treatment of inflammatory disorders beyond sepsis?, *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 36(4), 2007: S. 277-289.
16. T. Tanaka, T. Tsujinaka, J. Kambayashi, M. Higashiyama, M. Yokota, M. Sakon, T. Mori: The effect of heparin on multiple organ failure and disseminated intravascular coagulation in a sepsis model, *Thrombosis Research*, 60(4), 1990: S. 321-330.

17. M. Eriksson, S. Basu, A. Larsson, C. Mattsson, O. Eriksson, R. Kiiski, A. Nordgren: Effects of melagatran, a novel direct thrombin inhibitor, during experimental septic shock, *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 9(5), 2000: S. 1129-1137.
18. A. D. Cornet, E. G. Smit, A. Beishuizen, A. B. Groeneveld: The role of heparin and allied compounds in the treatment of sepsis, *Thrombosis and Haemostasis*, 98(3), 2007: S. 579-586.
19. A. Tsen, L. A. Kirschenbaum, C. Larow, R. Khan, S. Kurtz, S. Bansal, M. E. Astiz: The effect of anticoagulants and the role of thrombin on neutrophil-endothelial cell interactions in septic shock, *Shock*, 31(2), 2009: S. 120-124.
20. T. Nagatsuna, S. Nomura, E. Suehiro, H. Fujisawa, H. Koizumi, M. Suzuki: Systemic administration of argatroban reduces secondary brain damage in a rat model of intracerebral hemorrhage: Histopathological assessment, *Cerebrovascular Diseases*, 19(3), 2005: S. 192-200.
21. J. Hauptmann, J. Sturzebecher: Synthetic inhibitors of thrombin and factor Xa: From bench to bedside, *Thrombosis Research*, 93, 1999: S. 203-241.
22. S. Kleinschmidt, B. Stephan, G. Pindur, C. Bauer: Argatroban: Pharmacological properties and anaesthesiological aspects, *Anaesthetist*, 55(4), 2006: S. 443-450.
23. G. Escolar, J. Bozzo, S. Maragall: Argatroban: A direct thrombin inhibitor with reliable and predictable anticoagulant actions, *Drugs of Today*, 42(4), 2006: S. 223-236.
24. J. Hauptmann: Pharmacokinetics of an emerging new class of anticoagulant/antithrombotic drugs. A review of small-molecule thrombin inhibitors, *European journal of clinical pharmacology*, 57(11), 2002: S. 751-758.
25. K. Mckeage, G. L. Plosker: Argatroban, *Drugs*, 61(4), 2001: S. 515-522
26. J. Fareed, W. P. Jeske: Small-molecule direct antithrombins: Argatroban, *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 17(1), 2004: S. 127-138.
27. M. J. Winn, K. Jain, D. D. Ku: Argatroban and inhibition of the vasomotor actions of thrombin, *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 22(5), 1993: S. 754-760.
28. K. Nakamura, Y. Hatano, K. Mori: Thrombin-induced vasoconstriction in isolated cerebral arteries and the influence of a synthetic thrombin inhibitor, *Thrombosis Research*, 40, 1985: S. 715-720.
29. K. Reinhart, F. M. Brunkhorst, H. G. Bone, J. Bardutzky, C. E. Dempfle, H. Forst, P. Gastmeier, H. Gerlach, M. Grundling, S. John, W. Kern, G. Kreymann, W. Kruger, P. Kujath, G. Marggraf, J. Martin, K. Mayer, A. Meier-Hellmann, M. Oppert, C. Putensen, M. Quintel, M. Ragaller, R. Rossaint, H. Seifert, C. Spies, F. Stuber, N. Weiler, A. Weimann, K. Werdan, T. Welte: 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)), *German medical science: GMS e-journal*, 2010: 8:Doc14.
30. E. Abraham, P. F. Laterre, R. Garg, H. Levy, D. Talwar, B. L. Trzaskoma, B. Francois, J. S. Guy, M. Bruckmann, A. Rea-Neto, R. Rossaint, D. Perrotin, A. Sablotzki, N. Arkins, B. G. Utterback, W. L. Macias: Drotrecogin alfa (activated) for adults with severe sepsis and a low risk of death, *New England Journal of Medicine*, 353, 2005: S. 1332-1341.
31. J. L. Vincent, G. R. Bernard, R. Beale, C. Doig, C. Putensen, J. F. Dhainaut, A. Artigas, R. Fumagalli, W. Macias, T. Wright, K. Wong, D. P. Sundin, M. A. Turlo, J. Janes: Drotrecogin alfa (activated) treatment in severe sepsis from the global open-label trial enhance: Further evidence for survival and safety and implications for early treatment, *Critical Care Medicine*, 33, 2005: S. 2266-2277.

32. L. Altaweel, D. Sweeney, X. Cui, A. Barochia, C. Natanson, P. Q. Eichacker: Growing insights into the potential benefits and risks of activated protein C administration in sepsis: A review of preclinical and clinical studies, *Biologics: Targets & Therapy*, 3, 2009: S. 391-406.
33. C. Fuchs, E. Ladwig, J. Zhou, D. Pavlovic, K. Behrend, S. Whynot, O. Hung, M. Murphy, V. Cerny, C. Lehmann: Argatroban administration reduces leukocyte adhesion and improves capillary perfusion within the intestinal microcirculation in experimental sepsis, *Thrombosis and Haemostasis*, 104(5), 2010: S. 1022-1028.
34. N. Zantl, A. Uebe, B. Neumann, H. Wagner, J. R. Siewert, B. Holzmann, C. D. Heidecke, K. Pfeffer: Essential role of gamma interferon in survival of colon ascendens stent peritonitis, a novel murine model of abdominal sepsis, *Infection and Immunity*, 66(5), 1998: S. 2300-2309.
35. P. E. Spronk, D. F. Zandstra, C. Ince: Bench-to-bedside review: Sepsis is a disease of the microcirculation, *Critical Care*, 8(6), 2004: S. 462-468.
36. S. Miyahara, J. Kiryu, A. Tsujikawa, H. Katsuta, K. Nishijima, K. Miyamoto, K. Yamashiro, A. Nonaka, Y. Honda: Argatroban attenuates leukocyte- and platelet-endothelial cell interactions after transient retinal ischemia, *Stroke*, 34(8), 2003: S. 2043-2049.
37. D. Secor, F. Li, C. G. Ellis, M. D. Sharpe, P. L. Gross, J. X. Wilson, K. Tyml: Impaired microvascular perfusion in sepsis requires activated coagulation and p-selectin-mediated platelet adhesion in capillaries, *Intensive Care Medicine*, 36(11): S. 1928-1934.
38. M. X. Wan, A. A. Riaz, R. Schramm, Y. Wang, D. Vestweber, M. D. Menger, H. Thorlacius: Leukocyte rolling is exclusively mediated by p-selectin in colonic venules, *British Journal of Pharmacology*, 135(7), 2002: S. 1749-1756.
39. J. C. Marshall, N. V. Christou, J. L. Meakins: The gastrointestinal tract. The "undrained abscess" of multiple organ failure, *Annals of Surgery*, 218(2), 1993: S. 111-119.
40. M. P. Fink: Adequacy of gut oxygenation in endotoxemia and sepsis, *Critical Care Medicine*, 21(2), 1993: S. S4-8.
41. P. E. Marik: Total splanchnic resuscitation, SIRS, and MODS, *Critical Care Medicine*, 27(2), 1999: S. 257-258.
42. C. Beck, B. H. Pannen, O. Picker: Optimization of hepatosplanchnic oxygenation in septic shock, *Anästhesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie: AINS*, 43(1), 2008: S. 66-70.
43. G. Singer, K. Y. Stokes, D. N. Granger: Hepatic microcirculation in murine sepsis: Role of lymphocytes, *Pediatric Surgery International*, 24(1), 2008: S. 13-20.
44. M. Gawaz, T. Dickfeld, C. Bogner, S. Fateh-Moghadam, F. J. Neumann: Platelet function in septic multiple organ dysfunction syndrome, *Intensive Care Medicine*, 23(4), 1997: S. 379-385.
45. I. Cinel, R. P. Dellinger: Advances in pathogenesis and management of sepsis, *Current Opinion in Infectious Diseases*, 20(4), 2007: S. 345-352.
46. J. F. Dhainaut, A. F. Shorr, W. L. Macias, M. J. Kollef, M. Levi, K. Reinhart, D. R. Nelson: Dynamic evolution of coagulopathy in the first day of severe sepsis: Relationship with mortality and organ failure, *Critical Care Medicine*, 33, 2005: S. 341-348.
47. S. Ueshima, H. Fukao, K. Okada, O. Matsuo: The effect of argatroban on injured endothelial cells by thrombin, *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 11(7), 2000: S. 631-639.
48. C. Ince: The microcirculation is the motor of sepsis, *Critical Care*, 9 (4), 2005: S. S13-19.

49. S. Maier, T. Traeger, M. Entleutner, A. Westerholt, B. Kleist, N. Huser, B. Holzmann, A. Stier, K. Pfeffer, C. D. Heidecke: Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: Two distinct animal models for polymicrobial sepsis, *Shock*, 21(6), 2004: S. 505-511.
50. M. K. Lustig, V. H. Bac, D. Pavlovic, S. Maier, M. Grundling, O. Grisk, M. Wendt, C. D. Heidecke, C. Lehmann: Colon ascendens stent peritonitis--a model of sepsis adopted to the rat: Physiological, microcirculatory and laboratory changes, *Shock*, 28(1), 2007: S. 59-64.
51. A. Khan, R. Agarwal, A. N. Aggarwal, D. Gupta: Prevalence of serious bleeding events and intracranial hemorrhage in patients receiving activated protein C: A systematic review and meta-analysis, *Respiratory Care*, 55(7), 2010: S. 901-910.
52. M. J. Hursting, C. N. Verme-Giboney: Risk factors for major bleeding in patients with heparin-induced thrombocytopenia treated with argatroban: A retrospective study, *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 52(6), 2008: S. 561-566.
53. A. J. Yee, D. J. Kuter: Successful recovery after an overdose of argatroban, *The Annals of Pharmacotherapy*, 40, 2006: S. 336-339.
54. G. Young, K. E. Yonekawa, P. A. Nakagawa, R. C. Blain, A. E. Lovejoy, D. J. Nugent: Recombinant activated factor VII effectively reverses the anticoagulant effects of heparin, enoxaparin, fondaparinux, argatroban, and bivalirudin ex vivo as measured using thromboelastography, *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 18, 2007: S. 547-553.
55. Y. E. Claessens, J. F. Dhainaut: Diagnosis and treatment of severe sepsis, *Critical Care*, 11 (5), 2007: S. S2.

6. Zusammenfassung

Die erfolgreiche Behandlung der Sepsis ist bis heute eine Herausforderung in der Intensivmedizin. Antikoagulantien stellen eine neue Therapieoption dar, denn das Gerinnungs- und Immunsystem sind eng miteinander verknüpft sind. Thrombin scheint eines der wichtigsten verknüpfenden Enzyme zu sein, da es sowohl an der Gerinnungskaskade und auch an der Leukozytenrekrutierung und der darauffolgenden Störung der Mikrozirkulation beteiligt ist. In dieser Arbeit wurden die Effekte des direkten Thrombininhibitor Argatroban auf die intestinale Kapillarperfusion und die Endothel-Leukozyten-Interaktion von Ratten während experimentell induzierter Sepsis untersucht.

40 männliche Lewis Ratten wurden in 4 Gruppen eingeteilt (n=10): Schein-Operation (SHAM), experimentelle Sepsis (colon ascendens stent peritonitis – CASP), CASP-Gruppe mit Argatroban-Gabe (CASP+ARG) und SHAM-Gruppe mit Argatroban-Gabe (SHAM+ARG). 16 Stunden nach Einsetzen des Stents oder der SHAM-Operation erhielten die Tiere der CASP+ARG und SHAM+ARG Gruppen 2 mg/kg Argatroban (ARG) intravenös. Die Tiere der anderen Gruppen erhielten einen volumenäquivalenten Bolus an isotonischer 0,9 % Natriumchloridlösung. Anschließend erfolgte nach 60 Minuten die Intravitalmikroskopie.

Die Gabe von Argatroban verbesserte statistisch signifikant im Vergleich zu unbehandelten Tieren bei CASP-Tieren die Kapillarperfusion, besonders der Mukosa und verringerte statistisch signifikant in Venolen mit einem Durchmesser von 50-80 μm die Anzahl von aktivierten Leukozyten in der intestinalen Submukosa.

Die funktionelle Kapillardichte, als Marker der kapillaren Perfusion, wurde durch Argatroban in septischen Ratten verbessert und gleichzeitig wurden durch die verminderte Leukozytenadhärenz am Endothel antiinflammatorische Eigenschaften nachgewiesen. Die Therapie der Sepsis mit Argatroban könnte durch die verbesserte intestinale Kapillarperfusion vorteilhaft für das Outcome sein.

7. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Datum

Christian Fuchs

8. Danksagung

Ich danke Prof. Dr. med. Ch. Lehmann für seine Betreuung, Anregungen und Kritiken zur vorliegenden Dissertation, und die Möglichkeit der Posterpräsentationen in Weimar und San Diego. Priv.-Doz. Dr. med. habil. D. Pavlovic, Frau Sabine Will und besonders Frau Elena Ladwig danke ich für die Begleitung im Labor und Hilfe bei der Durchführung und Auswertung der Experimente.

9. Publikation

Argatroban administration reduces leukocyte adhesion and improves capillary perfusion within the intestinal microcirculation in experimental sepsis

Christian Fuchs¹; Elena Ladwig¹; Juan Zhou²; Dragan Pavlovic¹; Kristina Behrend¹; Sara Whynot²; Orlando Hung²; Michael Murphy²; Vladimir Cerny³; Christian Lehmann^{1,2}

¹Department of Anesthesia and Intensive Care Medicine, Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald, Germany; ²Department of Anesthesia, Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia, Canada; ³Department of Anesthesiology and Intensive Care Medicine, University Hospital Hradec Kralove, Charles University in Prague, Czech Republic

Summary

Co-activation of pro-coagulatory pathways in sepsis may result in disseminated intravascular coagulation and contributes to microvascular dysfunction. We investigated the effects of the direct thrombin inhibitor, argatroban (ARG), on the sepsis-induced impairment of the intestinal microcirculation (capillary perfusion, leukocyte adhesion) and the vascular contractility in rats. Forty male Lewis rats were randomly assigned to one of four groups: sham surgery (SHAM), experimental sepsis (colon ascendens stent peritonitis – CASP), CASP+ARG, and SHAM+ARG. At 16 hours after colon stent insertion (or sham surgery), 2 mg/kg argatroban or buffer were given intravenously, and 1 hour thereafter, intravital microscopy was performed. In addition, experiments to study the impact of ARG on vascular contractility were con-

ducted *in vitro*. ARG administration in CASP rats significantly increased functional capillary density in mucosal (+128%) and muscular layers (longitudinal: +42%; circular: +64%) and decreased the number of firmly adhering leukocytes in the intestinal submucosa compared to untreated animals. *In vitro* findings indicated a vasodilating effect of ARG. ARG administration during experimental sepsis improved intestinal microcirculation by preserving functional capillary density, an indicator of microvascular perfusion, and by reducing leukocyte adherence to the endothelium in submucosal venules.

Keywords

Inflammation, argatroban, sepsis, leukocytes, microcirculation

Correspondence to:

Christian Lehmann, MD PhD FRCPC
Dalhousie University Halifax, Department of Anesthesia
5850 College Street, 6H Tupper Building, Halifax, NS, Canada, B3H 1X5
Tel.: +1 902 494 1287, Fax: +1 902 494 1388
E-mail: chlehmann@dal.ca

Financial support:

The study was supported by an unrestricted grant from Mitsubishi Pharma Deutschland GmbH.

Received: April 20, 2010

Accepted after major revision: July 19, 2010

Prepublished online: August 30, 2010

doi:10.1160/TH10-04-0241

Thromb Haemost 2010; 104: 1022–1028

Introduction

Sepsis and the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) have a high prevalence in surgical intensive care unit (ICU) patients. Depending on the severity of sepsis, the crude 28-day mortality is as high as 10% in SIRS, 20% in sepsis, 20–40% in severe sepsis and 40–60% in septic shock. Even the patients who survived sepsis have an estimated 50% reduction of their life expectancy over the following five years (1). Current treatments of SIRS and sepsis include early initiation of adequate antimicrobial and surgical therapy and supportive intensive care. Adjunctive therapies with anti-inflammatory substances, like activated protein C (APC), have yielded in conflicting results (2). APC treatment is still recommended for the therapy of severe sepsis and septic shock (3, 4). Because of the central role of the coagulation cascade in sepsis, other anticoagulants were studied in clinical and experimental sepsis, including heparin, antithrombin (ATIII), tissue factor pathway inhibitor (TFPI), and hirudin (5–7).

Microorganisms and their toxins activate leukocytes and endothelial cells directly and indirectly (8–10). Expression of tissue factor (TF), down-regulation of thrombomodulin (TM), and release of plasminogen activation inhibitor-1 (PAI-1) induce a pro-coagulatory phenotype of endothelial cells with increased thrombin generation, reduced protein C activation, and inhibition of fibrinolysis (11). Activated endothelial cells express the adhesion molecules P-selectin and E-selectin on their surface and release platelet activating factor. This enhances the cell activating cycle by further activation of neutrophils, release of proteases and oxidants, causing further endothelial damage, downregulation of TM and endothelial protein C receptor (EPCR) by inhibiting gene transcription, shedding of thrombomodulin and thereby reduce formation of APC.

This imbalance of the coagulation system is a typical complication in patients with sepsis which can result in disseminated intravascular coagulation (DIC), characterised by the formation of microthrombi and haemorrhage responsible for microvascular

organ failure (12). Inhibition of thrombin is highly effective for preventing microthrombi. However, inhibition of thrombin as a therapeutic concept in sepsis is potentially problematic as thrombin is also the major enzyme for generation of APC after binding to TM. Thus inhibition of thrombin might result not only in reduced fibrin generation, but also in reduced APC generation in the normal vasculature. Since APC pathway is already impaired in sepsis due to TM downregulation, the anticoagulatory effect of thrombin might be less important in sepsis.

We evaluated the hypothesis that thrombin inhibition by argatroban (ARG) improves the microcirculation (capillary perfusion, leukocyte activation) during experimentally induced sepsis in rats using intestinal intravital microscopy (IVM). In addition, the effects of ARG on vascular contractility *in vitro* were investigated.

Material and methods

The study was performed in accordance with internationally recognised guidelines, the local Instructions for Animal Care of the Greifswald University and the German Law on the Protection of Animals (approved by the Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern, LALLF M-V/TSD/7221.3-1.2-029/06). The animals were kept under 12-hour (h) light/dark rhythmic conditions. Standard diet and water were available *ad libitum*.

A total of 40 male Lewis rats weighing 235–350 g were randomly assigned to one of four groups (n=10 each): sham surgery only (SHAM), experimental sepsis by colon ascendens stent peritonitis (CASP), CASP with argatroban (ARG; Mitsubishi Pharma Europe Ltd., London, UK) treatment (CASP+ARG) and SHAM with ARG treatment (SHAM+ARG).

CASP and SHAM surgery

The CASP procedure has been described in detail previously (13). Briefly, the rats were anaesthetised with pentobarbital (60 mg/kg i.p.) and colon ascendens was retracted via median laparotomy under sterile conditions. A 16 gauge venous indwelling cannula was inserted 2 cm distal to the ileocecal valve at the antimesenteric site of the colon ascendens, secured in place with sutures and cut to a length of approximately 5 mm. Before closure of the abdominal wall, 1 ml of sterile saline solution was flushed into the peritoneal cavity. The continuous faeces outflow from the intestinal lumen into the peritoneal cavity leads to polymicrobial sepsis. For the SHAM surgery the stent was not perforated into the intestinal lumen, but sutured to the abdominal wall only. Animals were returned back to their cages for recovering.

After recovering from anesthesia, no differences in behaviour between the CASP and the sham animals were detected for the first 12 h. After 12 h, animals from the CASP groups started showing

signs of sickness (lethargic behavior, ruffled fur). No mortality was observed in the observation period. In a previous study using the CASP experimental model we found that the first animals died after 18 h. Mortality was 71% within 48 h (13).

Microbiological examination of the model (16 h following CASP surgery) revealed predominantly different anaerobic bacteria (e.g. *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp.) as well as *Escherichia coli*, *Proteus* spp. and enterococci in the abdominal cavity whereas in sham animals no bacteria were found (14).

Animal preparation for intravital microscopy

Rats were anaesthetised again with pentobarbital i.p. (60 mg/kg for the SHAM and SHAM+ARG group and 45 mg/kg for the CASP and CASP+ARG group) 16 h after CASP- or sham-surgery. Pentobarbital was repeatedly bolussed every 30 minutes (min) (20 mg/kg i.v.).

To prevent hypothermia, the animals were placed on a heating pad. Intravascular catheters were inserted into the right external jugular vein for the administration of drugs and the continuous infusion of isotonic saline (5 ml/kg/h) as volume replacement therapy, and into the right common carotid artery for continuous monitoring of blood pressure and heart rate by a monitor (Hewlett Packard monitor, Model 66S, Saronno, Italy). Animals were tracheotomised with a 16 gauge cannula (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) to support spontaneous breathing, facilitate suctioning of secretions and provide access for artificial respiration in case of apnea (Ventilator Model 687; Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA).

After a 15-min equilibration period following preparation, the animals of the CASP+ARG and SHAM+ARG groups received a bolus of ARG (2 mg/kg i.v., stock solution: 1 mg/ml ARG dissolved in normal saline immediately before use). The ARG dose is within the upper range of the clinical dosage used to achieve therapeutic anticoagulation and was adjusted according a comparable study in rats by Miyahara et al. showing an effective prothrombin time and activated partial thromboplastin time prolongation (15). Animals of the CASP and SHAM groups received an equivalent bolus of normal saline. Intravital microscopy was performed 60 min later.

Intravital microscopy

For the examination of the intestinal microcirculation, the animals were placed on a custom made temperature-controlled microscopy bench to maintain body temperature (16).

The median laparotomy was re-opened. The terminal ileum was exposed and placed on a height-adjustable platform, providing constant submersion in 37°C warmed saline solution. The following technical devices were used for the intravital fluorescence video microscopy: epifluorescence microscope, Axiotech Vario (Carl Zeiss, Jena, Germany); light source, HBO 50 (Carl Zeiss); oculars, 10x (Carl Zeiss); lens, 20x/0.5 Achromplan (Carl Zeiss); filter

type #20 (Carl Zeiss) for the rhodamine examination; filter type #10 (Carl Zeiss) for fluorescein isothiocyanate-albumin (Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany) examinations; black and white charged-coupled device video camera (BC-12; AVT-Horn, Aalen, Germany); video tape recorder (Panasonic NV-SV120EG-S; Matsushita Audio Video, Peine, Germany).

Rhodamine 6G (1.5 ml/kg i.v.) was used to observe the leucocytes in the submucosa of the terminal ileum. Five video sequences of submucosal collecting venules (diameter: 50–80 μ m) were recorded for 30 seconds (s) each. For the examination of the functional capillary density (FCD) and dysfunctional capillary density (dFCD) 1 ml/kg bovine fluorescein isothiocyanate (FITC) bounded to albumin was given intravenously and five video sequences of 30 s each were recorded in the longitudinal and the circular musculature. For observation of the mucosal microcirculation (FCD; dFCD), the antimesenteric site of the intestinal lumen was opened with a microcautery knife (Model-100; Geiger, Monarch Beach, CA, USA) (17, 18). Isotonic saline was used to rinse out the faeces of the opened lumen and again five video sequences were recorded.

For analysis of microcirculatory parameters, the video sequences were analysed off-line on a video monitor by an observer blinded to the group allocation. The following parameters were analysed: flow of rolling leukocytes [the number of leukocytes that passed during an observation period of 30 s in a rolling motion through a selected vascular diameter; number of cells/min], adhering leukocytes [the number of leukocytes that during an observation period stayed immobile for at least 30 s to an oblique, cylindrical endothelial surface; cells/mm²], FCD [the length of capillaries with observable erythrocyte perfusion in relation to an predetermined rectangular field; methodology according to Schmid-Schoenbein et al. (19)] and dFCD [the length of capillaries with fluorescein isothiocyanate-albumin marked plasma or cells without continuous flow in relation to an predetermined rectangular field].

In vitro myography

The method was described previously (20). Briefly, for the experiment rat thoracic aortas were isolated and cleaned from surrounding tissue. Aortal rings (2–3 mm long) were mounted in the customary manner using the ring system of the apparatus connected to the isometric force transducer. After a period of stabilisation (90 min), the vascular muscle was stretched to its optimal length. The Krebs solution (at 37°C, pH 7.4, gassed with 95% O₂/5% CO₂) was exchanged every 20 min.

Contractility protocols

The effects of ARG on the passive tonus, at resting tension, or active, following pre-contraction elicited with phenylephrine (PE, 5x10⁻⁸M) or potassium chloride (KCl; 20 or 40 mM) isometric tension of aortal rings were examined. In all protocols cumulative dose response were performed. In addition, the effects of preincubation (30 min or 20 h) with ARG on cumulative dose-response to PE were performed.

Statistics

All data were analysed with Sigma Stat/Plot (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA). Normal distribution of data was tested by Kolmogorov-Smirnov test. Differences within groups were analysed by one-way ANOVA or ANOVA on ranks followed by a corrective t-test according to Student-Newman-Keuls. Haemodynamics were analysed by two-way-ANOVA with post-hoc testing according to Student-Newman-Keuls. For *in vitro* experiments, the data were fit to non-linear regression (Hill-Langmuir equation was applied) and calculated as mean of the negative decade logarithm from EC₅₀ using two-way ANOVA that was followed by Bonferroni post-hoc test. All data are presented as mean \pm standard error (mean \pm SE). Probability values (p) of less than 0.05 were considered significant.

	Time	SHAM	CASP	CASP+ARG	SHAM+ARG
MAP [mmHg]	-15 min	129 (\pm 3.6) #	103 (\pm 5.4)	118 (\pm 2.3) #	135 (\pm 8.2) #
	0 min	126 (\pm 4.2) #	98 (\pm 4.3)	105 (\pm 2.9)	119 (\pm 2.5) #
	15 min	115 (\pm 7.2) #	92 (\pm 5.9)	99 (\pm 5.6)	120 (\pm 5.9) #
	45 min	114 (\pm 6.3) #	95 (\pm 4.9)	98 (\pm 3.0)	115 (\pm 3.5) #
	75 min	145 (\pm 6.9) #	113 (\pm 5.5)	134 (\pm 2.6)	153 (\pm 3.4) #
	105 min	140 (\pm 4.7) #	121 (\pm 4.1)	123 (\pm 3.7)	143 (\pm 2.3) #
HR [bpm]	-15 min	487 (\pm 13.7)	481 (\pm 18.7)	463 (\pm 12.2)	479 (\pm 14.4)
	0 min	496 (\pm 14.7)	484 (\pm 15.9)	447 (\pm 9.3)	477 (\pm 7.9)
	15 min	477 (\pm 12.5)	479 (\pm 15.2)	479 (\pm 10.9)	448 (\pm 13.9)
	45 min	473 (\pm 11.2)	499 (\pm 17.8)	451 (\pm 15.9)	469 (\pm 11.4)
	75 min	488 (\pm 12.5)	516 (\pm 11.5)	500 (\pm 21.5)	479 (\pm 16.6)
	105 min	536 (\pm 8.9)	521 (\pm 16.5)	513 (\pm 16.6)	501 (\pm 9.8)

Table 1: Haemodynamics. Mean \pm SE; 0 min = time of argatroban administration. #p<0.05 vs. CASP; \$p<0.05 vs. CASP+ARG.

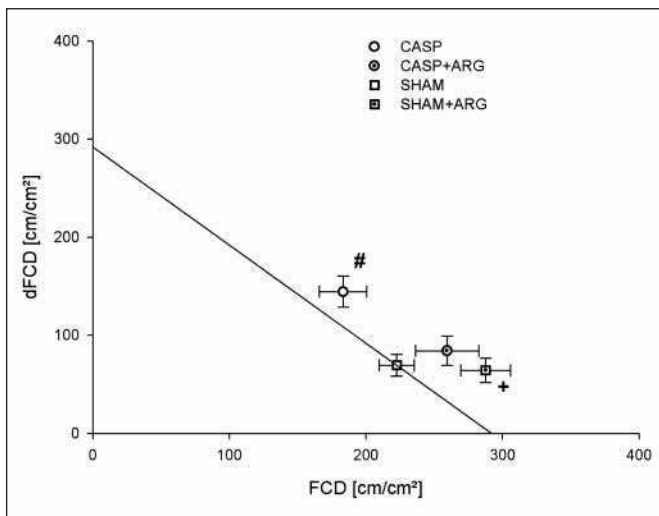


Figure 1: Functional vs. dysfunctional capillaries in the longitudinal muscular layer of the terminal ileum. # $p < 0.05$ vs. SHAM, CASP+ARG and SHAM+ARG; + $p < 0.05$ vs. SHAM; line: expected relation of functional [FCD] and dysfunctional capillaries [dFCD] given in a constant number of capillaries (based on control animals); mean \pm SE.

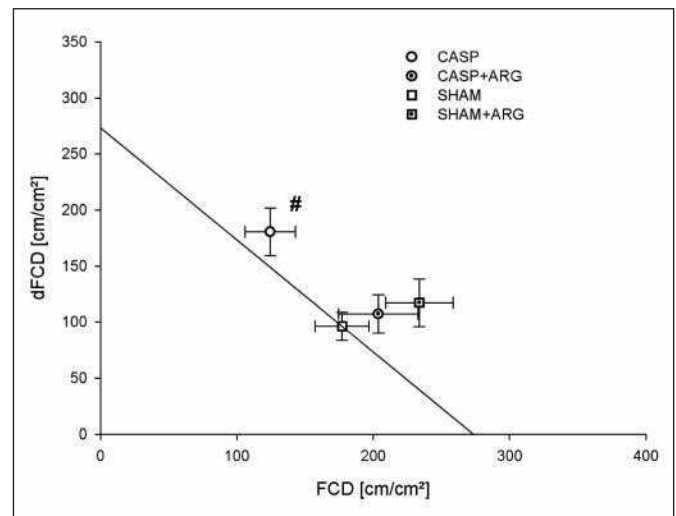


Figure 2: Functional vs. dysfunctional capillaries in the circular muscular layer of the terminal ileum. # $p < 0.05$ vs. SHAM, CASP+ARG and SHAM+ARG; line: expected relation of functional [FCD] and dysfunctional capillaries [dFCD] given in a constant number of capillaries (based on control animals); mean \pm SE.

Results

Macrocirculation

At baseline (0 min) mean arterial pressures in the SHAM and the SHAM+ARG group were significantly higher than in the CASP and the CASP+ARG groups ($p < 0.05$; ► Table 1). MAP increased slightly in all groups during the observation period. ARG administration had no impact on the changes in mean arterial pressure. The difference between the sham and the CASP groups remained significant. However, during the microcirculatory study periods (60–105 min), the average MAP of all animals was within the physiological range. The heart rate was stable in all groups (Table 1).

Functional / dysfunctional capillary density

Combined FCD and dFCD graphs are shown in ► Figures 1–3. Assuming a constant relation between functional and dysfunctional capillaries in healthy animals we calculated the sum of functional and dysfunctional capillaries in the SHAM group. A line was drawn through the data point of the SHAM animals connecting the FCD and dFCD axis at the sum values of capillaries. This presentation clearly shows changes in the number of capillaries. Data points on the left (below) of the line indicate that capillaries were closed, values on the right (above) of the line indicate that additional capillaries were opened.

Untreated CASP animals showed a significant impaired intestinal microperfusion with a decreased FCD and an increased dFCD in the muscular layers ($p < 0.05$; Fig. 1 and 2) and the mucosa

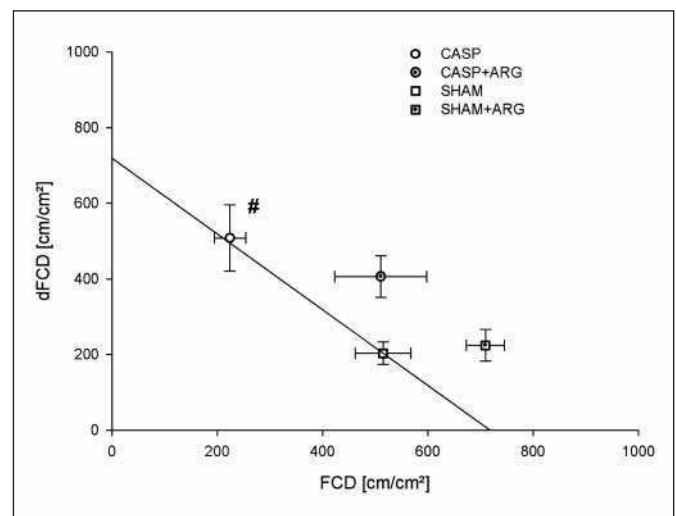


Figure 3: Functional vs. dysfunctional capillaries in the mucosa of the terminal ileum. # $p < 0.05$ vs. SHAM, CASP+ARG and SHAM+ARG; line: expected relation of functional [FCD] and dysfunctional capillaries [dFCD] given in a constant number of capillaries (based on control animals); mean \pm SE.

($p < 0.05$; Fig. 3). Interestingly, the data points of the untreated CASP animals were shifted to the right site of the connecting line in all intestinal layers suggesting opening of additional capillaries.

ARG treatment reversed the CASP-induced changes in the FCD and dFCD sepsis almost completely (no significant difference to SHAM animals detectable). FCD was increased in the longitudinal muscular layer by 42% and in the circular muscular layer by 64%. The mucosal microcirculation was affected mostly (+128%). However, the data points were still on the right site of the connecting line.

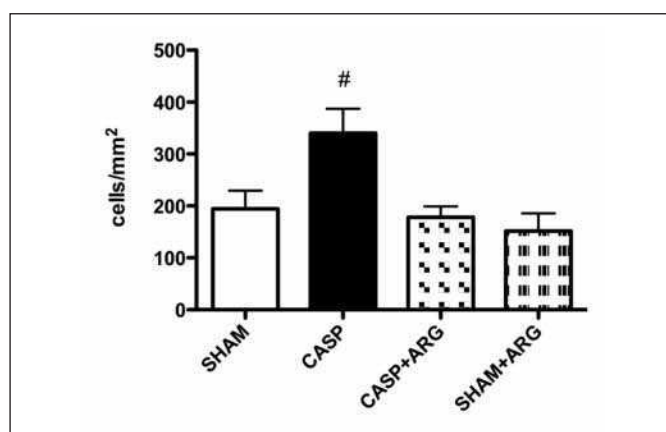


Figure 4: Leukocyte adhesion in submucosal collecting venules of the terminal ileum. [#] $p < .05$ vs. SHAM; mean \pm SE.

The right shift of the data points was also observed in all intestinal layers of ARG-treated SHAM animals. The reason for the right shift was an increase of the FCD values in comparison to SHAM animals whereas the dFCD in SHAM+ARG animals was unchanged.

Leukocyte-endothelial interaction

The CASP procedure significantly increased the number of leukocytes adhering to the endothelium in submucosal collecting venules (+74%, $p < 0.05$; ► Fig. 4). ARG administration in CASP animals completely abolished the increase in leukocyte activation. ARG treatment of SHAM animals further decreased the number of adhering leukocytes compared to untreated SHAM animals. The numbers of leukocytes that interacted temporarily with the endothelium and rolled along the endothelial surface were neither affected by endotoxaemia nor the administration of argatroban (data not shown).

In vitro myography

In rat aortal rings, the sensitivity to PE was diminished 30 min after preincubation with ARG 10^{-4} M (► Fig. 5), i.e. the dose-response curves of PE were displaced to the right (EC_{50} , ARG vs. controls, 7.17 ± 0.08 vs. 7.48 ± 0.06 , $p < 0.05$). However, ARG did not affect maximal tension of the aortic ring. In contrast, 20 hours incubation with ARG increased the sensitivity to PE (► Fig. 6) and shifted the dose-response curves to the left (EC_{50} , argatroban vs. controls, 7.37 ± 0.05 vs. 7.07 ± 0.05 , $p < 0.05$). The EC_{50} concentrations correspond to 10–70 nmol PE.

ARG had neither contracting nor relaxing effect in the preparation under basic tension or in the precontracted preparations with

PE (data not shown). In preparations, precontracted with KCl, ARG in higher concentrations induced relaxation of the aortic ring (precontracted with 20 mM KCl) to 31.76% ($\pm 10.19\%$) while it had little effect in the preparations precontracted with 40 mM KCl ($14.10\% \pm 3.67\%$).

Discussion

In this model of experimental sepsis, ARG administration improved microvascular perfusion and reduced leukocyte activation within the intestinal microcirculation. *In vitro*, a direct effect on vascular reactivity (vasodilation) could be shown.

The microcirculatory perfusion during sepsis is compromised by several mechanisms, e.g. an increased number of activated neutrophils which adhere to the endothelium, an activation of the coagulation cascade and the subsequent formation of microthrombi, maldistribution of blood flow and the opening of arterio-venous shunt (21).

Besides prevention of microthrombi formation, improvement of the septic intestinal microcirculation by ARG may be due to the reduction of intestinal microvascular leukocyte adhesion. As ARG is a direct thrombin inhibitor, these effects are likely caused by inhibition of thrombin. Thrombin is a potent activator of endothelial cells and platelets leading to expression of P-selectin. This promotes neutrophil and platelets interaction resulting in endothelial injury and subsequent platelet-neutrophil aggregation that may impair the microvascular blood flow (22, 23). As shown in the present study, the number of adhering leukocytes in collecting submucosal venules was significantly reduced after the administration of argatroban. Similar results were reported by Miyahara et al. after induction of transient retinal ischemia. They confirmed that ARG administration suppressed the ICAM-1 and P-selectin mediated interactions of leukocytes, platelets, and endothelial cells (15). In addition, in our experiments ARG administration resulted in an opening of additional capillaries, as the total number of capillaries significantly increased in ARG-treated animals.

The *in vitro* experiments showed that ARG had some inhibitory effects on the PE elicited cumulative dose response curves following short incubation while showing tendency to increase sensitivity to PE after 20 h incubation. This somehow complex effect could be linked to concentration dependent effects on potassium channel activity that could be demonstrated in the experiments in KCl precontracted preparations where presumably ARG had some relaxing effects following 20 mM precontraction while it did not affect tension of 40 mM KCl precontracted preparations, indicating some involvement of K^+ channel activation. The effects of ARG on aortal smooth muscle *in vitro* that we found were very small for yet very high ARG concentrations. In clinical use ARG blood concentrations reach 30 g/ml what is about 50 M (24). In our *in vitro* experiments we used 100 to 1,000 times higher ARG concentrations and even then obtained only minor effect. Therefore the measured direct effects of ARG on rat aorta in our study, although statistically significant, are probably of minor biological relevance.

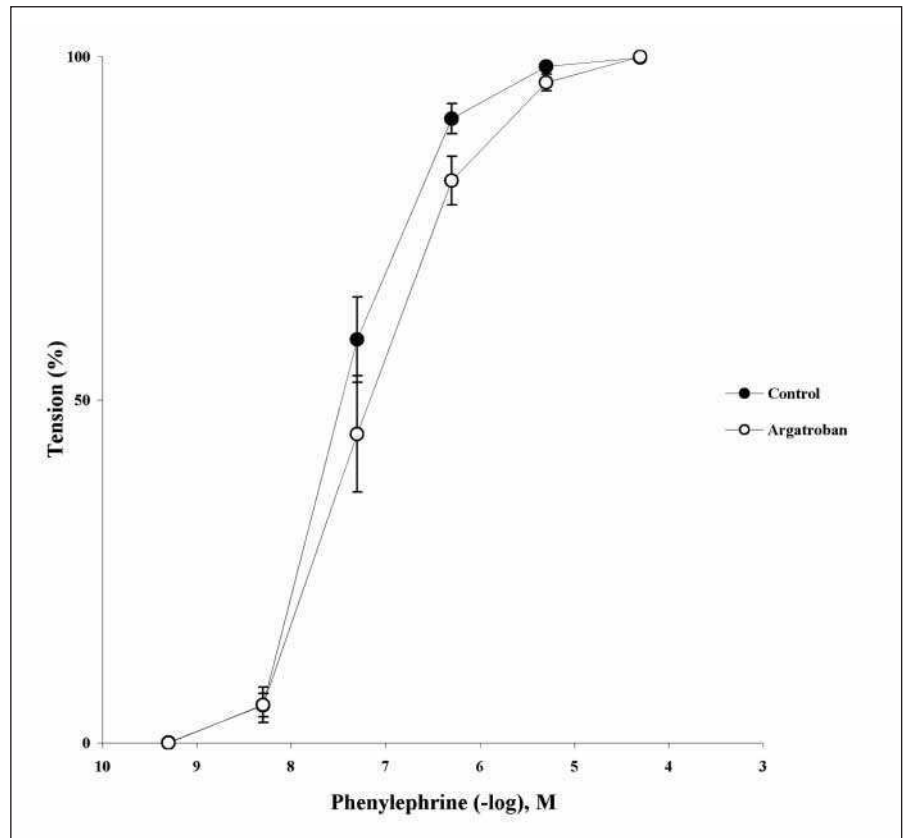


Figure 5: Vasoactive effects. Dose-response curve of phenylephrine following 30 minutes pre-incubation of rat aorta *in vitro* with argatroban 10^{-4} M (control vs. argatroban, $p < 0.05$; means \pm SE).

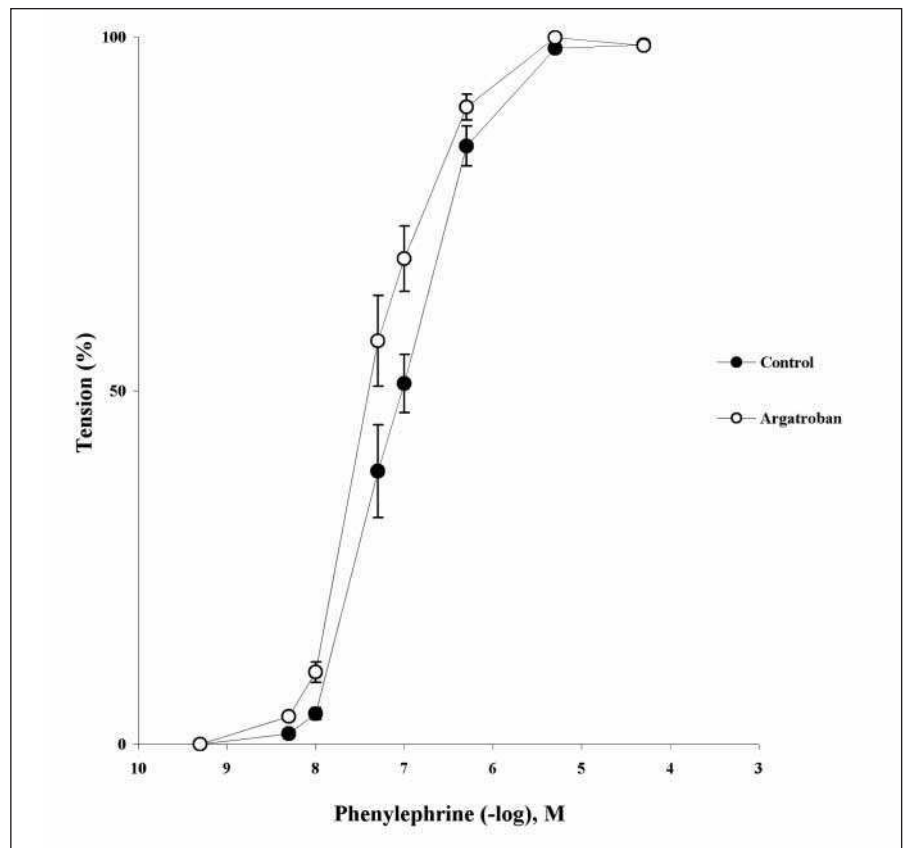


Figure 6: Vasoactive effects. Dose-response curve of phenylephrine following 20 hours pre-incubation of rat aorta *in vitro* with argatroban 2×10^{-3} M (control vs. argatroban, $p < 0.05$; means \pm SE).

What is known about this topic?

- Sepsis represents a systemic inflammatory response to an infection with significant impairment of the microcirculation and is associated with co-activation of pro-coagulatory pathways.
- Expression of tissue factor, down-regulation of thrombomodulin, and release of plasminogen activation inhibitor-1 induce a pro-coagulatory phenotype of endothelial cells with increased thrombin generation, reduced protein C activation, and inhibition of fibrinolysis.
- Inhibition of thrombin generation is effective for preventing sepsis-induced microthrombi formation.

What does this paper add?

- Administration of the direct thrombin inhibitor, argatroban, during experimental sepsis reduced leukocyte adherence to the endothelium in submucosal intestinal venules, an indicator of leukocyte activation.
- Argatroban administration in sepsis improved intestinal microcirculation by protecting functional capillary density.

Conclusion

This animal study evaluated the effect of ARG, a direct thrombin inhibitor, upon the intestinal microcirculation during experimental sepsis. ARG treatment improved intestinal functional capillary density and reduced leukocyte adherence during sepsis. The anti-coagulant therapy during sepsis with ARG may simultaneously influence the overwhelming inflammatory response, coagulation abnormalities and the intestinal microperfusion.

Acknowledgements

We thank Annette Wegner and Sabine Will for technical support. We also thank Andreas Greinacher for his support.

References

1. Brun-Buisson C. The epidemiology of the systemic inflammatory response. *Intensive Care Med* 2000; 26 (Suppl 1): S64–74.
2. Toltl LJ, Swystun LL, Pepler L, et al. Protective effects of activated protein C in sepsis. *Thromb Haemost* 2008; 100: 582–592.
3. Claessens YE, Dhainaut JF. Diagnosis and treatment of severe sepsis. *Crit Care* 2007; 11 (Suppl 5): S2.
4. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Intensive Care Med* 2008; 34: 17–60.
5. Tsen A, Kirschenbaum LA, LaRow C, et al. The effect of anticoagulants and the role of thrombin on neutrophil-endothelial cell interactions in septic shock. *Shock* 2009; 31: 120–124.
6. Pulletz S, Lehmann C, Volk T, et al. Influence of heparin and hirudin on endothelial binding of antithrombin in experimental thrombinemia. *Crit Care Med* 2000; 28: 2881–2886.
7. Hoffmann JN, Vollmar B, Laschke MW, et al. Microhemodynamic and cellular mechanisms of activated protein C action during endotoxemia. *Crit Care Med* 2004; 32: 1011–1017.
8. Fenton JW, 2nd, Ofofu FA, Brezniak DV, et al. Thrombin and antithrombotics. *Semin Thromb Hemost* 1998; 24: 87–91.
9. Esmon CT. Interactions between the innate immune and blood coagulation systems. *Trends Immunol* 2004; 25: 536–542.
10. Esmon CT. Role of coagulation inhibitors in inflammation. *Thromb Haemost* 2001; 86: 51–56.
11. Levi M, de Jonge E, van der Poll T. Sepsis and disseminated intravascular coagulation. *J Thromb Thrombolysis* 2003; 16: 43–47.
12. Dimpfle CE. Coagulopathy of sepsis. *Thromb Haemost* 2004; 91: 213–224.
13. Lustig MK, Bac VH, Pavlovic D, et al. Colon ascendens stent peritonitis—a model of sepsis adopted to the rat: physiological, microcirculatory and laboratory changes. *Shock* 2007; 28: 59–64.
14. Lehmann C, Bac VH, Pavlovic D, et al. Metronidazole improves intestinal microcirculation in septic rats independently of bacterial burden. *Clin Hemorheol Microcirc* 2006; 34: 427–438.
15. Miyahara S, Kiryu J, Tsujikawa A, et al. Argatroban attenuates leukocyte- and platelet-endothelial cell interactions after transient retinal ischemia. *Stroke* 2003; 34: 2043–2049.
16. Pavlovic D, Frieling H, Lauer KS, et al. Thermostatic tissue platform for intravital microscopy: 'the hanging drop' model. *J Microsc* 2006; 224: 203–210.
17. Bohlen HG, Gore RW. Preparation of rat intestinal muscle and mucosa for quantitative microcirculatory studies. *Microvasc Res* 1976; 11: 103–110.
18. Metry JM, Neff M, Knoblauch M. The microcirculatory system of the intestinal mucosa of the rat. An injection cast and scanning electron microscopy study. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1982; 71: 159–162.
19. Schmid-Schoenbein GW, Zweifach BW, Kovalcheck S. The application of stereological principles to morphometry of the microcirculation in different tissues. *Microvasc Res* 1977; 14: 303–317.
20. Frieling H, Grundling M, Lauer KS, et al. Intraperitoneal instillation of polihexanide produces hypotension and vasodilation: in vivo and in vitro study in rats. *Int J Colorectal Dis* 2006; 21: 373–380.
21. Spronk PE, Zandstra DF, Ince C. Bench-to bedside review: sepsis is a disease of the microcirculation. *Crit Care* 2004; 8: 462–468.
22. Kirschenbaum LA, Adler D, Astiz ME, et al. Mechanisms of platelet-neutrophil interactions and effects on cell filtration in septic shock. *Shock* 2002; 17: 508–512.
23. Opal SM, Esmon CT. Bench-to bedside review: functional relationships between coagulation and the innate immune response and their respective roles in the pathogenesis of sepsis. *Crit Care* 2003; 7: 23–38.
24. Warkentin TE, Greinacher A, Craven S, et al. Differences in the clinically effective molar concentrations of four direct thrombin inhibitors explain their variable prothrombin time prolongation. *Thromb Haemost* 2005; 94: 958–964.