

Therapeutische Wirksamkeit von Lepirudin am Maus-Modell der
Bleomycininduzierten Lungenfibrose

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Philipp Firas Jaber
aus Offenbach am Main

Gießen 2015

Therapeutische Wirksamkeit von Lepirudin am Maus-Modell der
Bleomycininduzierten Lungenfibrose

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Philipp Firas Jaber
aus Offenbach am Main

Gießen 2015

Aus dem Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik und Poliklinik II
Direktor: Prof. Dr. med. W. Seeger
Klinikum der Justus-Liebig-Universität in Gießen

Gutachter: Prof. Dr. A. Günther

Gutachter: Prof. Dr. T. Linn

Tag der Disputation: 16.12.2015

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Idiopathische pulmonale Fibrose	1
1.1.1 Allgemeines	1
1.1.2 Klassifikation/Unterteilung, Epidemiologie	1
1.1.3 Symptome/Klinik der IPF	2
1.1.4 Diagnostik der IPF	3
1.1.5 Risikofaktoren	5
1.1.6 Verlauf	7
1.1.7 Pathomechanismen.	9
1.1.8 Bisherige Behandlungsregime und aktuelle Empfehlungen	13
1.2 Gerinnung	14
1.2.1 Die Rolle der Hämostase im Allgemeinen	14
1.2.2 Gerinnung und Gerinnungsfaktoren	14
1.2.2.1 Die plasmatische Gerinnung	14
1.2.2.2 Thrombin (FII)	17
1.2.2.3 Fibrinogen/Fibrin	18
1.2.3 Fibrinolyse	20
1.2.4 Gerinnungshemmung/Antikoagulation	21
1.2.4.1 Antithrombin	23
1.2.4.2 Heparin	24
1.2.4.3 Direkte Thrombininhibitoren	27
1.2.5 Pathophysiologische Bedeutung des Gerinnungssystems bei der Fibrose	31
1.2.5.1 Auswirkung der Fibrinbildung auf das Surfactantsystem	32
1.2.5.2 PAR-vermittelte Effekte	35
1.2.6 Antikoagulation als neues Therapieprinzip bei akuten und chronischen interstitiellen Lungenerkrankungen	37
2 Material & Methoden	40
2.1 Material	40
2.1.1 Tierversuche	40
2.1.2 PTT-Messung	42
2.1.3 Lösliches Kollagen	43

2.1.4 Hydroxyprolin	44
2.1.5 Histologie	45
2.2 Modell der Bleomycin induzierten pulmonalen Fibrose	47
2.2.1 Versuchstiere	48
2.2.2 Tierversuchsgenehmigung	48
2.2.3 Bleomycinapplikation	48
2.3 Lepirudinapplikation	49
2.4 Gewichtsbestimmung	50
2.5 Compliancemessung und Probeentnahme am Ende einer Versuchsreihe	50
2.6 Differenzialzellbild	51
2.6.1 Anfertigen der Zytospins	51
2.6.2 Färbung der Zytospins und Auszählung	51
2.7 Lepirudin Aktivitätsbestimmung aus BAL-Flüssigkeit mittels PTT	52
2.8 Bestimmung des Gehaltes an löslichem Kollagen in BAL Flüssigkeit	53
2.9 Bestimmung des Kollagengehaltes von Lungengewebe mittels	
Hydroxyprolinbestimmung	53
2.10 Histologie	54
2.10.1 H&E Färbung	54
2.10.2 Masson-Goldner (Trichrom) Färbung	55
2.10.3 Einscannen und Analyse der Gewebeschnitte	56
2.11 Statistik	56
3 Fragestellung	57
4 Ergebnisse	58
4.1 Vorversuche	58
4.2 Dauertherapie bleomycingeschädigter Mäuse mit Lepirudin	63
4.2.1 Therapieschemata	63
4.2.2 Überleben	64
4.2.3 Gewichtsveränderung	65
4.2.4 Lungencompliance	67
4.2.5 Differenzialzellbild aus der BAL	69
4.2.6 Lösliches Kollagen in der BAL-Flüssigkeit	71
4.2.7 Hydroxyprolin aus hydrolysiertem Lungengewebe	72

4.2.8 Histologie	74
4.2.9 Quantitative morphometrische Analysen	80
5 Diskussion	84
6 Zusammenfassung	93
7 Abkürzungsverzeichnis	95
8 Abbildungsverzeichnis	97
9 Tabellenverzeichnis	98
10 Literaturverzeichnis	99
Ehrenwörtliche Erklärung	108
Danksagung	109

1 Einleitung

1.1 - Idiopathische pulmonale Fibrose

1.1.1 - Allgemeines

Die idiopathische pulmonale Fibrose (IPF) ist eine chronisch progressiv verlaufende, tödlich endende Erkrankung aus dem Kreis der interstitiellen Lungenerkrankungen. Trotz intensiver Forschung sind deren Ursachen und Pathogenese weitgehend unbekannt. Zwar sind Inzidenz und Prävalenz einer Metaanalyse von Nalysnyk et al. (2012) zufolge verhältnismäßig gering, in Ermangelung effektiver Therapien und der hohen Sterblichkeit innerhalb kurzer Zeit (mittlere Überlebensdauer etwa 2-3 Jahre [Rudd – 2007, Bjoeraker – 1998]), besteht jedoch ein großes Interesse daran neue Therapieoptionen zu finden, die den Verlauf der Krankheit möglichst stoppen, zumindest jedoch verlangsamen.

1.1.2 - Klassifikation/Unterteilung, Epidemiologie

Die idiopathischen interstitiellen Pneumonien (*idiopathic interstitial pneumonia, IIP*), werden nach einer Konsensus Klassifikation der American Thoracic Society/European Respiratory Society in klinikopathologische Entitäten unterteilt, die sich durch die unterschiedliche Ausprägung von Inflammation und Fibrose unterscheiden [Travis - 2013].

Dies sind in abnehmender Häufigkeit: Die Idiopathische Pulmonale Fibrose (IPF 47-64%), die Nichtspezifische Interstitielle Pneumonie (NSIP 14-36%), die Respiratorische Bronchiolitis assoziierte Interstitielle Lungenerkrankung (RB-ILD 10-17%), die Desquamative Interstitielle Pneumonie (DIP 10-17%), die Kryptogene Organisierende Pneumonie (COP 4-12%), die Akute Interstitielle Pneumonie (AIP 2%), die Lymphoide Interstitielle Pneumonie (LIP 2%) und die pleuroparenchymale Fibroelastose (keine Häufigkeit genannt), vgl. Abb. 1 [ATS/ERS – 2002; Kim - 2006, Travis - 2013].

Es existieren nur wenige Studien zur Inzidenz und Prävalenz. Die Angaben schwanken zudem je nach Studie und den zugrunde liegenden Definitionskriterien. Nach einer aktuellen Metaanalyse von Nalysnyk et al. – 2012 beträgt die Inzidenz der IPF in den USA 16,3-17,4 / 100.000, bzw. 6,8-8,8 / 100.000 bei enger gefassten Definitionskriterien. Die Prävalenz liegt bei 42,7-63 / 100.000 (weit gefasste

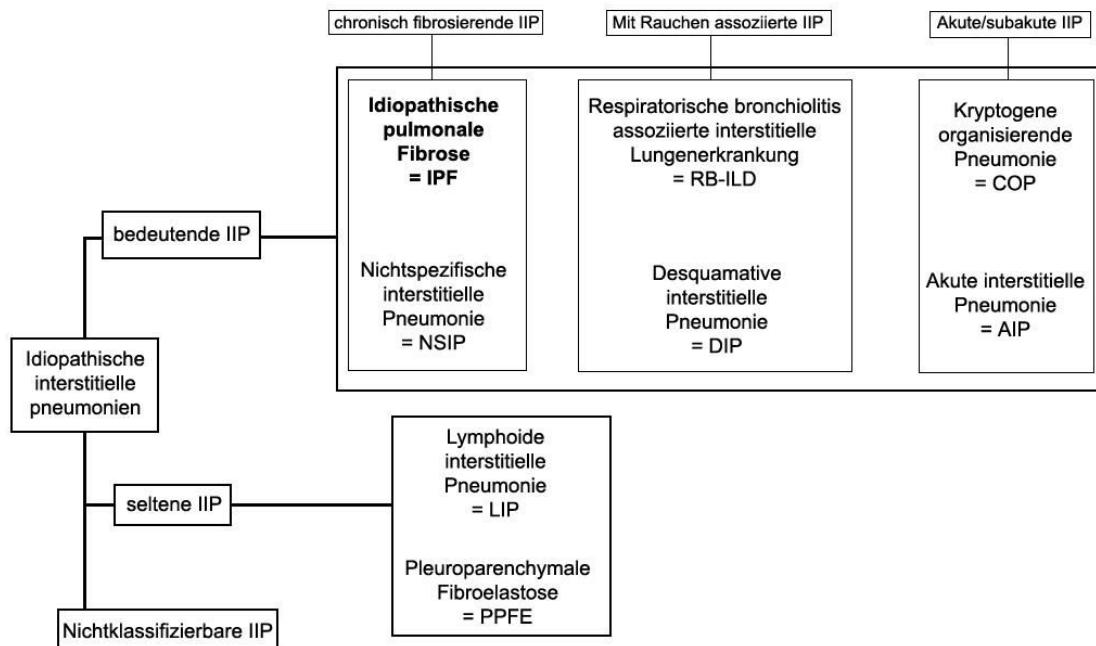


Abb. 1: Schematische Übersicht über die idiopathischen interstitiellen Pneumonien

Die idiopathischen interstitiellen Pneumonien (IIP) werden unterteilt in bedeutende, seltene und nichtklassifizierbare IIP, die bedeutenden IIP werden weiter unterteilt in chronisch fibrosierende, mit Rauchen assoziierte und akute/subakute IIP.

Definitions-kriterien) bzw. 14-27,9 / 100.000 (enger gefasste Definitions-kriterien). In Europa wird eine Inzidenz von 0,22-7,4 / 100.000 und eine Prävalenz von 1,25-23,4/ 100.000 angegeben, mit zunehmender Häufigkeit im höheren Lebensalter und einer geschlechtsspezifischen Ungleichverteilung zu Ungunsten der Männer. (1,5-1,7 : 1).[King – 2011]

1.1.3 - Symptome/Klinik der IPF

Typischerweise befinden sich die Patienten in der 6.-7. Lebensdekade, sind männlich und rauchten, bzw. rauchen [Gribbin – 2006; Iwai – 1994; Baumgartner - 1997].

Die Symptome, die den Patienten letztlich zum Arzt führen, sind relativ unspezifisch: trockener Husten und zunehmende Dyspnoe über mehrere Monate. Es finden sich häufig bibasale inspiratorische Knistergeräusche, sowie Trommelschlägelfinger (aufgetriebene Finger-/Zehenendglieder) [Kim - 2006].

1.1.4 – Diagnostik der IPF

Die Diagnose erweist sich auch heute noch als schwierig und erfordert eine enge Zusammenarbeit zwischen dem behandelnden Pulmonologen, Radiologen und Pathologen.

Lungenfunktionstests zeigen eine restriktive Funktionsstörung mit reduzierten Lungenvolumina, sowie eine reduzierte Diffusionskapazität für Kohlenmonoxid und eine arterielle Hypoxämie, die sich bei Belastung noch verschlimmert [Martinez - 2006].

Die konventionelle Röntgen-Thoraxaufnahme weist typischerweise diffuse retikuläre Verschattungen auf, hat jedoch nur eine mangelnde Spezifität und geringe Aussagekraft bezüglich der anatomischen Verteilung und Schwere der Krankheit [Misumi – 2006].

Die heute gültigen Kriterien, die für die Diagnose einer IPF erfüllt werden müssen, seien dargestellt und erläutert [Raghu - 2011]:

1: Der Ausschluss anderer Ursachen einer interstitiellen Lungenerkrankung, wie z.B. berufliche Belastungen, Kollagenosen und medikamentöse Toxizität, durch sorgfältige Anamnese und körperliche Untersuchung.

2: Das Vorhandensein des Bildes einer UIP (*Usual Interstitial Pneumonia*) im HRCT-Scan, typischerweise basal und peripher betont, bei Patienten, bei denen keine Lungenbiopsie vorgenommen wurde.

Ein UIP-Muster im HRCT ist definiert als die Anwesenheit von retikulären Verschattungen, assoziiert mit Traktionsbronchiektasien und "Honeycombing" – gebündelte, zystische Lufträume mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 3-10mm, die vor allem subpleural und basal auftreten [Nishimura – 1992; Hunninghake – 2003; ATS - 2000].

3: spezifische Kombinationen von HRCT- und Biopsie-Befunden bei Patienten, bei denen eine Biopsie vorgenommen wurde.

Eine UIP ist histologisch definiert als ein heterogenes Bild bei geringer Vergrößerung, in dem sich Bereiche der Fibrosierung mit Vernarbung und Honeycomb-Veränderungen abwechseln mit gesunden oder kaum betroffenen Arealen. Diese Veränderungen finden sich vor allem subpleural und paraseptal. Es findet sich nur eine gering ausgeprägte Entzündungsreaktion mit einem flächenhaften, interstitiellen Infiltrat von Lymphozyten und Makrophagen, kombiniert mit einer Hyperplasie der Typ II Alveolarepithel- und Bronchiolarepithelzellen.

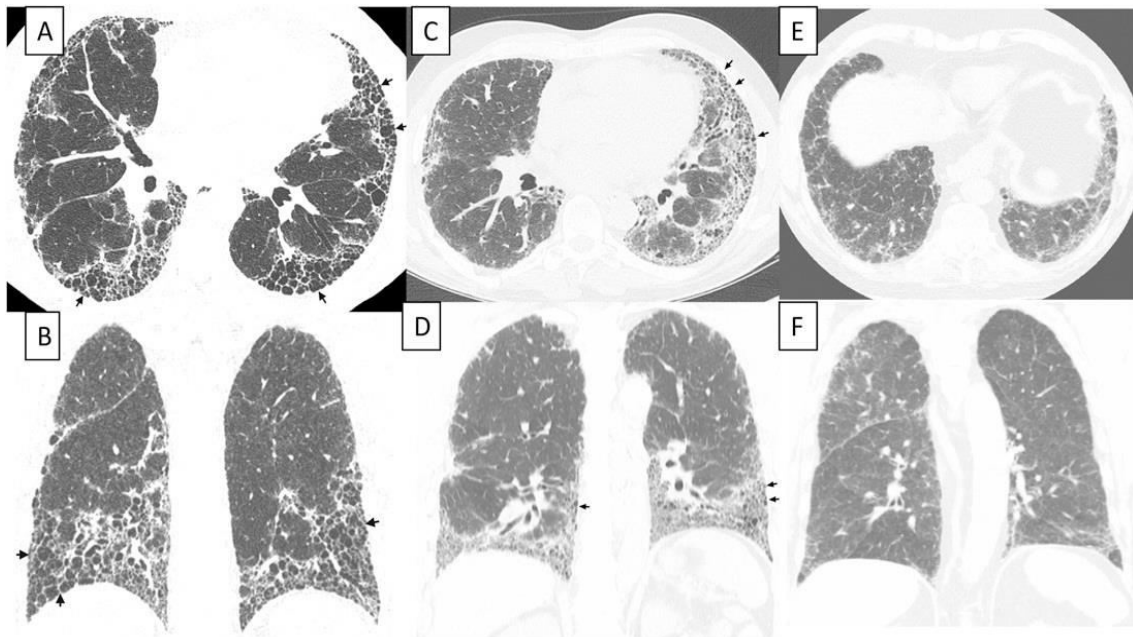


Abb. 2: HRCT-Aufnahmen, die das radiologische Bild einer UIP, bzw. einer möglichen UIP demonstrieren.

A und B: UIP-Muster mit ausgeprägtem Honeycombing (Pfeile). Die axiale und coronare Aufnahme zeigen basal und peripher vorherrschende retikuläre Abnormitäten.

C und D: UIP-Muster mit weniger ausgeprägtem Honeycombing (Pfeile). Die axiale und coronare Aufnahme zeigen basal und peripher vor allem subpleural vorherrschende retikuläre Abnormitäten.

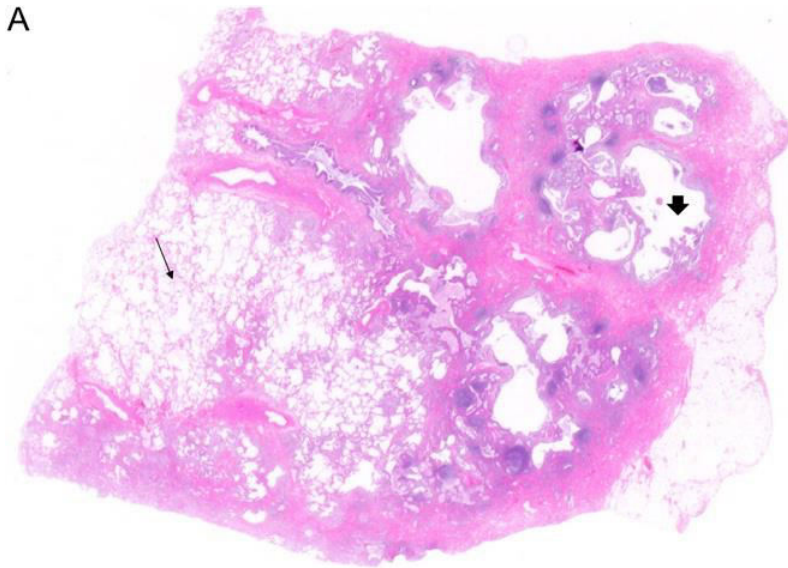
E und F: mögliches UIP Muster. Die axiale und coronare Aufnahme zeigen basal und peripher vorherrschende retikuläre Abnormitäten mit mäßig ausgeprägten Milchglasverschattungen, jedoch ohne Honeycombing.

Abb. übernommen aus Raghu - 2011.

Fibröse Bereiche bestehen vor allem aus dichtem Kollagen und beständig vorhandenen subepithelialen Fibroblasten-Foci (proliferierende Fibro- und Myofibroblasten).

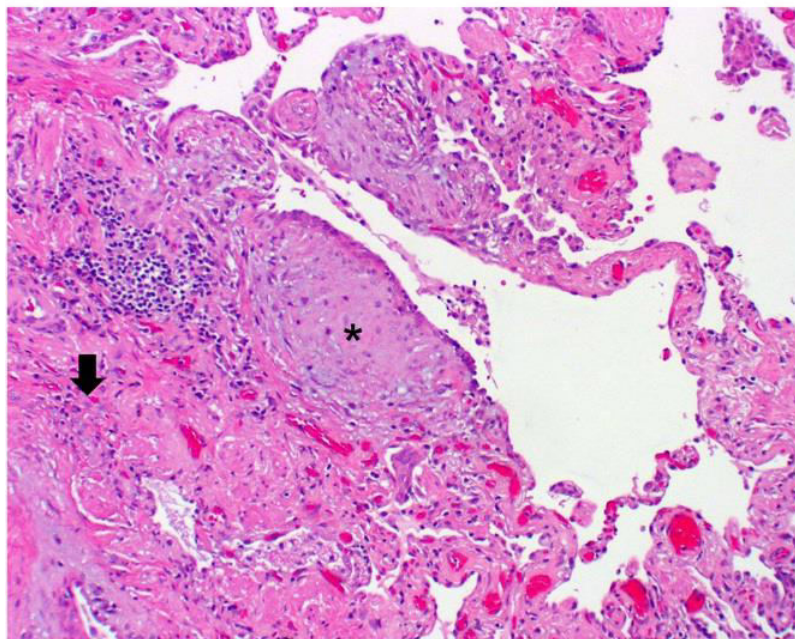
Bereiche mit Honeycomb-Veränderungen bestehen aus zystisch fibrotischen Lufträumen und sind von Bronchiolarepithel überzogen und mit Mucus und Entzündungszellen gefüllt [ATS – 2000; ATS/ERS - 2002].

A



A: Ungleichmäßiger Prozess mit Honeycomb-Zyste (dicker Pfeil), Bereichen mit erhaltenem Lungengewebe (dünner Pfeil) und Fibrose, die sich von den subpleuralen Regionen bis in die Lunge erstreckt.

B



B: Anliegend an Regionen mit chronisch fibrotischem Prozess (dicker Pfeil) befindet sich ein Fibroblasten Fokus (*), identifizierbar durch seine gerundete Form und die Zusammensetzung von ödematösem, fibroblastischem Gewebe.

Abb. 3: Chirurgische Lungenbiopsie. Demonstration des Musters der UIP. Übernommen aus Raghu - 2011.

1.1.5 - Risikofaktoren

Zwar ist bislang keine genaue Ursache für die IPF auszumachen, jedoch wurden inzwischen einige Risikofaktoren gefunden, die ein Auftreten der Krankheit wahrscheinlicher machen.

Das Alter hat hierbei eine bedeutende Rolle. Nach Raghu et al (2006a) beträgt die Inzidenz der IPF im Altersbereich zwischen 18 und 34 Jahren etwa 0,4-1,2 auf 100.000 und ist mit 27,1 – 76,4 auf 100.000 bei Personen, die älter als 75 Jahre sind wesentlich

höher. Auch in anderen Studien zeigte sich ein ähnlich altersabhängiger Anstieg der Inzidenz [Nalysnyk - 2011].

Auch das Geschlecht scheint eine Rolle zu spielen. So haben Männer im Vergleich zu Frauen ein höheres Risiko an IPF zu erkranken (Verhältnis von 1,5-1,7 : 1; King - 2011).

Weiterhin ist das Rauchen ein Faktor, der häufig mit dem Auftreten der IPF vorkommt, insbesondere wenn ein längerer Konsum (>20 pack-years) vorliegt [Baumgartner – 1997; Miyake - 2005].

Auch eine berufsbedingte (z.B. in Friseurhandwerk und Steinverarbeitung) Belastung mit diversen organischen und anorganischen Stäuben, wie Metall- und Holzstäube, Pflanzen- und Tierstäube, korreliert mit einem erhöhten Vorkommen von IPF [Iwai – 1994; Hubbard – 1996; Miyake - 2005; Taskar – 2006; Hubbard - 2000].

Die Assoziation mit einigen Krankheitserregern, u.a. Epstein-Barr-Virus, Hepatitis C Virus und verschiedenen Herpesviren, wurde intensiv untersucht, jedoch mit unterschiedlichen Ergebnissen, die zudem einigen Einschränkungen unterliegen, wie zum Beispiel einer oft stattfindenden immunsuppressiven Therapie oder einer ohnehin hohen Prävalenz in der Bevölkerung [Raghu - 2011; Ueda – 1992; Irving – 1993; Egan – 1995; Meliconi – 1996; Wangoo – 1997; Yonemaru – 1997; Stewart – 1999; Kelly – 2002; Tang – 2003; Zamo - 2005]. Somit kann letztlich keine sichere Aussage bezüglich des Auftretens bestimmter Erreger und dem Vorkommen der IPF getroffen werden.

Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass infektiöse Vorgänge einen Einfluss auf den Verlauf der IPF und auf das Auftreten von akuten Exazerbationen besitzen. Die Bedeutung infektiöser Auslöser für akute Exazerbationen der IPF wurde mittels Genexpressionsprofilen ebenfalls untersucht. Es ließ sich hierbei kein Zusammenhang zwischen akuten Exazerbationen und einem akuten infektiösen Geschehen feststellen, jedoch besteht die Möglichkeit, dass zuvor abgelaufene Infektionen als Trigger für eine weitere Progression der Erkrankung fungieren [Konishi – 2009, Song - 2011].

Das Auftreten eines Gastroösophagealen Refluxes (GER) scheint durch die angenommene Verbindung mit Mikroaspirationen einen weiteren Risikofaktor für IPF darzustellen und ist häufig bei IPF Patienten anzutreffen [Raghu – 2006b; Tobin – 1998], jedoch ist GER auch bei anderen Lungenkrankheiten häufig festzustellen [D'Ovidio - 2005]. Auch hier werden weitere Studien nötig sein, um den Stellenwert des GER weiter zu evaluieren.

Einen weiteren Risikofaktor scheint eine Erkrankung an Diabetes Mellitus darzustellen, da eine signifikante Verknüpfung von IPF mit Diabetes assoziierten Risiken, wie z.B. Insulingebrauch [Gribbin - 2009], sowie eine signifikant höhere Prävalenz von Diabetes Mellitus bei Patienten mit IPF besteht [Enomoto – 2003].

Die intensive Erforschung der familiären IPF, die etwa 2-20% aller Fälle ausmacht und sich klinisch und histologisch nicht von der sporadischen Form unterscheidet [Travis - 2013], führte zur Entdeckung einiger Mutationen in epithelständigen Genen wie zum Beispiel dem Surfactant Protein C und A [Thomas – 2002; Wang - 2009] und dem Telomerase Komplex [Armanios – 2007; Tsakiri – 2007].

Genpolymorphismen wurden gehäuft auch im Zusammenhang mit sporadischer IPF beobachtet, jedoch konnte bislang keine beständige Verknüpfung nachgewiesen werden [Raghu – 2011].

1.1.6 - Verlauf

Der Verlauf der IPF ist charakterisiert durch eine zunehmende Verschlechterung der Lungenfunktionen, die letztendlich in über 60% der Fälle zum Tode durch respiratorisches Versagen führt. Andere Todesursachen wie Herzversagen, Bronchialkarzinom, Infektion und Lungenembolie kommen jedoch auch gehäuft vor [Raghu – 2006a; Martinez – 2005; Panos - 1990].

Einige retrospektive, longitudinale Studien [Bjoraker – 1998; Rudd – 2007] stellten eine mittlere Überlebenszeit von 2-3 Jahren ab dem Zeitpunkt der Diagnosestellung fest, es zeigt sich jedoch eine hohe Variabilität in der Geschwindigkeit der Abnahme der Lungenfunktion.

Untersuchungen die darauf abzielten, prognostische Faktoren zu eruieren, brachten bisher einige Größen zu Tage, die zumindest abschätzen lassen, ob ein erhöhtes Risiko der Mortalität besteht [Raghu – 2011]. Diese Faktoren sind in nachfolgender Tabelle zusammengestellt. (Tab. 1)

Basalfaktoren*	Verlaufsfaktoren
Ausprägung der Dyspnoe**	Zunahme der Dyspnoe
DLCO < 40% berechnet	Abnahme der FVC um $\geq 10\%$ absoluter Wert
Entsättigung $\leq 88\%$ während des 6MWT	Abnahme der DLCO um $\geq 15\%$ absoluter Wert
Ausmaß des Honeycombing im HRCT	Verschlechterung der Fibrose im HRCT
Pulmonale Hypertension	

Tab. 1.: Prognostische Faktoren für das Mortalitätsrisiko bei IPF

Aufgeführt sind ausgewählte Merkmale, die mit einem erhöhten Mortalitätsrisiko vergesellschaftet sind.

Abkürzungen: 6MWT: 6-Minuten-Geh-Test; DLCO: Diffusionskapazität für Kohlenmonoxid; FVC: Forcierte Vitalkapazität

* - FVC als Basalfaktor hat bislang eine unklare Vorhersagekraft.

** - Bislang gibt es keine einheitliche Möglichkeit der Quantifizierung

Adaptiert aus Raghu – 2011.

Durch die Untersuchungen von Ley et al [2012] konnte durch den GAP-Index ein simples Modell zur Vorhersage der Mortalität entwickelt werden. Die in diesem Modell verwendeten Parameter sind Alter, Geschlecht, forcierte Vitalkapazität (FVC) und Kohlenmonoxid- Diffusionskapazität (DLCO). Anhand der Punktwerte erfolgt die Einteilung in 3 Stufen, welche das Mortalitätsrisiko innerhalb der nächsten 3 Jahre anzeigen.

Bei der Mehrzahl der Patienten ist der Verlauf durch ein langsames, stufenweises Fortschreiten der Krankheit gekennzeichnet. Es gibt jedoch auch Patienten, die über einen längeren Zeitraum stabil bleiben, im Gegensatz zu Anderen, deren Krankheit rapide voranschreitet [Selman - 2007]. Hinzu kommt bei manchen Patienten das Auftreten von Episoden, in denen sich das Krankheitsbild akut verschlechtert (vgl. Abb.4). Können diese Episoden nicht als Folge einer anderen Gegebenheit, wie zum Beispiel Pneumonie oder Lungenembolie charakterisiert werden, so wird der Begriff der akuten Exazerbation verwendet, wobei jedoch noch unklar ist, ob dies nur eine Manifestation einer unbekannten Komplikation ist oder ob eine Beschleunigung der pathobiologischen Prozesse der IPF zugrunde liegt [Martinez – 2005; Panos – 1990]. Weiterhin können Komorbiditäten, wie zum Beispiel pulmonale Hypertension oder Emphyseme den Verlauf beeinflussen [Mejia – 2009; Lettieri - 2006].

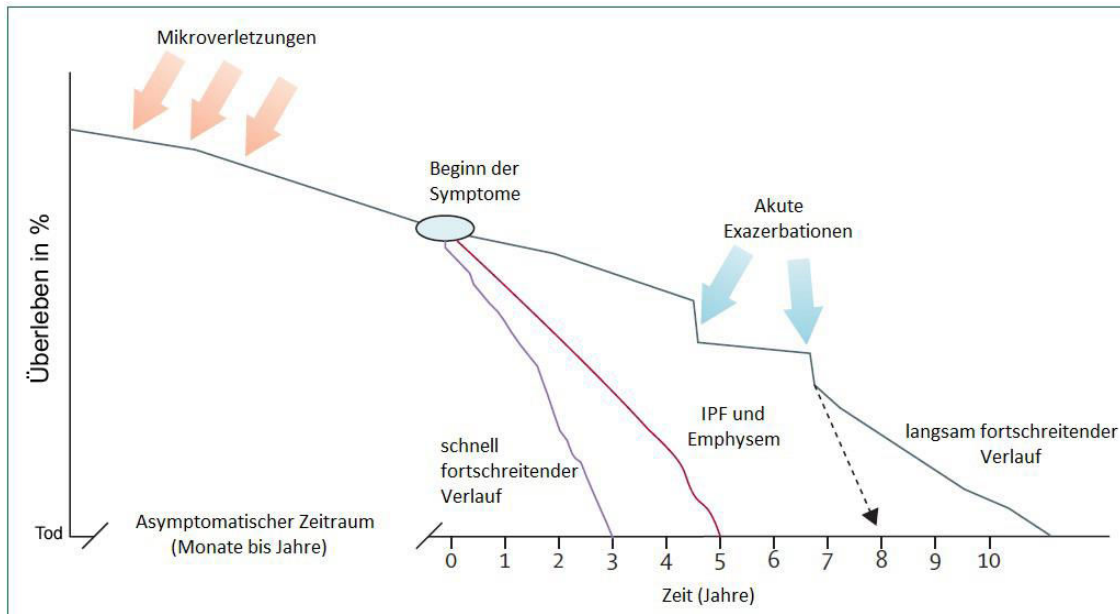


Abb. 4: Der natürliche Krankheitsverlauf der IPF – unterschiedliche klinische Phänotypen.
 Die Krankheit hat eine lange (Monate bis Jahre) dauernde asymptomatische Phase. Der Patient kommt dann, wenn die Schäden der Lunge die Grenze überschreiten, ab der die ersten Symptome auftreten.
 Die meisten Patienten durchlaufen eine langsam fortschreitende klinische und funktionelle Verschlechterung. 10% dieser Patienten zeigen Phasen der akuten Verschlechterung (akute Exazerbation), die der terminalen Krankheitsphase vorausgehen und sie möglicherweise einleiten. Wenige Patienten haben einen schnellen Krankheitsverlauf mit rascher klinischer Verschlechterung.
 Starke Raucher können zusätzlich zur IPF Emphysemata entwickeln, was mit einer kürzeren Überlebenszeit einhergeht, im Vergleich zu Patienten mit IPF allein.
 Adaptiert aus King – 2011.

Es ist noch nicht bekannt, ob diese unterschiedlichen Verläufe unterschiedliche Subtypen der IPF repräsentieren oder ob der Verlauf durch andere Faktoren (u.a. geographische oder kulturelle Faktoren, Umwelteinflüsse) beeinflusst wird.

1.1.7 - Pathomechanismen

Chronisch entzündliche Vorgänge spielen eine wichtige Rolle bei den meisten interstitiellen Lungenkrankheiten und lange Zeit nahm man an, dass diese Mechanismen ebenso eine wichtige Rolle beim Voranschreiten der IPF innehaben. Die Beobachtung, dass der Krankheitsverlauf trotz hochdosierter antiinflammatorischer und immunsuppressiver Therapie bis auf wenige Ausnahmen fast unverändert voranschreitet, spricht jedoch gegen diese Annahme [King – 2011].

Die fortschreitende fibrotische Reaktion wird inzwischen einem epithelabhängigen, fibroblastenaktivierenden Prozess zugeschrieben [Selman - 2001], was jedoch eine Beteiligung von dysregulierten Immunmechanismen mit nachfolgender Inflammation

bei gewissen Subgruppen von Patienten und der Entstehung, bzw. dem Progress der Krankheit, nicht ausschließt [Gilani - 2010].

Es sei nun ein Modell der involvierten Pathomechanismen erläutert (Abb. 5):

1. Epitheliale Zellen der Lunge werden durch wiederholte Mikroverletzungen geschädigt. Die Ursachen für diese Epithelzellschädigung sind noch weitgehend unbekannt. Man nimmt an, dass diese Schäden durch umweltbedingte Noxen, wie z.B. Zigarettenrauch oder durch chronische virale Infektionen, wie z.B. eine Infektion mit Herpesviren, weiter getriggert werden. Aufschluss geben hier die familiären Formen, da hier der Nachweis von Fehlfaltungen der Surfactantproteine (bei Surfactantprotein A und C Mutationen) zu ER-Stress und Apoptose von Typ II Pneumozyten führen. Altersassoziierte Veränderungen können zudem eine erhöhte Empfänglichkeit für solche Mikroverletzungen herstellen. Eine anhaltende Schädigung führt zu zellulärem Stress in Form von z.B. ER-Stress, Lysosomalem Stress und DNA-Schädigung. Kann dieser nicht beseitigt werden wird eine Apoptose von Typ I und Typ II Pneumozyten provoziert [King - 2011; Korfei - 2008].

2. Als Folge der Verletzung der epithelialen Barriere kommt es zu einer erhöhten vaskulären Permeabilität mit Austritt von u.a. Fibrinogen und Bildung einer provisorischen Matrix (Wundgerinnsel)

Nachfolgend migrieren und proliferieren Bronchiolar- und Alveolarepithelzellen im Versuch der Gewebsregeneration und Wiederherstellung der epithelialen Integrität [King - 2011].

3. Durch die Aktivierung embryonaler Signalwege, wie z.B. WNT, TGF- β und SHH [Selman - 2008] werden diese Zellen abnormal aktiviert, was zu einem hyperplastischen Epithel und Bronchialisierungsvorgang führt.

4. Die aktivierten Zellen produzieren ihrerseits Wachstumsfaktoren und Zytokine, die die Migration von ortsständigen Fibroblasten und Fibrozyten, die Transition von epithelialen zu mesenchymalen Zellen (=EMT) und die Differenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten auslösen, letzteres vor allem durch die Produktion von aktivem TGF-beta.

Auch ein vermindertes Ansprechen der Myofibroblasten auf apoptotische Signale wird durch TGF-beta bewirkt. Alle diese Zellen tragen in noch nicht gänzlich verstandener Weise und Quantität zur Bildung von Fibroblastenfoci bei.

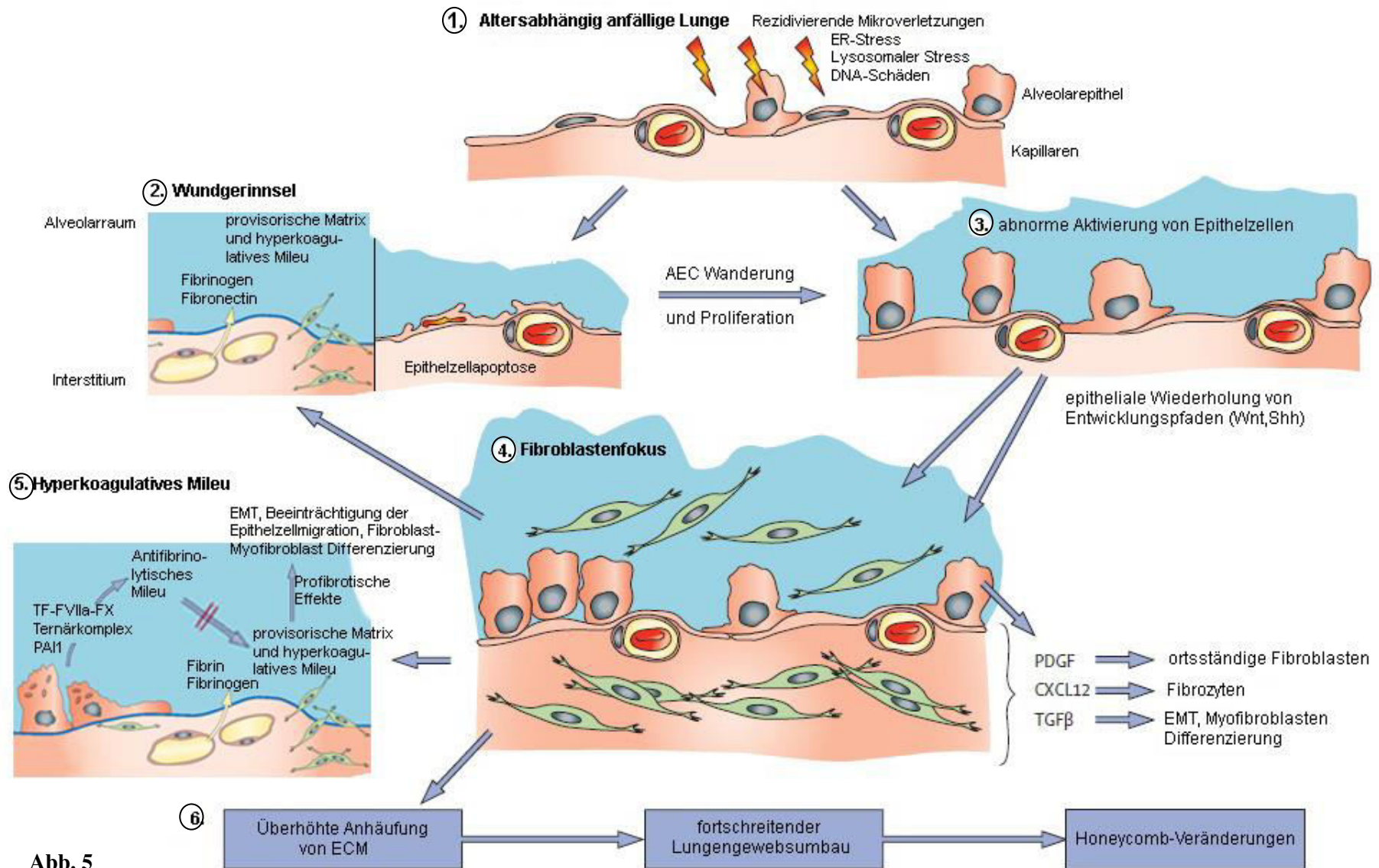


Abb. 5

Zu Abb. 5: Pathomechanismen, die der IPF zugrunde liegen.

①: Schädigung altersabhängig anfälliger epithelialer Zellen durch wiederholte Mikroverletzungen. ER-Stress und DNA-Schädigung führen zur Apoptose von Typ 2 Alveolarepithelzellen (AEC II) .

②: Schädigung der epithelialen Barriere mit Austritt von Fibrinogen und Wundgerinnungsbildung.

③: abnorme Aktivierung epithelialer Zellen zur Wiederherstellung der epithelialen Integrität.

④: epitheliale-mesenchymale Transition, sowie Migration und Proliferation von Fibroblasten durch Wachstumsfaktoren und Zytokine (v.a. TGF- β). Bildung von Fibroblastenfoci.

⑤: Intraalveoläre Fibrinbildung mit Formation einer provisorischen Matrix. Profibrotische Effekte durch Gerinnungsfaktoren und fortbestehende Matrix.

⑥: Fehlgeleiteter Wundheilungsprozess führt zu progredientem abnormem Geweberemodelling mit Ausbildung von Honigwaben-Zysten.

ER = Endoplasmatisches Reticulum; AEC = Alveolarepithelzelle; PDGF = Platelett Derived Growth Factor; TGF- β = Transforming Growth Factor Beta; EMT = Epitheliale Mesenchymale Transition; PAI = Plasminogen Aktivator Inhibitor; ECM = Extrazelluläre Matrix

Übernommen aus King – 2011.

5. In den Alveolen kommt es über Bildung des TF-FVIIa-FX Komplexes mit der nachfolgenden Aktivierung der Gerinnungsfaktoren FXa und Thrombin zur Ausbildung eines hyperkoagulativen Mileus. Das im Zuge der erhöhten vaskulären Permeabilität ausgetretene Fibrinogen wird zu Fibrin gespalten und bildet eine provisorische Matrix. Weiterhin bilden epitheliale Zellen PAI-1 (Plasminogen aktivator Inhibitor), wodurch ein antifibrinolytisches Mileu geschaffen und der Abbau der provisorischen Matrix verhindert wird. Das Fortbestehen dieser Matrix und aktive Proteasen der Gerinnungskaskade lösen ihrerseits Mechanismen aus, die die Entwicklung einer Fibrose begünstigen können. So können zum Beispiel Gerinnungsfaktoren wie FXa, Thrombin und TF/FVII über Protease aktivierte Rezeptoren (PAR) zur Fibroblastenaktivierung beitragen und einen fibrotischen Gewebeumbau fördern [King - 2011].

Auf die Bedeutung des Gerinnungssystems und dessen Beteiligung am Pathomechanismus der IPF wird im Kapitel 1.2.5 - "Pathophysiologische Bedeutung des Gerinnungssystems bei der Fibrose" - dieser Arbeit ausführlicher eingegangen.

6. Die Fibroblastenfoci bilden exzessive Mengen an extrazellulärer Matrix und können durch u.a. Wasserstoffperoxid zusätzlich die Apoptose benachbarter Epithelzellen auslösen.

Im Zuge dieses kontinuierlich fortschreitenden, abnormalen Geweberemodelling, welches auch in Abwesenheit des primären Stimulus voranschreitet [Selman - 2001], fördern angrenzendes Narbengewebe sowie die dysproportionale Sekretion von

Enzymen (z.B. Matrixmetalloproteinasen - MMPs), die Bildung von Honigwabenzysten durch mechanische Kräfte.

1.1.8 - Bisherige Behandlungsregime und aktuelle Empfehlungen

Da man zunächst vermutete, dass der IPF ein inflammatorischer Prozess zugrunde liege, wurden antiinflammatorische Therapiekonzepte z.B. mit Kortikosteroiden, Azathioprin und Acetylcystein untersucht.

Aufgrund mangelnder positiver Effekte und teilweise erheblicher Nebenwirkungen wurde jedoch im Konsensus Statement 2011 (Raghu - 2011) von einer Therapie mit Kortikosteroiden, Colchicin, Cyclosporin A, einer Kombinationstherapie mit Kortikosteroiden und immunmodulatorischen Medikamenten (z.B. Azathioprin oder Cyclophosphamid), Interferon- γ 1b, Bosentan oder Etanercept strengstens abgeraten. Eine Behandlung mit dem Immunsuppressivum und mTOR Inhibitor Everolimus im Rahmen einer klinischen Studie zeigte eine beschleunigte Krankheitsprogression [Malouf – 2011].

Neuere Studien bestätigten ein erhöhtes Risiko für Tod und Hospitalisation bei Behandlung mit Prednison, Azathioprin und Acetylcystein im Vergleich zu Placebo [Idiopathic Pulmonary Fibrosis Clinical Research Network – 2012].

Eine Monotherapie mit Acetylcystein wurde im Konsensus Statement 2011 (Raghu - 2011) für einzelne ausgewählte Fälle empfohlen, da günstige Effekte nachgewiesen werden konnten [Behr - 1997]. Eine aktuelle Studie des Idiopathic Pulmonary Fibrosis Clinical Research Network 2014 konnte jedoch keinen signifikanten Benefit nachweisen.

Pirfenidon, welches seit dem Februar 2011 in Europa zur Behandlung der leichten bis mittelschweren IPF zugelassen ist

[http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002154/human_med_001417.jsp&mid=WC0b01ac058001d124], ließ in zurückliegenden Studien ebenfalls positive Effekte erkennen [Taniguchi – 2010; Azuma – 2005]. Die CAPACITY Studien, die den Effekt einer Behandlung mit Pirfenidon abklären sollten, zeigten nur eine moderate Verlangsamung der Abnahme der FVC (forcierte Vitalkapazität) [Loomis-king – 2013; Noble – 2011], jedoch konnte ein verlangsamter Krankheitsprogress (dargestellt durch Lungenfunktion, Belastungstoleranz und

progressfreiem Überleben) in einer weiteren Phase 3 Studie untermauert werden [King – 2014].

Neben der pharmakologischen Therapie gibt es auch einige nichtpharmakologische Strategien wie Langzeit Sauerstoff Therapie und Atemtherapie, die empfohlen werden. Als letzter Ausweg verbleibt oftmals nur die Lungentransplantation [Morrison – 1992; Thabut - 2003; Nishiyama - 2008].

Im Laufe der Zeit wurden vielfältige Therapieansätze der IPF in klinischen Studien untersucht, bei denen verschiedenste Zielstrukturen beeinflusst wurden, doch trotz erheblicher Bemühungen ist es bislang noch nicht gelungen eine effektive Therapie für die IPF zu finden.

Studien zur Therapie mit Antikoagulantien

Es existieren bislang nur wenige klinische Studien zur Behandlung der IPF mit Antikoagulantien.

Eine Studie von Markart et al - 2010 wies eine gute Verträglichkeit für inhalativ verabreichtes unfractioniertes Heparin nach.

Ein zunächst vielversprechender Ansatz mit Antikoagulantien (Heparin, bzw. Warfarin) [Kubo - 2005] erwies sich in einer neueren Studie von Noth et al - 2012 als nicht zielführend. Bei der Therapie mit Warfarin zeigte sich hier eine erhöhte Mortalität bei fehlendem Benefit.

1.2 - Gerinnung

1.2.1 - Die Rolle der Hämostase im Allgemeinen

Da, wie bereits erwähnt, intraalveoläre koagulatorische Prozesse an der Pathogenese der IPF beteiligt sind (siehe Kapitel 1.1.7 - "Pathomechanismen") und sich diese Arbeit mit der Wirkung eines antikoagulatorischen Medikamentes befasst, sei hier im Besonderen auf die betreffenden Gerinnungsfaktoren und -wege eingegangen.

1.2.2 - Gerinnung und Gerinnungsfaktoren

1.2.2.1 - Die plasmatische Gerinnung

Die Hämostase ist ein wichtiger Prozess im menschlichen Körper, der im Normalfall sicherstellt, dass Verletzungen der Blutgefäße schnell abgedichtet werden.

Dieser Vorgang bedingt zwei wichtige Prozesse, die miteinander in Verbindung stehen: Die Blutstillung durch Thrombozytenaggregation, welche als primäre Hämostase die Bildung eines weißen, relativ instabilen Thrombus bewirkt, auf die hier jedoch nicht weiter eingegangen wird, und die Blutgerinnung (sekundäre Hämostase) unter Beteiligung von Plasmaproteinen, mit Bildung eines stabilisierenden Fibrinnetzes. Zur Übersicht seien die Gerinnungsfaktoren tabellarisch dargestellt:

Faktor	Synonym	Funktion
I	Fibrinogen/Fibrin	Bildung des Fibrinnetzes
II	Prothrombin/Thrombin	Aktiviert Faktor I, V, VIII, IX, XI und XIII
III	Gewebefaktor/Thromboplastin/TF (Tissue Factor)	Im subendothelialen Gewebe; Kofaktor von VIIa
IV	Ca ²⁺ -Ionen	Kofaktor
V	Proakzelerin	Kofaktor; bildet Komplex mit FX
VI	=Faktor Va	
VII	Prokonvertin	Komplexiert mit TF, wird von TF aktiviert; aktiviert FX
VIII	Antihämophiliefaktor A	Komplexieren; aktivieren FX
IX	Antihämophiliefaktor B; Christmas Faktor	
X	Stuart-Prower-Faktor	Komplexiert mit FV (FXa, FVa, Ca-Ionen, negativ geladene Zellmembranen = Prothrombinase-Komplex); aktiviert Prothrombin
XI	Rosenthal-Faktor	Aktiviert FIX und XII
XII	Hageman-Faktor	Aktiviert FXI; Präkallikrein; Plasminogen
XIII	Fibrinstabilisierender Faktor	Vernetzt Fibrin und stabilisiert es

Tab. 2: Die Gerinnungsfaktoren und ihre Funktionen im Überblick

Es existieren zwei Wege, über die Faktor X kaskadenartig aktiviert und nachfolgend Thrombin gebildet wird und letztlich die Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin erfolgt.

Extrinsischer Weg: Hierbei handelt es sich um das System, das vornehmlich für die Auslösung der Gerinnung verantwortlich ist und bei Sepsis, Malignomen oder Trauma durch Kontakt von Blut mit verletztem subendothelialelem Gewebe oder vermehrter Abgabe der extrinsischen Gerinnungsfaktoren in Gang gesetzt wird. Wichtigster Bestandteil ist der extravaskuläre Gewebefaktor (= Faktor III; *tissue factor*, TF),

welcher bei einer Gewebeerletzung freigesetzt wird und mit Faktor VII komplexiert und diesen aktiviert.

Intrinsischer Weg/Kontakt-System: Hierbei handelt es sich vor allem um ein System das sich an der Oberfläche aktivierter Thrombozyten abspielt und das der Verstärkung der Gerinnung dient bzw. die weitere Fibrinbildung unterhält. Hauptfaktoren sind hierbei der Komplex aus Faktor VIIIa und IXa, der für die FXa-Bildung verantwortlich ist, und weitere Kofaktoren wie FXI, FXII, Präkallikrein und hochmolekulares Kininogen.

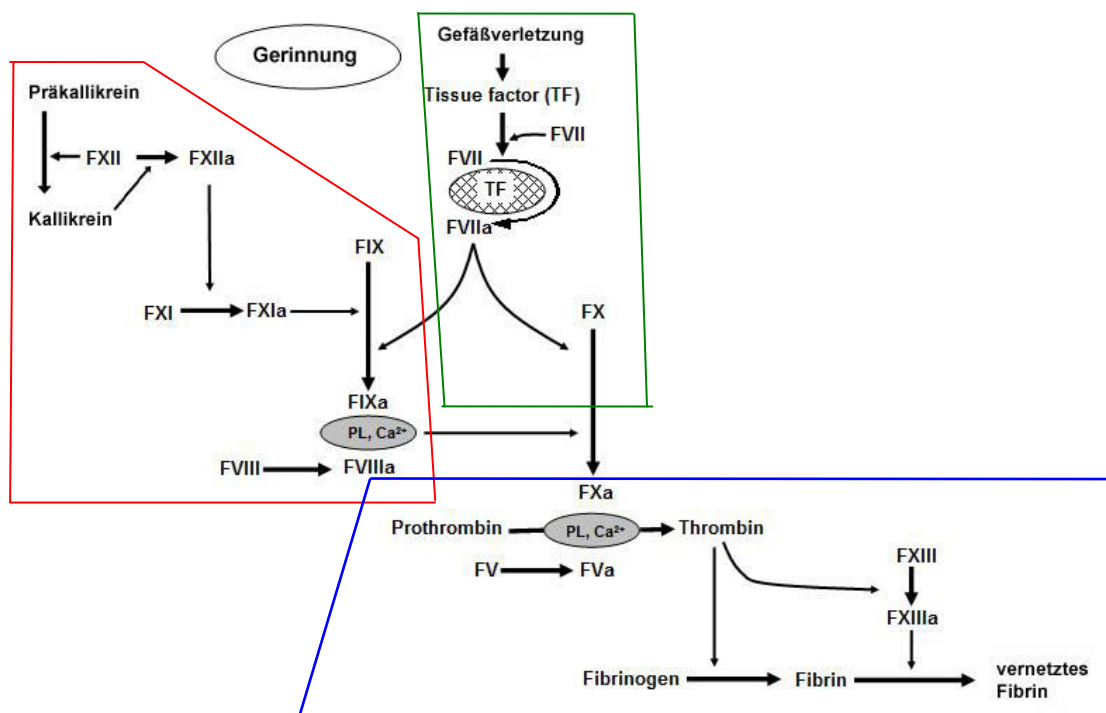


Abb. 6: Schematische Darlegung der Gerinnungskaskade.

Roter Rahmen: intrinsischer Weg; grüner Rahmen: extrinsischer Weg; blauer Rahmen: gemeinsame Endstrecke; TF = Tissue Factor; PL = Phospholipide Übernommen aus Ruppert – 2006a.

Beide Wege münden letztlich in einer gemeinsamen Endstrecke und führen zur Aktivierung von FX, welcher zusammen mit Faktor Va, gerinnungsaktiven Phospholipiden und Calcium den Prothrombinase-Komplex formt und das inaktive Prothrombin in das aktive Thrombin überführt. Thrombin katalysiert die Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin, wodurch das Blut von einem flüssigen in einen gallertartigen Zustand übergeht. Darüber hinaus induziert Thrombin die Aktivierung von FXIII, was

zu einer Quervernetzung und somit einer weiteren Verfestigung des Fibrinnetzes führt [Norris – 2003].

1.2.2.2 - Thrombin (FII)

Thrombin ist das entscheidende Enzym der plasmatischen Gerinnungskaskade, da es, neben vielfältigen anderen Effekten (s.u.), für die Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin verantwortlich ist. Es entsteht durch enzymatische Spaltung durch den Prothrombinase-Komplex (FXa, FVa, Ca-Ionen und negative geladene Zellmembranen) aus seiner inaktiven Vorstufe, dem Prothrombin, welches in der Leber gebildet wird.

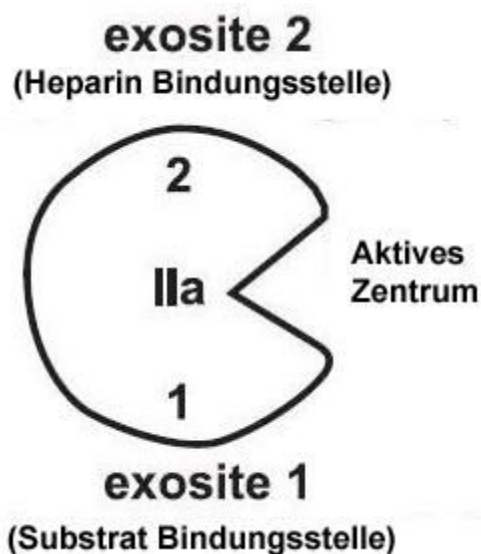


Abb. 7: Schematische Darstellung des Thrombins mit aktivem Zentrum und den beiden Exosites.

übernommen aus Gurm - 2005

Aufbau:

Thrombin ist eine Serinprotease, bestehend aus 295 Aminosäuren, die eine kürzere A und eine längere B Kette bilden, welche das Thrombinmolekül formen [Bode - 2006].

Dieses besitzt 3 Interaktionsstellen:

1. Die sogenannte „Exosite I“, die für die Bindung von Thrombin und Fibrin/-ogen benötigt wird. Eine Interaktion mit Fibrin bewirkt zudem eine Beschleunigung der Aktivierung von FXIII durch Thrombin [Janus - 1983].
2. Die sogenannte „Exosite 2“, die für die Interaktion mit Heparin benötigt wird. Nach Bindung von Heparin wird die Rate der Komplexbildung mit Antithrombin 3000-4000-Fach erhöht [Bode – 2006; Gettins - 2002].

3. Das aktive Zentrum, wo die eigentliche enzymatische Spaltung der Substrate stattfindet.

Funktionen:

Die wichtigste Funktion des Thrombins besteht darin Fibrinogen zu Fibrin zu spalten und somit die Gerinnung zu ermöglichen. Daneben besitzt Thrombin noch weitere Funktionen.

Einige zielen darauf ab seine eigene Aktivierung im Sinne einer positiven Rückkopplung zu verstärken. Über einen solchen Feedback-Loop aktiviert Thrombin z.B. Faktor V, einen seiner Kofaktoren. Weiterhin ist Thrombin ein wichtiger Aktivator von FVIII und FIX, also des extrinsischen Weges.

Eine weitere wichtige Funktion des Thrombins im Rahmen der Gerinnung ist die Aktivierung des Faktors XIII, der die entstandenen, noch locker verbundenen Fibrinmoleküle miteinander verknüpft und das Netz somit stabilisiert [Norris - 2003]. Auch an der Aktivierung der Thrombozyten über Protease aktivierte Faktoren (PAR) 1 und 4 ist Thrombin beteiligt [Clemetson – 2012; Gandhi - 2011].

Zusätzliche Effekte die Thrombin über PAR entfaltet sind im Kapitel 1.2.5.2 - "PAR-vermittelte Effekte" dargestellt.

Die Aktivität von Thrombin wird vor allem durch den Inhibitor Antithrombin (AT) reguliert, mehr dazu im Abschnitt 1.2.4.1 - "Antithrombin".

1.2.2.3 - Fibrinogen/Fibrin:

Bei der durch Thrombin katalysierten Spaltung von Fibrinogen werden Fibrin und die Fibrinopeptide A und B freigesetzt. Dieser Vorgang ist der Endpunkt der plasmatischen Gerinnungskaskade.

Aufbau:

Fibrinogen ist ein in der Leber gebildetes, hochmolekulares Protein, bestehend aus den 3 Polypeptidketten A α (67kDa), B β (56kDa) und γ (47kDa), die miteinander verflochten sind. Durch intramolekulare Disulfidbrückenbildung entsteht eine trinodulare Struktur mit zwei äußeren D-Domänen und einer zentralen E-Domäne [Standeven - 2005].

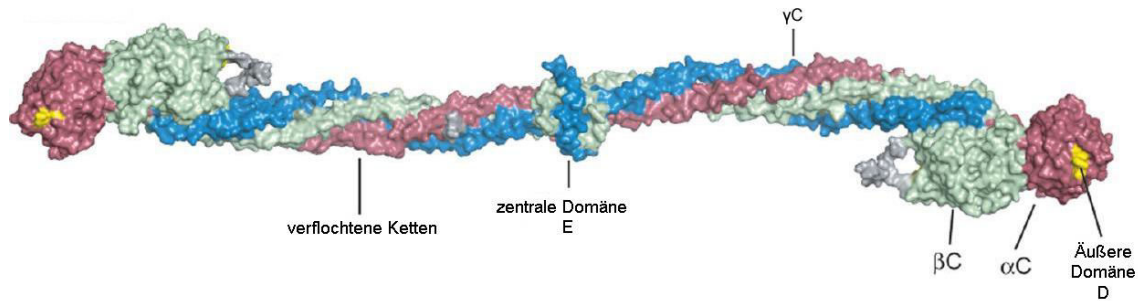


Abb. 8: Aufbau des Fibrinogen-Moleküls.

αC = Alpha Kette; βC = Beta Kette; γC = Gamma Kette. Übernommen aus Kollmann – 2009.

Funktion:

Nach Abspaltung der Fibrinopeptide A und B werden an der zentralen E-Domäne Fibrin Polymerisationsstellen freigelegt (Ea, Eb), über die weitere Fibrinmonomere zu einem Polymer verknüpft werden können. Solcherart verknüpfte Fibrinmoleküle bilden ein stabiles Netz, das der Stabilisierung des Thrombus und dem Wundverschluss dienen soll (vgl. Abb. 9).

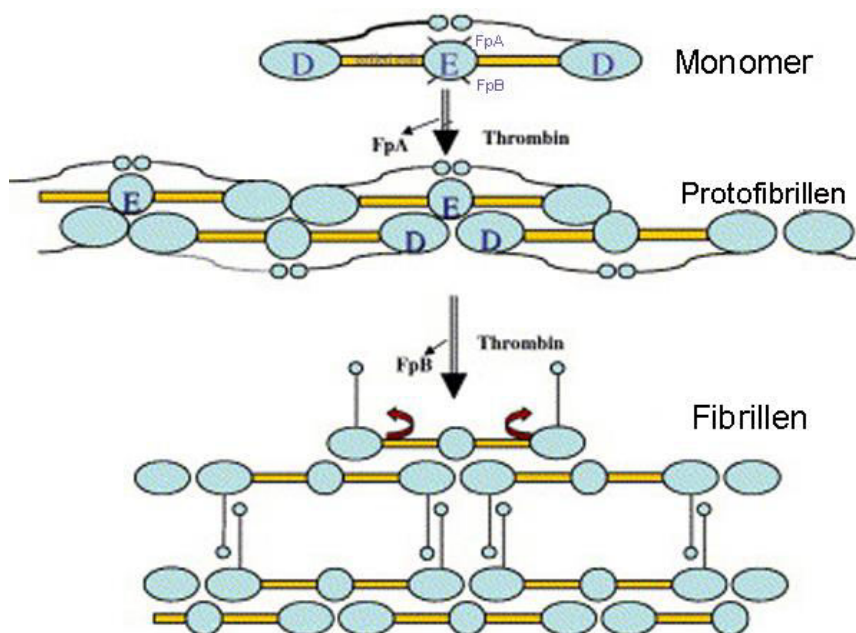


Abb. 9: Mechanismus der thrombinvermittelten Abspaltung der Fibrinopeptide A und B und Bildung von Fibrinpolymeren.

Die thrombinvermittelte Abspaltung von FpA führt durch Zusammenlagerung von Fibrinmonomeren zur Bildung von Protofibrillen. Die Abspaltung von FpB ermöglicht deren Quervernetzung und Ausbildung des Fibringerüsts.

Fp = Fibrinopeptid; Übernommen aus Standeven – 2005.

1.2.3 - Fibrinolyse

Der Prozess der Fibrinolyse dient dazu, einmal gebildetes Fibrin wieder abzubauen. Dies geschieht durch Plasmin, eine Serinprotease, welches aus der inaktiven Vorstufe Plasminogen gebildet wird. Die Bildung von Plasmin wird durch t-PA (*Tissue-type plasminogen-activator*, *Gewebsplasminogenaktivator*) oder durch Urokinase (auch u-PA, *Urokinase-type plasminogen-activator*) katalysiert (Norris - 2003).

Bei der Spaltung von Fibrin durch Plasmin entstehen wasserlösliche Fibrinspaltprodukte.

Plasmin besitzt zudem die Fähigkeit Wachstumsfaktoren, Zytokine und Matrix Metalloproteinasen zu aktivieren und wirkt so bei dem Abbau von Matrix Glycoproteinen mit [Wygrecka - 2008].

Auch die Fibrinolyse besitzt physiologische Inhibitoren, die der Regulation des Abbaus dienen. Der primäre Inhibitor von aktivem Plasmin ist $\alpha 2$ -Antiplasmin, das irreversibel an Plasmin bindet und einen stabilen Komplex bildet. Daneben können auch $\alpha 2$ -Makroglobulin und Antithrombin (AT) die Plasminaktivität inhibieren, spielen jedoch in vivo eine untergeordnete Rolle bei der Fibrinolyse

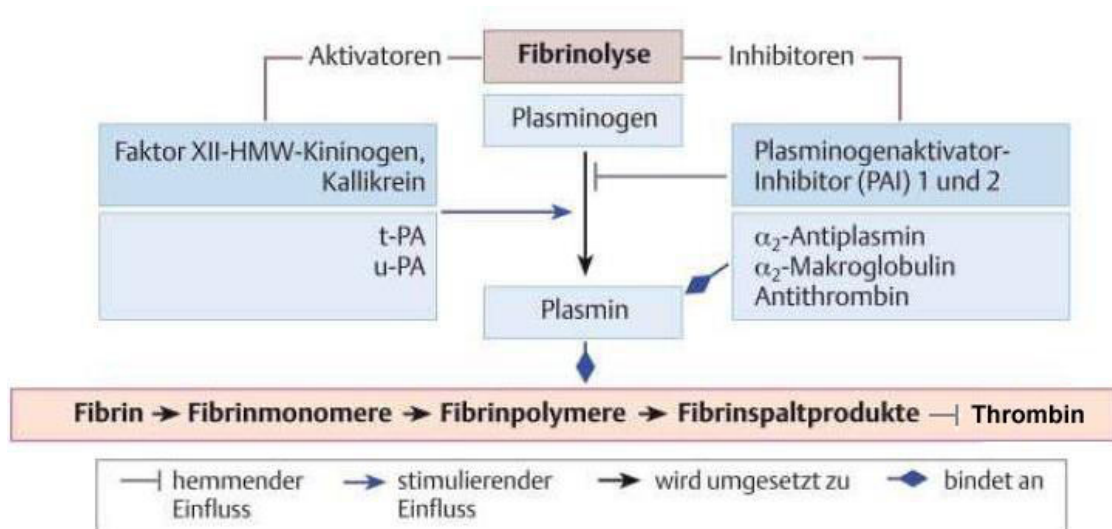


Abb. 10: Schematische Darstellung der Fibrinolyse und ihrer Inhibitoren.

Die Plasminogenaktivator-Inhibitoren inhibieren t-PA und u-PA.

α 2-Antiplasmin, α 2-Makroglobulin und Antithrombin binden freies Plasmin und inaktivieren es. Übernommen aus Arastéh K ; Duale Reihe - Innere Medizin; Thieme Verlag, Stuttgart; 2. Auflage; 2009; S.1270.

Eine weitaus wichtigere Rolle bei der Inhibition der Fibrinolyse spielen die Plasminogenaktivatorinhibitoren (PAI), welche t-PA und u-PA binden und inhibieren

und somit die Fibrinolyse auf der Ebene der Plasmingeneration regulieren, allen voran PAI-1. Dieses wird vornehmlich in den Endothelzellen gebildet und durch eine Vielzahl von Stoffen freigesetzt. Es liegt in größerer Menge vor als t-PA, wodurch dieses großteils in gebundener Form vorliegt, und somit eine vorzeitige Fibrinolyse verhindert wird (Norris - 2003).

1.2.4 - Gerinnungshemmung/Antikoagulation

Auch ohne Gefäßverletzung als Auslöser kommt es vor, dass einzelne Gerinnungsfaktoren aktiviert werden. Um zu verhindern, dass dadurch der vollständige Prozess der Gerinnung unnötigerweise abläuft, existieren einige Wirkstoffe im menschlichen Körper, die aktivierte Gerinnungsfaktoren inaktivieren können. Zusätzlich existiert eine Vielzahl von Stoffen, die normalerweise nicht im menschlichen Körper vorkommen, welche ebenso eine gerinnungshemmende Wirkung besitzen und therapeutisch genutzt werden [Norris – 2003]. Es sollen kurz die wichtigsten dieser Stoffe erwähnt werden.

Wirkstoff	Bildungs- bzw. Gewinnungsort	Wirkung
Antithrombin (AT)	Leber	Inaktivierung v.a. von FIXa; FXa und Thrombin. Inaktivierung auch anderer Gerinnungsfaktoren
Thrombomodulin	Oberfläche von Endothelzellen	Verändert Wirkung von Thrombin: Spezifische Aktivierung von Protein C
APC (aktiviertes Protein C)	Inaktives Protein - Leber	Komplexiert mit Protein S, Phospholipiden und Calcium: Inaktiviert FVa und und FVIIIa
TFPI	Endothelzellen, Megakaryozyten, Thrombozyten, Plasma, Monozyten/Makrophagen	Inhibiert FXa, komplex mit FXa inhibiert TF/FVIIa
Heparin - hochmolekulares bzw. unfraktioniertes Heparin (GAG-	- Mensch: Mastzellen - Schweinedarmmukosa	Verstärkung der Aktivität von AT um den Faktor 1000, Inhibition von Thrombin und FXa. Niedermolekulare

<p>Kettenlänge >17)</p> <p>- niedermolekulares bzw. fraktioniertes Heparin (GAG-Kettenlänge 5-17)</p>		<p>Heparine verstärken vor allem die Inhibition von FXa</p>
<p>Heparinoide (z.B. Danaparoid)</p>	<p>Schweinedarmmukosa, Heparin und Heparinfragmente werden entfernt</p>	<p>Verstärkung der Aktivität von AT, ähnlich niedermolekularem Heparin inhibiert AT vornehmlich FXa.</p>
<p>Cumarine (Phenprocoumon, Warfarin)</p>	<p>Cumarin = sekundärer Pflanzenstoff. Herstellung durch chemische Modifikation von Cumarin</p>	<p>Hemmung des Vitamin-K abhängigen Enzyms Vitamin K-Epoxid-Reduktase und somit Synthesehemmung der Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X in der Leber.</p>
<p>Direkte Thrombininhibitoren</p> <p>- Hirudin</p> <p>- r-Hirudine (r = rekombinant); Lepirudin, Desirudin)</p> <p>- Hirudinanaloga (Bivalirudin)</p> <p>- Argatroban, Ximelagatran</p>	<p>Speicheldrüsen des Blutegels (hirudo medicinalis)</p> <p>Gentechnologisch modifizierte Hefen</p> <p>Derivat des Hirudins</p> <p>Synthetische Hirudinderivate</p>	<p>Direkte Bindung und Inaktivierung von Thrombin</p>
<p>Faktor Xa-Inhibitoren</p> <p>- Fondaparinux</p> <p>- Rivaroxaban</p>	<p>Synthetische Herstellung</p>	<p>AT vermittelte selektive Inhibition von FXa</p> <p>AT unabhängige selektive Inhibition von FXa</p>

Tab. 3: Auflistung der wichtigsten im menschlichen Körper vorkommenden und wichtiger therapeutisch genutzter gerinnungshemmender Faktoren.

GAG = Glykosaminoglykan.

Zusammengetragen aus Norris - 2003; Nader - 2004; Acostamadiedo - 2000; Park - 1988; Hirsh - 2005; Weitz 2004.

1.2.4.1 - Antithrombin

Aufbau:

Antithrombin ist ein Glykoprotein, bestehend aus 432 Aminosäuren, das zu den Serinprotease Inhibitoren (Serpine) [Irving - 2000] gehört und in der Leber synthetisiert wird.

Funktionen:

Seine wichtigste Funktion besteht vor allem in der Inaktivierung von Thrombin, FIXa und FXa und somit der Kontrolle der Gerinnung.

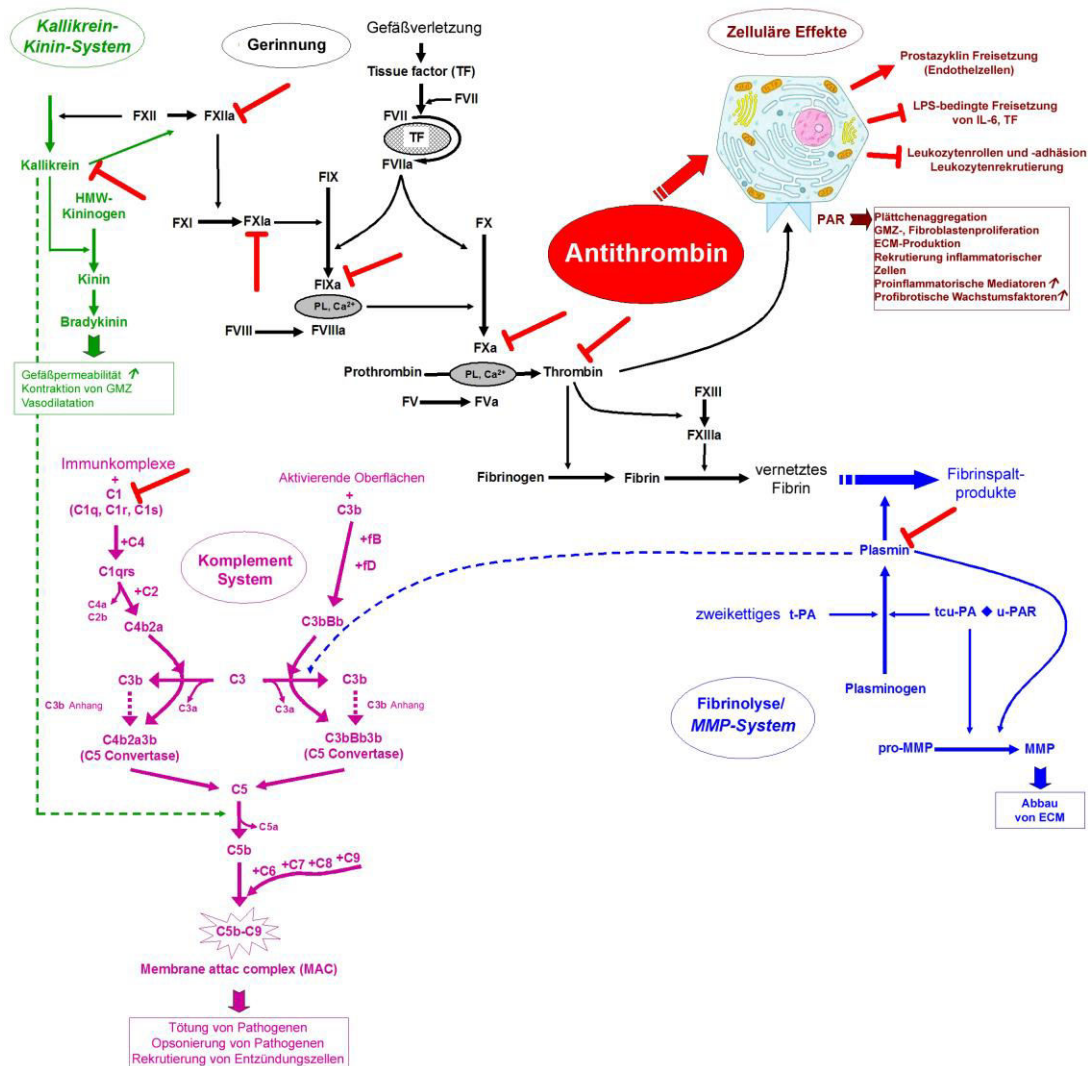


Abb. 11: Übersicht über die vielfältigen Funktionen von Antithrombin.

LPS = Lipopolysaccharid; IL = Interleukin; PAR = Protease aktivierte Rezeptoren; GMZ = glatte Muskelzellen; ECM = Extrazelluläre Matrix; HMW-Kininogen = High Molecular Weight-Kininogen; MMP = Matrix-Metalloproteinase; t-PA = tissue-type plasminogen activator

Übernommen aus Ruppert – 2006a.

Die genannten Faktoren werden durch die Bildung eines stabilen Komplexes im Verhältnis 1:1 inaktiviert. Antithrombin wird durch diese Bindung verbraucht [Huntington - 2000]. Auch andere Serinproteasen, wie FXI, FXII, Plasmin, Kallikrein und der Komplementfaktor C1, werden auf diese Art inaktiviert.

Die Aktivität von Antithrombin allein ist relativ gering, wird jedoch durch die Bindung von Heparin um einen Faktor von etwa 1000 gesteigert [Olson - 1992]. AT macht etwa 80% der Thrombin-inhibierenden Aktivität im Plasma aus [Ruppert – 2006a].

Abgesehen von den antikoagulatorischen Funktionen wurden in einigen Studien antiinflammatorische Effekte für Antithrombin nachgewiesen, vermittelt durch eine erhöhte Produktion und Freisetzung von Prostaglandin I₂ in Endothelzellen [Yamauchi – 1989; Uchiba - 1995], durch Inhibition der TNF-Alpha und IL-6 Produktion und durch Inhibition des proinflammatorischen NfκB-Signalweges [Hagiwara – 2008] .

1.2.4.2 - Heparin

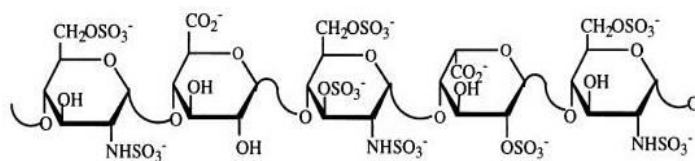


Abb. 12: Pentasaccharideinheit aus einem Heparinmolekül

Die Pentasaccharideinheit des Heparins besteht aus drei sulfatierten D-Glucosaminen und zwei Uronsäuremolekülen (D-Glucuronsäure und L-Iduronsäure)

Übernommen aus Gunay – 1999.

Aufbau: Heparin ist ein kettenförmiges, sulfatiertes Glykosaminoglykan, das sich aus einem variablen Gemisch an Disaccharideinheiten (bestehend aus D-Glucosamin und D-Glucuronsäure bzw D-Glucosamin und L-Iduronsäure) zusammensetzt und in menschlichen Mastzellen vorkommt. Als funktionelle Gruppen enthält Heparin Sulfatreste, die entweder an Stickstoff (Sulfamid) oder an Sauerstoffatome (Schwefelsäureester) gebunden sind. Das therapeutisch als Antikoagulans verwendete Heparin stammt vor allem aus der Dünndarmmukosa von Schweinen. Es existieren Heparine mit unterschiedlichen Kettenlängen und Molekülmodifikationen (siehe Tab. 3), was mit einer unterschiedlichen Wirksamkeit der Gerinnungshemmung einhergeht [Gunay – 1999].

Für die eigentliche Interaktion des Heparins mit Antithrombin ist eine Pentasaccharid-Einheit aus drei sulfatierten Glucosaminen und zwei Uronsäuremolekülen verantwortlich (Abb. 12) [Gunay – 1999].

Funktionen:

Die Wirkung von Heparin beruht auf einer Bindung der Pentasaccharid-Einheit an eine hochaffine Bindungsstelle von Antithrombin mit darauf folgender Konformationsänderung, welche dessen reaktive Stelle besser zugänglich macht und somit die inhibitorische Aktivität von Antithrombin um den Faktor 1000 erhöht [Gunay - 1999; Hirsh – 1992; Hirsh – 1991].

Die Bindung der Pentasaccharid-Einheit an AT bewirkt vor allem eine verstärkte Inaktivierung des FXa. Für die Inaktivierung von anderen Faktoren, u.a. Thrombin, werden länger-kettige Heparine (Kettenlänge mindestens 18 Saccharid-Einheiten) benötigt, da hierfür ein anderer Wirkmechanismus von Bedeutung ist, bei dem Heparin als Template für die Komplexbildung aus AT und Zielprotease fungiert. Über eine zweite, niedrig affine Heparinbindungsstelle im AT Molekül werden Inhibitor und Protease in räumliche Nähe zueinander gebracht (sogenannter Annäherungsmechanismus) [Ruppert – 2006a].

Wichtig zu erwähnen ist, dass bereits an Fibrin gebundenes Thrombin und an Plättchen gebundener FXa nicht mehr inaktiviert werden können [Weitz - 1990, Eisenberg – 1993]. Heparin fördert hierbei die Bindung von Thrombin über seine Exosite 1 an Fibrin. Durch die Bildung dieses Komplexes, bei dem beide Exosites besetzt sind, ist Thrombin vor der Inaktivierung durch den Heparin/AT-Komplex geschützt, da die nötige Annäherung von Enzym und Inhibitor nicht stattfinden kann [Adams – 2006; Hogg – 1990; Hogg – 1996; Liaw - 2001].

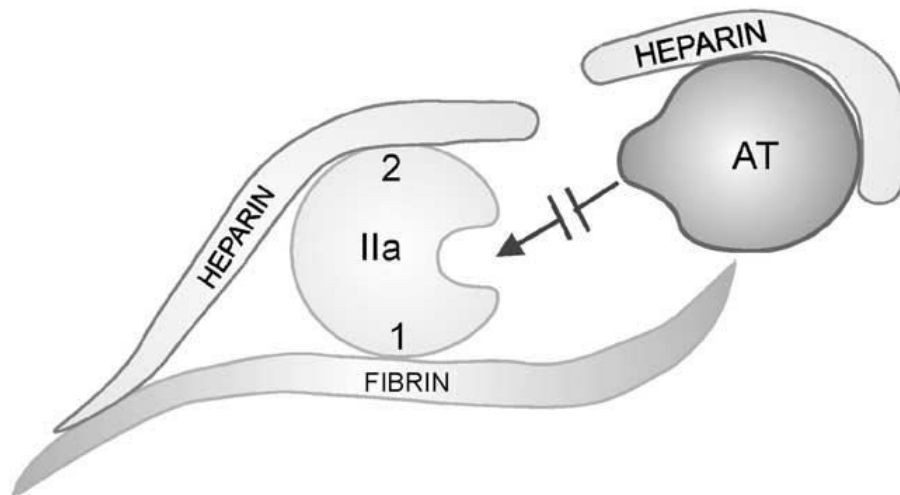


Abb. 13: Schematische Darstellung der Interaktion von Heparin mit AT und an Fibrin gebundenem Thrombin.

Bereits an Fibrin gebundenes Thrombin kann aufgrund der Interaktion mit Heparin nicht mehr durch Antithrombin inaktiviert werden.

Übernommen aus Weitz - 2002.

Der Mechanismus, durch den FXa, eingebaut in den Prothrombinase Komplex, vor Heparin geschützt wird ist noch kaum verstanden [Brufatto – 2003].

Medizinische Verwendung:

Heparin wird vielfach zur Prävention und Therapie von venösen und arteriellen Thrombosen verwendet [Weitz – 2002], jedoch hat es einige Beschränkungen.

So muss es parenteral verabreicht werden, bindet an Plasmaproteine, deren Plasmalevel variieren und bedarf somit Laborkontrollen, um abzusichern, dass die Wirkung in einem therapeutischen Bereich liegt [Hirsh - 1991].

Diese Problematik kann zwar durch die Gabe von niedermolekularem Heparin (durch Spaltung aus nativem Heparin gewonnen), welches eine geringere Affinität zu Plasmaproteinen hat und somit kaum einer Laborkontrolle bedarf [Weitz - 1997], umgangen werden, jedoch gibt es noch einige andere Problematiken, u.a. die Gefahr einer Heparin induzierten Thrombozytopenie (HIT) und damit einhergehender Thrombosegefahr [Chong - 2003] oder einem Reboundeffekt bei Beendigung der Therapie [Theroux - 1992]. Mit Ausnahme der Intensivmedizin spielt unfractioniertes Heparin daher in der klinischen Routine keine Rolle mehr.

1.2.4.3 - Direkte Thrombininhibitoren

Hirudin ist ein hochspezifischer direkter Thrombin Inhibitor, bestehend aus 65 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von etwa 7000 Da [Markwardt - 1994]. Er wurde schon früh aus den Speicheldrüsen des Blutegels (*hirudo medicinalis*) isoliert [Haycraft - 1884] und zu Forschungszwecken herangezogen. Die Gentechnologie ermöglichte um 1986/87 die effektive und mengenmäßig zufrieden stellende Gewinnung von rekombinantem Hirudin (r-Hirudin) aus Bakterien [Harvey – 1986] und später aus Hefen [Park – 1995].

Aufbau:

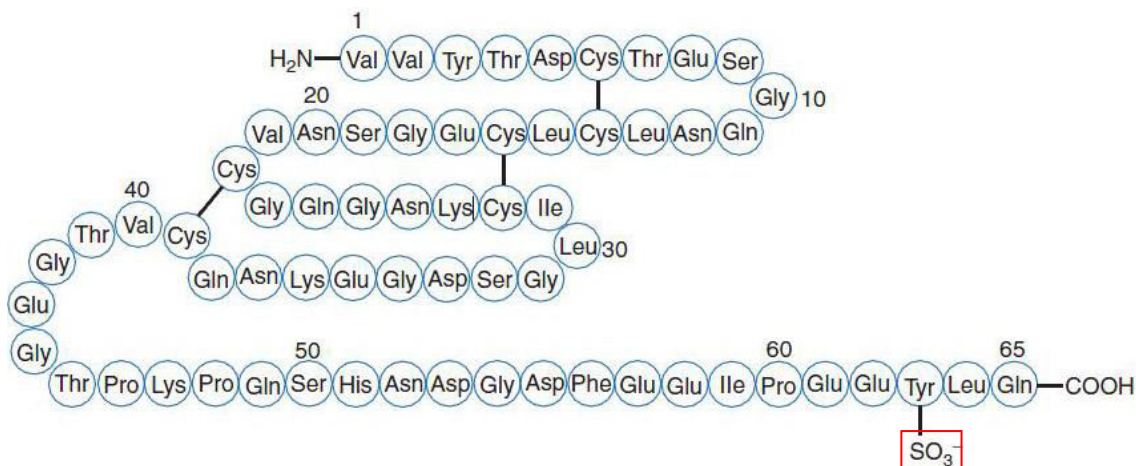


Abb. 14: Aminosäuresequenz von Hirudin.

Den rekombinant hergestellten Hirudinen fehlt die Sulfatgruppe an Tyrosin-63 (Desulfatohirudin) Übernommen aus Ruppert – 2006b.

Die rekombinant erzeugten Produkte, Lepirudin und Desirudin, weisen eine identische molekulare Struktur wie der natürliche Wirkstoff auf, bis auf eine Sulfat-Gruppe am Tyr-63, was ihnen die Bezeichnung Desulfato-Hirudine verlieh. Lepirudin hat zusätzlich eine veränderte Aminosäuresequenz am NH₂-Terminus: 1-Leu-2-Thr-. Die antikoagulatorische Wirkweise dieser Produkte ist der des natürlichen Hirudins gleichzusetzen, jedoch ist die Affinität zu Thrombin 10-fach geringer [Markwardt – 1988; Markwardt - 1994].

Neben dem natürlichen und den rekombinant hergestellten Hirudinen existieren synthetisch hergestellte Hirudinanaloga, z.B. Bivalirudin, auf die im Weiteren jedoch nicht eingegangen wird.

Funktion:



Abb. 15: Darstellung des Wirkmechanismus von Hirudin, bzw. r-Hirudinen.

Adaptiert aus Gurm – 2005.

Die Wirkung von Hirudin, bzw r-Hirudin beruht auf der irreversiblen Bindung von Thrombin im Verhältnis 1:1. Dabei interagiert die COOH-terminale Domäne des Hirudinmoleküls mit der Exosite 1 des Thrombins und verhindert die Bindung von Thrombin an sein Substrat. Die NH2-terminale Domäne des Hirudins lagert sich nach einem Schlüssel-Schloss Prinzip an das aktive Zentrum und blockiert es (Abb.15) [Weitz – 2002].

Durch Interaktion von Hirudin mit Thrombin werden alle proteolytischen Effekte von Thrombin inhibiert, was bedeutet, dass neben der Spaltung von Fibrinogen auch die Aktivierung der Faktoren V, VIII, IX, XI und XIII verhindert wird [Lindhout – 1990; Hauptmann - 1987]. Dies bedeutet, dass zum einen der positive Rückkopplungsmechanismus, durch den Thrombin seine eigene Bildung fördert, und zum anderen die Quervernetzung und Stabilisierung des Fibringerüsts verhindert wird. Auch die Thrombin induzierte Plättchenaggregation wird durch Hirudin beeinflusst. Für die Inhibition der Plättchenaggregation wird jedoch eine größere Menge Hirudin benötigt, da die Affinität von Thrombin zu Rezeptoren auf der Plättchenmembran höher ist als zu Fibrinogen [Markwardt – 1994].

Abgesehen von den antikoagulatorischen Wirkungen verhindert Hirudin auch die zellvermittelten Effekte von Thrombin, wie z.B. die Stimulation der Fibroblastenproliferation (Abb. 16) [Glusa – 1988; Van Obberghen-Schilling – 1982].

Therapeutische Verwendung von direkten Thrombininhibitoren:

	Zulassung	Indikation
Hirudin	Bislang keine Zulassung [Di Nisio - 2005]	
Lepirudin	13/03/1997 bis 27/07/2012 (Rücknahme nach Antrag des „marketing authorisation holder“ wegen kommerzieller Gründe)	Antikoagulation bei erwachsenen Patienten mit Heparininduzierter Thrombozytopenie (HIT) Typ II und thrombembolischer Erkrankung, die eine parenterale antithrombotische Therapie benötigt. http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000122/human_med_001020.jsp&mid=WC0b01ac058001d124
Desirudin	09/07/1997	Prävention einer tiefen Venenthrombose nach Hüft- oder Knieersatz. http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000104/human_med_001032.jsp&mid=WC0b01ac058001d124

Tab. 4: Indikationen der European Medicines Agency für Hirudin und r-Hirudine [Stand: Februar 2014]

Ausgehend von Hirudin wurden zahlreiche weitere direkte Thrombininhibitoren (DTI) entwickelt. Tabelle 5 zeigt eine Übersicht über die am Markt erhältlichen DTI, vor allem solcher, die oral verabreicht werden können.

	Zulassung	Indikation
Bivalirudin Angiox®	20/09/2004	Antikoagulation bei Erwachsenen die sich einer perkutanen Koronarintervention unterziehen müssen, einschließlich Patienten mit ST-Strecken Hebungsinfarkt (STEMI) und primärer PCI. Behandlung erwachsener mit instabiler Angina pectoris/Nicht ST-Strecken Hebungsinfarkt (IAP/NSTEMI) mit geplanter dringender oder früher Intervention. Bivalirudin sollte mit Aspirin und Clopidogrel verabreicht werden. http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000562/human_med_000647.jsp&mid=WC0b01ac058001d124

Dabigatran etexilate mesilate	18/03/2008	<p>Primäre Prävention von venösen thromboembolischen Ereignissen bei Erwachsenen die eine elektive vollständige Hüftersatz Operation oder vollständige Knieersatz Operation durchlaufen haben.</p> <p>Prävention von Schlaganfällen und systemischen Embolien bei Erwachsenen mit nicht valvulärem Vorhofflimmern und einem oder mehr der folgenden Risikofaktoren:</p> <ul style="list-style-type: none"> • zurückliegende/r Schlaganfall, transiente ischämische Attacke oder systemische Embolie • linksventrikuläre Auswurffraktion <40% • Symptomatische Herzinsuffizienz \geq New York Heart Association (NYHA) Klasse 2 • Alter \geq 75 Jahre • Alter \geq 65 Jahre assoziiert mit einem der folgenden: Diabetes mellitus, koronare Herzkrankheit oder Hypertension <p>http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000829/human_med_000981.jsp&mid=WC0b01ac058001d124</p>
Argatroban		<p>Prophylaxe oder Behandlung einer HIT mit Thrombose. Patienten, die sich einer PCI unterziehen mit dem Risiko eine HIT zu entwickeln.</p> <p>Seit Mitte 2005 bei Patienten mit heparininduzierter Thrombozytopenie Typ II (HIT-II) zur Antikoagulation (Hemmung der Blutgerinnung) in Deutschland zugelassen</p> <p>http://www.medknowledge.de/neu/med/jahr/2006/I-2006-5-argatra.htm</p>
Ximelagatran	Keine Zulassung	2006 vom Markt genommen wegen Lebertoxizität; Keine Zulassung in den USA

Tab. 5: Indikationen der European Medicines Agency für direkte Thrombininhibitoren
[Stand: Dezember 2014]

1.2.5 - Pathophysiologische Bedeutung des Gerinnungssystems bei der Fibrose

Bei der IPF besteht eine gestörte intraalveoläre Hämostaseregulation.

Zu dieser Dysbalance tragen eine erhöhte prokoagulatorische Aktivität durch vermehrte Expression von TF und Ausbildung des TF-FVIIa-Komplexes mit konsekutiver Aktivierung der Gerinnungskaskade [Idell – 1989a,b; Günther – 2000; Nakstadt – 1990; Kotani – 1995; Imokawa – 1997; Olman – 1995], sowie eine supprimierte fibrinolytische Aktivität im Alveolarraum bei.

Tierexperimentelle Studien legen nahe, dass Alveolarmakrophagen sowie Alveolarepithelzellen vom Typ II die Hauptquelle der erhöhten prokoagulatorischen Aktivität im Rahmen einer inflammatorischen Lungenschädigung darstellen (Wygrecka - 2004; Wygrecka - 2007).

Es entsteht zudem eine ungenügende Antagonisierung durch antikoagulatorische Faktoren, wie zum Beispiel von Antithrombin (AT), welches Thrombin und einige andere Proteasen des Gerinnungsweges inhibiert (vgl. 1.2.4.1 - "Antithrombin") und TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor), welcher vor allem den TF-FVIIa-FXa-Komplex inhibiert [Fujii – 2000; Wygrecka – 2004; Kobayashi – 1998; Yasui – 2000; de Moerloose – 1992]. Aktiviertes Protein C (APC) inaktiviert die Faktoren Va und VIIIa, reduziert die Produktion einiger inflammatorischer Zytokine und die PDGF-Expression (Platelet derived growth factor – potente mitogene Wirkung auf Fibroblasten) und ist weiterhin auch für die Inhibition von Plasminogen Aktivator Inhibitor (PAI-1) verantwortlich (Esmon – 2006; Shimizu – 2003; Wygrecka – 2008; D'Angelo - 1987). Ein Mangel an APC verursacht folglich eine erhöhte Aktivität von PAI und somit eine geringere fibrinolytische Kapazität.

Diese wird noch weiter reduziert durch die verminderte Produktion von u-PA und einer vermehrten Synthese von PAI (Plasminogen aktivator Inhibitor) und $\alpha 2$ -Plasmin Inhibitor, was in einer verstärkten Inhibition von Plasmin und u-PA/t-PA resultiert. [Idell – 1989a,b; Günther – 2000; Kotani - 1995].

Als Folge dieser Dysregulation wird intraalveolär Fibrin gebildet, welches unter anderem als Matrix für Fibroblasten dient, welche vermehrt einwandern und Kollagen produzieren, sowie einige weitere Wirkungen entfaltet.

1.2.5.1 – Auswirkung der Fibrinbildung auf das Surfactantsystem

Surfactant:

Die Alveolen der Lunge sind mit einer dünnen Schicht aus Phospholipiden und Proteinen, dem so genannten Surfactant, ausgekleidet [Weibel - 1968]. Dabei handelt es sich um ein Lipid-Protein-Gemisch, bestehend aus 90% Lipiden (meist Phospholipide) und 10% Proteinen, darunter den vier spezifischen Surfactant-Proteinen SP-A, SP-B, SP-C und SP-D [Goerke - 1998] (vgl. Abb. 17), welches von den Typ II Pneumozyten produziert und sezerniert wird [Zuo – 2008].

Die Hauptaufgabe des Surfactant besteht darin, die alveoläre Oberflächenspannung zu reduzieren und somit eine normale Lungenmechanik zu garantieren [Goerke - 1998].

Dies bedeutet einerseits einen geringeren Kraftaufwand zum Aufblähen der Lunge und eine erhöhte Compliance und andererseits eine Reduzierung des elastischen Rückzuges und Vermeidung des Kollapses der Alveolen während der Expiration [Lumb – 2005].

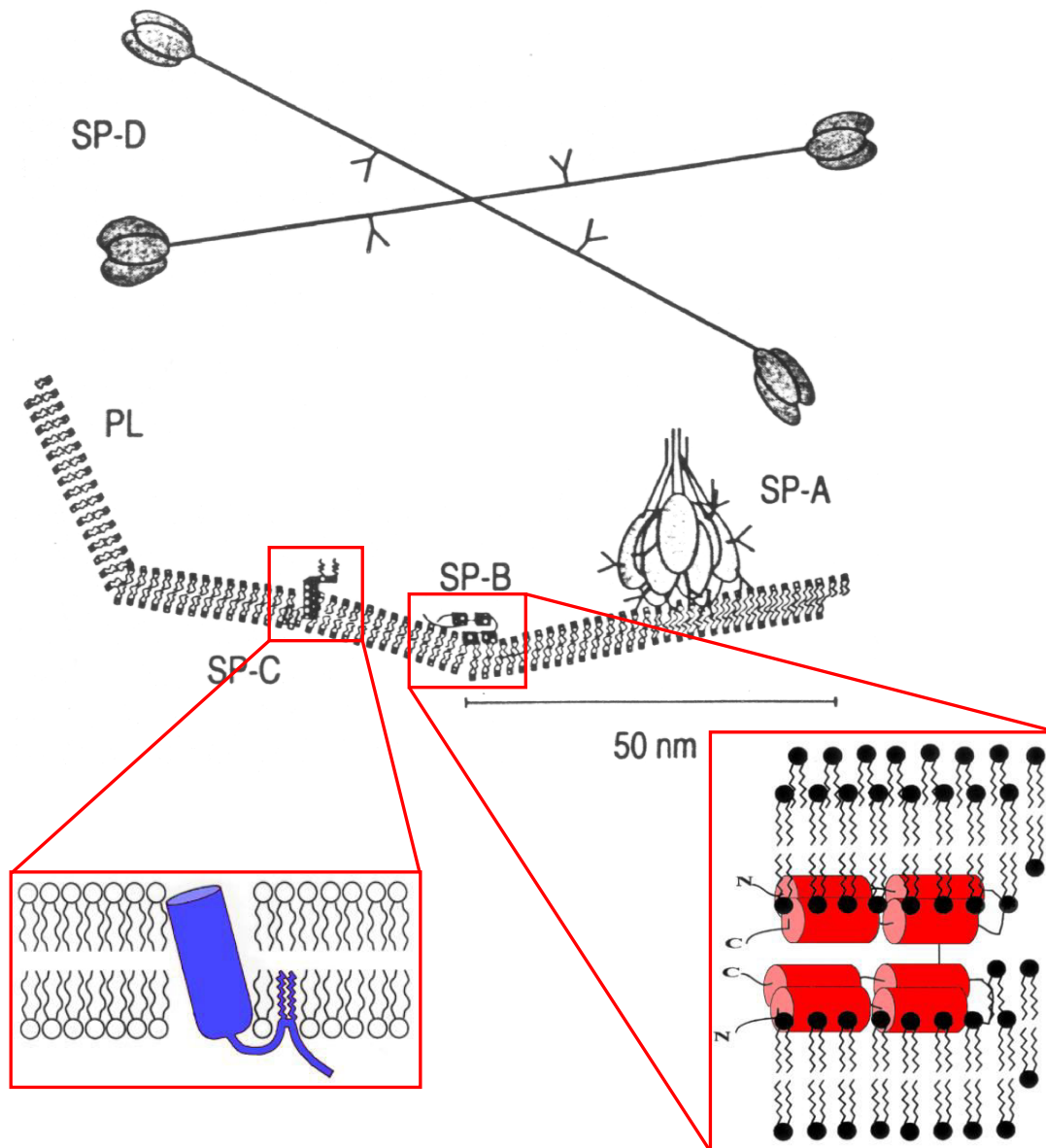


Abb. 17: Schematische Darstellung der Surfactantproteine.

Übersicht und Einzeldarstellung. SP = Surfactant Protein, PL = Phospholipide
Adaptiert aus Griesse - 1999.

Abgesehen von diesen Eigenschaften besitzt Surfactant noch einige andere Funktionen, wie zum Beispiel die Regulation des osmotischen Drucks (anti-Ödem-Faktor), die Erleichterung der mukoziliären Clearance, die Beseitigung von Fremdkörpern, sowie bei der unspezifischen Immunabwehr [Bilek – 2003; Frerking – 2001; Brown – 1993]. Ein Mangel an oberflächenaktivem Surfactant infolge fetaler Unreife führt zum neonatalen Atemnotsyndrom (IRDS) [Frerking - 2001]. Daneben kann Surfactant bei

bestimmten Erkrankungsbildern verändert und in seiner Funktion beeinträchtigt sein, was sich klinisch ebenfalls in Gasaustauschstörungen bemerkbar macht. Beispiele sind die Inaktivierung von Surfactant beim Mekoniumaspirationssyndrom oder die Schädigung durch Proteasen, Phospholipasen und reaktive Sauerstoffspezies bei inflammatorischen Lungenerkrankungen wie dem akuten Lungenversagen (*acute respiratory distress syndrome*, ARDS) oder Pneumonien [Günther – 2001; Rodriguez-Capote – 2006; Günther – 1999; Spragg – 2007]. Hierbei konnte gezeigt werden, dass insbesondere die Plasmaproteine, die über eine gestörte Barrierefunktion in den Alveolarraum gelangen maßgeblich zur Inhibition der Surfactantfunktion beitragen [Seeger – 1985; Günther – 1999]. Vergleichbare Veränderungen im Phospholipid-, Fettsäure- und Surfactantproteinprofil mit Verlust der Oberflächenspannungsregulation wurden auch bei Patienten mit chronisch interstitiellen Lungenerkrankungen festgestellt [Günther – 1999].

Auswirkung der Fibrinbildung:

Plasmaproteine, insbesondere Fibrin, besitzen (per se) eine starke Surfactant inhibitorische Aktivität. Darüberhinaus können für die Oberflächenspannungsregulation wichtige Surfactantkomponenten (PL, SPB, SPC) in Fibringerinnsel inkorporiert werden, was zu einem dauerhaften Verlust der Oberflächenaktivität in der Lunge mit Bildung von Atelektasen führt.

[Seeger - 1993; Burkhardt - 1989]. Durch ein Verkleben atelektatischer Alveolarwände durch Fibrin wird zudem eine provisorische Matrix gebildet, in die Fibroblasten einwandern und Kollagen produzieren können, und die als ein Reservoir für profibrotische Faktoren dient [Grainger - 1995; Burkhardt - 1989]. Darüber hinaus dienen Fibrin und seine Abbauprodukte als chemotaktische Proteine, die neutrophile Granulozyten anlocken [Leavell - 1996], die Gefäßpermeabilität [Dang - 1985] und die Migration und Proliferation von Entzündungszellen (Makrophagen) steigern [Ciano - 1986] (Vgl. Abb. 18).

Die Störung der Lungenmechanik durch die dysregulierte intraalveoläre Hämostase lässt sich durch die Korrelation von Lungenfunktionsparametern (FVC, TLC) mit anderen Parametern darstellen. Zum Einen mit der reduzierten Surfactantfunktion, dargestellt über eine verringerte Oberflächenaktivität und zum Anderen mit einer erhöhten Konzentration an D-Dimeren [Günther - 1999].

Trotz dieser vielfältigen Auswirkungen der intraalveolären Fibrinbildung muss angemerkt werden, dass Fibrinogen Knockout Mäuse nicht vor der Entwicklung einer Lungenfibrose nach Bleomycinapplikation geschützt sind und der Fibrinbildung somit nicht die Schlüsselrolle bei der Ausbildung einer Fibrose zugeschrieben werden kann [Hattori – 2000].

1.2.5.2 - Protease aktivierte Rezeptor (PAR-) vermittelte Effekte

Wie bereits in Kap. 1.1.7 - " Pathomechanismen" erwähnt, können Gerinnungsfaktoren auch zelluläre Effekte vermitteln. So können der TF/FVIIa-Komplex, Thrombin und Faktor Xa über Protease aktivierte Rezeptoren (PAR 1-4), einer Gruppe von G-Protein gekoppelten Rezeptoren, zu fibrotischen und inflammatorischen Effekten beitragen. Thrombin und FXa stimulieren über PAR-I die Proliferation von Fibroblasten und die Prokollagen Produktion [Chambers – 1998; Blanc-Brude - 2005] und Thrombin über PAR-I die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten [Bogatkevich - 2001]. Weiterhin kann durch die Aktivierung von PAR-I und -II durch Thrombin, FXa und den TF/FVII-Komplex die Expression von profibrotischen und –inflammatorischen Zytokinen erhöht werden [Chambers - 2000; Ludwicka-Bradley - 2000; Shimizu - 2004; Monroe - 2007; Wygrecka - 2008]. Zudem wird durch die FVII abhängige PAR-II Aktivierung die Proliferation von Fibroblasten und die Produktion von extrazellulärer Matrix gesteigert [Wygrecka - 2011].

Abgesehen von den dargestellten Effekten besitzen die PAR noch weitere Funktionen, wie z.B. vielfältige Effekte auf die Gefäße (Regulation des Gefäßtonus, Induktion von Endothelproliferation) und auf Immunkompetente Zellen (Aktivierung von Monozyten, T-Lymphozyten und Mastzellen mit Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen), sowie die Freisetzung u.a. von PDGF und TGF- β [Ruppert – 2008].

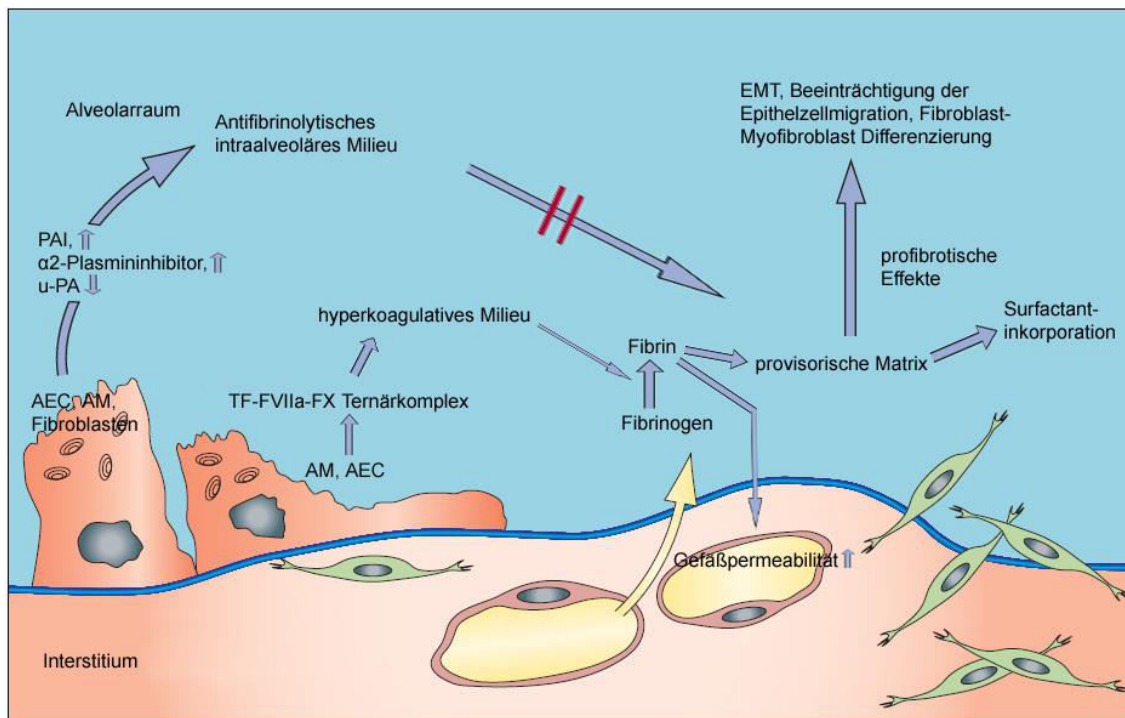


Abb. 18: gestörte intraalveoläre Hämostase und Effekte von Fibrin.

Aktivierte Alveolarmakrophagen (AM) und Alveolarepithelzellen (AEC) bilden prokoagulatorische und antifibrinolytische Substanzen. Übertritt von Fibrinogen in den Alveolarraum und Formation einer provisorischen Matrix. Surfactant wird in die Matrix inkorporiert und funktionslos. Die persistierende Matrix, sowie die Proteasen der Gerinnungskaskade lösen verschiedene profibrotische Mechanismen aus, wie z.B. die Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT). PAI = Plasminogen aktivator Inhibitor; u-PA = urokinase Typ Plasminogen Aktivator. Übernommen aus King – 2011.

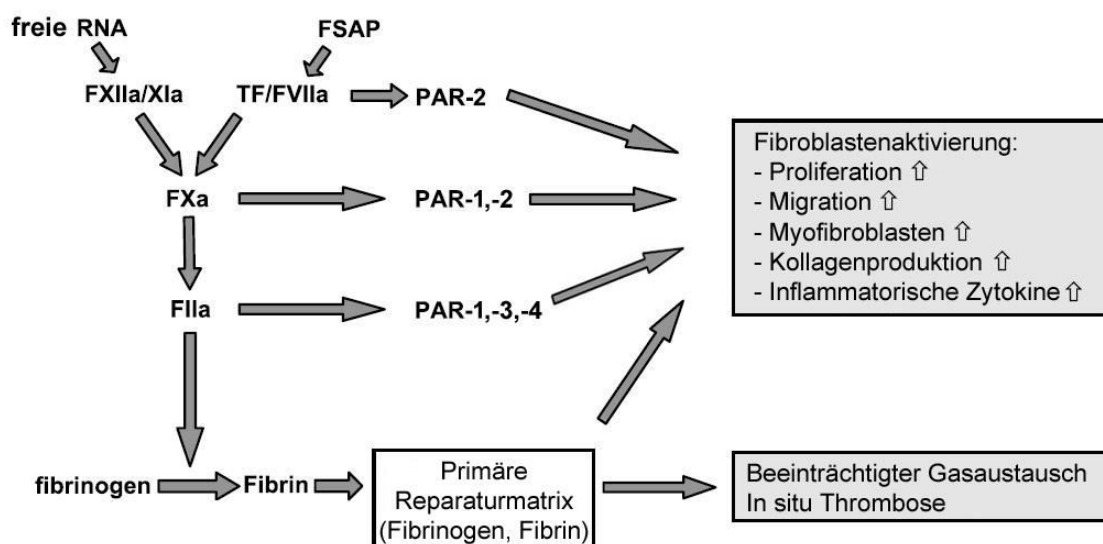


Abb. 19: Schematische Übersicht über PAR-vermittelte profibrotische Prozesse

Die vier bekannten PAR unterscheiden sich in ihrer Sensitivität und Spezifität für unterschiedliche Proteasen. Thrombin aktiviert vornehmlich PAR-1; -3 und -4, FXa vor allem PAR-1 und -2 und TF/FVIIa PAR-2.

Übernommen aus Ruppert – 2008.

1.2.6 – Antikoagulation als neues Therapieprinzip bei akuten und chronischen interstitiellen Lungenerkrankungen

Ausgehend von der Bedeutung der Gerinnungsveränderungen bei der Pathogenese der IPF wurden verschiedene antikoagulative Strategien entwickelt und an tierexperimentellen Modellen untersucht.

TFPI / inaktivierter FVIIa:

Eine Studie von Creasey et al (1993) bei Pavianen mit Sepsis und nachfolgender Infusionsbehandlung mit TFPI zeigte eine verlängerte Überlebenszeit und eine Reduktion des sepsisverursachten Organschadens.

Auch bei Ratten mit einem LPS-verursachten Lungenschaden und vorheriger und nachfolgender Behandlung mit TFPI konnte eine verminderte Schädigung und eine Reduktion des TNF- α , [Enkhbaatar – 2000], sowie bei einer Behandlung mit inaktiviertem FVIIa eine verminderte alveoläre Inflammation, Fibrinablagerung und reduzierte Spiegel von IL-1 und IL-6 aufgezeigt werden [Miller – 2002].

Aktiviertes protein C (APC):

Untersuchungen an Ratten bzw. Mäusen konnten für eine Behandlung mit APC einen schützenden Effekt vor Lungenödemen, interstitieller Granulozyteninfiltration und einen verminderten Anstieg von TNF- α [Murakami - 1997], beziehungsweise eine verminderte Lungenfibrose, Expression von IL-1 und erhöhter Plasminogenaktivator-Aktivität nachweisen [Yasui - 2001].

Heparin:

Versuche mit Heparin bei Kaninchen mit Bleomycin-induzierter Lungenfibrose, per Inhalation unter Spontanatmung verabreicht [Günther – 2003], zeigten eine signifikante Abmilderung der Lungenfibrose, u.a. durch verbesserte Compliance, Reduktion der histologischen Abnormalitäten, wie Ablagerung von Extrazellulärmatrix, und Reduktion des löslichen Kollagens in BAL-Flüssigkeit.

Antithrombin (AT)

Eine Studie mit LPS-verursachtem Lungenschaden bei Ratten und i.v. Behandlung mit AT konnte eine Reduktion des Gefäßschadens, der vaskulären Permeabilität und der Leukozytenakkumulation aufzeigen, jedoch war hierfür eine weit höhere Dosis nötig als sie für antikoagulative Effekte benötigt wird [Okajima - 1998]. Eine Untersuchung an Kaninchen konnte bei kombinierter Behandlung eines LPS-verursachten Lungenschadens mit AT und C1-Esterase-Inhibitor eine reduzierte Fibrinablagerung und Gefäßpermabilität nachweisen [Giebler – 1999].

Direkte Thrombininhibitoren:

In einer Studie von Howell et al (2001) konnte gezeigt werden, dass der direkte Thrombininhibitor UK-156406 bei der Bleomycin induzierten Lungenfibrose bei Ratten signifikant die Thrombin induzierten Effekte (wie Fibroblastenproliferation, Prokollagen Produktion u.a.) reduziert, insofern er in äquimolarer Menge zu Thrombin vorhanden ist. Auf die Rekrutierung von Entzündungszellen konnte kein Einfluss festgestellt werden.

Ebenso konnte bei einem LPS-verursachten Lungenschaden eine verminderte Produktion von PAR-1 und reduzierte Freisetzung von TNF- α und MMP 12 aufgezeigt werden [Bao - 2012].

Auch für Dabigatran wurden antifibrotische und antiinflammatorische Effekte im Mausmodell der bleomycininduzierten Lungenfibrose nachgewiesen [Bogatkevich – 2011].

Ausgehend von den positiven Effekten in Tierversuchen wurden diverse klinische Studien angestrengt:

Für TFPI konnte bei Patienten mit schwerer Sepsis und ARDS eine verringerte Lungendysfunktion und ein verbessertes Überleben gezeigt werden [Abraham – 2001].

In der großen Kybersept Studie [Warren – 2001] zeigte die Behandlung mit AT von Patienten mit schwerer Sepsis eine Verringerung der Prävalenz von neu auftretender pulmonaler Dysfunktion, sowie eine höhere 90-Tage Überlebensrate, jedoch auch vermehrt Blutungskomplikationen bei Kombinationsbehandlung mit Heparin.

Die PROWESS-Studie [Bernard – 2001], ebenfalls bei Patienten mit schwerer Sepsis durchgeführt, zeigte, dass APC zu einem verbesserten Überleben, einem schnelleren Rückgang von pulmonaler Dysfunktion sowie einer Erhöhung der Anzahl

beatmungsfreier Tage führt, jedoch auch gesteigerte Blutungskomplikationen mit sich bringt, welche mit zusätzlichen invasiven Prozeduren zusammenhängen. In weiteren Studien wurde dies untersucht und die PROWESS-SHOCK-Studie [Ranieri - 2012] konnte nachweisen, dass die Anwendung von APC keine signifikante Reduktion der Mortalität bewirkt.

In einer Studie von Kubo et al (2005) wurde eine Monotherapie der IPF mit Prednisolon verglichen mit einer Therapie mit Prednisolon und Warfarin bei ambulanten Patienten, sowie mit Prednisolon und niedermolekularem Heparin bei stationär aufgenommenen Patienten. Die zusätzliche antikoagulatorische Therapie zeigte einen signifikant positiven Effekt auf das Patientenüberleben nach akuten Exazerbationen.

Auch eine Studie von Watanabe et al (2011) zeigte einen positiven Effekt auf das Überleben bei Behandlung von schnell voranschreitenden interstitiellen Lungenerkrankungen bei Behandlung mit Dalteparin bzw. Warfarin im Vergleich zur Standardtherapie.

Einer aktuellen Studie von Noth et al (2012) zufolge zeigte sich jedoch bei der Therapie mit Warfarin eine erhöhte Mortalität bei fehlendem Benefit.

In einer Verträglichkeitsstudie von Markart et al (2010) konnte bei der Verabreichung von Heparin per Inhalation bei gesunden Probanden und IPF-Patienten eine gute Verträglichkeit des Wirkstoffes ohne unerwünschte Nebenwirkungen nachgewiesen werden.

2 Material & Methoden:

2.1 - Material

2.1.1 - Tierversuche

Geräte/Instrumente:

Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg,
Deutschland	
Wasserbad	Julabo GmbH, Seeldorf, Deutschland
Waage: Mettler PJ 600	Mettler Instrumente GmbH, Gießen, Deutschland
Stereomikroskop: Durchlicht, DMLA	Leica, Nussloch, Deutschland
Mikroskopieröl	March, Darmstadt, Deutschland
Kaltlichtlampe: KL 200	Schott AG, Mainz, Deutschland
Paralux Loupe TPS Bino Bras Article 20x	Paralux, Geispolsheim, Frankreich
Beatmungsgerät: MiniVent, Type 845	Hugo Sachs Elektronik, March- Hugstetten, Deutschland
Heizplatte: Desaga Thermoplate S	Desaga GmbH, Heidelberg,
Deutschland	
Mikrooperationsbesteck: Pinzetten, Scheren;	Aesculap AG, Tuttlingen,
Deutschland;	
Präparationsbesteck	FST (Fine Science Tool), Heidelberg, Deutschland
Bodyplethysmograph: Robertson-Box	Boehringer Ingelheim GmbH,
Ingelheim,	Deutschland
Medizinischer O ₂	Linde AG, Mainz Kostheim,
Deutschland	
Zentrifuge: Hettich Mikro 200R	Hettich GmbH, Tuttlingen,
Deutschland	
Vortexer: REAX 2000	Heidolph Instruments GmbH,
Schwabach,	Deutschland
Microsprayer: High Pressure Syringe FMJ-250;	Penn-Century Inc., Pennsylvania,
USA	
Intratracheal Aerosolizer IA-1C	

Injektionslösungen und Substanzen:

Ketaminhydrochlorid (100mg/ml)

Deutschland

Physiologische Kochsalzlösung

Sevofluran

Deutschland

Xylazinhydrochlorid

Düsseldorf,

Xylocain-Lösung - 2%

Deutschland

Heparin-Natrium

Deutschland

0,9%ige NaCl-Lösung

Lepirudin

Bleomycin

Bela-pharm GmbH, Vechta,

Braun Melsungen AG, Melsungen,

Deutschland

Abbott GmbH, Wiesbaden,

Ceva Tiergesundheit GmbH,

Deutschland

AstraZeneca GmbH, Wedel,

Ratiopharm GmbH, Ulm,

Baxter Deutschland GmbH,

Unterschleißheim, Deutschland

Schering AG, Berlin, Deutschland

Hexal AG, Holzkirchen, Deutschland

Verbrauchsmaterial:

Altromin Standarddiätfutter

Einmalhandschuhe Nobaglove^R

Wetter,

Einmalspritze, 1ml, 20 ml (Inject Luer^R)

Greiner Tubes (15 ml)

Frickenhausen,

Haushaltsbindfaden Nr.12

Heidelberger Verlängerung

Hailer,

Kanüle: 26G1/2; 20G1/2 (BD Microlance^R)

USA

Mulltupfer, pflaumengroß

Eppendorf-Cups

Altromin Spezialfutter GmbH, Lage,

Deutschland

Noba Verbandmittel Danz GmbH,

Deutschland

Braun Melsungen AG, Melsungen,

Deutschland

Greiner Bio One GmbH,

Deutschland

M.Schilling GmbH, Gelnhausen-

Deutschland

Beckton-Dickinson, New Jersey,

Beese GmbH, Barbüttel

Eppendorf AG, Hamburg,

Deutschland

Flüssiger Stickstoff

Messer GmbH, Griesheim,

Deutschland

Venenverweilkanüle: 20G (Vasocan Braunüle^R)
Deutschland

Leukosilk® Pflaster

BSN Medical GmbH, Hamburg,
Deutschland

Pipettenspitzen

Sarstedt AG, Nümbrecht,

Deutschland

2.1.2 - PTT-Messung

Geräte/Instrumente:

Pipetten

Eppendorf AG, Hamburg,

Deutschland

Vortex-Genie 2

Scientific Industries, New York, USA

Amelung Coagulometer KC1A; Küvetten;

Amelung GmbH, Lemgo,

Deutschland

Messkugeln

Magellan-Software

Tecan Group Ltd., Männedorf,

Schweiz

Substanzen:

Pathromtin SL

Dade Behring Marburg GmbH,

Marburg,

Deutschland

Calcium Chlorid Lsg. 0,025M

Dade Behring Marburg GmbH,

Marburg,

Deutschland

Heparin-Natrium

Ratiopharm GmbH, Ulm,

Deutschland

0,9%ige NaCl-Lösung

Baxter Deutschland GmbH,

Unterschleißheim, Deutschland

Lepirudin

Schering AG, Berlin, Deutschland

Humanplasma, gepoolt von gesunden Spendern

Verbrauchsmaterialien:

Eppendorf-Cups

Deutschland

Einmalhandschuhe Nobaglove^R

Wetter,

Pipettenspitzen

Deutschland

Eppendorf AG, Hamburg,

Noba Verbandmittel Danz GmbH,

Deutschland

Sarstedt AG, Nümbrecht,

2.1.3 - Lösliches Kollagen**Geräte/Instrumente:**

Pipetten

Deutschland

Vortex-Genie 2

Shaker: Heidolph Duomax 1030

Schwabach,

Zentrifuge: Hettich Mikro 200R

Deutschland

Spectrophotometer Nanodrop 2000c

Erlangen,

ELISA-Reader: Spectra Fluor Plus

Crailsheim,

Eppendorf AG, Hamburg,

Scientific Industries, New York, USA

Heidolph Instruments GmbH,

Deutschland

Hettich GmbH, Tuttlingen,

PEQLAB Biotechnologie GmbH,

Deutschland

Tecan, Deutschland GmbH,

Deutschland

Substanzen:

0,9%ige NaCl-Lösung

Sircol Kollagen Assay S5000

Baxter Deutschland GmbH,

Unterschleißheim, Deutschland

Biocolor Ltd., Carrickfergus,

Großbritannien

Verbrauchsmaterialien:

Eppendorf-Cups

Deutschland

Messküvetten

Deutschland

Eppendorf AG, Hamburg,

Sarstedt AG, Nümbrecht,

Einmalhandschuhe Nobaglove^R
Wetter,
Pipettenspitzen
Deutschland

Noba Verbandmittel Danz GmbH,
Deutschland
Sarstedt AG, Nümbrecht,

2.1.4 - Hydroxyprolin

Geräte/Instrumente:

Trockenschrank: Typ UT6

Heraeus Holding GmbH, Hanau,
Deutschland

Heizblock: VLM EC2

VLM GmbH, Bielefeld, Deutschland

Shaker: Heidolph Duomax 1030
Schwabach,

Heidolph Instruments GmbH,
Deutschland

Zentrifuge: Hettich Mikro 200R
Deutschland

Hettich GmbH, Tuttlingen,

Vortex-Genie 2

Scientific Industries, New York, USA

Precellys Gewebekomogenisator
Erlangen,

PEQ Lab Biotechnologie GmbH,
Deutschland

ELISA-Reader: Spectra Fluor Plus
Crailsheim,

Tecan, Deutschland GmbH,
Deutschland

Substanzen:

Quickzyme Hydroxyprolin Assay Kit

QuickZyme Biosciences, Leiden,
Niederlande

Salzsäure, HCL 32%
Deutschland

Carl Roth GmbH, Karlsruhe,

Aqua dest.

Braun Melsungen AG, Melsungen,
Deutschland

Verbrauchsmaterialien:

ELISA 96-well-Platten
Deutschland

Sarstedt AG, Nümbrecht,

Eppendorf-Cups
Deutschland

Eppendorf AG, Hamburg,

Precellys Ceramic Beads - 1,4mm; 2,8mm
 Erlangen,
 Micro Packaging Vials 2ml
 Erlangen,
 Micro Packaging Vial Closure
 Erlangen,
 Einmalhandschuhe Nobaglove^R
 Wetter,
 Pipettenspitzen
 Deutschland

PEQ Lab Biotechnologie GmbH,
 Deutschland
 PEQ Lab Biotechnologie GmbH,
 Deutschland
 PEQ Lab Biotechnologie GmbH,
 Deutschland
 Noba Verbandmittel Danz GmbH,
 Deutschland
 Sarstedt AG, Nümbrecht,

2.1.5 Histologie

Geräte:

Heizplatte

 Kühlplatte (EG 1150 C)
 Digitaler Objektträger-Scanner:
 Mirax-Desk mit AxioVision® Software
 Paraffinausgießstation (EG 1140 H)
 Paraffinstreckbad (HI 1210)
 Rotationsmikrotom, vollautomatisch
 Vakuumgewebefixationsautomat (TP 1050)
 Wasserbad
 Waage: Mettler PJ 600

 Zentrifuge: Tharmac - Cellspin I
 Deutschland

Leica Microsystems, Nussloch,
 Deutschland
 Leica Microsystems, Nussloch
 Zeiss AG, Göttingen, Deutschland

 Leica Microsystems, Nussloch
 Leica Microsystems, Nussloch
 Leica Microsystems, Nussloch
 Leica Microsystems, Nussloch
 Leica Microsystems, Nussloch
 Mettler Instrumente GmbH, Gießen,
 Deutschland
 Tharmac GmbH, Waldsolms,

Verbrauchsmaterial:

Einmalhandschuhe Nobaglove^R
 Wetter,
 Deckgläser, 24x36 mm

Noba Verbandmittel Danz GmbH,
 Deutschland
 R. Langenbrinck, Emmerdingen,
 Deutschland

Einbettkassetten mit Deckel
Staufen,
Eindeckmedium, Xylol-löslich (Pertex^R)
Deutschland
Mikrotomklingen S35

Objektträger (Super Frost Plus^R)

Paraffin Einbettmedium (Paraplast Plus^R)

Filterpapier
München,

Chemikalien/Reagenzien:

PBS

Aqua dest.

Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat
Deutschland
Ethanol (70 %,95 %, 99,6 %)

Isopropanol (99,8 %)
Buchs,
Kaliumhydrogenphosphat, pro analysi
Deutschland
Natriumchlorid, pro analysi
Deutschland
Roti®-Histofix 4,5%
Deutschland
Xylol
Deutschland
Hämatoxylin
Hämalaun, sauer nach Mayers

Sakura Finetek Germany GmbH,
Deutschland
Medite GmbH, Burgdorf,

Feather, Japan (über Produkte für die
Medizin AG, Köln, Deutschland)
R. Langenbrinck, Emmerdingen,
Deutschland
R. Langenbrinck, Emmerdingen
Deutschland
Bio Rad Laboratories GmbH,
Deutschland

PAA Laboratories GmbH, Pasching,
Österreich
Braun Melsungen AG, Melsungen,
Deutschland
Merck KGaA, Darmstadt,

Fischer Scientific GmbH, Schwerte,
Deutschland
Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
Schweiz
Merck KGaA, Darmstadt,

Carl Roth GmbH, Karlsruhe,

Carl Roth GmbH, Karlsruhe,

Carl Roth GmbH, Karlsruhe,

Polysciences Inc., Pennsylvania, USA
Waldeck GmbH, Münster,

Shandon Eosin Y, alkoholisch USA	Deutschland Thermo Scientific, Massachusetts,
Ponceau de Xylidine	Waldeck GmbH, Münster, Deutschland
Säurefuchsin	Waldeck GmbH, Münster, Deutschland
Phosphorwolframsäure Deutschland	Merck KGaA, Darmstadt,
Orange G	Waldeck GmbH, Münster, Deutschland
Lichtgrün SF	Waldeck GmbH, Münster, Deutschland
Essigsäure (Eisessig) Deutschland	Merck KGaA, Darmstadt,
Eisen(3)-chlorid-Lösung 29%ig Deutschland	Merck KGaA, Darmstadt,
Salzsäure Deutschland	Carl Roth GmbH, Karlsruhe,
Roti®-Histofix 4,5% Deutschland May-Grünwald Lsg. Deutschland	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Merck KGaA, Darmstadt,
Giemsa Lsg. Deutschland	Merck KGaA, Darmstadt,

2.2 - Modell der Bleomycin induzierten pulmonalen Fibrose

Zur Untersuchung der Auswirkungen von Lepirudin wurde das Modell der Bleomycin induzierten Lungenfibrose verwendet, da es ein häufig verwendetes, etabliertes und gut erforschtes Modell ist.

2.2.1 – Versuchstiere

Für die Versuche wurden männliche Mäuse des Zuchtstammes C57Bl6/N mit einem Gewicht von 18-22 g zu Versuchsbeginn verwendet. Das Gewicht wurde vor Versuchsbeginn genau bestimmt, um in der späteren Compliance-Messung eingerechnet werden zu können. Zuchtbetrieb und Lieferant der Tiere war Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland. Die Versuchstiere wurden für die Dauer der Versuche im Tierstall des Zentrums für Innere Medizin der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums Giessen gehalten.

Die Fütterung erfolgte mit Altromin^R Standarddiätfutter ad libidum. Die Tiere hatten jederzeit unbegrenzten Zugang zu Leitungswasser. Die Umgebungstemperatur betrug im Mittel 25 °C. Die Beleuchtungsdauer im Tierstall betrug 12 Stunden pro Tag.

2.2.2 - Tierversuchsgenehmigung

Die durchgeführten Versuche wurden durch das Regierungspräsidium Gießen genehmigt. Der hierfür geltende Tierversuchsantrag kann unter dem AZ: Gi20/10 Nr. 08/2003 eingesehen werden. Für die vorliegende Arbeit wurden die dort gesammelten und archivierten Proben weiter aufgearbeitet und analysiert.

2.2.3 - Bleomycinapplikation

Bleomycin wurde als intratracheales Aerosol in einer Dosierung von 5U/kg verabreicht.

Ansetzen der Bleomycin Stammlösung 2U/ml:

Eine Flasche Bleomycin (15U) wurde in 7,5ml isotoner 0,9% Kochsalzlösung (NaCl) aufgelöst was eine Stammlösung von 2U/ml ergab. Daraus wurde eine Bleomycin Applikationslösung, abhängig vom Gewicht der Mäuse, wie in Tab. 6 dargestellt, angesetzt.

Zur Bleomycin Applikation wurden die Mäuse zunächst mittels Inhalationsnarkose narkotisiert. Dazu wurde die Maus in eine geschlossene Narkose-Box aus Plexiglas gesetzt, die 3-4% Isofluran mit Sauerstoff enthielt. Sobald der Umdrehreflex erlosch, konnten die Tiere aus der Narkose-Box herausgenommen werden. Anhand des Zwischenzehenreflexes wurde zusätzlich überprüft, ob die nötige Narkosetiefe erreicht war. Das Tier wurde dann unter dem Mikroskop orotracheal intubiert. Anschließend erfolgte über den Tubus die Verabreichung des Bleomycin Aerosols, mittels eines

Microsprayers. Der Applikationsvorgang selbst nahm nur max. 2 Sekunden in Anspruch. Danach wurden die Tiere nötigenfalls beatmet und dann extubiert. Anschließend wurden die Tiere für fünf Stunden intensiv nachbeobachtet und schließlich in die Käfige zurückgebracht. Dort galten die gleichen Bedingungen wie vor Versuchsbeginn (Futter und Wasser ad libitum).

Gewicht	U Bleo total/Maus	Stamm Lösung [µl]	NaCl [µl]	Zu applizierendes Volumen [µl]	Bleomycin -dosis
15g (14-17,9g)	0,075	37,5	162,5	200	5U/kg
20g (18-22,9g)	0,1	50	150	200	5U/kg
25g (23-27,9g)	0,125	62,5	137,5	200	5U/kg

Tab. 6: Anzusetzende Bleomycin Applikationslösungen

2.3 – Lepirudinapplikation

Für Versuche zur Dosisbestimmung wurden Lepirudin Applikationslösungen nach folgendem Schema angesetzt:

Ein Fläschchen Refludan® mit 20mg Lepirudin wurde in 750µl A.dest aufgelöst. Dies ergab eine Stammlösung mit einer Konzentration von 26,67mg/ml.

Davon ausgehend wurden durch Verdünnung mit isotoner NaCl-Lösung folgende Applikationslösungen hergestellt, von denen jeweils 150µl pro Maus verabreicht wurden.

Konzentration Ausgangslösung	Verdünnung mit NaCl	Neue Konzentration Applikationslösung	Dosis bei 150 µl Applikationsvolumen
26,67mg/ml	1:1	13,33mg/ml	2mg/Maus = 100mg/kg
13,33mg/ml	1:1	6,67 mg/ml	1mg/Maus = 50mg/kg
6,67mg/ml	1:4	1,33 mg/ml	200µg/Maus = 10mg/kg
1,33 mg/ml	1:1	0,67 mg/ml	100µg/Maus = 5mg/kg

Tab. 7: Lepirudin Applikationslösungen mit unterschiedlicher Wirkstoffkonzentration

Für die therapeutische Intervention im Bleomycin Modell wurde den Mäusen jeden zweiten Tag 150µl einer Applikationslösung mit 13,33mg/ml, entsprechend 100mg/kg, verabreicht.

2.4 – Gewichtsbestimmung

Das Gewicht der Versuchstiere wurde in den Hauptversuchen an Tag 0, 7, 14 und 21 bestimmt.

2.5 – Compliancemessung und Probeentnahme am Ende einer Versuchsreihe

Die funktionelle Charakterisierung mittels Compliancemessung und die Organentnahme erfolgte in allen Versuchsreihen am Tag 21 nach Bleomycinexposition. Hierzu wurden die Tiere mittels intraperitonealer Applikation von 0,05 ml eines Gemisches aus Ketaminhydrochlorid (100mg/ml) und Xylazinhydrochlorid narkotisiert. Das solcherart sedierte, relaxierte und analgisierte Tier wurde dann tracheotomiert. Dazu wurde das Operationsgebiet mit 2%-iger Xylocain-Lösung zunächst unterspritzt. Nach etwa 3 Minuten Einwirkzeit wurden die Haut und Faszien median gespalten. Die Trachea wurde quer inzidiert und ein Beatmungstubus in die Trachea eingeführt. Nach Umlagerung in eine Robertsonbox (Ganzkörperbodyplethysmograph) wurden die narkotisierten und muskelrelaxierten Tiere dann volumenkontrolliert mit einem konstanten Atemzugvolumen von 200 μ l beatmet und der intrathorakale Beatmungsdruck für die folgende Compliance-Bestimmung gemessen. Die Compliance errechnete sich als Quotient aus Volumen und Beatmungsdruck, wurde auf das Gewicht der Tiere bezogen und ist in kPa/ml/kg angegeben.

Die Mäuse wurden nachfolgend mittels eines Gemisches aus Ketanest und Rompun in tiefer Narkose getötet.

Anschließend wurde die Maus auf einer Präparierunterlage fixiert und das Abdomen eröffnet. Entlang der Rippenbögen wurden Entlastungsschnitte gesetzt. Das Brustbein wurde mit Hilfe einer Pinzette angehoben und vorsichtig mit einer Irisschere das Zwerchfell entfernt ohne die Lunge zu verletzen. Nun wurde das Brustbein mittig mit der Schere durchtrennt. Die linke Lunge wurde mit einer Klemme am Hauptbronchus abgeklemmt und die rechte Lunge nach dem Einführen einer rosa Braunüle in die Trachea mit 3 Mal 350 μ L NaCl gespült (jedes Mal Lösung 3x in Lunge hineingeben und wieder mit Spritze aspirieren). Die gesammelte Lavageflüssigkeit wurde in ein Eppendorf-Cup gegeben und auf Eis gestellt.

Anschließend wurde die Klemme vom linken Hauptbronchus entfernt und die rechte Seite der Lunge ebenfalls am Hauptbronchus damit abgeklemmt. Die rechte Lunge

wurde entfernt, in ein weiteres Eppendorf-Cup gegeben und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Nun wurde die linke Lunge über das Herz blutleer gespült. Dazu wurde eine Inzision im linken Ventrikel gesetzt, mit einer Kanüle in den rechten Ventrikel eingestochen und dann mit 10-20ml NaCl gespült. Die auf diese Weise blutleer gespülte Lunge wurde nun mit Formalin (RotiHistofix 4,5%) gefüllt. Dazu wurde das Formalin über die Braunüle in der Trachea mit einem Druck von 20cm Wassersäule in die Lunge geleitet, bis diese sich vollständig entfaltet hatte. Anschließend wurden Trachea oder Hauptbronchus abgebunden, die Lunge vorsichtig herauspräpariert und in ein mit Formalin (RotiHistofix 4,5%) gefülltes Falcon Cup gegeben. Das Gewebe wurde 12-24 Stunden im Formalin belassen und anschließend in eine Einbettkassette überführt und in PBS bis zur Entwässerung im Kühlraum aufbewahrt. Die Entwässerung erfolgte dann über Nacht im geschlossenen Vakuum-Gewebefixationsautomaten. Am Folgetag wurde das Lungengewebe in Paraffin eingegossen und 3µm dünne Schnitte mittels eines Mikrotoms hergestellt.

Nach Beendigung der Probeentnahme wurde die BAL zur Bestimmung der Zellen zentrifugiert (4°C, 10 min., RZB=300xg). Der Überstand wurde in ein Eppendorf-Cup überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.6 - Differenzialzellbild

2.6.1 – Anfertigen der Zytospins

Das Pellet der BAL Zellen nach Zentrifugation wurde mit 1ml NaCl resuspendiert. 100µl und 150µl des resuspendierten Pellets wurden auf einen mit aufgelegtem Filter versehenen Objektträger gegeben und zentrifugiert (5 min., RZB=300xg). Die Objektträger wurden an der Luft trocknen gelassen und in einer Präparatmappe aufbewahrt.

2.6.2 – Färbung der Zytospins und Auszählung

Die Zytospins wurden mit der Färbetechnik nach May-Grünwald Giemsa gefärbt (vgl. Tab.8).

Die Auszählung erfolgte bei 100-facher Vergrößerung. Es wurden Makrophagen, Polymorphkernige Neutrophile und Lymphozyten in nebeneinander liegenden Sichtfeldern gezählt, bis man eine Gesamtzahl von 100 erreicht hatte. Dieser Vorgang

wurde 1 Mal an einer anderen Stelle des Cytospins wiederholt. Aus beiden Zählungen wurde ein Mittelwert gebildet.

5 Minuten	May-Grünwald (Merck) unverdünnt
Spülen	A.dest.
10 Minuten	Giemsa (Merck) 1:20 verdünnt mit A.dest
Spülen	A.dest.
	Trocknen

Tab. 8: Färbetechnik nach May-Grünwald Giemsa

2.7 - Lepirudin Aktivitätsbestimmung aus BAL-Flüssigkeit mittels PTT

Prinzip:

Zur Bestimmung der Lepirudinaktivität in der BAL wurde die partielle Thromboplastinzeit (PTT) mit einem Amelung Kugelkoagulometer bestimmt. Hierzu wurde die BAL mit Citratplasma und Patromthin Reagenz versetzt und die Zeit vom Einleiten der Gerinnung bis zur Fibrinbildung gemessen.

Herstellung der Standards:

Als Standards wurde eine Lepirudinlösung (Refludan®) verwendet, die mit NaCl auf 8/4/2/1/0,5/0,25/0,125 µg/ml verdünnt wurde.

Die Proben (BAL) wurden über serielle Verdünnungen so stark verdünnt, bis sie im Bereich der Standardkurve lagen.

Durchführung:

80µl Plasma Pool + 80µl Standard/Probe (BAL) wurden in Eppendorf Cups gemischt.

Davon wurden 150µl in die Küvette des Kugel-Koagulometers pipettiert und 100µl Pathromtin-Reagenz sowie ein Stahlkugelchen hinzugegeben.

Die befüllte Küvette wurde nun 2 min. bei 37°C vorinkubiert.

Nach Zugabe von 100µl Calciumchlorid Lösung wurde die Zeitmessung gestartet.

Durch die Gerinnung der Probe wird das Metallkugelchen in der sich drehenden Küvette aus der Messposition entfernt und die Zeitmessung angehalten. Die gemessene Zeit wurde notiert. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

Aus den für die mitgeführten Standardlösungen gemessenen Gerinnungszeiten wurde eine Standardkurve erstellt mit deren Hilfe die ermittelten Probenwerte computergestützt ausgewertet wurden.

2.8 - Bestimmung des Gehaltes an löslichem Kollagen in BAL Flüssigkeit

Die Bestimmung des löslichen Kollagens erfolgte mit dem Sircol Soluble Collagen Assay S5000 der Firma Biocolor Ltd..

Prinzip:

Das in der Lavageflüssigkeit enthaltene Kollagen wird mit dem Reagenz zu einem Farbstoff umgesetzt, der photometrisch vermessen werden kann.

Durchführung:

In je zwei Eppendorf Cups wurden für die Erstellung einer Standardkurve 2,5/5/10/25/50/100µl der Kollagen-Stammlösung gegeben, entsprechend 2,5/5/10/25/50/100µg Kollagen. Die Cups wurden mit 0,9% NaCl zu einem Volumen von 100µl aufgefüllt. Für die Probenanalyse wurden von jeder BAL 100µl in Cups gegeben. Für die Leerwertkontrollen wurde 100µl 0,9% NaCl in die Cups pipettiert. Zu jedem Cup wurde 1ml Sircol Dye Reagent zugefügt und anschließend für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken inkubiert. Während dieser Zeit verbindet sich das Farbreagenz mit löslichem Kollagen und dieser Komplex präzipitiert. Im Anschluss wurden die Cups bei 15000g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt, der Kollagen-Farbstoff-Komplex verblieb. Nun wurde zu jedem Cup 1ml Alkali Reagenz zugefügt und für 10 Minuten gevortext. Danach wurde die entstandene Lösung in Küvetten verbracht und die Absorption photometrisch bei 540nm Wellenlänge im Vergleich zu Luft gemessen.

Die gemessenen Absorptionswerte wurden anhand der Standardkurve computergestützt ausgewertet.

2.9 - Bestimmung des Kollagengehaltes von Lungengewebe mittels Hydroxyprolinbestimmung

Für die Bestimmung des Hydroxyprolingehaltes wurde ein Hydroxyprolin Assay-Kit der Firma Quickzyme Biosciences, Leiden, Holland verwendet.

Prinzip:

Hydroxyprolin ist eine nicht proteinogene Aminosäure, die in Elastin und v.a. Kollagen vorkommt. Bei Gewebshydrolysaten kann es zur Bestimmung des Kollagengehaltes herangezogen werden. Mit dem Assay wird ein Chromogen gebildet, das photometrisch quantifiziert werden kann.

Durchführung:

Vor Durchführung des Assays wurden das Gewicht der Lunge und des zur Analyse eingesetzten Gewebestückes bestimmt um den Hydroxyprolingehalt später auf die ganze Lunge beziehen zu können. Etwa 1/3 einer Lunge wurde mit 1ml 6M HCl versetzt und mit einem Precellys Gewebehomogenisator zerkleinert. Anschließend erfolgte ein Verkochen der Probe für 24h bei 90°C zur Hydrolyse der Aminosäuren. Parallel dazu wurden Hydroxyprolinstandardlösungen mit je 12,5/25/50/100/150/200/300 µM Hydroxprolin angesetzt.

Je 100µl hydrolysierte Probe wurden mit 4M HCl mindestens 1:1 verdünnt.

Anschließend wurden je 35µl Probe bzw. Standard auf eine ELISA-Platte pipettiert und mit 75µl Assay-Puffer versetzt. Nach 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von 75µl frisch angesetztem Färbereagenz. Nach einer weiteren Inkubation von 60 Minuten bei 60°C im Trockenschrank erfolgte die Umsetzung zum Farbprodukt dessen Intensität mit einem ELISA Reader bei 560nm gemessen wurde. Die gemessenen Absorptionswerte wurden anhand der Standardkurve computergestützt ausgewertet. Um den Kollagengehalt der gesamten Lunge ermitteln zu können wurden bei der Kalkulation noch Korrekturfaktoren wie Lungenteilgewicht/Lungengesamtgewicht und der Verdünnungsfaktor durch den Assay berücksichtigt.

2.10 - Histologie

Von den in Paraffin eingebetteten Lungen wurden 3µm dicke Gewebeschnitte angefertigt und nach den folgenden Schemata gefärbt.

2.10.1 - H&E Färbung

Die H&E Färbung erfolgte nach dem Protokoll in Tab. 9, die Masson-Goldner (Trichrom) Färbung erfolgte nach dem Protokoll in Tab. 10.

10 Minuten	Entparaffinieren in Xylol
Jeweils 2 Minuten	absteigende Alkoholreihe 100% → 96% → 70% → A.dest → A.dest
20 Minuten	Hämaulaun, sauer nach Meyer (Waldeck 2E-038)
5 Minuten	Leitungswasser (fließend bis keine Farbschlieren mehr zu sehen sind)
1 Minute	Ethanol 96%
4 Minuten	Eosin (Shandon Eosin Y Alcoholic 6766007)
Kurz spülen	A.dest
	Aufsteigende Alkoholreihe 96% → 96% → 100% → 100% jeweils eintauchen und kurz schwenken
	3 mal Xylol – jeweils kurz schwenken und im letzten Xylol-Bad bis zum Eindecken stehen lassen
	Eindecken mit Pertex (Medite PER30000)

Tab. 9: Färbeprotokoll H&E

Die angefärbten Strukturen stellen sich folgendermaßen dar: Zellkerne - blau; Erythrozyten - kirschrot; Kollagen - blassrosa; Basophiles Zytoplasma - violett; Azidophiles Zytoplasma - rot

2.10.2 - Masson-Goldner (Trichrom) Färbung

10 Minuten	Entparaffinieren in Xylol
Jeweils 2 Minuten	absteigende Alkoholreihe 100% → 96% → 70% → A.dest → A.dest
5 Minuten	Weigert's Hämatoxylin Gebrauchslösung (Weigert A – Weigert B = 1:1, frisch angesetzt)
10 Minuten	warmes Leitungswasser (fließend bis keine Farbschlieren mehr zu sehen sind)
5 Minuten	Ponceau de Xylidine
Spülen	Essigsäure 1% (2-3 Mal)
20 Sekunden	Orange G
Spülen	Essigsäure 1% (2-3 Mal)
5 Minuten	Lichtgrün

Spülen	Essigsäure 1% (2-3 Mal)
	Aufsteigende Alkoholreihe 96% → 96% → 100% → 100% jeweils eintauchen und kurz schwenken
	3 mal Xylol – jeweils kurz schwenken und im letzten Xylol-Bad bis zum Eindecken stehen lassen
	Eindecken mit Pertex (Medite PER30000)

Tab. 10: Färbeprotokoll Masson-Goldner (Trichrom)

Die angefärbten Strukturen stellen sich folgendermaßen dar: Kollagenes Bindegewebe und Schleim - grün; Zellkerne - braunschwarz; Zytoplasma - rot; Erythrozyten - orangerot; Muskulatur - blaßrot

2.10.3 - Einscannen und Analyse der Gewebeschnitte

Die gefärbten Gewebeschnitte wurden mit einem Mirax-Slide-Scanner digitalisiert. Von den Scans wurden subpleurale Areale markiert und als Bilddateien exportiert, die dann mit dem Programm Axio Vision morphometrisch analysiert wurden. Dabei wurden Alveolendurchmesser und Septendicke gemessen und die relative Verteilungshäufigkeit im Vergleich zur Gesamtlungenfläche als Datensatz zusammengestellt. Die Entwicklung einer Lungenfibrose lässt sich durch eine Erhöhung des relativen Anteils der Gewebefläche (Verringerung des Alveolendurchmessers, Verdickung der Septen) dokumentieren.

2.11 - Statistik

Eine statistische Auswertung der bestimmten Parameter erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test unter Verwendung des Statistikprogramms GraphPadPrism Version 5.00 (GraphPad Software, San Diego, USA). Es wurden Lepirudin behandelte Mäuse mit der mit Kochsalz behandelten Gruppe verglichen. Diese beiden Gruppen wurden zudem mit unbehandelten Kontrolltieren verglichen. Die Signifikanzniveaus sind mit * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.001$) und *** ($p < 0.0001$) angegeben.

3. Fragestellung:

Ausgehend von Beobachtungen aus vorangegangenen Studien, die eine pathomechanistische Beteiligung der Gerinnung an der Fibroseentwicklung nahelegen, soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob eine Korrektur der gestörten intraalveolären hämostatischen Balance durch Lepirudingabe den Verlauf der bleomycininduzierten pulmonalen Fibrose positiv beeinflussen kann.

Die gezielte antikoagulatorische Wirkung von Lepirudin lässt vermuten, dass die Aktivität von lokal gebildetem Thrombin nach Vernebelung des Wirkstoffes und Aufnahme in die Lunge inhibiert wird. Hierdurch sollte die Bildung von Fibrin aus Fibrinogen, das über die gestörte Barrierefunktion in den Alveolarraum ausgetreten ist, die Ausbildung einer Fibrinmatrix, sowie die Inkorporierung und Inaktivierung von Surfactant und das dauerhafte Verkleben der Alveolen verhindert werden. Zusätzlich sollte auch die Aktivierung weiterer Prozesse über PAR inhibiert werden. Es besteht Grund zur Annahme, dass durch diese Wirkungen ein der IPF vermutlich zugrunde liegender Prozess abgemildert werden kann.

In der vorliegenden Arbeit sollte auf folgende Fragen eine Antwort gefunden werden:

- Kann Lepirudin in therapeutisch wirksamen Konzentrationen alveolär verabreicht werden? Gelingt es, die alveoläre hämostatische Imbalance zu korrigieren und welches wäre die hierfür benötigte Dosis? In welchen Intervallen muss Lepirudin verabreicht werden um einen kontinuierlichen Wirkspiegel aufrecht zu erhalten?
- Treten unerwünschte Nebenwirkungen auf?
- Wird das Überleben günstig beeinflusst?
- Hat die Lepirudingabe einen Einfluss auf das Geweberemodelling? Kann die Kollagendeposition reduziert und die Lungenfunktion verbessert werden?
- Ist der Effekt von Lepirudin abhängig vom Therapiezeitraum? Sind eine frühe (d1-d11) und eine späte (d11-19) Therapie gleichermaßen wirksam?

4. Ergebnisse:

4.1 – Vorversuche

A: Dosisfindung

Zunächst wurde in Vorversuchen die Lepirudindosis ermittelt, die zu einer messbaren antikoagulatorischen Aktivität im Alveolarraum bleomycingeschädigter Mäuse führt. Dazu wurde den Versuchstieren an Tag 0 5U/kg Bleomycin intratracheal verabreicht. An Tag 7 wurden ihnen nach folgender Tabelle unterschiedlich hohe Dosen Lepirudin, bzw. NaCl per Verneblung zugeführt.

Gruppe	Intervention/Dosierung	N
1 - Kein Bleo (gesunde Kontrollgruppe)	\	2
2 - Bleo	NaCl	2
3 - Bleo	Lepirudin: 5mg/kg = 100µg/Maus	3
4 - Bleo	Lepirudin: 50mg/kg = 1mg/Maus	3
5 - Bleo	Lepirudin: 100mg/kg = 2 mg/Maus	3

Tab. 11: Gruppeneinteilung des Versuchs zur Dosisfindung

Eine Stunde nach Applikation wurden die Mäuse mit einer Überdosis Narkosemittel getötet und die komplette Lunge lavagiert.

Nach Depletion der zellularen Anteile (Zentrifugation RZB=300xg, 4°C, 10 min) wurde im BAL-Überstand wie im Methodenteil beschrieben die Lepirudin-Konzentration über die antikoagulatorische Aktivität anhand der PTT ermittelt.

Erwartungsgemäß zeigte sich nach der Bleomycinapplikation eine Abnahme der PTT, jedoch nicht signifikant ($p=0,1278$). Unter der Lepirudinbehandlung fand sich ein dosisabhängiger, deutlicher Anstieg. Bereits bei einer Dosierung von 5mg/kg war ein Anstieg der Lepirudinkonzentration in der BAL auf $17,3 \pm 13,1 \mu\text{g/ml}$ zu beobachten. Bei 50mg/kg betrug die Lepirudinkonzentration in der BAL $420,2 \pm 56,5 \mu\text{g/ml}$ ($p=0,0021$ - NaCl vs. 50 mg/kg Lepirudin) und bei 100mg/kg $915,9 \pm 259,8 \mu\text{g/ml}$ ($p=0,0179$ - NaCl vs. 100mg/kg Lepirudin; vgl. Abb. 20).

Da die Versuchstiere auch bei hoher Dosierung keine Unverträglichkeiten zeigten, wurden 100mg/kg als Versuchsdosis festgelegt, um eine ausreichende intraalveoläre Wirkstoffkonzentration über einen längeren Zeitraum zu gewährleisten.

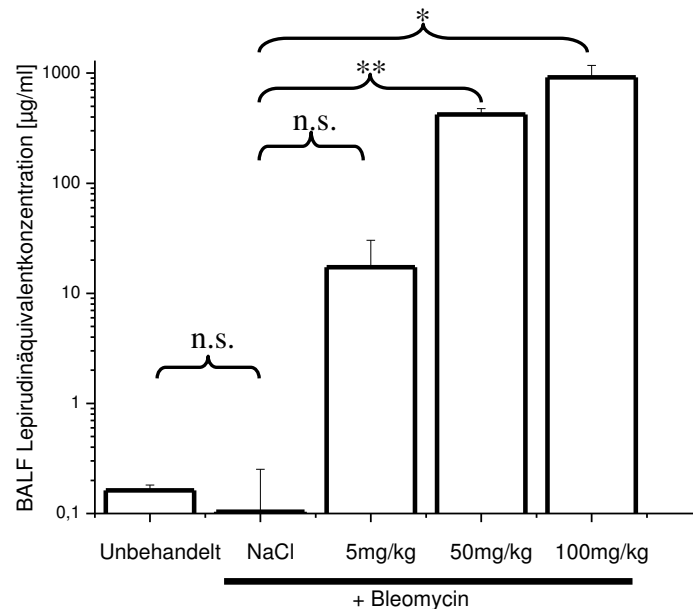


Abb. 20: Lepirudinäquivalentkonzentration in der BAL eine Stunde nach Applikation unterschiedlicher Lepirudindosierungen.

Dargestellt ist die mittels PTT bestimmte antikoagulatorische Aktivität in der BAL un behandelter Mäuse (n=2), die anhand eines Lepirudinstandards in eine Lepirudinäquivalentkonzentration umgerechnet wurde, im Vergleich zu Bleomycin behandelten Mäusen ohne (n=2) und mit Lepirudingabe (5-100mg/kg; je n=3).

Die Probeentnahme erfolgte an d7, 1h nach Applikation.

*: $p < 0,05$ im Vgl. zu mit NaCl behandelten Tieren; **: $p < 0,01$ im Vgl. zu mit NaCl behandelten Tieren. Die statistische Auswertung erfolgte mittels unpaarigem t-Test

B: Untersuchung zur Pharmakokinetik

Nach Ermitteln einer wirksamen Lepirudindosis wurde untersucht, wie lange der antikoagulatorische Effekt in der BAL bestehen blieb, um daran das Applikationsintervall für die Langzeitversuche bestimmen zu können.

Den Versuchstieren wurde an Tag 0 5U/kg Bleomycin intratracheal verabreicht.

An Tag 7 wurde Lepirudin in einer Dosierung von 100mg/kg zugeführt.

Zur Bestimmung der Pharmakokinetik wurden die Mäuse 2, 4 und 8 Stunden nach Applikation lavagiert und die verbliebene Lepirudinaktivität der BAL bestimmt. Dies erfolgte, wie oben beschrieben, durch Bestimmung der PTT. Für die NaCl sowie für die 1h-Gruppe wurden die Daten aus dem Versuch zur Dosisfindung (100mg/kg Lepirudin) verwendet.

Gruppe	Zeitpunkt	N
1 – Kein Bleo (gesunde Kontrollgruppe)	\	2
2 - Bleo + NaCl	1h nach Appl.	2
3 - Bleo + Lepirudin	1h nach Appl.	3
4 - Bleo + Lepirudin	2h nach Appl.	3
5 - Bleo + Lepirudin	4h nach Appl.	3
6 - Bleo + Lepirudin	8h nach Appl.	3

Tab. 12: Gruppeneinteilung des Versuchs zur Kinetikuntersuchung

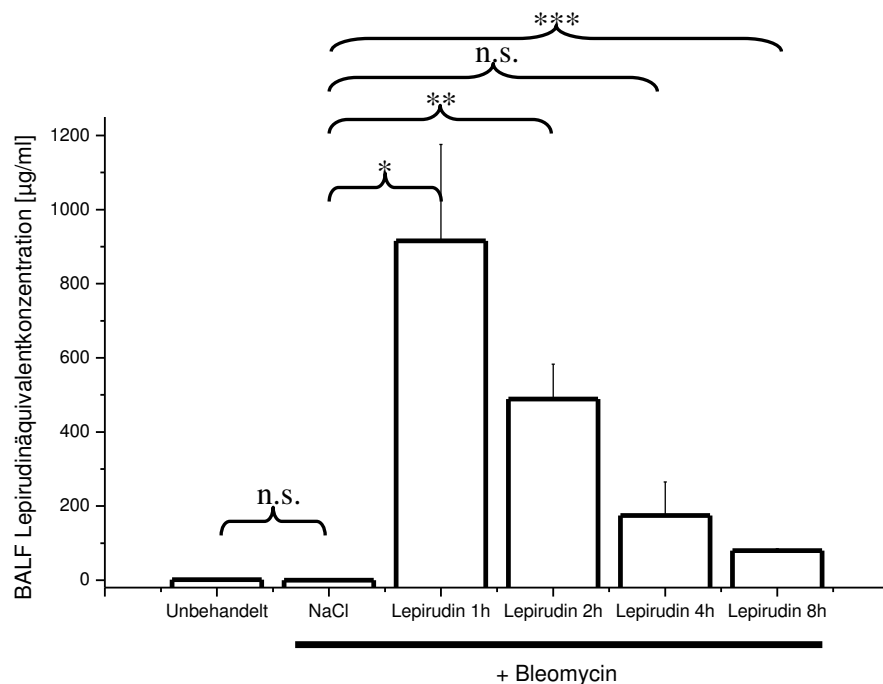


Abb. 21: Lepirudinäquivalentkonzentration in bleomycinbehandelten Mäusen nach einmaliger Applikation im zeitlichen Verlauf.

Dargestellt ist die mittels PTT bestimmte antikoagulatorische Aktivität in der BAL, die anhand eines Lepirudinstandards in eine Lepirudinäquivalentkonzentration umgerechnet wurde, im zeitlichen Verlauf. Bleomycinbehandelte Tiere erhielten an d7 100mg/kg Lepirudin oder NaCl und wurden nach 1h, 2h, 4h, 8h lavagiert. NaCl-Kontrollwert und 1h-Wert wurden aus dem Versuch zur Dosisfindung übernommen. Gesunde Kontrollen - n=2; NaCl - n=2; Lepirudin - je n=3

*: $p < 0,05$ im Vgl. zu mit NaCl behandelten Tieren; **: $p < 0,01$ im Vgl. zu mit NaCl behandelten Tieren; ***: $p < 0,001$ im Vgl. zu mit NaCl behandelten Tieren. Die statistische Auswertung erfolgte mittels unpaarigem t-Test.

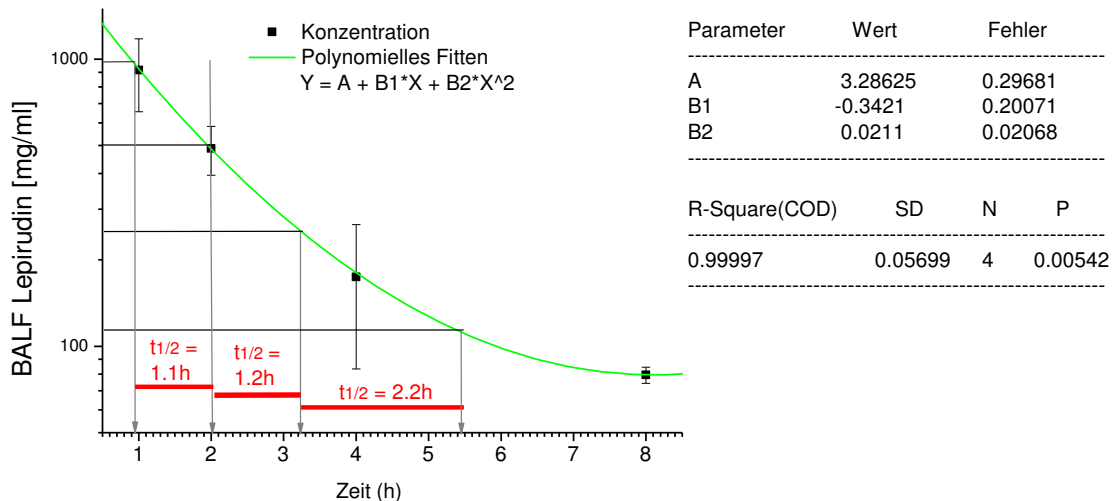


Abb. 22: Bestimmung der Halbwertszeit

Halblogarithmische Darstellung der alveolären Lepirudinaktivität in Abhängigkeit von der Zeit und polynomielles Fitten. Die Halbwertszeit für Lepirudin wurde manuell anhand der Graphik bestimmt (Exponentialfunktion).

Es zeigte sich ein kontinuierlicher Abfall der Wirkstoffkonzentration innerhalb der ersten 8 Stunden nach Lepirudingabe. Die Lepirudinkonzentration der BAL betrug nach 1 Stunde $915,9 \pm 259,8 \mu\text{g/ml}$ ($p=0,0179$ - NaCl vs. Lepirudin 1h), nach 2 Stunden $488,6 \pm 94,7 \mu\text{g/ml}$ ($p=0,0062$ - NaCl vs. Lepirudin 2h), nach 4 Stunden $174,2 \pm 90,8 \mu\text{g/ml}$ (nicht signifikant zu NaCl) und nach 8 Stunden $79,5 \pm 5,1 \mu\text{g/ml}$ ($p=0,0002$ - NaCl vs. Lepirudin 8h; vgl. Abb. 21).

In der halblogarithmischen Darstellung (Abb. 22) ergibt sich ein exponentieller Kurvenverlauf, der auf eine Eliminationskinetik 1. Ordnung hinweist. Wie aus der Graphik ersichtlich, ist der Konzentrationsabfall pro Zeiteinheit nicht konstant. Die Lepirudin Konzentration nimmt zunächst schnell ab und mit sinkender (Rest-) Konzentration wird die Abnahme immer langsamer. Der Abfall der Wirkstoffkonzentration im alveolären Kompartiment ist also proportional zu der im Moment vorliegenden Konzentration.

Für pharmakokinetische Berechnungen und die Bestimmung der Halbwertszeit bei einer Eliminationskinetik 1. Ordnung müssen komplexere Modelle (z.B. Zwei-Kompartiment-Modelle) herangezogen werden. Die dazu benötigten Parameter konnten mit dem hier beschriebenen Versuchsaufbau jedoch nicht ermittelt oder abgeleitet werden, so dass nur eine näherungsweise Berechnung der Halbwertszeit anhand der Graphik durchgeführt werden konnte. Diese lag bei 1-2 Stunden. Da eine pharmakokinetische Berechnung des Applikationsintervalls aufgrund der genannten Limitierungen nicht möglich war, wurde für die therapeutische Intervention eine

Verabreichung an jedem zweiten Tag gewählt. Ausschlaggebend hierfür war, eine übermäßige Belastung der Mäuse durch wiederholte Applikationen bzw. größere Mengen an Protein zu vermeiden. Zudem zeigten die Versuche zur Kinetik, dass 8 Stunden nach der Applikation zwar weniger als 1/10 der ursprünglichen Lepirudinaktivität im Alveolarraum nachweisbar war, aber mit 79,5 µg/ml BAL-Spiegel gemessen wurden, die um den Faktor 795 höher waren, als bei nicht mit Lepirudin behandelten Tieren und auf einen länger anhaltenden antikoagulativen Effekt hinweisen.

C: Bestimmung der Gerinnungsaktivität am Ende der Versuchsreihe

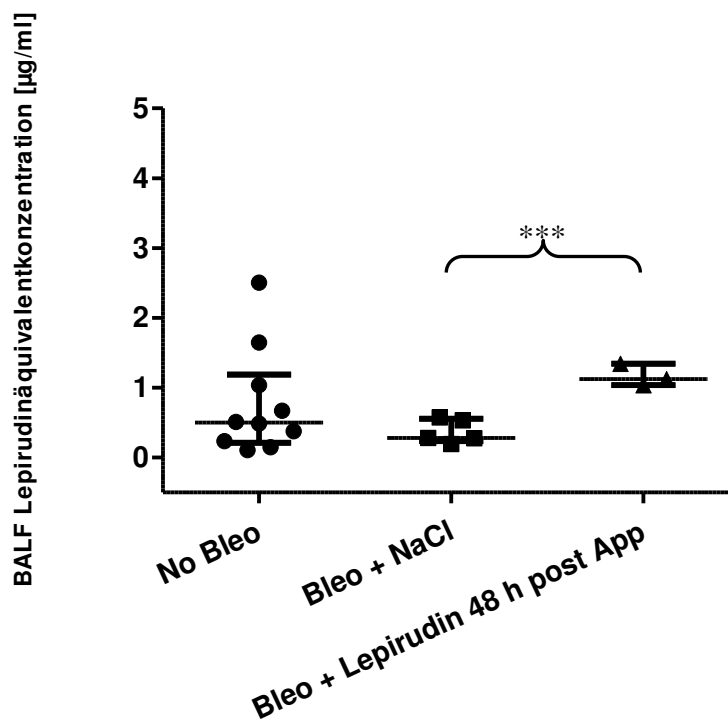


Abb. 23: Lepirudinäquivalentkonzentration in der BAL-Flüssigkeit von Mäusen mit spät stattfindender Lepirudingabe

Dargestellt ist die mittels PTT bestimmte antikoagulatorische Aktivität in der BAL, die anhand eines Lepirudinstandards in eine Lepirudinäquivalentkonzentration umgerechnet wurde.

*** $p < 0,001$ im Vgl. zu mit NaCl behandelten Tieren.

Am Ende der Versuchsreihe mit spät stattfindender Lepirudinapplikation wurde die verbliebene Lepirudinaktivität in der BAL 48 Stunden nach der letzten Applikation ermittelt. Dies erfolgte, wie oben beschrieben, durch Bestimmung der PTT. Es zeigt sich ein nahezu vollständiger Abbau des Wirkstoffes. Zwischen den mit NaCl und den mit Lepirudin behandelten Mäusen zeigt sich zwar ein signifikanter Unterschied ($p=0,0006$), jedoch ist die tatsächliche Lepirudinkonzentration mit 1,17 µg/ml nur noch geringfügig erhöht.

4.2 – Dauertherapie bleomycingeschädigter Mäuse mit Lepirudin

4.2.1 – Therapieschemata

Für die Dauertherapie Bleomycin geschädigter Mäuse wurden zwei Behandlungsregime ausgewählt: ein frühes mit einem Applikationszeitraum von Tag 1 bis Tag 11 und ein spätes mit einem Applikationszeitraum von Tag 11 bis Tag 19. Die Lepirudin Applikation fand in diesen Zeiträumen jeden zweiten Tag statt.

Die Unterteilung in ein frühes und ein spätes Behandlungsschema sollte dazu beitragen zu differenzieren in welcher Phase der Bleomycininduzierten Lungenfibrose der Wirkstoff einen Effekt zeigt.

Behandlungsregime	Dauer (Tage)	Applikationszeitraum	Anzahl der Versuchstiere und Aufteilung in die Gruppen
Frühtherapie	21	d1-11	Lepirudin - n=10 NaCl - n=10 Gesunde Kontrolle - n=5
Spättherapie	21	d11-19	Lepirudin - n=10 NaCl - n=10 Gesunde Kontrolle - n=5

Tab. 13: Darstellung der Versuchsgruppen der Langzeittherapieversuche
Applizierte Bleomycindosis: 5U/kg; Applizierte Lepirudindosis: 100mg/kg;
Applikationsintervall für Lepirudin/NaCl: jeden 2. Tag

4.2.2 - Überleben

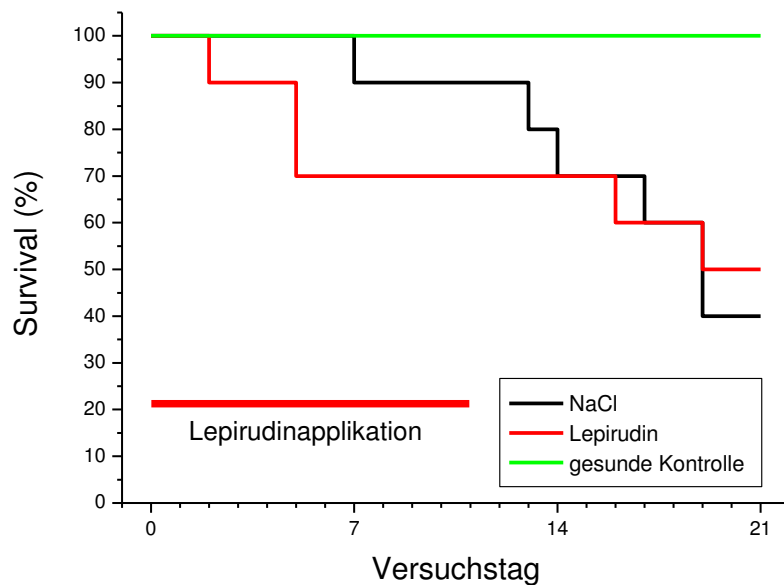


Abb. 24: Überlebensrate der Versuchsreihe mit früh stattfindender Lepirudingabe.

In der Gruppe Frühtherapie war die Sterblichkeit bei den Lepirudinbehandelten Tieren in den ersten Tagen höher als in der Kochsalzgruppe (Überleben an d7: 70% für Lepirudin, 90% für NaCl), jedoch glichen sich die beiden Gruppen gegen Ende der Versuchsreihe einander fast an, so dass letztlich ein geringer und nicht signifikanter Unterschied bestand (Überleben an d21 40% für NaCl und 50% für Lepirudin).

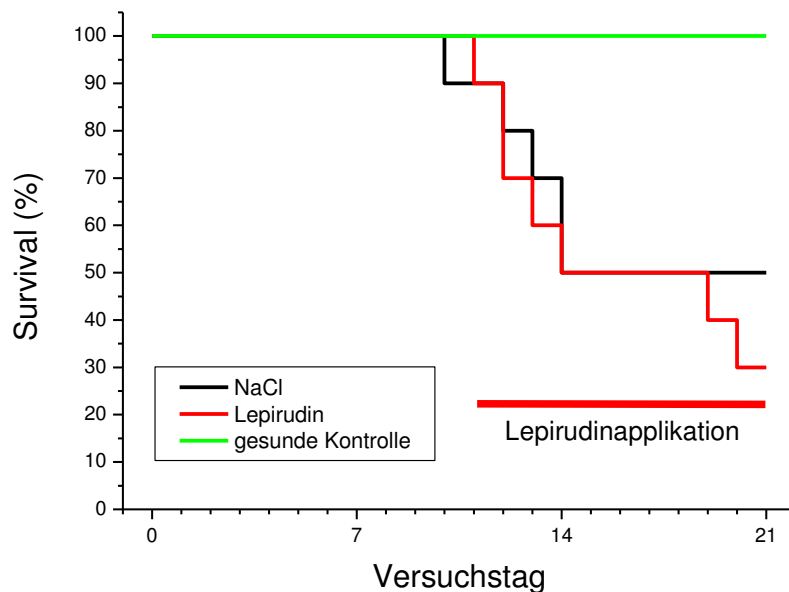


Abb. 25: Überlebensrate der Versuchsreihe mit spät stattfindender Lepirudingabe.

Lepirudin- und Kochsalzgruppe unterschieden sich bei der Versuchsreihen mit spät stattfindender Lepirudingabe hinsichtlich der Überlebenswahrscheinlichkeit bis zum Schluss kaum voneinander, erst in den letzten Tagen zeigte sich ein Überlebensvorteil

für die mit NaCl behandelte Gruppe (Überleben an d21: 30% für Lepirudin; 50% für NaCl).

Für die folgenden Grafiken wurden die unbehandelten Mäuse beider Versuchsreihen zu einer Kontrollgruppe zusammengefasst (n = 10).

4.2.3 - Gewichtsveränderung

Das Gewicht der Mäuse wurde an Tag 0 vor Bleomycinexposition und an Tag 7, Tag 14 und Tag 21 nach Bleomycinapplikation bestimmt.

Innerhalb der gesunden Kontrollgruppe zeigte sich ein kontinuierlicher Anstieg des Gewichts über den gesamten Beobachtungszeitraum (Abb. 26: an Tag 21 Zunahme um 22,9%). Eine Woche nach Bleomycingabe zeigten Tiere aus der Lepirudin- wie auch aus der Kochsalzgruppe gleichermaßen einen deutlichen Gewichtsverlust (d7: NaCl – MW=85,1 ± 6,8% der Kontrolle; Lepirudin MW=88,7 ± 7,5% der Kontrolle). Bis zum Ende des Versuches hatte sich das Gewicht der behandelten Mäuse wieder dem Ausgangswert angenähert (d21: NaCl – MW=110,6 ± 4,7%; Lepirudin - MW=97,9 ± 12,6%), lag jedoch noch signifikant unterhalb des Gewichtes der gesunden Kontrollgruppe.

Die Veränderungen der behandelten im Vergleich zu den unbehandelten Mäusen waren signifikant. Zwischen der Lepirudin- und der Kochsalzgruppe bestand zu keiner Zeit ein signifikanter Unterschied

Auch bei der Spättherapie fand sich eine Woche nach Bleomycingabe sowohl in der Lepirudin- wie auch in der Kochsalzgruppe ein hoch signifikanter Gewichtsverlust. Dieser betrug bei der Kochsalzgruppe 13,3% und bei der Lepirudingruppe 14,4% (vgl. Abb. 27). Über die restliche Versuchszeit nahmen diese Mäuse nur wenig an Gewicht zu (d21: NaCl – MW=91,2 ± 13,1% der Kontrolle; Lepirudin - MW=93,1 ± 17,4% der Kontrolle), so dass am Versuchsende ein signifikanter Unterschied zur gesunden Kontrollgruppe bestand, jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Therapiegruppen.

Im Vergleich der Behandlungsschemata fiel die Gewichtszunahme der behandelten Tiere in der Frühtherapie etwas stärker aus als bei der Spättherapie.

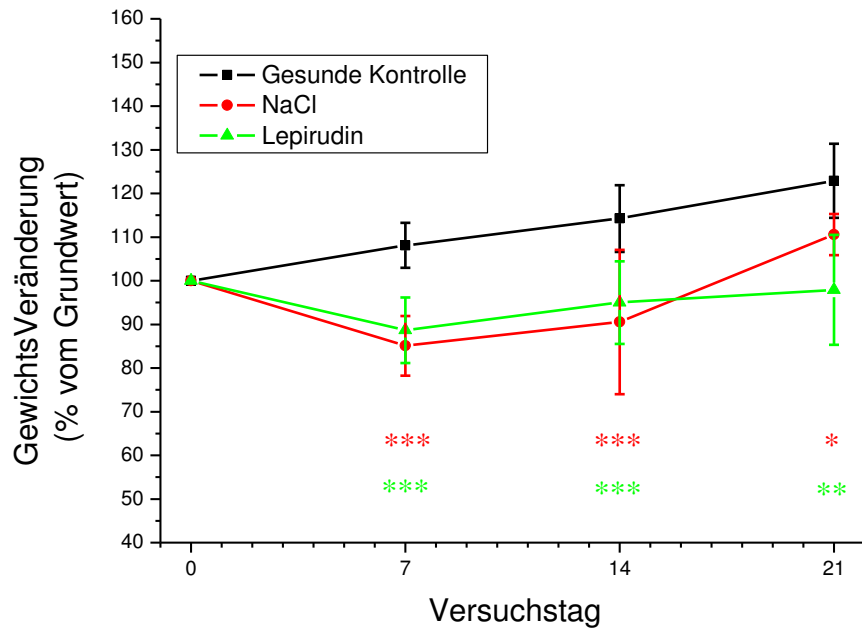


Abb. 26: Gewichtsveränderung der Versuchsgruppe Frühtherapie.

Die an d0 ermittelten Werte wurden 100% gesetzt und die an d7, d14 und d21 gemessenen Werte dazu ins Verhältnis gesetzt.

Für die statistische Auswertung wurde ein Zweistichproben t-Test verwendet (Mann-Whitney Test)

*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$, jeweils im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe.

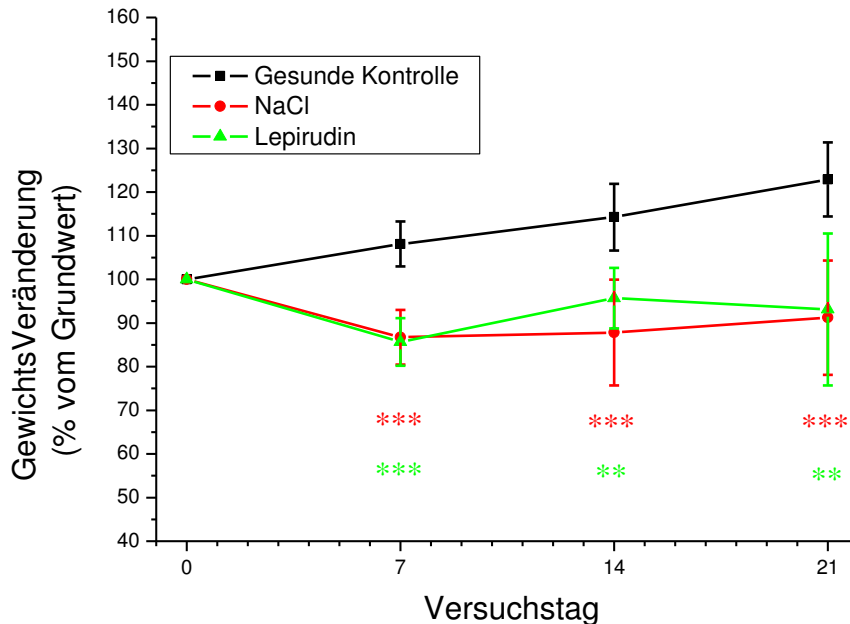


Abb. 27: Gewichtsveränderung der Versuchsgruppe Spättherapie.

Die an d0 ermittelten Werte wurden 100% gesetzt und die an d7, d14 und d21 gemessenen Werte dazu ins Verhältnis gesetzt.

Für die statistische Auswertung wurde ein Zweistichproben t-Test verwendet (Mann-Whitney Test).

*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$, jeweils im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe.

4.2.4 - Lungencompliance

Die Lungencompliance der Versuchstiere wurde mit Hilfe eines Ganzkörperplethysmographen bestimmt und auf das Körpergewicht der Tiere zu Versuchsbeginn bezogen.

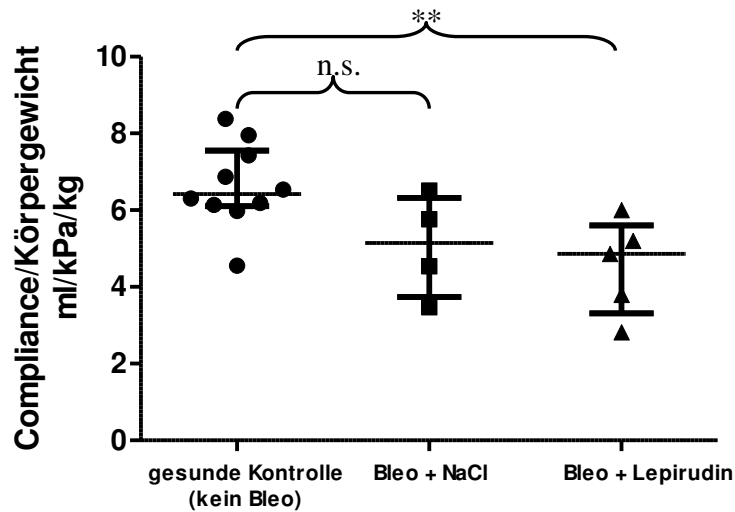


Abb. 28: Lungencompliance der Versuchsgruppe Frühtherapie.

Die Messung erfolgte mit einem Ganzkörperplethysmographen. Dargestellt sind Einzelwerte mit Median und Interquartilrange.

Für die statistische Auswertung wurde ein Zweistichproben t-Test verwendet (Mann-Whitney Test)

**: $p < 0,01$ im Vgl. zu gesunder Kontrolle

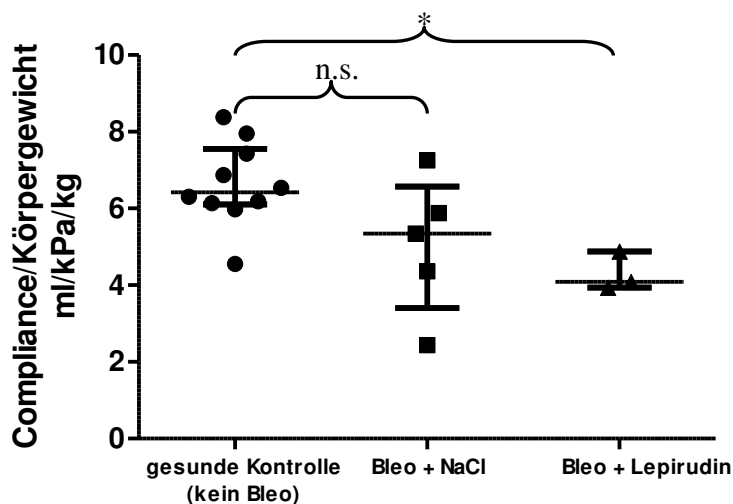


Abb. 29: Lungencompliance der Versuchsgruppe Spättherapie

Die Messung erfolgte mit einem Ganzkörperplethysmographen. Dargestellt sind Einzelwerte mit Median und Interquartilrange.

Für die statistische Auswertung wurde ein Zweistichproben t-Test verwendet (Mann-Whitney Test)

*: $p < 0,05$ im Vgl. zu gesunder Kontrolle.

In der Kochsalz- ($MW=5,1 \pm 1,3 \text{ ml/kPa/kg}$), sowie der Lepirudingruppe ($MW=4,5 \pm 1,2 \text{ ml/kPa/kg}$) der Frühtherapie war eine Verringerung der Compliance im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren ($MW=6,6 \pm 1,1 \text{ ml/kPa/kg}$) festzustellen, die in der Lepirudingruppe sogar signifikant ($p=0,008$) ausfiel. Die Compliancewerte der Lepirudin- und Kochsalzgruppe unterschieden sich nicht signifikant voneinander (Vgl. Abb. 28).

Auch bei der Spättherapie konnte im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe ($MW=6,6$; $SD=1,1 \text{ ml/kPa/kg}$) eine Reduktion der Compliance bei Kochsalz- ($MW=5,1 \pm 1,8 \text{ ml/kPa/kg}$), und Lepirudinbehandelten ($MW=4,3 \pm 0,5 \text{ ml/kPa/kg}$) Tieren beobachtet werden. Auch hier waren Änderungen in der Lepirudingruppe signifikant ($p=0,014$). Gleichsam unterschieden sich die Compliancewerte der Lepirudin- und Kochsalzgruppe nicht signifikant voneinander. (vgl. Abb. 29)

4.2.5 – Differenzialzellbild aus der BAL

Für die Differenzialzellbilder wurden Cytospins aus den BAL-Zellen hergestellt, gefärbt und ausgezählt.

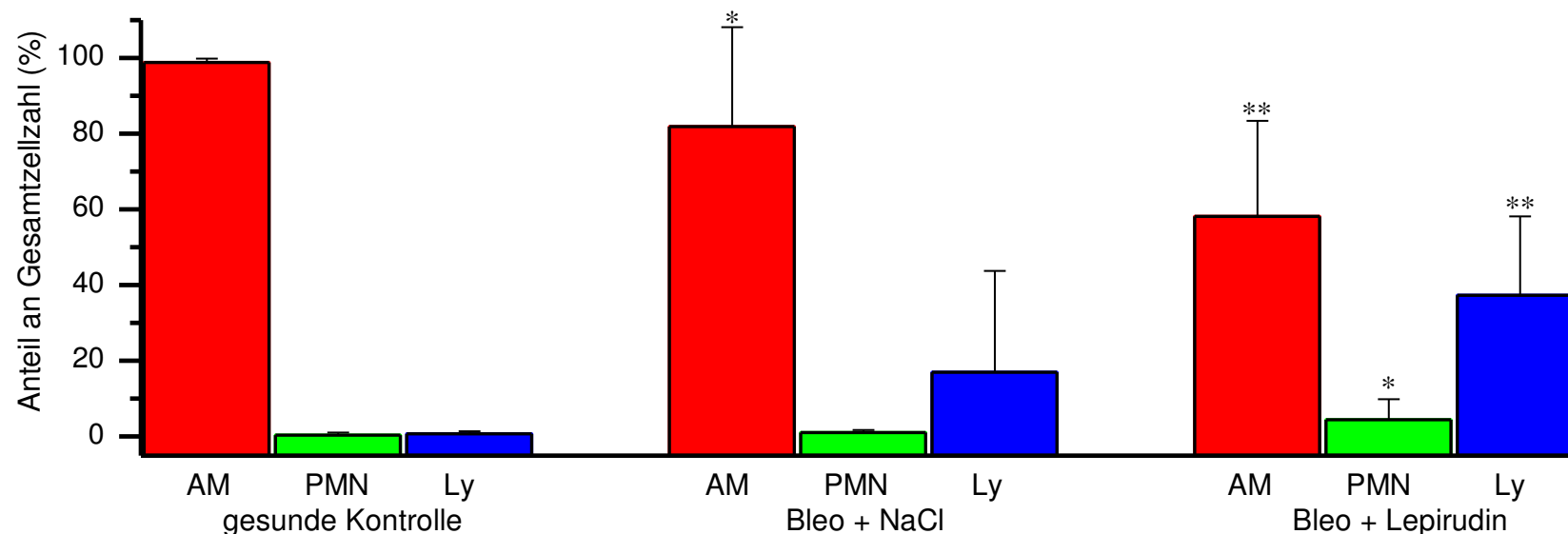


Abb. 30: Zelldifferential der Cytospin Auszählungen als prozentuale Verteilung der Versuchsgruppe Frühtherapie

Für die statistische Auswertung wurde ein Zweistichproben t-Test verwendet (Mann-Whitney Test)

*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$, jeweils im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe.

Das Zellbild der Lavageflüssigkeit unterschied sich deutlich zwischen gesunder Kontrolle (Makrophagen - MW=98,9 ± 1,0%; PMN - MW=0,4 ± 0,7%; Lymphozyten - MW=0,8 ± 0,7%) und den mit Bleomycin behandelten Gruppen. Bei letzteren waren eine signifikante Reduktion der alveolären Makrophagen (NaCl – MW=81,8 ± 26,3%; $p=0,0221$; Lepirudin - MW=58,2 ± 25,2%; $p=0,0026$) und ein Anstieg vor allem der Lymphozyten sowie der Neutrophilen Granulozyten (PMN) zu verzeichnen. Bei der Lepirudingruppe waren die Abweichungen signifikant (PMN - MW=4,5 ± 5,5%; $p=0,0195$; Lymphozyten - MW=37,3 ± 20,9%; $p=0,0022$). Zwischen den behandelten Gruppen bestand kein signifikanter Unterschied. Es fand sich eine starke Varianz der Zellzahlen bei den behandelten Versuchsgruppen.

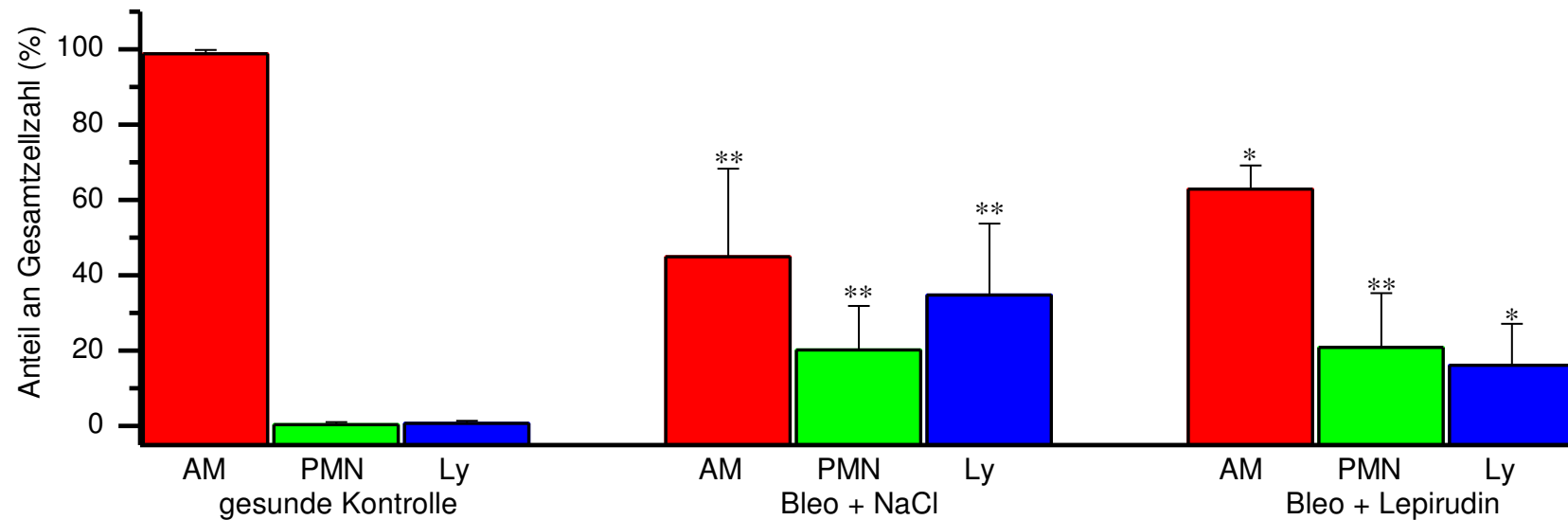


Abb. 31: Zelldifferential der Cytospin Auszählungen als prozentuale Verteilung der Versuchsgruppe Spättherapie

Für die statistische Auswertung wurde ein Zweistichproben t-Test verwendet (Mann-Whitney Test)

*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$, jeweils im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe.

Das Zellbild der Lavageflüssigkeit unterschied sich auch hier deutlich zwischen gesunder Kontrolle (Makrophagen - $MW = 99,1 \pm 1,1\%$; PMN - $MW = 0,4 \pm 0,7\%$; Lymphozyten - $MW = 0,6 \pm 0,7\%$) und den mit Bleomycin behandelten Gruppen. Wie bei der Frühtherapie fand sich eine signifikante Reduktion der alveolären Makrophagen (NaCl - $MW = 45,0 \pm 23,4\%$; $p = 0,0026$; Lepirudin - $MW = 62,8 \pm 6,3\%$; $p = 0,014$) sowie ein Anstieg der Lymphozyten (NaCl - $MW = 20,2 \pm 11,7\%$; $p = 0,0022$; Lepirudin - $MW = 20,9 \pm 14,4\%$; $p = 0,0117$) und der neutrophilen Granulozyten (PMN) (NaCl - $MW = 34,8 \pm 19,1\%$; $p = 0,0016$; Lepirudin - $MW = 16,2 \pm 11,0\%$; $p = 0,0077$) bei den behandelten Tieren. Es bestand eine starke Varianz der Zellzahlen bei den behandelten Versuchsgruppen. Zwischen Lepirudin- und Kochsalzgruppe ließ sich hier kein signifikanter Unterschied in der Zellzahlverteilung feststellen.

4.2.6 - Lösliches Kollagen in der BAL-Flüssigkeit

Mit Hilfe eines colorimetrischen Assays erfolgte die Bestimmung des löslichen Kollagens als indirekter Marker für den fibrotischen Gewebeumbau aus der BAL-Flüssigkeit der Versuchstiere.

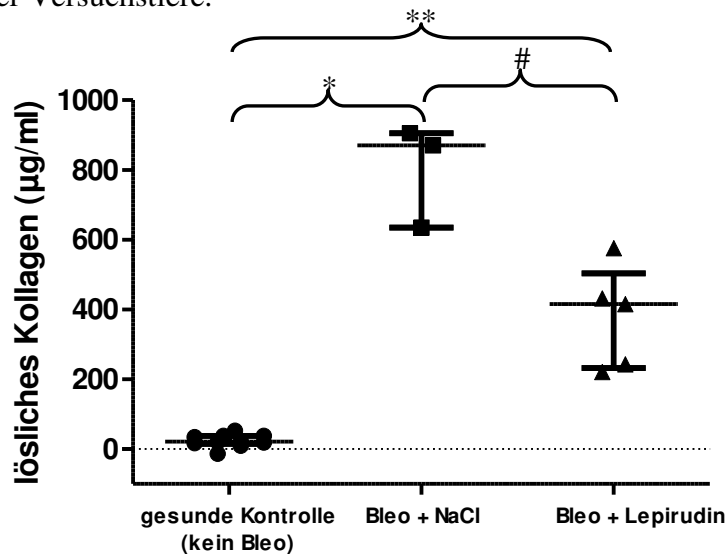


Abb. 32: Gehalt an löslichem Kollagen in der BAL-Flüssigkeit der Versuchsgruppe Frühtherapie.

Dargestellt sind Einzelwerte, Median und Interquartilrange.

Für die statistische Auswertung wurde ein Zweistichproben *t*-Test verwendet (Mann-Whitney Test)

∗: $p < 0,05$; ∗∗: $p < 0,01$, jeweils im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe; #: $p < 0,05$ im Vgl. zu NaCl

Die Konzentration an löslichem Kollagen in der BAL-Flüssigkeit war in Bleomycinbehandelten Tieren im Vergleich zur gesunden Kontrolle signifikant erhöht (Vgl. Abb. 32; gesunde Kontrolle - $MW = 23,8 \pm 18,3 \mu\text{g/ml}$; NaCl – $MW = 803,4 \pm 147,0 \mu\text{g/ml}$, $p = 0,0141$; Lepirudin - $MW = 377,5 \pm 146,8 \mu\text{g/ml}$, $p = 0,0027$). Es bestand zudem ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Therapiegruppen ($p = 0,0357$) mit einem niedrigeren Gehalt an löslichem Kollagen in der Lepirudingruppe.

Die Konzentration an löslichem Kollagen in der BAL-Flüssigkeit war auch in der Gruppe der "spät" therapierten und mit Bleomycin behandelten Tieren im Vergleich zur gesunden Kontrolle signifikant erhöht (Abb. 33: gesunde Kontrolle - $MW = 23,8 \pm 18,3 \mu\text{g/ml}$; NaCl – $MW = 300,1 \pm 119,6 \mu\text{g/ml}$, $p = 0,0027$; Lepirudin - $MW = 393,0 \pm 206,2 \mu\text{g/ml}$, $p = 0,0141$), jedoch bestand zwischen der Kochsalz- und der Lepirudingruppe kein signifikanter Unterschied.

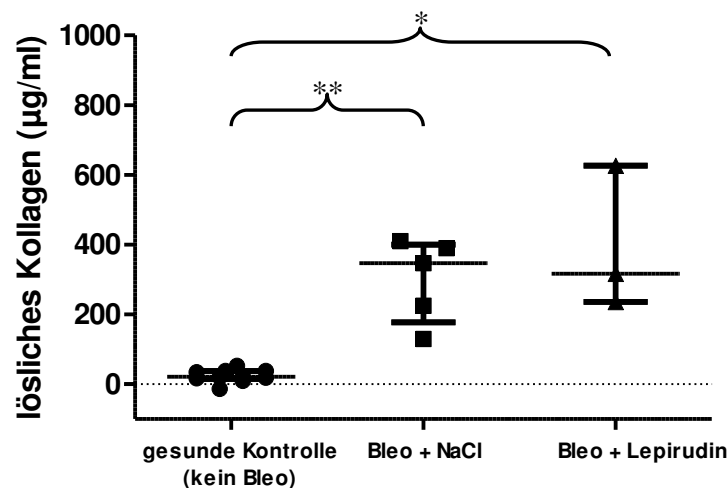


Abb. 33: Gehalt an löslichem Kollagen in der BAL-Flüssigkeit der Versuchsgruppe Spättherapie

Dargestellt sind Einzelwerte, Median und Interquartilrange.

Für die statistische Auswertung wurde ein Zweistichproben t-Test verwendet (Mann-Whitney Test)

∗: $p < 0,05$; ∗∗: $p < 0,01$, jeweils im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe.

4.2.7 - Hydroxyprolin aus hydrolysiertem Lungengewebe

Mit Hilfe eines colorimetrischen Assays erfolgte die Bestimmung des

Hydroxyprolingehaltes aus hydrolysiertem Lungengewebe als Marker für dessen

Kollagengehalt.

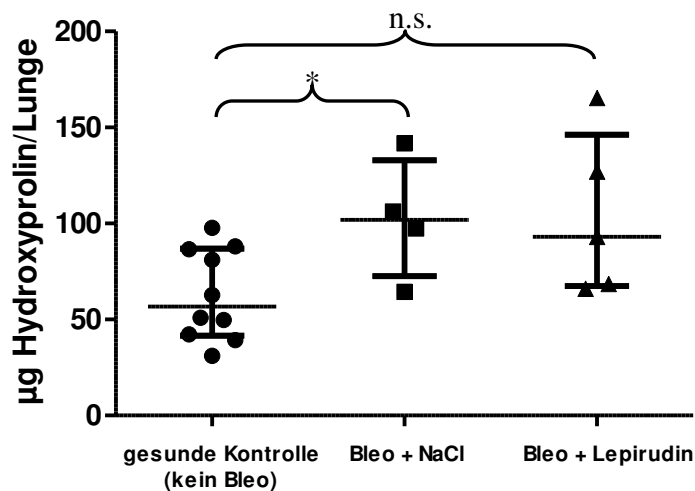


Abb. 34: Hydroxyprolingehalt im Lungengewebe der Versuchsgruppe Frühtherapie.

Dargestellt sind Einzelwerte, Median und Interquartilrange.

Für die statistische Auswertung wurde ein Zweistichproben t-Test verwendet (Mann-Whitney Test)

∗: $p < 0,05$ im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe.

Der Hydroxyprolingehalt im Lungengewebe war in der Kochsalzgruppe signifikant erhöht im Vergleich zur gesunden Kontrolle (gesunde Kontrolle - MW=63,0 ± 23,7µg; NaCl – MW=102,5 ± 31,8µg, $p=0,036$). Ein erhöhter Hydroxyprolingehalt fand sich

auch in der Lepirudingruppe, jedoch ohne Signifikanz (Lepirudin - $MW=104,1 \pm 42,2\mu g$). Es fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Therapiegruppen.

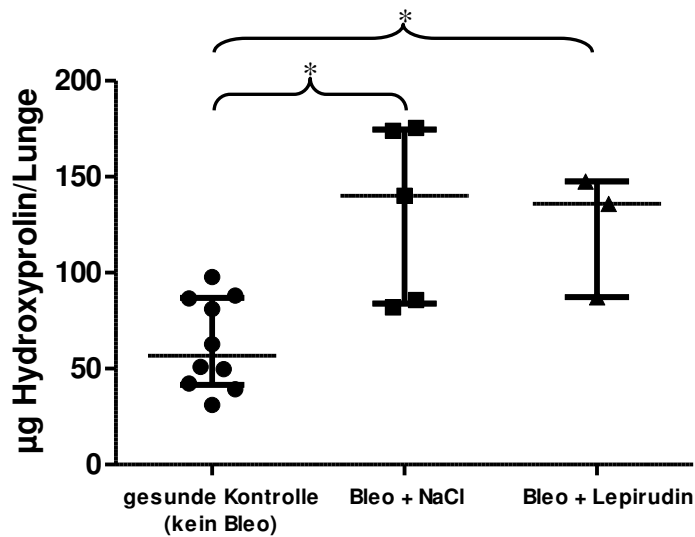


Abb. 35: Hydroxyprolingehalt im Lungengewebe der Versuchsgruppe Spättherapie.

Dargestellt sind Einzelwerte, Median und Interquartilrange.

Für die statistische Auswertung wurde ein Zweistichproben t-Test verwendet (Mann-Whitney Test)

*: $p < 0,05$ im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe.

Bei der Spättherapie war der Hydroxyprolingehalt im hydrolysierten Lungengewebe in Kochsalz- und Lepirudingruppe signifikant erhöht im Vergleich zur gesunden Kontrolle (gesunde Kontrolle - $MW=63,0 \pm 23,7\mu g$; NaCl – $MW=131,4 \pm 45,7\mu g$, $p=0,0193$; Lepirudin - $MW=123,6 \pm 32,0\mu g$, $p=0,0280$), jedoch bestand ebenso kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Therapiegruppen.

4.2.8 - Histologie

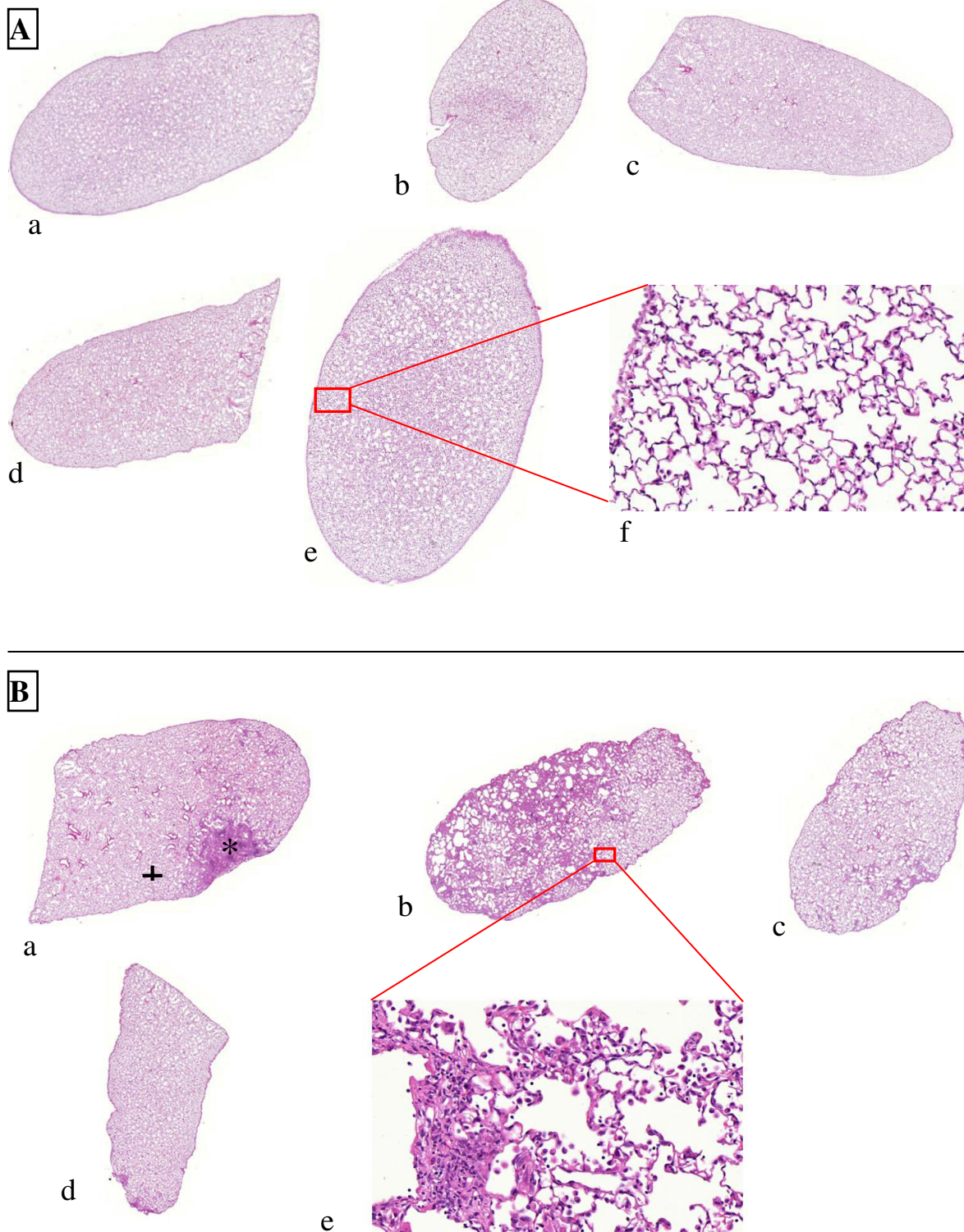


Abb. 36: Histologische Untersuchung: H&E Färbung

A - Gesunde Mäuse ohne Bleomycinapplikation. a-e: Übersicht ganze Schnitte nach H&E Färbung. f: 20-fache Vergrößerung eines repräsentativen Ausschnitts aus e.

B - Bleomycin + Kochsalz (NaCl). a-d: Übersicht ganze Schnitte nach H&E Färbung. e: 20-fache Vergrößerung eines repräsentativen Ausschnitts aus b.

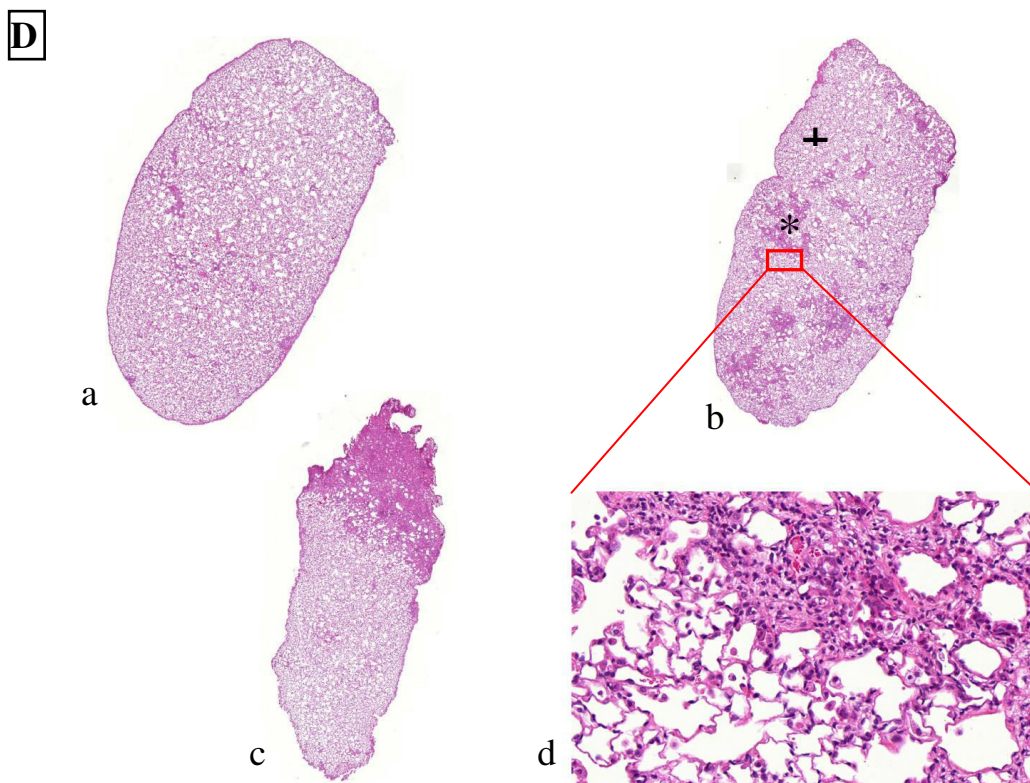
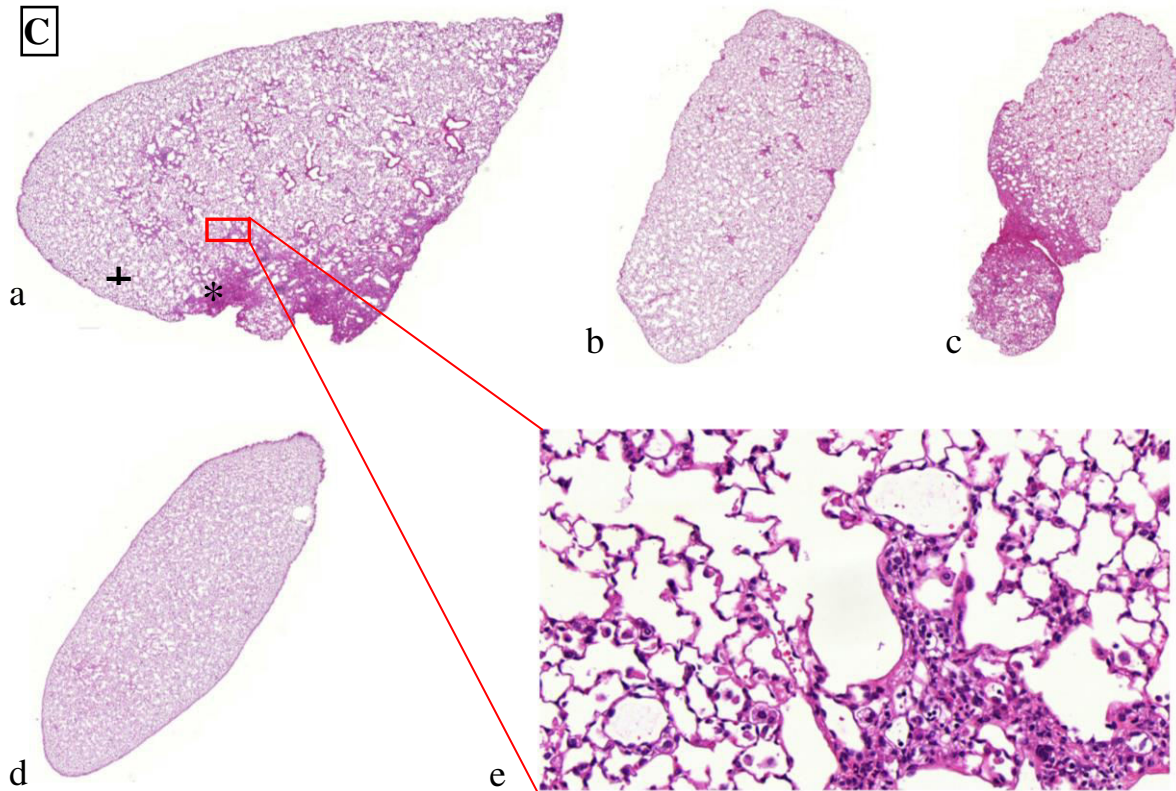


Abb. 36 (Fortsetzung):

C - Frühtherapieregime - Bleomycin + Lepirudin. a-d: Übersicht ganze Schnitte nach H&E Färbung. e: 20-fache Vergrößerung eines repräsentativen Ausschnitts aus a.

D - Spättherapieregime - Bleomycin + Lepirudin. a-c: Übersicht ganze Schnitte nach H&E Färbung. d: 20-fache Vergrößerung eines repräsentativen Ausschnitts aus b.

In den Übersichtsaufnahmen und der Vergrößerung der H&E Färbung der Gewebeschnitte der gesunden Kontrolltiere zeigt sich gesundes Lungengewebe mit regelrechter und homogener Struktur (Abb. 36A). Es zeigen sich dünne Septen, die zahlreiche kleine Alveolen unterteilen, sowie nur wenige intraalveoläre Zellen. Die Alveolarräume sind frei von Entzündungszellen, Schleim und entzündlichem Infiltrat (Abb. 36A.f).

Bei der nur mit Kochsalz behandelten Gruppe bleomycingeschädigter Mäuse zeigt sich in der H&E Färbung die für eine Bleomycin induzierte pulmonale Fibrose typische veränderte Lungenarchitektur (Abb. 36B). Es besteht eine starke Inhomogenität der Lungenarchitektur, bei der Bereiche mit starker Fibrosierung und entzündlichen Veränderungen (Abb. 36B.a: *) in direkter Nachbarschaft zu nahezu unveränderten Arealen (Abb. 36B.a: +) liegen. Ebenso sieht man emphysematös veränderte Areale mit größeren Bullae und auch in weniger betroffenen Arealen zeigen sich pathologische Veränderungen.

Der vergrößerte Ausschnitt zeigt eine Gewebeverdichtung mit verdickten Septen und vermehrtem Bindegewebe. Weiterhin kann man eine Auflösung der regulären Alveolarstruktur mit vergrößerten, zahlenmäßig verringerten Alveolen erkennen. In den Alveolen befinden sich mitunter vermehrt Entzündungszellen (Abb. 36B.e).

Im Vergleich zu den mit Lepirudin behandelten Gruppen erkennt man mikroskopisch gleiche Veränderungen in vergleichbarer Ausprägung.

So sieht man auch bei bleomycingeschädigten und mit Lepirudin behandelten Tieren in der H&E Färbung (Abb. 36C - Frühtherapie, Abb. 36D - Spättherapie) die für eine Bleomycininduzierte pulmonale Fibrose typische inhomogen veränderte Lungenarchitektur.

Im Vergleich der Lepirudingruppen untereinander zeigen sich die gleichen mikroskopischen Veränderungen in vergleichbarer Ausprägung.

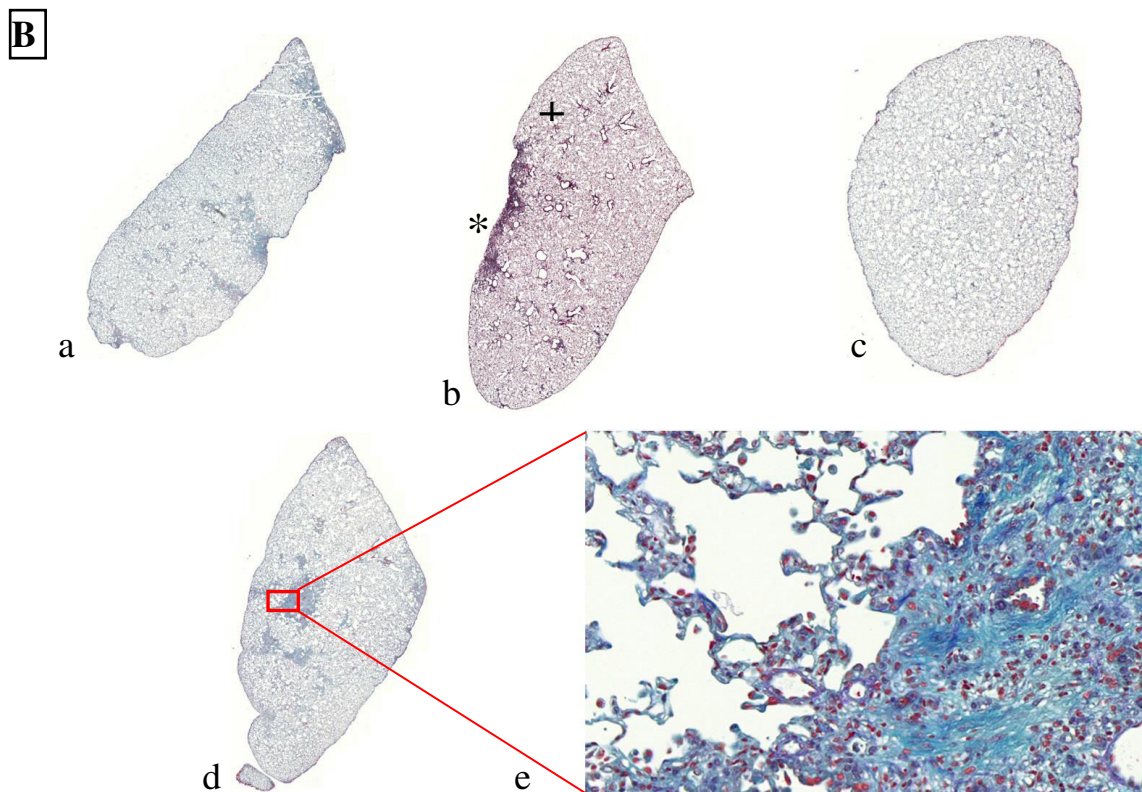
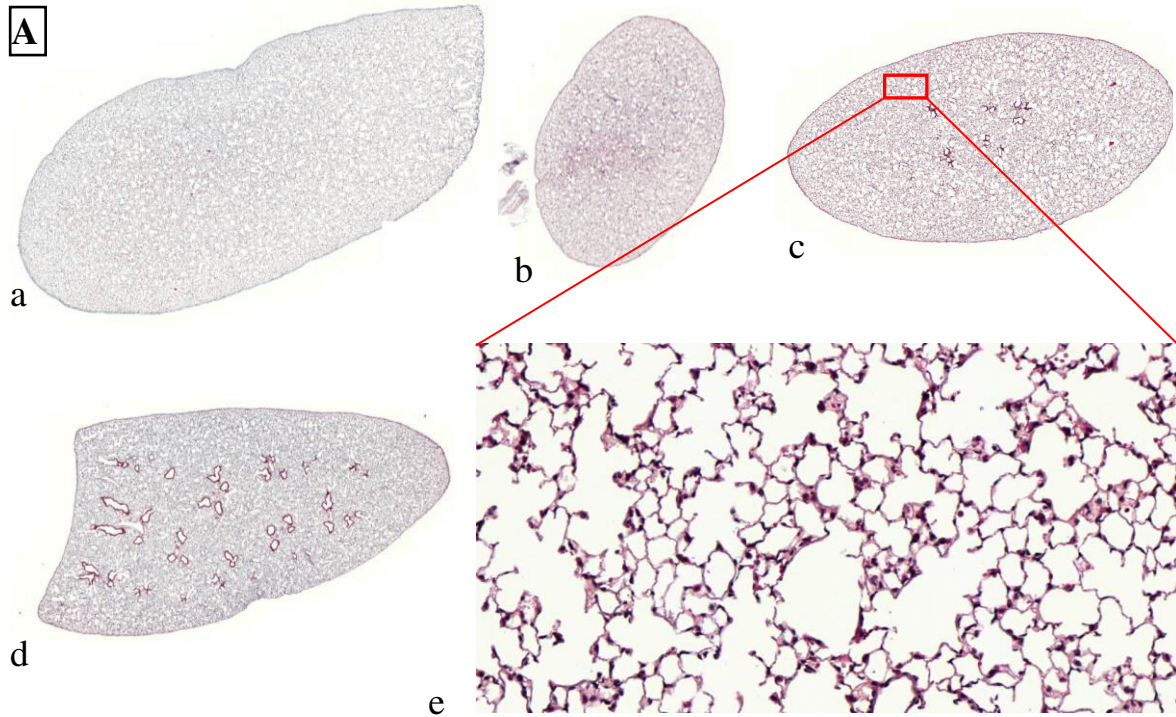


Abb. 37: Histologische Untersuchung: Masson-Goldner Färbung

A - Gesunde Mäuse ohne Bleomycinapplikation. a-d: Übersicht ganze Schnitte nach Masson-Goldner Färbung. e: 20-fache Vergrößerung eines repräsentativen Ausschnitts aus c.

B - Bleomycin + Kochsalz (NaCl). a-d: Übersicht ganze Schnitte nach Masson-Goldner Färbung, keine Vergrößerung; e: 20-fache Vergrößerung eines repräsentativen Ausschnitts aus d.

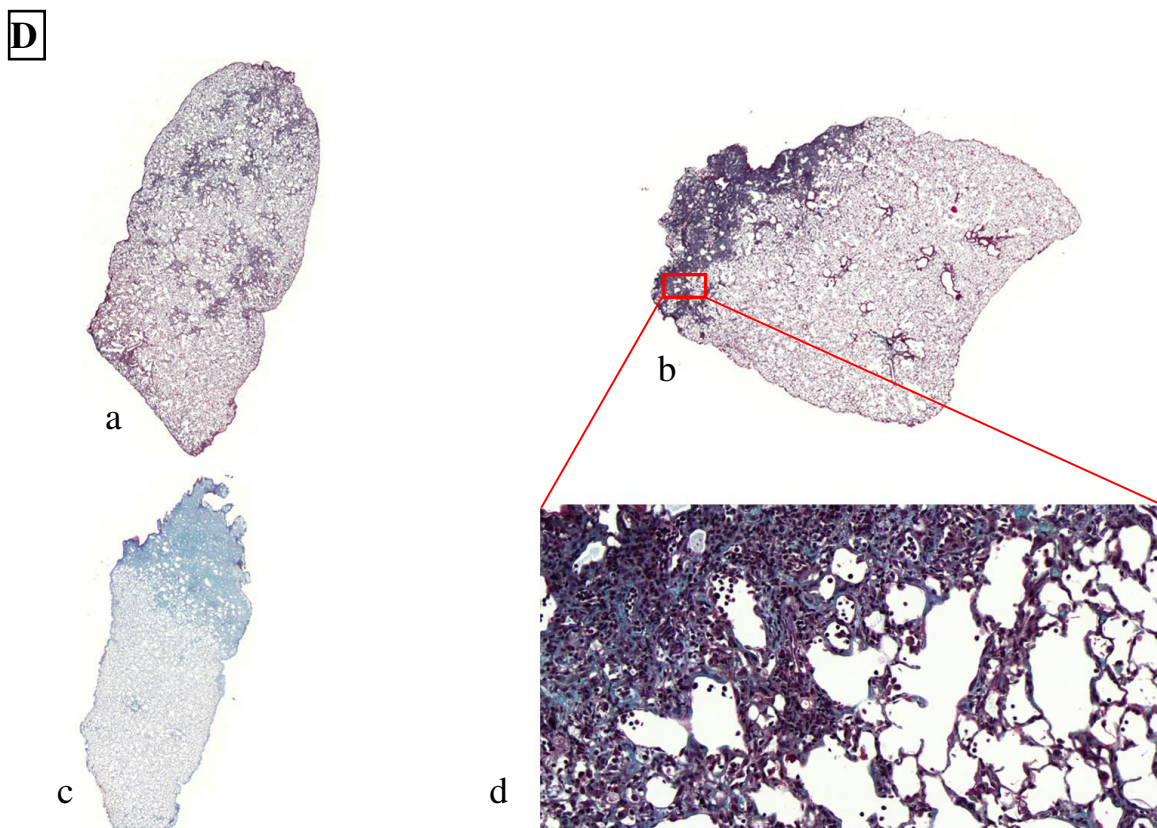
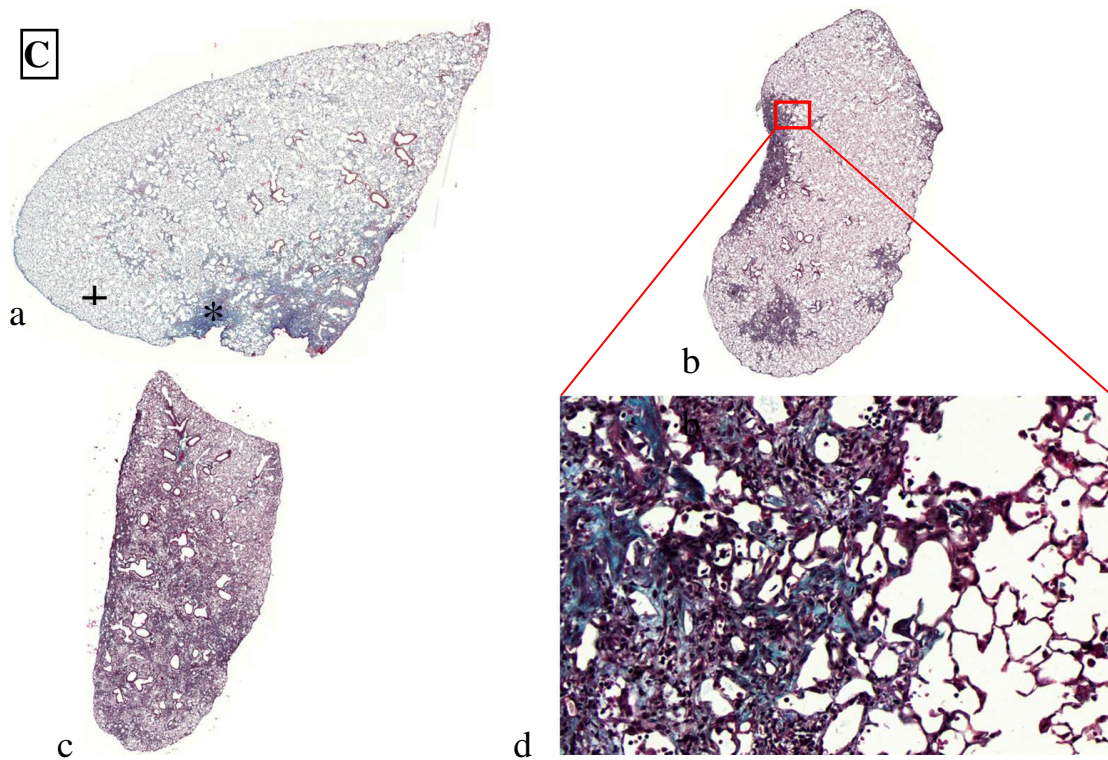


Abb. 37 (Fortsetzung):

C - Frühtherapieregime - Bleomycin + Lepirudin. a-c: Übersicht ganze Schnitte nach Masson-Goldner Färbung. d: 20-fache Vergrößerungen eines repräsentativen Ausschnitts aus b.

D - Spättherapieregime - Bleomycin + Lepirudin. a-c: Übersicht ganze Schnitte nach Masson-Goldner Färbung. d: 20-fache Vergrößerung eines repräsentativen Ausschnitts aus b.

In den Übersichtsaufnahmen und der Vergrößerung der Masson-Goldner Färbung der Gewebeschnitte der gesunden Kontrolltiere zeigt sich gesundes Lungengewebe mit regelrechter und homogener Struktur (Abb. 37A). Es zeigen sich dünne Septen, die zahlreiche kleine Alveolen unterteilen, sowie nur wenige intraalveoläre Zellen. Es existiert nur wenig kollagenes Bindegewebe. Die Alveolarräume sind frei von Entzündungszellen, Schleim und entzündlichem Infiltrat. (Abb. 37A.e)

Die für eine Bleomycin induzierte pulmonale Fibrose typische inhomogene Lungenarchitektur findet sich in der mit Kochsalz behandelten Kontrollgruppe (Abb. 37B) ebenso wie in den mit Lepirudin behandelten Gruppen (Abb. 37C - Frühtherapie, Abb. 37D - Spättherapie). In direkter Nachbarschaft zu Bereichen mit starker Fibrosierung und entzündlichen Veränderungen (Abb. 37B.b: *; Abb. 37C.a: *) liegen nahezu unveränderte Areale (Abb. 37B.b: +; Abb. 37C.a: +). Auch in den weniger betroffen scheinenden Arealen zeigen sich pathologische Veränderungen, vor allem emphysematös veränderte Areale mit größeren Bullae.

In der Vergrößerung erkennt man verdickte Septen und vermehrtes Bindegewebe, was eine Gewebeverdichtung bedeutet. Sowohl in den Übersichtsaufnahmen als auch in den Vergrößerungen kann man eine deutliche Mehrablagerung von Kollagen (grünblau) erkennen, vornehmlich in den stark fibrosierten Bereichen

In der Färbung nach Masson-Goldner lassen sich mikroskopisch keine Unterschiede zwischen mit Lepirudin behandelten Tieren (Abb. 37C - Frühtherapie, Abb. 37D - Spättherapie) und Tieren die Kochsalzlösung (Abb. 37B) erhielten feststellen. Ebenso zeigen sich im Vergleich der Lepirudingruppen untereinander die gleichen mikroskopischen Veränderungen in vergleichbarer Ausprägung.

4.2.9 – Quantitative morphometrische Analysen

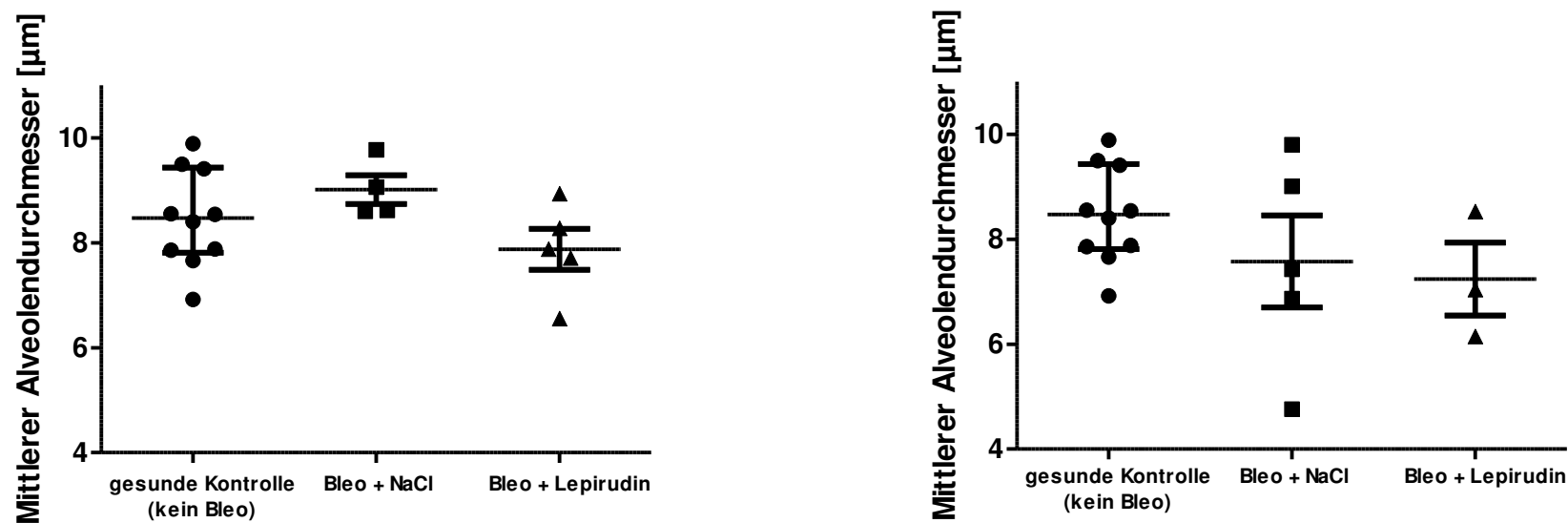


Abb. 38: Morphometrische Analyse der histologischen Schnittpräparate. Dargestellt sind die mittleren alveolären Durchmesser.

Links – Frühtherapie; Rechts – Spättherapie; Eingezeichnet sind Einzelwerte, Median und Interquartilrange.

Für die statistische Auswertung wurde ein Zweistichproben t-Test verwendet (Mann-Whitney Test)

Im Vergleich der mittleren Alveolendurchmesser zeigten sich bei beiden Therapieregimen geringe Unterschiede zur gesunden Kontrollgruppe, welche jedoch nicht signifikant waren (gesunde Kontrolle - $MW=8,5 \pm 0,9\mu\text{m}$; NaCl früh - $MW=9,0 \pm 0,5\mu\text{m}$; NaCl spät - $MW=7,6 \pm 2,0\mu\text{m}$; Lepirudin früh - $MW=7,9 \pm 0,9\mu\text{m}$; Lepirudin spät - $MW=7,2 \pm 1,2\mu\text{m}$).

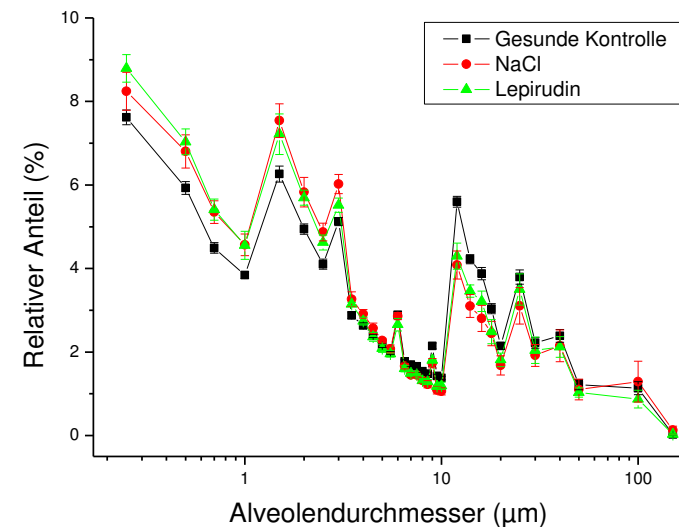
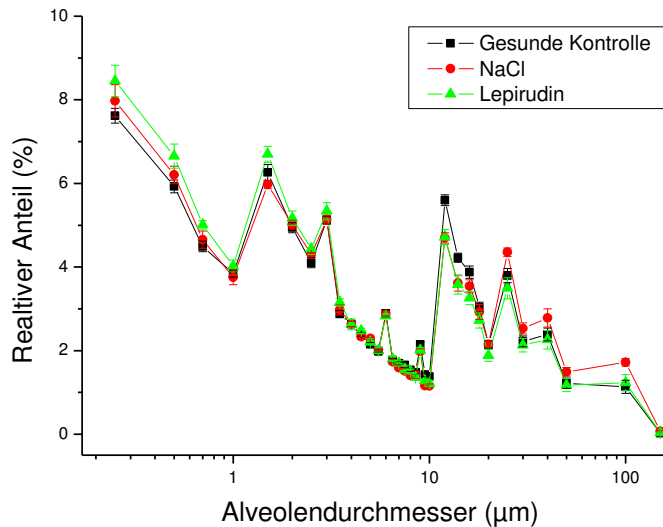


Abb. 39: Morphometrische Analyse der histologischen Schnittpräparate. Dargestellt sind die Häufigkeitsverteilungen für den Alveolendurchmesser bei früh (links), bzw. spät (rechts) therapierten Mäusen.

Die computergestützte morphometrische Analyse der Gewebeschnitte zeigte ein charakteristisches Verteilungsmuster für die Alveolendurchmesser in der gesunden Kontrollgruppe. Bei den mit Bleomycin behandelten Gruppen zeigten sich teilweise deutliche Abweichungen der Verteilung der Alveolendurchmesser von der unbehandelten Kontrolle. So ist zum Beispiel der Anteil der Alveolen im Bereich zwischen 10-20µm geringer. Im Bereich zwischen 0,25-3µm fand sich v. a. in der Spättherapie in den behandelten Gruppen ein erhöhter Anteil an sehr kleinen Alveolen, was auf ein gesteigertes Remodelling schließen lässt.

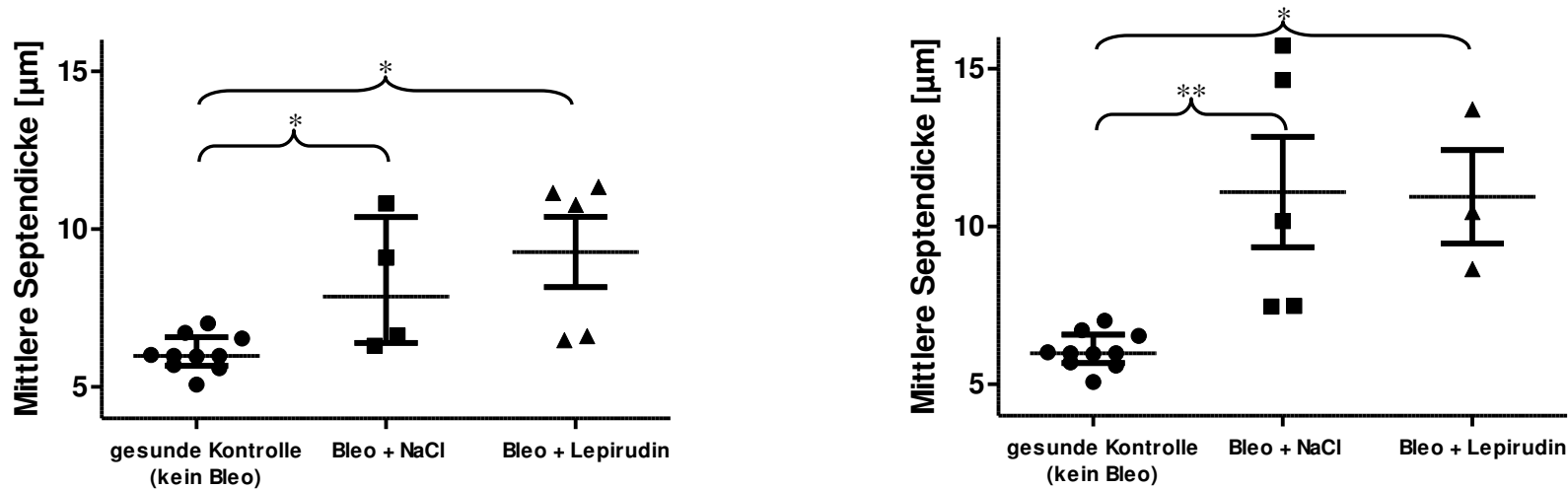


Abb. 40: Morphometrische Analyse der histologischen Schnittpräparate. Dargestellt sind die mittleren Septendicken.

Links – Frühtherapie; Rechts – Spättherapie; Eingezeichnet sind Einzelwerte, Median und Interquartilrange.

Für die statistische Auswertung wurde ein Zweistichproben t-Test verwendet (Mann-Whitney Test)

*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$, jeweils im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe.

Der Vergleich der mittleren Septendicken ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den unbehandelten Kontrollen und den mit Bleomycin behandelten Mäusen. In der Gruppe Frühtherapie waren die Werte von $6,1\mu\text{m}$ (unbehandelt) auf $8,2\mu\text{m}$ (NaCl), bzw. $9,3\mu\text{m}$ (Lepirudin) erhöht. In der Gruppe Spättherapie stiegen die Werte auf $11,1\mu\text{m}$ (NaCl), bzw. $10,9\mu\text{m}$ (Lepirudin). Es bestand zwischen Lepirudin- und Kochsalzgruppen jedoch kein signifikanter Unterschied.

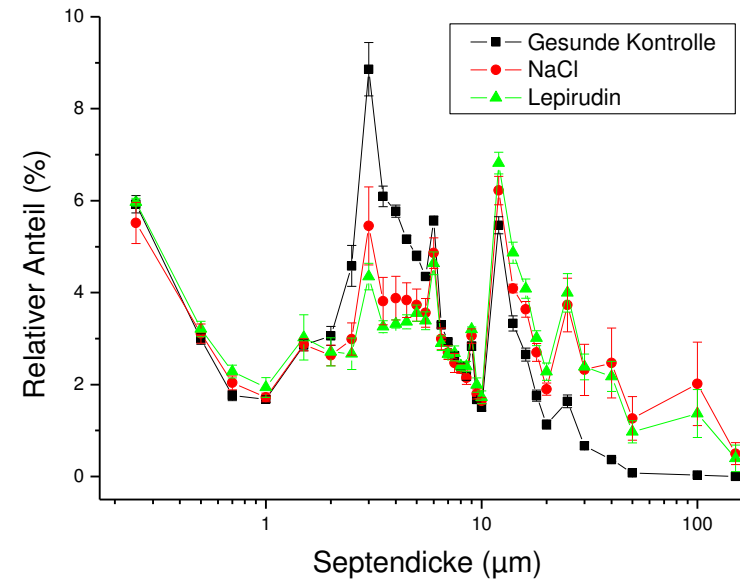
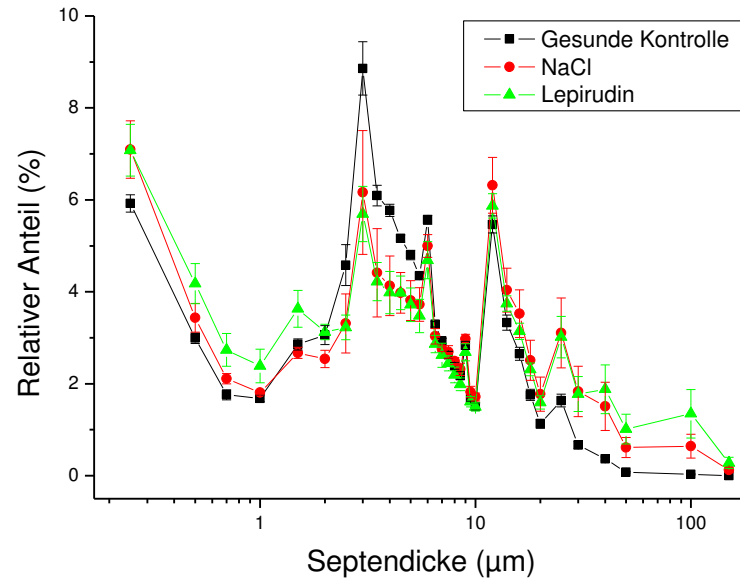


Abb. 41: Morphometrische Analyse der histologischen Schnittpräparate. Dargestellt sind Häufigkeitsverteilungen für die Septendicke bei früh (links), bzw. spät (rechts) therapierten Mäusen.

Die computergestützte morphometrische Analyse der Gewebeschnitte zeigte ein charakteristisches Verteilungsmuster für die Septendicken in der gesunden Kontrollgruppe. Bei den mit Bleomycin behandelten Gruppen zeigten sich in beiden Behandlungsschemata deutliche Abweichungen der Verteilung der Septendicken von den unbehandelten Mäusen.

Vor allem ein erhöhter Anteil an dickeren Septen (20-100µm) und gleichzeitig reduzierter Anteil an dünneren Septen (2-6µm) war festzustellen.

Zwischen Lepirudin- und Kochsalzgruppe besteht nur ein geringer Unterschied.

5. Diskussion

Es konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass ein antikoagulatives Therapiekonzept fibrotische und entzündliche Parameter bei pulmonaler Schädigung positiv beeinflussen kann. Hierzu finden sich vielfältige Studien, die verschiedenste Agenzien untersuchten, so zum Beispiel Heparin bei einem Kaninchenmodell der bleomycininduzierten Lungenfibrose [Günther - 2003], Antithrombin oder aktiviertes Protein C bei einem Rattenmodell des LPS-verursachten Lungenschadens [Murakami - 1997; Okajima - 1998]. Auch für direkte Thrombininhibitoren wurden Versuche durchgeführt, welche einen positiven Einfluss auf profibrotische Parameter aufzeigen konnten [Howell - 2001]. Eine Untersuchung des direkten Thrombininhibitors Lepirudin bei dem Mausmodell der bleomycininduzierten Lungenfibrose fehlt bislang. In der vorliegenden Arbeit wurde nun untersucht, inwieweit eine antikoagulative Therapie mit Lepirudin den Pathomechanismus der gestörten intraalveolären Hämostase bei der Bleomycin induzierten pulmonalen Fibrose bei dem verwendeten Mausmodell zu beeinflussen vermag, und ob diese Intervention einen therapeutischen Benefit darstellt. Hierzu wurden Bleomycin-geschädigte Mäuse inhalativ mit Lepirudin behandelt und das Ausmaß der Fibrose anhand lungenfunktioneller, biochemischer und histologischer Parameter ermittelt. Die initialen Versuche zur Dosisbestimmung und Pharmakokinetik ließen bereits erkennen, dass die Mäuse die Lepirudingabe in der ermittelten Dosierung gut vertrugen und dass in einem kurzen Zeitraum danach keine unerwünschten Wirkungen, wie z. B. Blutungen oder eine akute Toxizität, die zu erhöhter Mortalität führt, auftraten. Zudem konnte über die PTT-Bestimmung aus der BAL-Flüssigkeit der Mäuse nachgewiesen werden, dass durch die Lepirudingabe die Imbalance der alveolären Hämostase korrigiert und ein antikoagulatorisches Milieu im Alveolarraum geschaffen werden konnte.

Auch im Verlauf der Langzeit Versuche konnte beobachtet werden, dass die Versuchstiere die Lepirudingabe gut vertragen haben und dass auch hierbei keine unerwünschten Nebenwirkungen wie Blutungen aufgetreten sind.

Nach Bleomycinapplikation entwickelten die Tiere eine Lungenfibrose, die lungenfunktionell, sowie durch biochemische und histologische Analysen näher charakterisiert wurde. Hinsichtlich der Mortalität zeigen sich nur geringe Unterschiede zwischen den mit Lepirudin behandelten Tieren und der mit Kochsalz behandelten

Kontrollgruppe. Bei der Gruppe "Spättherapie" lässt sich sogar ein ungünstiger Einfluss von Lepirudin vermuten.

Signifikante Unterschiede zwischen den behandelten Gruppen konnten einzig beim Gehalt an löslichem Kollagen in der Versuchsgruppe Frühtherapie nachgewiesen werden. Dieser war bei den mit Lepirudin behandelten Tieren weniger stark erhöht als bei denen, die Kochsalz erhielten.

Alle anderen erhobenen Parameter wie Gewicht, Compliance, Differenzialzellbild, Hydroxyprolingehalt und die morphometrische Analyse der histologischen Schnitte wiesen geringe, jedoch nicht signifikante Unterschiede zwischen den mit Lepirudin und den mit NaCl behandelten Gruppen auf, die zudem unabhängig vom Applikationszeitraum waren.

Die hier erhobenen Befunde stehen im Widerspruch zu Ergebnissen aus anderen vergleichbaren Studien, die eine deutliche Beeinflussung des Ausmaßes der Fibroseentwicklung durch Korrektur der alveolären hämostatischen Imbalance zeigten. Howell et al (2001) testeten den direkten Thrombin Inhibitor UK-156406 an einem Modell der bleomycininduzierten Lungenfibrose bei Ratten und zeigte eine signifikante Abmilderung der pulmonalen Kollagenakkumulation, sowie der Menge an mRNA für Connective Tissue Growth Factor (CTGF), eines profibrotisch wirkenden Stoffes, jedoch keinen Effekt auf die Rekrutierung inflammatorischer Zellen.

Günther et al (2003) zeigten in einem Kaninchenmodell der bleomycininduzierten pulmonalen Fibrose eine weitgehende Normalisierung der Compliance und Unterdrückung der Akkumulation von Hydroxyprolin und löslichem Kollagen durch Behandlung mit Heparin oder Urokinase. Vor allem eine frühe Therapie mit Heparin (Tag 2-12 nach Bleomycingabe) bzw eine späte Therapie mit Urokinase (Tag 14-24 nach Bleomycingabe) waren besonders effizient.

Der direkte Thrombininhibitor Dabigatran Etexilat wurde von Bogatkevich et al (2011) untersucht und zeigte in einem Mausmodell der bleomycininduzierten Lungenfibrose bei oraler Zufuhr als Nahrungszusatz eine Reduktion der Thrombinaktivität, reduzierte Zahlen an inflammatorischen Zellen, eine Reduktion histologischer Fibrosezeichen und eine Reduktion des pulmonalen Kollagen und Hydroxyprolingehaltes.

Das Ausbleiben eines therapeutischen Effektes, trotz Beeinflussung bereits ausgemachter Pathomechanismen einerseits und positiver Resultate in mehreren vergleichbaren Studien andererseits führt zu folgenden Überlegungen:

- 1: Das verwendete Modell besitzt Unzulänglichkeiten
- 2: Es existieren Fehler im Versuchsaufbau
- 3: Thrombin ist nicht die richtige Zielstruktur für einen antikoagulatorischen Therapieansatz
- 4: Abgesehen von der Fibrinbildung existieren weitere Mechanismen, die für die Fibroseentwicklung von Bedeutung sind.

Zu 1)

Bislang ist das Modell der Bleomycin induzierten Lungenfibrose das meistverwendete und best etablierte, da es relativ einfach durchzuführen ist und eine gute Reproduzierbarkeit besitzt, jedoch unterliegt es auch einigen Einschränkungen. So besitzt die initiale Reaktion auf Bleomycin vornehmlich inflammatorischen Charakter, ausgelöst durch eine Überproduktion freier Radikale mit vermehrter Produktion proinflammatorischer Zytokine und Aktivierung von Makrophagen und Neutrophilen, was dem Bild eines akuten Lungenschadens entspricht. [Moeller – 2008]. Die folgende Entwicklung einer Fibrose ist in starkem Maße abhängig von dem initialen inflammatorischen Stimulus und zudem teilweise reversibel [Izbicki – 2002], was im Gegensatz zur IPF, deren Fortschreiten irreversibel ist, steht. Der Wechsel zwischen diesen beiden Phasen findet um den neunten Tag nach Verabreichung statt [Chaudhary - 2006].

In den vorliegenden Versuchen hat die Bleomycin Applikation zur Ausbildung einer Fibrose mit den typischen Charakteristika geführt (histologische Veränderungen, Reduktion der Compliance, Erhöhung von Hydroxyprolinegehalt und löslichem Kollagen). Prinzipiell ist das Bleomycin-Modell zur Beantwortung der hier adressierten Fragen geeignet, da es die Gerinnungsabnormalitäten aufweist, die bei der IPF eine Rolle spielen und somit die Targets einer antikoagulativen Therapie vorhanden waren [Wygrecka - 2008].

Zudem besitzt das Modell die nötigen Eigenschaften um tatsächlich signifikante Effekte eines Wirkstoffes, seien diese nun antiinflammatorischer oder antifibrotischer Natur, aufzudecken.

Zwar haben andere Versuche mit antikoagulativen Therapien und gleicher Zielstruktur deutlich positive Effekte nachweisen können [Howell – 2001], jedoch muss darauf hingewiesen werden, dass dabei Versuchstiere einer anderen Spezies behandelt wurden. Andere Studien zeigten auf, dass sowohl geschlechtsspezifische Unterschiede in den Gerinnungssystemen [Lemini - 2007], als auch Unterschiede zwischen verschiedenen Spezies [Siller-Matula - 2008; Karges - 1994] existieren. So liegt z.B. die Aktivität von Faktor V bei Kaninchen um den Faktor 50 höher als beim Menschen [Karges - 1994] und es fanden sich deutlich voneinander differierende Werte der Hämostaseparameter zwischen Mäusen und Ratten [Lemini - 2007]. Die Vermutung liegt somit nahe, dass bei Mäusen andere, durch Lepirudin nicht beeinflusste Wege des Gerinnungssystems, überwiegen.

Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass der Wirkstoff nur humanes Thrombin, nicht jedoch das Thrombin der Maus inhibiert. Eine Studie von Esumi et al [1991] zeigte bei Mäusen jedoch eine deutliche Verlängerung der Gerinnungszeit nach r-Hirudin (CGP 39393) Applikation, womit diese Möglichkeit ausscheidet.

Ein weiterer Unterschied könnte in einer veränderten Pharmakokinetik von applizierten Antikoagulantien liegen, z.B. einer vermehrten Inaktivierung oder einer schnelleren Elimination des Wirkstoffes in der Maus.

Zu 2)

Eine mögliche Ursache für das Ausbleiben positiver Effekte könnte im Versuchsaufbau liegen. So könnte eine Therapie in einem ungünstigen Zeitfenster ohne die erhoffte Wirkung bleiben. Für eine solche Annahme spricht, dass in der Studie von Günther et al. [2003] eine solche Abhängigkeit vom Applikationszeitraum beobachtet wurde. Die deutlichsten Effekte einer Heparin-gabe auf den Fibroseverlauf waren bei einem frühen Therapieregimen zu sehen, während einer Phase also, in der die prokoagulatorische Aktivität nach Bleomycingabe am größten ist [Idell - 1987; Olman - 1995]. Da jedoch keines der verwendeten Therapieregime eine signifikante Beeinflussung des Krankheitsverlaufes zeigt, lässt sich ein Fehler durch eine Beeinflussung im falschen Zeitfenster der bleomycininduzierten Fibrose mit hoher Wahrscheinlichkeit ausschließen.

Auch ein zu lang gewähltes Applikationsintervall könnte für das Ausbleiben positiver Effekte ursächlich sein. Wir haben uns für ein Behandlungsintervall mit Applikation an jedem zweiten Tag entschieden, was möglicherweise zu lang war, um Thrombin

dauerhaft zu inhibieren, so dass keine kontinuierliche antikoagulatorische Aktivität im Alveolarraum aufrecht erhalten werden konnte. Für die Verabreichung an jedem zweiten Tag entschieden wir uns um eine übermäßige Belastung der Mäuse durch wiederholte Applikationen bzw. größere Mengen an Protein zu vermeiden. Zwar wurde in den Vorversuchen eine relativ kurze Halbwertszeit von 1-2 Stunden bestimmt, aber auch 8 Stunden nach der Applikation war immer noch eine 795-fach erhöhte Lepirudinaktivität im Alveolarraum nachweisbar war, die auf einen länger anhaltenden antikoagulativen Effekt hinwies. Dies ließ den Schluss zu, ein längeres Applikationsintervall wählen zu können was auch im Einklang mit den Versuchen am Kaninchen Bleomycinmodell steht, bei dem bis 36 Stunden nach Heparinverneblung noch eine antikoagulatorische Aktivität im Alveolarraum nachweisbar war [Günther - 2003].

Die Vermutung, dass das Applikationsintervall zu lang gewählt wurde, wird durch die Bestimmung der Gerinnungsaktivität in der BAL Flüssigkeit von Mäusen der Spättherapiegruppe, bei denen zwischen letzter Applikation und Probeentnahme etwa 48 Stunden liegen, bestätigt, da dort keine im Vergleich zu unbehandelten Mäusen erhöhte PTT Verlängerung messbar war. Zwar bestand zwischen den mit NaCl und den mit Lepirudin behandelten Mäusen ein signifikanter Unterschied ($p=0,0006$), jedoch waren die PTT-Werte nur geringfügig verlängert.

Folglich müsste der Wirkstoff in kürzeren Zeitabständen dargereicht werden, was jedoch wiederum eine höhere Belastung für die Versuchstiere darstellen und zu einer höheren Mortalität führen kann. In den vorliegenden Versuchen mit früh stattfindender Therapie ist auffällig, dass der größte Anteil der mit Lepirudin behandelten Tiere im Applikationszeitraum von d1 bis d11 verstarb. Die Vermutung liegt nahe, dass die Kombination der Belastungsfaktoren akut geschädigte Lunge, Wirkstoffapplikation und Proteinüberladung zu dieser hohen Mortalität führt.

Eine mögliche Lösung wäre die Implantation einer Minipumpe, welche einerseits den Vorteil einer kontinuierlichen Wirkstoffgabe ermöglicht und andererseits geringere Wirkstoffmengen aufgrund des gleichmäßig vorhandenen Wirkstoffspiegels notwendig macht. Nachteil dieser Methode ist die Tatsache, dass der Wirkstoff nicht direkt auf der alveolären Seite, sondern nur über den Blutweg in die Lunge gelangt. Andererseits konnte auch gezeigt werden, dass eine Beeinflussung der Fibroseentwicklung prinzipiell auch nach systemischer Applikation des Wirkstoffes möglich ist. In der Studie von Bogatkevich et al [2011] wurde der direkte Thrombininhibitor Dabigatran Etxilat

peroral über das Futter dargereicht, somit ist dieser ebenso nur auf dem Blutweg in die Lunge gelangt, und es zeigte sich dennoch eine deutliche Verringerung des fibrotischen Umbaus der Lunge.

zu 3) Es besteht die Möglichkeit, dass Thrombin als Zielstruktur ungeeignet ist und somit Lepirudin als Therapiestrategie ausscheidet.

Gegen eine solche Annahme spricht eine Studie von Howell et al (2001) an Ratten, die zeigte, dass ein direkter Thrombininhibitor (UK-156406) in der Lage war die Kollagenakkumulation in der Lunge zu reduzieren, wenn er in äquimolarer Konzentration zu Thrombin verwendet wurde. Mit Lepirudin als direktem Thrombininhibitor wird ebenfalls gezielt Thrombin inaktiviert und die Gerinnungskaskade unterbrochen. Auf diese Weise sollten fibrinvermittelte profibrotische Effekte, sowie zelluläre über PAR vermittelte Effekte von Thrombin blockiert werden. In einer Studie von Lindhout et al (1990) wurde allerdings nachgewiesen, dass der Mechanismus der Thrombininhibition durch r-Hirudin nicht schnell genug vonstatten geht, so dass geringe Mengen Thrombin gebildet werden, wodurch die Gerinnungsfaktoren VIII und V aktiviert werden und der Mechanismus der positiven Rückkopplung zu einer explosionsartigen Vermehrung von Thrombin führt, selbst wenn ausreichend r-Hirudin vorhanden ist. Folglich besteht die Möglichkeit, dass auch in unseren Versuchen trotz ausreichender Lepirudindosis Thrombin nicht schnell genug inhibiert wird und prokoagulatorische und profibrotische Effekte entfaltet.

Zu 4)

Hinsichtlich der pathogenetischen Bedeutung einer gestörten Gerinnungsregulation im Alveolarraum wurde vermutet, dass vor allem intraalveoläre gebildetes und akkumuliertes Fibrin eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung einer Lungenfibrose einnimmt [Seeger - 1993; Burkhardt - 1989]. Dass intraalveoläres Fibrin bei der Fibroseentwicklung möglicherweise nicht die entscheidende Schlüsselrolle besitzt, wurde in einer Studie von Hattori et al (2000) aufgeworfen, in der gezeigt wurde, dass Fibrinogen Knockout Mäuse nicht vor der Entwicklung einer Lungenfibrose nach Bleomycinapplikation geschützt sind.

Untersuchungen mit PAR-1 knock out Mäusen, die nach Bleomycinapplikation eine attenuierte Fibroseantwort zeigten [Howell – 2005], legten nahe, dass die profibrotischen Effekte einer gesteigerten Gerinnungsaktivierung möglicherweise über

zelluläre Effektoren vermittelt werden und diese unter Umständen einen größeren Stellwert besitzen als die durch Fibrin vermittelten Effekte

Lepirudin sollte jedoch auch die über Thrombin am PAR Rezeptor vermittelten Effekte inhibieren. Diese wären die über die Rezeptoren PAR-1, sowie PAR-3 und -4 vermittelte vermehrte Proliferation von Fibroblasten und Prokollagen Produktion [Chambers – 1998; Blanc-Brude - 2005], die Stimulation der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten [Bogatkevich - 2001] und weiterer profibrotischer und –inflammatorischer Zytokine [Chambers - 2000; Chambers - 2002; Ludwicka-Bradley - 2000; Shimizu - 2004; Monroe - 2007; Wygrecka - 2008].

PAR-1 wird jedoch nicht allein durch Thrombin aktiviert, sondern auch durch andere Agonisten, wie z.B. FXa (siehe Kapitel 1.2.5.2 - PAR-vermittelte Effekte), der in der Gerinnungskaskade oberhalb unserer Intervention liegt. Es ist also vorstellbar, dass trotz Thrombinhemmung über PAR-1 profibrotische Effekte vermittelt werden und unter Umständen diese übergeordneten Faktoren eine größere Rolle für die Fibroseentwicklung spielen. Zudem konnte gezeigt werden, dass auch PAR-2 Signalling, welches durch FXII/XI und TF/FVII aktiviert wird, und somit durch unsere Intervention nicht beeinflusst wurde, eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung einer Lungenfibrose spielt [Wygrecka - 2011].

Auch wenn Fibrinogen-Knockout Mäuse nicht vor einer Bleomycininduzierten Fibrose geschützt sind und die Fibrinbildung für die Fibroseentwicklung nicht ursächlich ist, kann eine gesteigerte Gerinnungsaktivität, neben den zellulären, über PAR vermittelten Effekten, auch anderweitig Einfluss auf den Verlauf der Fibroseentwicklung nehmen. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass intraalveolär deponiertes Fibrin ein starker Inhibitor der Surfactantfunktion [Seeger – 1993] ist. Über den Verlust der Oberflächenspannungsregulation und die damit einhergehende Beeinträchtigung der Compliance können profibrotische Prozesse möglicherweise begünstigt werden [Günther – 1999]. Fibrin ist jedoch nicht der einzige Faktor, der in der Lage ist die Funktion des Surfactant zu inhibieren. So können auch andere Stoffe wie Albumin und Hämoglobin, C-reaktives Protein, Lipide, sowie Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) ebenso die Funktion des Surfactant ungünstig beeinflussen [Zuo – 2008; Rodriguez-Capote – 2006] und dadurch ebenfalls die Lungenfunktion beeinträchtigen oder möglicherweise sogar zum fibrotischen Prozess beitragen.

Ein weiterer in unseren Versuchen unbeeinflusster Faktor ist das aktivierte Protein C, welches vielfältige Aktivitäten besitzt [Wygrecka - 2008, Esmon - 2006], jedoch in interstitiellen Lungenerkrankungen signifikant reduziert ist [Yasui – 2000], wodurch seine protektiven Wirkungen verloren gehen. So wären dies unter anderem die Inaktivierung von Faktor Va und VIIIa und die Inhibition von Plasminogen Aktivator Inhibitor (PAI-1).

Ein Mangel an APC bewirkt also über eine verminderte Inhibition von Faktor VIIIa eine Aktivierung der positiven Rückkopplung und somit eine vermehrte Thrombinproduktion. Das explosionsartig entstehende Thrombin könnte, in Anlehnung an die Versuche von Lindhout et al (1990), nicht ausreichend von Lepirudin inaktiviert werden.

Eine vermehrte PAI-Aktivität, wie sie durch den APC Mangel auftreten kann, führt nach Eitzmann et al (1996) zu einer stärkeren Ausbildung einer Fibrose, vermutlich basierend auf einer reduzierten Aktivität des fibrinolytischen Systems.

Zudem könnte durch die Inhibition von Thrombin die Bildung des Thrombin/Thrombomodulin-Komplexes reduziert sein, welcher Protein C aktiviert und wodurch folglich eine weitere Reduktion von APC stattfindet mit wiederum einer Verstärkung der zuvor beschriebenen nachfolgenden negativen Effekte dieses Defizites, sowie weiterer bislang unbekannter Effekte. Dieser Mechanismus konnte bisher noch nicht abschließend aufgeklärt werden und es sind hierfür weitere Studien nötig.

In Anbetracht der Ergebnisse dieser Studie, die bei den erhobenen Parametern keine Differenz zwischen den mit Lepirudin und den mit Kochsalz behandelten Tieren aufzeigen konnten, lässt sich vermuten, dass die spezifische Inhibition von Thrombin zu weit Downstream in der Gerinnungskaskade einzugreifen scheint und Mechanismen beeinflusst, die von untergeordneter Bedeutung für die Progression der Fibrose sind, bedeutsamere Wege jedoch unbeeinflusst lässt.

Multiproteaseinhibitoren bzw. duale Thrombin/FaktorXa Inhibitoren wären für eine antikoagulatorische Therapieform möglicherweise geeigneter, da sie an mehreren Stellen in der Gerinnungskaskade angreifen und dadurch vermutlich die profibrotischen Prozesse deutlicher inhibieren könnten.

Diese Vermutung lässt sich mit den Beobachtungen aus der Studie von Günther et al (2003) stützen, die eine signifikante Abmilderung der Bleomycin induzierten Lungenfibrose nach Heparinverneblung darlegen. Abgesehen von den Speziesunterschieden, wie oben diskutiert, wurde unfraktioniertes Heparin verwendet,

was neben der Inhibition von FIXa, Xa und Thrombin noch weitere, vielfältige Mechanismen über Antithrombin entwickelt [siehe 1.2.4 – Antithrombin]. Durch diese zusätzlichen Mechanismen kann, im Gegensatz zu Lepirudin, möglicherweise auch früh genug und an verschiedenen Punkten in die Gerinnungskaskade eingegriffen und profibrotische Folgereaktionen blockiert werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das verwendete Modell prinzipiell geeignet ist die in dieser Arbeit adressierten Fragen anzugehen und zu beantworten ob der Verlauf der bleomycininduzierten Lungenfibrose durch Lepirudin günstig beeinflusst, bzw. ob das gestörte intraalveoläre hämostatische Gleichgewicht korrigiert werden kann. Es bestand jedoch höchstwahrscheinlich ein zu lang gewähltes Applikationsintervall, wodurch keine kontinuierliche antikoagulatorische Aktivität im Alveolarraum aufrecht erhalten werden konnte. Bei weiteren Untersuchungen sollte folglich ein kürzeres Zeitintervall, möglicherweise in Kombination mit einer alternativen Darreichungsform (z.B. mittels implantierbarer Minipumpe) gewählt werden. Auch eine intensivere Untersuchung der Pharmakokinetik von Lepirudin bei Mäusen erscheint sinnvoll, da diese sich in dieser Arbeit als sehr komplex erwiesen hat. Des Weiteren besteht die Vermutung, dass alternative Wege (u.a. über PAR, APC oder alternative Surfactantinaktivierung), die durch die Thrombininhibition unbeeinflusst bleiben, wesentlich zur Fibroseentwicklung beitragen und somit dessen alleinige Beeinflussung nicht genügt um einen therapeutischen Effekt zu erzielen.

6. Zusammenfassung

Diese Studie beschäftigte sich mit der Frage, ob durch den direkten Thrombininhibitor Lepirudin der Verlauf der bleomycininduzierten Lungenfibrose günstig beeinflusst werden kann, ob dadurch die gestörte Gerinnungsregulation im Alveolarraum korrigiert werden kann und ob diese Therapieoption verträglich und praktikabel ist. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob es ein therapeutisches Zeitfenster gibt, in der die Lepirudingabe besonders wirksam ist.

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden Mäuse mit Bleomycin behandelt und zu einem frühen (d1-d11) oder einem späten Zeitpunkt (d11-d19) nach Lungenschädigung mit Lepirudin bzw. NaCl behandelt. An Tag 21 wurden Verlaufs- (Überleben, Gewicht) und Fibroseparameter (Compliance, Differenzialzellbild, lösliches Kollagen in BAL, Hydroxyprolinegehalt der Lunge und histologische Morphometrie) bestimmt und die gewonnenen Daten wurden einander gegenübergestellt.

Die Therapie wurde von den Mäusen gut vertragen und es zeigten sich im Verlauf keine unerwünschten Wirkungen.

Im Vergleich zu mit NaCl-behandelten Kontrolltieren zeigten die mit Lepirudin behandelten Tiere keine Anzeichen für eine abgeschwächte Fibroseentwicklung. Einzig beim Gehalt an löslichem Kollagen in der Versuchsgruppe Frühtherapie (Tag 1-11) konnten signifikante Unterschiede zwischen den behandelten Gruppen nachgewiesen werden. Alle anderen Parameter zeigten keinen signifikanten Unterschied.

Gründe für das Ausbleiben positiver Effekte liegen einerseits vermutlich an einem zu lang gewählten Applikationsintervall und damit verbunden am Fehlen eines kontinuierlich hohen Wirkspiegels, sowie andererseits an dem Umstand, dass durch eine selektive Thrombinhemmung nicht alle für die Fibroseentwicklung relevanten Pathomechanismen beeinflusst werden. Darüberhinaus können speziesspezifische Besonderheiten für den unzureichenden therapeutischen Effekt mitverantwortlich sein. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die intraalveoläre Inhibition von Thrombin durch den direkten Thrombininhibitor Lepirudin bei den durchgeführten Versuchen keinen eindeutig nachweisbaren positiven Effekt auf die bleomycininduzierte Lungenfibrose besitzt, was sich am ehesten darauf zurückführen lässt, dass, abseits von den über Thrombin ausgelösten Effekten, noch weitere Signalwege und Kaskaden existieren, die bereits vor dem Schritt der Thrombingeneration, also stromaufwärts gelegen, beginnen und somit unabhängig davon und im überwiegenden Ausmaß zur Progression der Lungenfibrose beitragen.

Summary

This study dealt with the question whether the course of the IPF could be positively influenced by the direct thrombin inhibitor Lepirudin, whether the deranged regulation of coagulation in the alveolar space could be corrected and whether this option of treatment is tolerated and feasible. In addition should be examined if there is a therapeutic window in which the administration of Lepirudin would be the most effective.

To answer these questions, mice were treated with Bleomycin and received Lepirudin or saline solution at an early (d1-d11) or a late (d11-d19) point of time, after lung damage. At day 21 parameters of progress (survival, weight) and fibrosis (Compliance, differential cell count, soluble collagen in BAL, Hydroxyprolin content of the lung and histological morphometry) were obtained and the results gained were opposed to each other.

Therapy was well tolerated by the mice and no adverse effects could be seen during the study.

Compared to saline treated animals, animals who received Lepirudin showed no signs of an attenuated development of fibrosis. Significant differences could only be seen in the level of soluble collagen in the early therapy group (day 1-11). All other parameters showed no significant difference.

Reasons for the absence of positive effects could be an intervall of administration chosen too long and, as a result, the lack of a continuous high level of anticoagulation on the one hand and the fact that the selective inhibition of thrombin does not influence all pathomechanisms that are relevant for the development of fibrosis on the other.

Furthermore, species specific characteristics can be jointly responsible for the insufficient therapeutic effect.

In summary there is to say that the intraalveolar inhibition of Thrombin by the direct thrombininhibitor Lepirudin showed no detectable distinct positive effect on the bleomycin induced pulmonary fibrosis. This is most likely attributable to the fact that, aside the effects activated by thrombin, there are more signalling pathways and cascades beginning upstream, that is before thrombingeneration, and hence account independently and predominantly to the progression of pulmonary fibrosis.

7 Abkürzungsverzeichnis

(a)PTT	(aktivierte) partielle Thromboplastinzeit
6MWT	6-Minuten-Geh-Test / <i>6-minute walk test</i>
A.dest.	destilliertes Wasser / <i>Aqua destillata</i>
AEC	Alveolarepithelzelle
AIP	Akute Interstitielle Pneumonie
AM	Alveolarmakrophagen
APC	Aktiviertes Protein C
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrome</i>
AT	Antithrombin
ATS	<i>American Thoracic Society</i>
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
Ca	Calcium
COP	Kryptogene Organisierende Pneumonie
Da	Dalton - Einheit der Molekülmasse
DIP	Desquamative Interstitielle Pneumonie
DLCO	Diffusionskapazität für Kohlenmonoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure / <i>deoxyribonucleic acid</i>
DTI	direkte Thrombininhibitoren
ECM	Extrazelluläre Matrix
EMT	epitheliale mesenchymale Transition
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERS	<i>European Respiratory Society</i>
F-...	Faktor-...
F-...a	aktivierter Faktor-...
Fp	Fibrinopeptid
FVC	Forcierte Vitalkapazität
GAG	Glykosaminoglykan
GER	Gastroösophagealer Reflux
GMZ	glatte Muskelzellen
HCL	Salzsäure
HIT	Heparininduzierte Thrombozytopenie
HMW-Kininogen	<i>High Molecular Weight-Kininogen</i>
HRCT	Hochauflösende Computertomographie / <i>High Resolution Computed Tomography</i>
IAP	instabile Angina pectoris
IIP	idiopathische interstitielle Pneumonie / <i>idiopathic interstitial pneumonia</i>
IL	Interleukin
IPF	idiopathische pulmonale Fibrose
IRDS	neonatales Atemnotsyndrom / <i>Infant respiratory distress syndrome</i>
kg	Kilogramm (10^3 g)
LIP	Lymphoide Interstitielle Pneumonie
LPS	Lipopolysaccharid
LPS	Lipopolysaccharid
mg	Milligramm (10^{-3} g)
ml	Milliliter (10^{-3} l)
µl	Mikroliter (10^{-6} l)
mm	Millimeter (10^{-3} m)
MMP	Matrixmetalloproteinase
mTOR	<i>mammalian Target of Rapamycin</i>

NaCl	isotone 0,9% Kochsalzlösung
NfκB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NSIP	Nichtspezifische Interstitielle Pneumonie
NSTEMI	Nicht ST-Strecken Hebungsinfarkt / <i>Non-ST-elevation myocardial infarction</i>
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
PAI	Plasminogen Aktivator Inhibitor
PAR	Protease aktivierte Rezeptoren
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung / <i>Phosphate buffered saline</i>
PCI	perkutane Koronarintervention
PDGF	<i>Platelett Derived Growth Factor</i>
PMMA	Polymethyl-methyl acrylat-Membran
PPFE	Pleuroparenchymale Fibroelastose
PT	Prothrombin Zeit / <i>Prothrombin time</i>
RB-ILD	Respiratorische Bronchiolitis assoziierte Interstitielle Lungenerkrankung
r-Hirudin	rekombinantes Hirudin
RNA	Ribonukleinsäure / <i>ribonucleic acid</i>
RZB	Relative Zentrifugationsbeschleunigung
SHH	<i>Sonic Hedgehog</i> (Wachstumsfaktor)
SP	Surfactant Protein
STEMI	ST-Strecken Hebungsinfarkt / <i>ST-elevation myocardial infarction</i>
TF	<i>Tissue Factor</i>
TFPI	<i>Tissue factor pathway inhibitor</i>
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor-Beta</i>
TLC	Totale Lungenkapazität
TNF-Alpha	Tumornekrosefaktor-Alpha
t-PA	Gewebsplasminogenaktivator / <i>Tissue-type plasminogen-activator</i>
TZ	Thrombin Zeit
U	Units (internationale Einheiten)
UIP	gewöhnliche interstitielle Pneumonie / <i>Usual Interstitial Pneumonia</i>
u-PA	Urokinase / <i>Urokinase-type plasminogen-activator</i>
WNT	Wachstumsfaktor (W ing; I nt)

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Übersicht über die idiopathischen interstitiellen Pneumonien	2
Abbildung 2: HRCT-Aufnahmen, die das radiologische Bild einer UIP, bzw. einer möglichen UIP demonstrieren [übernommen aus Raghu - 2011]	4
Abbildung 3: Chirurgische Lungenbiopsie. Demonstration des Musters der UIP [übernommen aus Raghu - 2011]	5
Abbildung 4: Der natürliche Krankheitsverlauf der IPF – unterschiedliche klinische Phänotypen [adaptiert aus King – 2011]	9
Abbildung 5: Pathomechanismen, die der IPF zugrunde liegen [übernommen aus King – 2011]	11
Abbildung 6: Schematische Darlegung der Gerinnungskaskade [übernommen aus Ruppert – 2006a]	16
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Thrombins mit aktivem Zentrum und den beiden Exosites [übernommen aus Gurm - 2005]	17
Abbildung 8: Aufbau des Fibrinogen-Moleküls [übernommen aus Kollmann – 2009]	19
Abbildung 9: Mechanismus der thrombinvermittelten Abspaltung der Fibrinopeptide A und B und Bildung von Fibrinpolymeren [übernommen aus Standeven – 2005]	19
Abbildung 10: Schematische Darstellung der Fibrinolyse und ihrer Inhibitoren [übernommen aus Arastéh K ; Duale Reihe - Innere Medizin; Thieme Verlag, Stuttgart; 2. Auflage; 2009; S.1270]	20
Abbildung 11: Übersicht über die vielfältigen Funktionen von Antithrombin [übernommen aus Ruppert – 2006a]	23
Abbildung 12: Pentasaccharideinheit aus einem Heparinmolekül [übernommen aus Gunay – 1999]	24
Abbildung 13: Schematische Darstellung der Interaktion von Heparin mit AT und an Fibrin gebundenem Thrombin [übernommen aus Weitz - 2002]	26
Abbildung 14: Aminosäuresequenz von Hirudin [übernommen aus Ruppert – 2006b]	27
Abbildung 15: Darstellung des Wirkmechanismus von Hirudin, bzw. r-Hirudinen [adaptiert aus Gurm – 2005]	28
Abbildung 16: Übersicht über die Effekte der direkten Thrombininhibitoren [übernommen aus Ruppert – 2006a]	29
Abbildung 17: Schematische Darstellung der Surfactantproteine [adaptiert aus Griese - 1999]	33
Abbildung 18: gestörte intraalveoläre Hämostase und Effekte von Fibrin [übernommen aus King – 2011]	36
Abbildung 19: Schematische Übersicht über PAR-vermittelte profibrotische Prozesse [übernommen aus Ruppert – 2008]	36
Abbildung 20: Lepirudinäquivalentkonzentration in der BAL eine Stunde nach Applikation unterschiedlicher Lepirudindosierungen	59
Abbildung 21: Lepirudinäquivalentkonzentration in bleomycinbehandelten Mäusen nach einmaliger Applikation im zeitlichen Verlauf	60
Abbildung 22: Bestimmung der Halbwertszeit	61
Abbildung 23: Lepirudinäquivalentkonzentration in der BAL-Flüssigkeit von Mäusen mit spät stattfindender Lepirudingabe	62
Abbildung 24: Überlebensrate der Versuchsreihe mit früh stattfindender Lepirudingabe.	64
Abbildung 25: Überlebensrate der Versuchsreihe mit spät stattfindender Lepirudingabe	64
Abbildung 26: Gewichtsveränderung der Versuchsgruppe Frühtherapie	66
Abbildung 27: Gewichtsveränderung der Versuchsgruppe Spättherapie	66
Abbildung 28: Lungencompliance der Versuchsgruppe Frühtherapie	67
Abbildung 29: Lungencompliance der Versuchsgruppe Spättherapie	67

Abbildung 30: Zelldifferential der Cytospin Auszählungen als prozentuale Verteilung der Versuchsgruppe Frühtherapie	69
Abbildung 31: Zelldifferential der Cytospin Auszählungen als prozentuale Verteilung der Versuchsgruppe Spättherapie	70
Abbildung 32: Gehalt an löslichem Kollagen in der BAL-Flüssigkeit der Versuchsgruppe Frühtherapie	71
Abbildung 33: Gehalt an löslichem Kollagen in der BAL-Flüssigkeit der Versuchsgruppe Spättherapie	72
Abbildung 34: Hydroxyprolingehalt im Lungengewebe der Versuchsgruppe Frühtherapie.	72
Abbildung 35: Hydroxyprolingehalt im Lungengewebe der Versuchsgruppe Spättherapie	73
Abbildung 36: Histologische Untersuchung: H&E Färbung	74/75
Abbildung 37: Histologische Untersuchung: Masson-Goldner Färbung	77/78
Abbildung 38: Morphometrische Analyse der histologischen Schnittpräparate. Dargestellt sind die mittleren alveolären Durchmesser	80
Abbildung 39: Morphometrische Analyse der histologischen Schnittpräparate. Dargestellt sind die Häufigkeitsverteilungen für den Alveolendurchmesser.	81
Abbildung 40: Morphometrische Analyse der histologischen Schnittpräparate. Dargestellt sind die mittleren Septendicken	82
Abbildung 41: Morphometrische Analyse der histologischen Schnittpräparate. Dargestellt sind die Häufigkeitsverteilungen für die Septendicke	83

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Prognostische Faktoren für das Mortalitätsrisiko bei IPF [adaptiert aus Raghu – 2011]	8
Tabelle 2: Die Gerinnungsfaktoren und ihre Funktionen im Überblick	15
Tabelle 3: Auflistung der wichtigsten im menschlichen Körper vorkommenden und wichtiger therapeutisch genutzter gerinnungshemmender Faktoren [zusammengetragen aus Norris - 2003; Nader - 2004; Acostamadiedo - 2000; Park - 1988; Hirsh - 2005; Weitz 2004]	21/22
Tabelle 4: Indikationen der European Medicines Agency für Hirudin und r-Hirudine	30
Tabelle 5: Indikationen der European Medicines Agency für direkte Thrombininhibitoren	30/31
Tabelle 6: Anzusetzende Bleomycin Applikationslösungen	49
Tabelle 7: Lepirudin Applikationslösungen mit unterschiedlicher Wirkstoffkonzentration	49
Tabelle 8: Färbetechnik nach May-Grünwald Giemsa	52
Tabelle 9: Färbeprotokoll H&E	55
Tabelle 10: Färbeprotokoll Masson-Goldner (Trichrom)	55/56
Tabelle 11: Gruppeneinteilung des Versuchs zur Dosisfindung	58
Tabelle 12: Gruppeneinteilung des Versuchs zur Kinetikuntersuchung	60
Tabelle 13: Darstellung der Versuchsgruppen der Langzeittherapieversuche	63

10 Literaturverzeichnis

- American Thoracic Society.** Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Diagnosis and Treatment. International Consensus Statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). *Am J Respir Crit Care Med* **2000**, 161:646-64.
- Abraham E**, Reinhart K, Svoboda P, Seibert A, Olthoff D, Dal Nogare A et al.. Assessment of the safety of recombinant tissue factor pathway inhibitor in patients with severe sepsis: a multicenter, randomized, placebo-controlled, single-blind, dose escalation study. *Crit Care Med* **2001**, 29:2081-9.
- Acostamadiedo JM**, Iyer UG, Owen J. Danaparoid Sodium. *Expert Opin Pharmacother* **2000**, 1:803-14.
- Adams TE**, Huntington JA. Thrombin-Cofactor Interactions: Structural Insights Into Regulatory Mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2006**, 26:1738-45.
- American Thoracic Society, European Respiratory Society.** American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001. *Am J Respir Crit Care Med* **2002**, 165:277-304.
- Arastéh K**, Duale Reihe - Innere Medizin, Thieme Verlag, Stuttgart, 2. Auflage **2009**, S.1270.
- Armanios MY**, Chen JJ, Cogan JD, Alder JK, Ingersoll RG, Markin C et al.. Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* **2007**, 356:1317-26.
- Azuma A**, Nukiwa T, Tsuboi E, Suga M, Abe S, Nakata K et al.. Double-blind, placebo-controlled trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **2005**, 171:1040-7.
- Bao Y**, Geng Y, Jing H. Effect of hirudin on the levels of acute lung injury rat tumor necrosis factor- α and matrix metalloproteinase-12. *Mol Med Rep* **2012**, 5:873-5.
- Baumgartner KB**, Samet JM, Stidley CA, Colby TV, Waldron JA. Cigarette smoking: a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **1997**, 155:242-8.
- Behr J**, Maier K, Degenkolb B, Krombach F, Vogelmeier C. Antioxidative and clinical effects of high-dose N-acetylcysteine in fibrosing alveolitis. Adjunctive therapy to maintenance immunosuppression. *Am J Respir Crit Care Med* **1997**, 156:1897-901.
- Bernard GR**, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A et al.. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* **2001**, 344:699-709.
- Bilek AM**, Dee KC, Gaver DP 3rd. Mechanisms of surface-tension-induced epithelial cell damage in a model of pulmonary airway reopening. *J Appl Physiol* **2003**, 94:770-83.
- Bjoraker JA**, Ryu JH, Edwin MK, Myers JL, Tazelaar HD, Schroeder DR, Offord KP. Prognostic significance of histopathologic subsets in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **1998**, 157:199-203.
- Blanc-Brude OP**, Archer F, Leoni P, Derian C, Bolsover S, Laurent GJ, Chambers RC. Factor Xa stimulates fibroblast procollagen production, proliferation, and calcium signaling via PAR1 activation. *Exp Cell Res* **2005**, 304:16-27.
- Bode W**. Structure and interaction modes of thrombin. *Blood Cells Mol Dis* **2006**, 36:122-30.
- Bogatkevich GS**, Tourkina E, Silver RM, Ludwicka-Bradley A. Thrombin differentiates normal lung fibroblasts to a myofibroblast phenotype via the proteolytically activated receptor-1 and a protein kinase C-dependent pathway. *J Biol Chem* **2001**, 276:45184-92.
- Bogatkevich GS**, Ludwicka-Bradley A, Nietert PJ, Akter T, van Ryn J, Silver RM. Antiinflammatory and antifibrotic effects of the oral direct thrombin inhibitor dabigatran etexilate in a murine model of interstitial lung disease. *Arthritis Rheum* **2011**, 63:1416-25.
- Brown DL**, Pattishall EN. Other uses of surfactant. *Clin Perinatol* **1993**, 20:761-89.

- Brufatto N**, Ward A, Nesheim ME. Factor Xa is highly protected from antithrombin-fondaparinux and antithrombin-enoxaparin when incorporated into the prothrombinase complex. *J Thromb Haemost* **2003**, 1:1258-63.
- Burkhardt A**. Alveolitis and Collapse in the Pathogenesis of Pulmonary Fibrosis. *Am Rev Respir Dis* **1989**, 140:513-24.
- Chambers RC**, Dabbagh K, McAnulty RJ, Gray AJ, Blanc-Brude OP, Laurent GJ. Thrombin stimulates fibroblast procollagen production via proteolytic activation of protease-activated receptor 1. *Biochem J* **1998**, 333:121-7.
- Chambers RC**, Leoni P, Blanc-Brude OP, Wembridge DE, Laurent GJ. Thrombin is a potent inducer of connective tissue growth factor production via proteolytic activation of protease-activated receptor-1. *J Biol Chem* **2000**, 275:35584-91.
- Chambers RC**, Laurent GJ. Coagulation cascade proteases and tissue fibrosis. *Biochem Soc Trans* **2002**, 30:194-200.
- Chaudhary NI**, Schnapp A, Park JE. Pharmacologic differentiation of inflammation and fibrosis in the rat bleomycin model. *Am J Respir Crit Care Med* **2006**, 173:769-76.
- Chong BH**. Heparin-induced thrombocytopenia. *J Thromb Haemost* **2003**, 1:1471-8.
- Ciano PS**, Colvin RB, Dvorak AM, McDonagh J, Dvorak HF. Macrophage migration in fibrin gel matrices. *Lab Invest* **1986**, 54:62-70.
- Clemetson KJ**. Platelets and Primary Haemostasis. *Thromb Res* **2012**, 129:220-4.
- Creasey AA**, Chang AC, Feigen L, Wun TC, Taylor FB [JR], Hinshaw LB. Tissue factor pathway inhibitor reduces mortality from Escherichia coli septic shock. *J Clin Invest* **1993**, 91:2850-60.
- Dang CV**, Bell WR, Kaiser D, Wong A. Disorganization of cultured vascular endothelial cell monolayers by fibrinogen fragment D. *Science* **1985**, 227:1487-90.
- D'Angelo A**, Lockhart MS, D'Angelo SV, Taylor FB Jr. Protein S is a cofactor for activated protein C neutralization of an inhibitor of plasminogen activation released from platelets. *Blood* **1987**, 69:231-7.
- de Moerloose P**, De Benedetti E, Nicod L, Vifian C, Reber G. Procoagulant activity in bronchoalveolar fluids: no relationship with tissue factor pathway inhibitor activity. *Thromb Res* **1992**, 65:507-18.
- Di Nisio M**, Middeldorp S, Büller HR. Direct Thrombin Inhibitors. *N Engl J Med* **2005**, 353:1028-40.
- D'Ovidio F**, Singer LG, Hadjiliadis D, Pierre A, Waddell TK, de Perrot M et al.. Prevalence of gastroesophageal reflux in end-stage lung disease candidates for lung transplant. *Ann Thorac Surg* **2005**, 80:1254-60.
- Egan JJ**, Stewart JP, Hasleton PS, Arrand JR, Carroll KB, Woodcock AA. Epstein-Barr virus replication within pulmonary epithelial cells in cryptogenic fibrosing alveolitis. *Thorax* **1995**, 50:1234-9.
- Eisenberg PR**, Siegel JE, Abendschein DR, Miletich JP. Importance of factor Xa in determining the procoagulant activity of whole-blood clots. *J Clin Invest* **1993**, 91:1877-83.
- Eitzman DT**, McCoy RD, Zheng X, Fay WP, Shen T, Ginsburg D, Simon RH. Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis in Transgenic Mice That either Lack or Overexpress the Murine Plasminogen Activator Inhibitor-1 Gene. *J Clin Invest* **1996**, 97:232-7.
- Enkhbaatar P**, Okajima K, Murakami K, Uchiba M, Okabe H, Okabe K, Yamaguchi Y. Recombinant tissue factor pathway inhibitor reduces lipopolysaccharide-induced pulmonary vascular injury by inhibiting leukocyte activation. *Am J Respir Crit Care Med* **2000**, 162:1752-9.
- Enomoto T**, Usuki J, Azuma A, Nakagawa T, Kudoh S. Diabetes mellitus may increase risk for idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* **2003**, 123:2007-11.
- Esmon CT**. Inflammation and the activated protein C anticoagulant pathway. *Semin Thromb Hemost* **2006**, 32:49-60.
- Esumi N**, Fan D, Fidler IJ. Inhibition of murine melanoma experimental metastasis by recombinant desulfatohirudin, a highly specific thrombin inhibitor. *Cancer Res* **1991**, 51:4549-56.
- Frerking I**, Günther A, Seeger W, Pison U. Pulmonary surfactant: functions, abnormalities and therapeutic option. *Intensive Care Med* **2001**, 27:1699-717.

- Fujii M**, Hayakawa H, Urano T, Sato A, Chida K, Nakamura H, Takada A. Relevance of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor for hypercoagulable state in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Thromb Res* **2000**, 99:111-7.
- Gandhi PS**, Chen Z, Appelbaum E, Zapata F, Cera E. Structural basis of thrombin-protease-activated receptor interactions. *IUBMB Life* **2011**, 63:375-82.
- Gettins PG**. Serpin structure, mechanism, and function. *Chem Rev* 2002, 102:4751-804.
- Giebler R**, Schmidt U, Koch S, Peters J, Scherer R. Combined antithrombin III and C1-esterase inhibitor treatment decreases intravascular fibrin deposition and attenuates cardiorespiratory impairment in rabbits exposed to Escherichia coli endotoxin. *Crit Care Med* **1999**, 27:597-604.
- Gilani SR**, Vuga LJ, Lindell KO, Gibson KF, Xue J, Kaminski N et al.. CD28 down-regulation on circulating CD4 T-cells is associated with poor prognoses of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One* **2010**, 5:e8959.
- Glusa E**, Markwardt F. Studies on thrombin-induced endothelium-dependent vascular effects. *Biomed Biochim Acta* **1988**, 47:623-30.
- Goerke J**. Pulmonary surfactant: functions and molecular composition. *Biochim Biophys Acta* **1998**, 1408:79-89.
- Grainger DJ**, Wakefield L, Bethell HW, Farndale RW, Metcalfe JC. Release and activation of platelet latent TGF-beta in blood clots during dissolution with plasmin. *Nat Med* **1995**, 1:932-7.
- Gribbin J**, Hubbard RB, Le Jeune I, Smith CJ, West J, Tata LJ. Incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis in the UK. *Thorax* **2006**, 61:980-5.
- Gribbin J**, Hubbard R, Smith C. Role of diabetes mellitus and gastro-oesophageal reflux in the aetiology of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med* **2009**, 103:927-31.
- Griese M**. Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art. *Eur Respir J* **1999**, 13:1455-1476.
- Gunay NS**, Linhardt RJ. Heparinoids: structure, biological activities and therapeutic applications. *Planta Med* **1999**, 65:301-6.
- Günther A**, Schmidt R, Nix F, Yabut-Perez M, Guth C, Rosseau S et al. Surfactant abnormalities in idiopathic pulmonary fibrosis, hypersensitivity pneumonitis and sarcoidosis. *Eur Respir J* **1999**, 14:565-73.
- Günther A**, Mosavi P, Heinemann S, Ruppert C, Muth H, Markart P et al. Alveolar fibrin formation caused by enhanced procoagulant and depressed fibrinolytic capacities in severe pneumonia. Comparison with the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* **2000**, 161:454-62.
- Günther A**, Ruppert C, Schmidt R, Markart P, Grimminger F, Walmrath D, Seeger W. Surfactant alteration and replacement in acute respiratory distress syndrome. *Respir Res* **2001**, 2:353-64.
- Günther A**, Lübke N, Ermert M, Schermuly RT, Weissmann N, Breithöcker A et al. Prevention of Bleomycin-induced Lung Fibrosis by Aerosolization of Heparin or Urokinase in Rabbits. *Am J Respir Crit Care Med* **2003**, 168:1358-65.
- Gurm HS**, Bhatt DL.. Thrombin, an ideal target for pharmacological inhibition: A review of direct thrombin inhibitors. *Am Heart J* **2005**, 149:43-53.
- Hagiwara S**, Iwasaka H, Matsumoto S, Noguchi T. High dose antithrombin III inhibits HMGB1 and improves endotoxin-induced acute lung injury in rats. *Intensive Care Med* **2008**, 34:361-7.
- Harvey RP**, Degryse E, Stefani L, Schamber F, Cazenave JP, Courtney M et al.. Cloning and expression of a cDNA coding for the anticoagulant hirudin from the bloodsucking leech, *Hirudo medicinalis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1986**, 83:1084-8.
- Hattori N**, Degen JL, Sisson TH, Liu H, Moore BB, Pandrangi RG et al. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in fibrinogen-null mice. *J Clin Invest* **2000**, 106:1341-50.
- Hauptmann J**, Brüggener E, Markwardt F. Effect of heparin, hirudin, and a synthetic thrombin inhibitor on antithrombin III in thrombin-induced disseminated intravascular coagulation in rats. *Haemostasis* **1987**, 17:321-8.

- Haycraft JB.** Ueber die Einwirkung eines Secretes des officinellen Blutegels auf die Gerinnbarkeit des Blutes. *Archiv f. experiment. Pathol. u. Pharmacol* **1884**, 18:209-217.
- Hirsh J.** Heparin. *N Engl J Med* **1991**, 324:1565-74.
- Hirsh J, Levine MN.** Low molecular weight heparin. *Blood* **1992**, 79:1-17.
- Hirsh J, O'Donnell M, Weitz JI.** New anticoagulants. *Blood* **2005**, 105:453-63.
- Hogg PJ, Jackson CM.** Formation of a ternary complex between thrombin, fibrin monomer, and heparin influences the action of thrombin on its substrates. *J Biol Chem* **1990**, 265:248-55.
- Hogg PJ, Jackson CM, Labanowski JK, Bock PE.** Binding of Fibrin Monomer and Heparin to Thrombin in a Ternary Complex Alters the Environment of the Thrombin Catalytic Site, Reduces Affinity for Hirudin, and Inhibits Cleavage of Fibrinogen. *J Biol Chem* **1996**, 271:26088-95.
- Howell DC, Goldsack NR, Marshall RP, McAnulty RJ, Starke R, Purdy G et al.** Direct Thrombin Inhibition Reduces Lung Collagen, Accumulation, and Connective Tissue Growth Factor mRNA Levels in Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis. *Am J Pathol* **2001**, 159:1383-95.
- Howell DC, Johns RH, Lasky JA, Shan B, Scotton CJ, Laurent GJ, Chambers RC.** Absence of Proteinase-Activated Receptor-1 Signaling Affords Protection from Bleomycin-Induced Lung Inflammation and Fibrosis. *Am J Pathol* **2005**, 166:1353-65.).
- Hubbard R, Lewis S, Richards K, Johnston I, Britton J.** Occupational exposure to metal or wood dust and aetiology of cryptogenic fibrosing alveolitis. *Lancet* **1996**, 347:284-9.
- Hubbard R, Cooper M, Antoniak M, Venn A, Khan S, Johnston I et al.** Risk of cryptogenic fibrosing alveolitis in metal workers. *Lancet* **2000**, 355:466-7.
- Hunninghake GW, Lynch DA, Galvin JR, Gross BH, Müller N, Schwartz DA et al.** Radiologic Findings Are Strongly Associated With a Pathologic Diagnosis of Usual Interstitial Pneumonia. *Chest* **2003**, 124:1215-23.
- Huntington JA, Read RJ, Carrell RW.** Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature* **2000**, 407:923-6.
- Idell S, Gonzalez KK, MacArthur CK, Gillies C, Walsh PN, McLarty J, Thrall RS.** Bronchoalveolar lavage procoagulant activity in bleomycin-induced lung injury in marmosets. Characterization and relationship to fibrin deposition and fibrosis. *Am Rev Respir Dis* **1987**, 136:124-33.
- Idell S, James KK, Gillies C, Fair DS, Thrall RS.** Abnormalities of pathways of fibrin turnover in lung lavage of rats with oleic acid and bleomycin-induced lung injury support alveolar fibrin deposition. *Am J Pathol* **1989**, 135:387-99. (A)
- Idell S, James KK, Levin EG, Schwartz BS, Manchanda N, Maunder RJ et al.** Local abnormalities in coagulation and fibrinolytic pathways predispose to alveolar fibrin deposition in the adult respiratory distress syndrome. *J Clin Invest* **1989**, 84:695-705. (B)
- Idiopathic Pulmonary Fibrosis Clinical Research Network, Raghu G, Anstrom KJ, King TE Jr, Lasky JA, Martinez FJ.** Prednisone, Azathioprine, and N -Acetylcysteine for Pulmonary Fibrosis. *N Engl J Med* **2012**, 366:1968-77.
- Idiopathic Pulmonary Fibrosis Clinical Research Network, Martinez FJ, de Andrade JA, Anstrom KJ, King TE Jr, Raghu G.** Randomized Trial of Acetylcysteine in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *N Engl J Med* **2014**, 37:2093-101.
- Imokawa S, Sato A, Hayakawa H, Kotani M, Urano T, Takada A.** Tissue factor expression and fibrin deposition in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis and systemic sclerosis. *Am J Respir Crit Care Med* **1997**, 156:631-6.
- Irving JA, Pike RN, Lesk AM, Whisstock JC.** Phylogeny of the serpin superfamily: implications of patterns of amino acid conservation for structure and function. *Genome Res* **2000**, 10:1845-64.
- Irving WL, Day S, Johnston ID.** Idiopathic pulmonary fibrosis and hepatitis C virus infection. *Am Rev Respir Dis* **1993**, 148:1683-4.
- Iwai K, Mori T, Yamada N, Yamaguchi M, Hosoda Y.** Idiopathic pulmonary fibrosis. Epidemiologic approaches to occupational exposure. *Am J Respir Crit Care Med* **1994**, 150:670-5.

- Izbicki G**, Segel MJ, Christensen TG, Conner MW, Breuer R. Time course of bleomycin-induced lung fibrosis. *Int J Exp Pathol* **2002**, 83:111-9.
- Janus TJ**, Lewis SD, Lorand L, Shafer JA. Promotion of thrombin-catalyzed activation of factor XIII by fibrinogen. *Biochemistry* **1983**, 22:6269-72.
- Karges HE**, Funk KA, Ronneberger H. Activity of coagulation and fibrinolysis parameters in animals. *Arzneimittelforschung* **1994**, 44:793-7.
- Kelly BG**, Lok SS, Hasleton PS, Egan JJ, Stewart JP. A rearranged form of Epstein-Barr virus DNA is associated with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **2002**, 166:510-3.
- Kim DS**, Collard HR, King TE Jr.. Classification and Natural History of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. *Proc Am Thorac Soc* **2006**, 3:285-92.
- King TE Jr**, Pardo A, Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet* **2011**, 378:1949-61.
- King TE Jr**, Bradford WZ, Castro-Bernardini S, Fagan EA, Glaspole I, Glassberg MK. A Phase 3 Trial of Pirfenidone in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *N Engl J Med* **2014**, 370:2083-92.
- Klöcking HP**. Toxicology of Hirudin. *Semin Thromb Hemost* **1991**, 17:126-9.
- Kobayashi H**, Gabazza EC, Taguchi O, Wada H, Takeya H, Nishioka J et al. Protein C anticoagulant system in patients with interstitial lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* **1998**, 157:1850-4.
- Kollman JM**, Pandi L, Sawaya MR, Riley M, Doolittle RF. Crystal Structure of Human Fibrinogen. *Biochemistry* **2009**, 48:3877-86.
- Konishi K**, Gibson KF, Lindell KO, Richards TJ, Zhang Y, Dhir R et al. Gene Expression Profiles of Acute Exacerbations of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **2009**, 180:167-75.
- Korfei M**, Ruppert C, Mahavadi P, Henneke I, Markart P, Koch M et al. Epithelial Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Sporadic Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **2008**, 178:838-46.
- Kotani I**, Sato A, Hayakawa H, Urano T, Takada Y, Takada A. Increased procoagulant and antifibrinolytic activities in the lungs with idiopathic pulmonary fibrosis. *Thromb Res* **1995**, 77:493-504.
- Kubo H**, Nakayama K, Yanai M, Suzuki T, Yamaya M, Watanabe M, Sasaki H. Anticoagulant Therapy for Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Chest* **2005**, 128:1475-1482.
- Leavell KJ**, Peterson MW, Gross TJ. The role of fibrin degradation products in neutrophil recruitment to the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* **1996**, 14:53-60.
- Lefèvre G**, Duval M, Gauron S, Brookman LJ, Rolan PE, Morris TM et al. Effect of renal impairment on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of desirudin. *Clin Pharmacol Ther* **1997**, 62:50-9.
- Lemini C**, Jaimez R, Franco Y. Gender and inter-species influence on coagulation tests of rats and mice. *Thromb Res* **2007**, 120:415-9.
- Lettieri CJ**, Nathan SD, Barnett SD, Ahmad S, Shorr AF. Prevalence and outcomes of pulmonary arterial hypertension in advanced idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* **2006**, 129:746-52.
- Ley B**, Ryerson CJ, Vittinghoff E, Ryu JH, Tomassetti S, Lee JS. A Multidimensional Index and Staging System for Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Ann Intern Med* **2012**, 156:684-91.
- Liaw PC**, Becker DL, Stafford AR, Fredenburgh JC, Weitz JI. Molecular basis for the susceptibility of fibrin-bound thrombin to inactivation by heparin cofactor ii in the presence of dermatan sulfate but not heparin. *J Biol Chem* **2001**, 276:20959-65.
- Lindhout T**, Blezer R, Hemker HC. The anticoagulant mechanism of action of recombinant hirudin (CGP 39393) in plasma. *Thromb Haemost* **1990**, 64:464-8.
- Loomis-King H**, Flaherty KR, Moore BB. Pathogenesis, current treatments and future directions for idiopathic pulmonary fibrosis. *Curr Opin Pharmacol* **2013**, 13:377-85.
- Ludwicka-Bradley A**, Tourkina E, Suzuki S, Tyson E, Bonner M, Fenton JW 2nd et al. 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* **2000**, 22:235-43.

- Lumb AB**, Nunn JF. Nunn's applied respiratory physiology - Andrew B. Lumb, John Francis Nunn - Google Books. *Nunn's Applied Respiratory Physiology*, Elsevier/Butterworth Heinemann, Edinburgh **2005**.
- Malouf MA**, Hopkins P, Snell G, Glanville AR, Everolimus in IPF Study Investigators. An investigator-driven study of everolimus in surgical lung biopsy confirmed idiopathic pulmonary fibrosis. *Respirology* **2011**, 16:776-83.
- Markart P**, Nass R, Ruppert C, Hundack L, Wygrecka M, Korfei M et al. Safety and tolerability of inhaled heparin in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* **2010**, 23:161-72.
- Markwardt F**, Nowak G, Stürzebecher J, Griessbach U, Walsmann P, Vogel G. Pharmacokinetics and anticoagulant effect of hirudin in man. *Thromb Haemost* **1984**, 52:160-3.
- Markwardt F**, Nowak G, Stürzebecher J, Vogel G. Clinico-pharmacological studies with recombinant hirudin. *Thromb Res* **1988**, 52:393-400.
- Markwardt F**. The development of hirudin as an antithrombotic drug. *Thromb Res* **1994**, 74:1-23.
- Martinez FJ**, Safran S, Weycker D, Starko KM, Bradford WZ, King TE Jr et al. The clinical course of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Ann Intern Med* **2005**, 142:963-7.
- Martinez FJ**, Flaherty K. Pulmonary function testing in idiopathic interstitial pneumonias. *Proc Am Thorac Soc* **2006**, 3:315-21.
- Mejía M**, Carrillo G, Rojas-Serrano J, Estrada A, Suárez T, Alonso D et al. Idiopathic pulmonary fibrosis and emphysema: decreased survival associated with severe pulmonary arterial hypertension. *Chest* **2009**, 136:10-5.
- Meliconi R**, Andreone P, Fasano L, Galli S, Pacilli A, Miniero R et al. Incidence of hepatitis C virus infection in Italian patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* **1996**, 51:315-7.
- Miller DL**, Welty-Wolf K, Carraway MS, Ezban M, Ghio A, Suliman H, Piantadosi CA. Extrinsic Coagulation Blockade Attenuates Lung Injury and Proinflammatory Cytokine Release after Intratracheal Lipopolysaccharide. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2002**, 26:650-8.
- Misumi S**, Lynch DA. Idiopathic pulmonary fibrosis/usual interstitial pneumonia: imaging diagnosis, spectrum of abnormalities, and temporal progression. *Proc Am Thorac Soc* **2006**, 3:307-14.
- Miyake Y**, Sasaki S, Yokoyama T, Chida K, Azuma A, Suda T et al. Occupational and environmental factors and idiopathic pulmonary fibrosis in Japan. *Ann Occup Hyg* **2005**, 49:259-65. Epub 2005 7.
- Moeller A**, Ask K, Warburton D, Gaudie J, Kolb M. The bleomycin animal model: A useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? *Int J Biochem Cell Biol* **2008**, 40:362-82.
- Monroe DM**, Key NS. The tissue factor-factor VIIa complex: procoagulant activity, regulation, and multitasking. *J Thromb Haemost* **2007**, 5:1097-105.
- Morrison DA**, Stovall JR. Increased exercise capacity in hypoxemic patients after long-term oxygen therapy. *Chest* **1992**, 102:542-50.
- Murakami K**, Okajima K, Uchiba M, Johno M, Nakagaki T, Okabe H, Takatsuki K. Activated protein C prevents LPS-induced pulmonary vascular injury by inhibiting cytokine production. *Am J Physiol* **1997**, 272:L197-202.
- Nader HB**, Lopes CC, Rocha HA, Santos EA, Dietrich CP. Heparins and Heparinoids: Occurrence, Structure and Mechanism of Antithrombotic and Hemorrhagic Activities. *Curr Pharm Des* **2004**, 10:951-66.
- Nakstad B**, Lyberg T, Skjønberg OH, Boye NP. Local activation of the coagulation and fibrinolysis systems in lung disease. *Thromb Res* **1990**, 57:827-38.
- Nalysnyk L**, Cid-Ruzafa J, Rotella P, Esser D. Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis: review of the literature. *Eur Respir Rev* **2012**, 21:355-61.
- Nishimura K**, Kitaichi M, Izumi T, Nagai S, Kanaoka M, Itoh H. Usual interstitial pneumonia: histologic correlation with high-resolution CT. *Radiology* **1992**, 182:337-42.
- Nishiyama O**, Kondoh Y, Kimura T, Kato K, Kataoka K, Ogawa T et al. Effects of pulmonary rehabilitation in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respirology* **2008**, 13:394-9.

- Noble PW**, Albera C, Bradford WZ, Costabel U, Glassberg MK, Kardatzke D et al. Pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (CAPACITY): two randomised trials. *Lancet* **2011**, 377:1760-9.
- Norris LA**. Blood Coagulation. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* **2003**, 17:369-83.
- Noth I**, Anstrom KJ, Calvert SB, de Andrade J, Flaherty KR, Glazer C et al. A Placebo-Controlled Randomized Trial of Warfarin in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **2012**, 186:88-95.
- Okajima K**, Uchiba M. The Anti-Inflammatory Properties of Antithrombin III: New Therapeutic Implications. *Semin Thromb Hemost* **1998**, 24:27-32.
- Olman MA**, Mackman N, Gladson CL, Moser KM, Loskutoff DJ. Changes in Procoagulant and Fibrinolytic Gene Expression during Bleomycin-induced Lung Injury in the Mouse. *J Clin Invest* **1995**, 96:1621-30.
- Olson ST**, Björk I, Sheffer R, Craig PA, Shore JD, Choay J. Role of the antithrombin-binding pentasaccharide in heparin acceleration of antithrombin-proteinase reactions. Resolution of the antithrombin conformational change contribution to heparin rate enhancement. *J Biol Chem* **1992**, 267:12528-38.
- Panos RJ**, Mortenson RL, Niccoli SA, King TE Jr.. Clinical deterioration in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: causes and assessment. *Am J Med* **1990**, 88:396-404.
- Park BK**. Warfarmetabolism and mode of action. *Biochem Pharmacol* **1988**, 37:19-27.
- Park JB**, Kweon YE, Rhee SK, Seo JH. Production of hirudin by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* in a membrane-recycle fermentor. *Biotechnol Lett* **1995**, 17:1031-1036.
- Raghu G**, Weycker D, Edelsberg J, Bradford WZ, Oster G. Incidence and prevalence of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **2006**, 174:810-6. (A)
- Raghu G**, Freudenberger TD, Yang S, Curtis JR, Spada C, Hayes J et al. High prevalence of abnormal acid gastro-oesophageal reflux in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* **2006**, 27:136-42. (B)
- Raghu G**, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK et al. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Statement: Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Evidence-based Guidelines for Diagnosis and Management. *Am J Respir Crit Care Med* **2011**, 183:788-824.
- Ranieri VM**, Thompson BT, Barie PS, Dhainaut JF, Douglas IS, Finfer S. Drotrecogin Alfa (Activated) in Adults with Septic Shock. *N Engl J Med* **2012**, 366:2055-64.
- Rodríguez-Capote K**, Manzanares D, Haines T, Possmayer F. Reactive oxygen species inactivation of surfactant involves structural and functional alterations to surfactant proteins SP-B and SP-C. *Biophys J* **2006**, 90:2808-21.
- Rudd RM**, Prescott RJ, Chalmers JC, Johnston ID, Fibrosing Alveolitis Subcommittee of the Research Committee of the British Thoracic Society. British Thoracic Society Study on cryptogenic fibrosing alveolitis: Response to treatment and survival. *Thorax* **2007**, 62:62-6.
- Ruppert C**, Günther A. Coagulation Cascade - Antithrombin III. *Encyclopedia of Respiratory Medicine* (G. J. Laurent and S. D. Shapiro, Ed.) Elsevier, Oxford, UK **2006**, Vol.1:486-489. (A)
- Ruppert, C.**, Guenther, A. Anticoagulants. *Encyclopedia of Respiratory Medicine* (G. J. Laurent and S. D. Shapiro, Ed.) Elsevier, Oxford, UK **2006**, Vol.1:115-128. (B)
- Ruppert C**, Markart P, Wygrecka M, Preissner KT, Günther A. Role of coagulation and fibrinolysis in lung and renal fibrosis. *Hamostaseologie* **2008**, 28:30-2, 34-6.
- Seeger W**, Stöhr G, Wolf HR, Neuhofer H. Alteration of surfactant function due to protein leakage: special interaction with fibrin monomer. *J Appl Physiol* **1985**, 58:326-38.
- Seeger W**, Elssner A, Günther A, Krämer HJ, Kalinowski HO. Lung Surfactant Phospholipids Associate with Polymerizing Fibrin Loss of Surface Activity. *Am J Respir Cell Mol Biol* **1993**, 9:213-20.
- Selman M**, King TE, Pardo A, American Thoracic Society, European Respiratory Society, American College of Chest Physicians. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Prevailing and Evolving Hypotheses about Its Pathogenesis and Implications for Therapy. *Ann Intern Med* **2001**, 134:136-51.

- Selman M**, Carrillo G, Estrada A, Mejia M, Becerril C, Cisneros J et al. Accelerated variant of idiopathic pulmonary fibrosis: clinical behavior and gene expression pattern. *PLoS One* **2007**, 2:e482.
- Selman M**, Pardo A, Kaminski N. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Aberrant Recapitulation of Developmental Programs? *PLoS Med* **2008**, 5:e62.
- Shimizu S**, Gabazza EC, Taguchi O, Yasui H, Taguchi Y, Hayashi T et al. Activated protein C inhibits the expression of platelet-derived growth factor in the lung. *Am J Respir Crit Care Med* **2003**, 167:1416-26.
- Shimizu T**, Nishihira J, Watanabe H, Abe R, Honda A, Ishibashi T, Shimizu H. Macrophage migration inhibitory factor is induced by thrombin and factor Xa in endothelial cells. *J Biol Chem* **2004**, 279:13729-37.
- Siller-Matula JM**, Plasenzotti R, Spiel A, Quehenberger P, Jilma B. Interspecies differences in coagulation profile. *Thromb Haemost* **2008**, 100:397-404.
- Song JW**, Hong SB, Lim CM, Koh Y, Kim DS. Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis: incidence, risk factors and outcome. *Eur Respir J* **2011**, 37:356-63.
- Spragg R**. Surfactant for Acute Lung Injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2007**, 37:377-8.
- Standeven KF**, Ariëns RA, Grant PJ. The molecular physiology and pathology of fibrin structure/function. *Blood Rev* **2005**, 19:275-88.
- Stewart JP**, Egan JJ, Ross AJ, Kelly BG, Lok SS, Hasleton PS, Woodcock AA. The detection of Epstein-Barr virus DNA in lung tissue from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **1999**, 159:1336-41.
- Tang YW**, Johnson JE, Browning PJ, Cruz-Gervis RA, Davis A, Graham BS et al. Herpesvirus DNA is consistently detected in lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Microbiol* **2003**, 41:2633-40.
- Taniguchi H**, Ebina M, Kondoh Y, Ogura T, Azuma A, Suga M et al. Pirfenidone in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* **2010**, 35:821-9.
- Taskar VS**, Coultas DB. Is idiopathic pulmonary fibrosis an environmental disease? *Proc Am Thorac Soc* **2006**, 3:293-8.
- Thabut G**, Mal H, Castier Y, Groussard O, Brugière O, Marrash-Chahla R et al. Survival benefit of lung transplantation for patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Thorac Cardiovasc Surg* **2003**, 126:469-75.
- Thérault P**, Waters D, Lam J, Juneau M, McCans J. Reactivation of unstable angina after the discontinuation of heparin. *N Engl J Med* **1992**, 327:141-5.
- Thomas AQ**, Lane K, Phillips J 3rd, Prince M, Markin C, Speer M et al. Heterozygosity for a surfactant protein C gene mutation associated with usual interstitial pneumonitis and cellular nonspecific interstitial pneumonitis in one kindred. *Am J Respir Crit Care Med* **2002**, 165:1322-8.
- Tobin RW**, Pope CE 2nd, Pellegrini CA, Emond MJ, Sillery J, Raghu G. Increased prevalence of gastroesophageal reflux in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **1998**, 158:1804-8.
- Travis WD**, Costabel U, Hansell DM, King TE Jr, Lynch DA, Nicholson AG et al. An Official American Thoracic Society/European Respiratory Society Statement: Update of the International Multidisciplinary Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* **2013**, 188:733-48.
- Tsakiri KD**, Cronkhite JT, Kuan PJ, Xing C, Raghu G, Weissler JC et al. Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, 104:7552-7.
- Uchiba M**, Okajima K, Murakami K, Okabe H, Takatsuki K. Effects of antithrombin III (AT III) and Trp49-modified AT III on plasma level of 6-keto-PGF1 alpha in rats. *Thromb Res* **1995**, 80:201-8.
- Ueda T**, Ohta K, Suzuki N, Yamaguchi M, Hirai K, Horiuchi T et al. Idiopathic pulmonary fibrosis and high prevalence of serum antibodies to hepatitis C virus. *Am Rev Respir Dis* **1992**, 146:266-8.
- Van Obberghen-Schilling E**, Pérez-Rodríguez R, Pouyssegur J. Hirudin, a probe to analyze the growth promoting activity of thrombin in fibroblasts, Reevaluation of the temporal action of competence factors. *Biochem Biophys Res Commun* **1982**, 106:79-86.

- Vanholder R**, Camez A, Veys N, Van Loo A, Dhondt AM, Ringoir S. Pharmacokinetics of recombinant hirudin in hemodialyzed end-stage renal failure patients. *Thromb Haemost* **1997**, 77:650-5.
- Wang Y**, Kuan PJ, Xing C, Cronkhite JT, Torres F, Rosenblatt RL et al. Genetic defects in surfactant protein A2 are associated with pulmonary fibrosis and lung cancer. *Am J Hum Genet* **2009**, 84:52-9.
- Wangoo A**, Shaw RJ, Diss TC, Farrell PJ, du Bois RM, Nicholson AG. Cryptogenic fibrosing alveolitis: lack of association with Epstein-Barr virus infection. *Thorax* **1997**, 52:888-91.
- Warren BL**, Eid A, Singer P, Pillay SS, Carl P, Novak I et al. Caring for the critically ill patient. High-dose antithrombin III in severe sepsis: a randomized controlled trial. *JAMA* **2001**, 286:1869-78.
- Watanabe K**, Tajima S, Tanaka J, Moriyama H, Nakayama H, Terada M et al. Effects of anticoagulant therapy for rapidly progressive interstitial pneumonias. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi* **2011**, 49:407-12.
- Weibel ER**, Gil J. Electron microscopic demonstration of an extracellular duplex lining layer of alveoli. *Respir Physiol* **1968**, 4:42-57.
- Weitz JI**, Hudoba M, Massel D, Maraganore J, Hirsh J. Clot-bound thrombin is protected from inhibition by heparin-antithrombin III but is susceptible to inactivation by antithrombin III-independent inhibitors. *J Clin Invest* **1990**, 86:385-91.
- Weitz JI**. Low-Molecular-Weight Heparins. *N Engl J Med* **1997**, 337:688-98.
- Weitz JI**, Crowther M. Direct thrombin inhibitors. *Thromb Res* **2002**, 106:V275-84.
- Weitz JI**. New Anticoagulants for Treatment of Venous Thromboembolism. *Circulation* **2004**, 110:I19-26.
- Wygrecka M**, Markart P, Ruppert C, Kuchenbuch T, Fink L, Bohle RM et al. Compartment- and cell-specific expression of coagulation and fibrinolysis factors in the murine lung undergoing inhalational versus intravenous endotoxin application. *Thromb Haemost* **2004**, 92:529-40.
- Wygrecka M**, Markart P, Ruppert C, Petri K, Preissner KT, Seeger W, Guenther A. Cellular origin of pro-coagulant and (anti)-fibrinolytic factors in bleomycin-injured lungs. *Eur Respir J* **2007**, 29:1105-14.
- Wygrecka M**, Jablonska E, Guenther A, Preissner KT, Markart P. Current view on alveolar coagulation and fibrinolysis in acute inflammatory and chronic interstitial lung diseases. *Thromb Haemost* **2008**, 99:494-501.
- Wygrecka M**, Kwapiszewska G, Jablonska E, von Gerlach S, Henneke I, Zakrzewicz D et al. Role of Protease-activated Receptor-2 in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **2011**, 183:1703-14.
- Yamauchi T**, Umeda F, Inoguchi T, Nawata H. Antithrombin III stimulates prostacyclin production by cultured aortic endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **1989**, 163:1404-11.
- Yasui H**, Gabazza EC, Taguchi O, Risteli J, Risteli L, Wada H et al. Decreased protein C activation is associated with abnormal collagen turnover in the intraalveolar space of patients with interstitial lung disease. *Clin Appl Thromb Hemost* **2000**, 6:202-5.
- Yasui H**, Gabazza EC, Tamaki S, Kobayashi T, Hataji O, Yuda H et al. Intratracheal administration of activated protein C inhibits bleomycin-induced lung fibrosis in the mouse. *Am J Respir Crit Care Med* **2001**, 163:1660-8.
- Yonemaru M**, Kasuga I, Kusumoto H, Kunisawa A, Kiyokawa H, Kuwabara S et al. Elevation of antibodies to cytomegalovirus and other herpes viruses in pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* **1997**, 10:2040-5.
- Zamò A**, Poletti V, Reghellin D, Montagna L, Pedron S, Piccoli P, Chilosi M. HHV-8 and EBV are not commonly found in idiopathic pulmonary fibrosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* **2005**, 22:123-8.
- Zuo YY**, Veldhuizen RA, Neumann AW, Petersen NO, Possmayer F. Current perspectives in pulmonary surfactant—Inhibition, enhancement and evaluation. *Biochim Biophys Acta* **2008**, 1778:1947-77.

Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Andreas Günther für die Zuteilung dieses Forschungsthemas, für sein immer offenes Ohr und seine Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit bedanken.

Ein großer Dank gebührt meinem Betreuer, Dr. rer. nat. Clemens Ruppert, der immer als Ansprechpartner verfügbar war und mir bei der Lösung vieler Probleme als kompetenter und geduldiger Berater zur Seite gestanden hat.

Professor Dr. med. Werner Seeger danke ich für das mir entgegengebrachte Vertrauen und für die Ermöglichung der Durchführung dieser Arbeit.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Ingrid Henneke und Frau Stefanie Hezel sowie den weiteren Mitarbeitern des Surfactant Labors, die mir immer geduldig und freundlich die notwendigen Arbeitstechniken beigebracht und mir hierbei mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben. Die gemeinsame Arbeit hat mir sehr gefallen und ich bin für ihre Unterstützung sehr dankbar.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei den vielen lieben Menschen, die ich kenne, bedanken; bei meiner Familie, die mich in jeder Lebenslage unterstützt und mir Mut gemacht hat, wenn die Probleme Überhand zu nehmen schienen und die mir alle gezeigt haben, was ich ihnen bedeute.

Ebenso danke ich meinen guten Freunden, die mir oft geholfen haben und die mich schon sehr lange durch gute und schlechte Zeiten begleiten. Mit ihnen konnte ich die oft spärliche Freizeit immer wieder sehr genießen.