

***In vivo* Analyse der zellulären und molekularen
Mechanismen der arteriellen und venösen Thrombose in
der Maus**

Maria Köllnberger

Aus der 1. Medizinischen Klinik
(Prof. Dr. med. A. Schömig)
der Technischen Universität München

Angefertigt unter der Leitung von
Priv.-Doz. Dr. med. S. Massberg

Vorgelegt über
Prof. Dr. med. vet. W. Schmahl
Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie
am Institut für Tierpathologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

***In vivo* Analyse der zellulären und molekularen
Mechanismen der arteriellen und venösen Thrombose in
der Maus**

Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

eingereicht von
Maria Köllnberger
Tierärztin aus Mögling

München, 2006

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer

Referent: Prof. Dr. Schmahl

Korreferent(en): Prof. Dr. Hirschberger
Prof. Dr. Kaspers
Prof. Dr. Knospe
Prof. Dr. Wolf

Tag der Promotion: 9. Februar 2007

Für meine Eltern

Inhalt

1	Einleitung	9
1.1	Morphologie und Funktion von Arterien und Venen	10
1.1.1	Arterien.....	10
1.1.2	Venen	12
1.1.3	Gegenüberstellung beider Gefäßtypen	13
1.2	Morphologie und Funktion von Thrombozyten.....	14
1.2.1	Charakteristika der Thrombozyten.....	14
1.2.2	Bildung und Funktion von Thrombozyten	15
1.3	Morphologie und Funktion von Leukozyten	17
1.3.1	Charakteristika der Leukozyten	17
1.3.2	Bildung und Funktion von Leukozyten.....	18
1.4	Physiologie der Hämostase	21
1.4.1	Primäre Hämostase.....	21
1.4.1.1	Thrombozytenadhäsion u. -aggregation.....	21
1.4.1.2	Thrombozytenaktivierung u. -sekretion.....	22
1.4.2	Sekundäre Hämostase	24
1.4.2.1	Gerinnungskaskade	24
1.4.2.2	Mögliche Bedeutung von Leukozyten	26
1.4.2.3	Physiologische Gerinnungshemmung.....	27
1.5	Membranglykoproteine.....	28
1.5.1	Integrine	28
1.5.2	Leuzinreiche Glykoproteine.....	30
1.5.3	Selektine	30
1.5.4	Adhäsionsrezeptoren vom Immunglobulin-Typ	30
1.6	Pathologie der Hämostase.....	31
1.6.1	Definition und Prävalenz der Thrombose	31

1.6.1.1	Arterielle Thrombogenese	31
1.6.1.2	Venöse Thrombogenese.....	32
2	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	34
2.1	Etablierung eines arteriellen und venösen Thrombosemodells	34
2.2	Charakterisierung der für die arterielle und venöse Thrombogenese verantwortlichen zellulären Mechanismen	34
2.3	Analyse der molekularen Determinanten der arteriellen und venösen Thrombose	35
3	Material und Methoden	36
3.1	Verwendete Versuchstiere	36
3.1.1	Durchführung der Mäusezucht und genetischer Hintergrund der Linien	37
3.1.1.1	Kontrollstämme	38
3.1.1.2	Gendefiziente und transgene Mauslinien.....	38
3.1.1.2.1	P-Selektin ^{-/-}	38
3.1.1.2.2	Glykoprotein IIb ^{-/-}	38
3.1.1.2.3	mTF defiziente, hTF transgene Mäuse (mTF ^{-/-} /HCV100) mit 100% Expression des humanen „tissue factor“ Transgens (HCV100)	39
3.1.1.2.4	mTF defiziente, hTF transgene Mäuse (mTF ^{-/-} /hTF ⁺) mit 1% Expression des humanen „tissue factor“ Transgens (low TF).....	39
3.1.2	Haltungsbedingungen der Tiere im Experiment	40
3.2	Wahl und Durchführung der Narkose.....	40
3.3	Technische Ausrüstung für das vorliegende Versuchsvorhaben	43
3.3.1	Prinzip der intravitalem Videofluoreszenzmikroskopie.....	43
3.3.2	Fluoreszenzfarbstoffe	47
3.3.2.1	DCF - 5- (und 6)Carboxy-2',7'-Dichlorofluoreszein-Diacetat.....	48
3.3.2.2	Rhodamin 6G.....	49

3.3.2.3	Rhodamin B	49
3.3.2.4	Alexa 488	50
3.3.2.5	Hoechst Vitalfarbstoff.....	50
3.3.2.6	Acridin Orange	51
3.4	Präparations- und Färbeverfahren.....	51
3.4.1	Verwendete Puffer.....	51
3.4.2	Blutentnahme	51
3.4.3	Färbeprotokolle	52
3.4.3.1	Thrombozytenpräparation und Bestimmung der Thrombozytenzahl.....	52
3.4.3.2	Mikropartikelpräparation und Bestimmung der Mikropartikelanzahl.....	53
3.4.3.3	Leukozytenisolation und -doppelfärbung	54
3.4.3.4	Fluoreszenzmarkierung des Fibrin-Antikörpers mit Alexa 488	54
3.5	Versuchsaufbau und -verlauf	55
3.6	Operationsmethoden	55
3.6.1	Venöser Zugang zur rechten Vena jugularis	56
3.6.2	Operationstechnik des arteriellen Thrombosemodells	57
3.6.3	Operationstechnik des venösen Thrombosemodells	58
3.7	Durchführung der intravitralen Videofluoreszenzmikroskopie	59
3.7.1	Arterielle Thrombose	60
3.7.1.1	Untersuchung der zellulären Mechanismen in der arteriellen Thrombose	60
3.7.1.2	Thrombozytenrekrutierung	60
3.7.1.3	Leukozytenrekrutierung.....	62
3.7.2	Venöse Thrombose.....	62
3.7.2.1	Untersuchung der zellulären Mechanismen in der venösen Thrombose	62
3.7.2.1.1	Leukozyten- und Thrombozytenrekrutierung.....	63
3.7.3	Fibrinbildung und Mikropartikelrekrutierung.....	63
3.8	Organentnahme	64
3.9	Dokumentation.....	64

3.10	Auswertung der Videoaufzeichnungen.....	65
3.10.1	Arterielle Thrombose.....	65
3.10.2	Venöse Thrombose	65
3.11	Histologische Untersuchungen	65
3.11.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.)	66
3.11.2	Van Gieson Färbung.....	66
3.11.3	MSB-Färbung nach LENDRUM (Martius-Scarlet-Blue)	66
3.11.4	Weigert`sche Fibrinfärbung.....	67
3.12	Elektronenmikroskopische Untersuchungen	67
3.12.1	Raster-Elektronenmikroskopie (REM).....	67
3.12.2	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).....	68
3.13	Versuchsplanung und -durchführung.....	68
3.13.1	Tierzahlen	68
3.13.2	Versuchsgruppen	69
3.13.3	Experimentelles Protokoll	72
3.14	Statistische Versuchsauswertung.....	72
4	Ergebnisse	74
4.1	In vivo Darstellung zellulärer Thrombosierungsmechanismen	74
4.1.1	Arterielle Thrombose	74
4.1.1.1	Analyse der Thrombozyten- sowie Leukozytenadhäsion u. -aggregation bei Wildtyptieren.....	74
4.1.1.2	Einfluss des GP-IIb-IIIa-Integrinrezeptors auf die Thrombozyten- sowie Leukozytenadhäsion u. -aggregation	78
4.1.1.3	Einfluss des Membranglykoproteins P-Selektin auf die Thrombozyten- sowie Leukozytenadhäsion u. -aggregation	81
4.1.1.4	Differentielle Bedeutung von GPIIb und P-Selektin für die Rekrutierung von Thrombozyten und Leukozyten in der A. carotis communis.....	85
4.1.2	Venöse Thrombose.....	88

4.1.2.1	Thrombozytenadhäsion u. -aggregation.....	88
4.1.2.1.1	Ermittlung der Kontrollwerte für Thrombozytenadhäsion u. -aggregation im Rahmen der venösen Thrombose	88
4.1.2.1.2	Einfluss des GPIIb-IIIa-Integrinrezeptors auf die Thrombozytenadhäsion u. -aggregation im Rahmen der venösen Thrombose	88
4.1.2.1.3	Einfluss des Membranglykoproteins Tissue Faktor auf die Thrombozyten-adhäsion u. -aggregation im Rahmen der venösen Thrombose	89
4.1.2.2	Leukozytenadhäsion u. -koaggregation	90
4.1.2.2.1	Ermittlung der Kontrollwerte für Leukozytenadhäsion u. -koaggregation.....	90
4.1.2.2.2	Einfluss des GPIIb-IIIa-Integrinrezeptors auf die Leukozytenadhäsion u. -koaggregation.....	92
4.1.2.2.3	Einfluss des Membranproteins P-Selektin auf die Leukozytenadhäsion u. -koaggregation	93
4.1.2.2.4	Differentielle Bedeutung von GPIIb und P-Selektin für die Rekrutierung von Thrombozyten und Leukozyten in der V. cava.....	94
4.1.2.2.5	Einfluss des Membranglykoproteins Tissue Faktor auf die Leukozyten-adhäsion u. -koaggregation	95
4.1.2.3	Mikropartikelrekrutierung im venösen Thrombus.....	99
4.1.3	Fibrinbildung bei arterieller und venöser Thrombosierung	99
4.2	Histopathologische Evaluierung der Thrombosierung	102
4.3	Charakterisierung ultrastruktureller Veränderungen.....	106
5	Diskussion.....	108
5.1	Wahl der Mäuselinien	108
5.2	Diskussion experimenteller <i>in vivo</i> Modelle der arteriellen und venösen Thrombose	109
5.2.1	Arterielle Thrombosemodelle	109
5.2.1.1	Mechanische Endothelverletzung: Ligatur und Denudation.....	109
5.2.1.2	Elektrische Endothelverletzung	110

5.2.1.3	Photochemische Endothelverletzung: Laser	110
5.2.1.4	Chemische Endothelverletzung: FeCl ₃ -induzierte Thrombose.....	111
5.2.2	Venöse Thrombosemodelle (dysfunktionales Endothel)	111
5.2.3	Spezifische Diskussion der verwendeten Thrombosemodelle	113
5.2.4	Charakterisierung der ablaufenden zellulären Interaktionen und der beteiligten molekularen Phänomene	115
5.2.5	Einfluss unterschiedlicher Zelltypen u. -rezeptoren auf die Thrombosierung	115
5.2.6	Ultrastrukturelle Unterschiede beider Thromboseformen.....	119
5.2.7	Ausblick	121
6	Zusammenfassung.....	122
7	Summary	124
8	Literaturverzeichnis	126
9	Tabellenverzeichnis	137
10	Abbildungsverzeichnis.....	138
11	Abkürzungsverzeichnis.....	143
12	Danksagung.....	147
13	Lebenslauf.....	148

1 Einleitung

Im 21. Jahrhundert zählen Thrombosen, welche klinisch als Schlaganfall, Herzinfarkt bzw. Lungenembolien manifest werden, zu den häufigsten Todesursachen in industrialisierten Ländern¹⁴⁸. So erkrankten heutzutage 2 von 1000 Männern und Frauen an einer Thrombose. Allein für Deutschland bedeutet dies ca. 200.000 Thrombosen pro Jahr, wobei hierbei überwiegend Frauen betroffen sind. Hiervon erleiden ein Drittel der Betroffenen innerhalb der darauf folgenden acht Jahre erneut eine Thrombose. Allein diese hohe Zahl der Betroffenen zeigt, welche wichtige Bedeutung der Erforschung zum erweiterten Verständnis der Thrombose und den daran beteiligten Faktoren beigemessen werden muss. Als Therapieansätze werden grundsätzlich folgende drei Optionen genannt: Medikamentöse Auflösung (Thrombolyse), chirurgische Entfernung (Thrombektomie), Überbrückung durch Umgehungskreislauf (Bypass). Hieraus ist bereits zu erkennen, dass es sich bei der Behandlung einer Thrombose immer um einen sehr aufwändigen, z.T. mit großen Eingriffen und somit mit erweiterten Risiken verbundenen Therapieprozess handelt. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, ein Entstehen der Thrombose von vornherein zu verhindern. Hierbei reichen die Maßnahmen zur Prophylaxe von Thrombosestrümpfen, dem Anraten zur gesunden Lebensweise bis hin zur präventiven Gabe hochdosierter Medikamente. Allerdings zeigen die Zahlen der Betroffenen sowie der Verstorbenen, dass sowohl in der Therapie, aber besonders in der Prophylaxe von Thrombosen noch große Anstrengungen unternommen werden müssen, um dieser Erkrankung effektiver begegnen zu können.

Als Auslöser für arterielle wie venöse Thrombosen gelten auch heute noch die von Rudolph Virchow 1856 etablierten drei Hauptfaktoren, welche eine Thrombosebildung induzieren. Diese werden unter dem so genannten Begriff der „Virchow Trias“ zusammengefasst. Als Hauptfaktoren für eine Thrombosebildung nannte Virchow Gerinnungsstörungen, die Verlangsamung des Blutstroms sowie Schäden der inneren Gefäßwände. Erst in neuerer Zeit wurden Untersuchungen zur genaueren Differenzierung zwischen arteriellen und venösen Thrombosen sowie deren Mechanismen durchgeführt. Diese Untersuchungen zeigen alle, dass zwischen arterieller und venöser Thrombose sowohl in der Entstehung, als auch im Besonderen in der medikamentösen Behandlung eine Unterscheidung erforderlich ist. So differieren die Risikofaktoren beider Thromboseformen erheblich voneinander. Während Rauchen, Bluthochdruck oder Hyperlipidämie zu den Hauptrisikofaktoren für arterielle Thrombosen zählen, spielen diese mit Ausnahme des Rauchens im Zusammenhang mit venöser Thrombosierung kaum eine Rolle. Venöse Thromben entstehen hauptsächlich in Verbindung mit genetischen und erworbenen Risikofaktoren, welche die Blutstase sowie eine veränderte Zusammensetzung des Blutes (Hyperkoagulabilität) nach sich ziehen, aber auch im Rahmen von Tumorerkrankungen oder als Folge einer chronisch-venösen Insuffizienz. Unter diesen neuen Gesichtspunkten muss dementsprechend das Triasmodell an die unterschiedlichen Gegebenheiten im arteriellen und venösen System angepasst werden¹⁷².

1.1 Morphologie und Funktion von Arterien und Venen

Arterien und Venen sind charakterisiert durch eine Dreischichtung der Gefäßwand in Tunica interna (Intima), Tunica media (Media) und Tunica externa (Adventitia)^{63,77,78}. Der Wandaufbau der verschiedenen Gefäßtypen variiert entsprechend ihrer Beanspruchung durch die Gefäßinnendrucke, ihrer unterschiedlichen Funktionen, sowie ihrer Lokalisationen im Organismus⁷⁷.

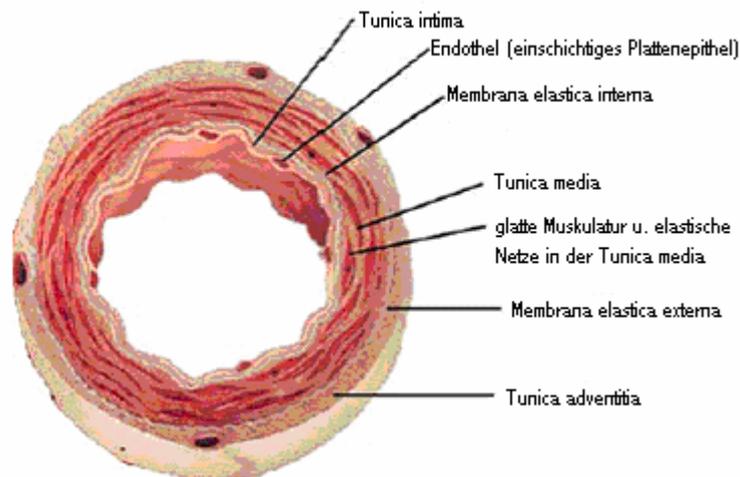


Abbildung 1: Bauplan der Blutgefäße modifiziert nach³¹.

1.1.1 Arterien

Arterien sind Blutgefäße, welche das Blut vom Herzen wegführen und somit zum Hochdruckteil des Blutkreislaufes zählen. Hierdurch bedingt weisen arterielle Gefäße muskelreichere und daher deutlich dickere Gefäßwände als venöse Gefäße auf. Im großen Kreislauf transportieren sie sauerstoffreiches Blut, wohingegen die Arterien des Lungenkreislaufs sauerstoffarmes Blut führen⁷⁷. Die Strukturierung der Gefäßwände setzt sich in Form einer klar ausgebildeten Schichtung wie folgt zusammen:

Die äußerste Schicht (Tunica externa), auch als Adventitia bezeichnet besteht aus fibroelastischen Fasernetzen des Kollagen-Typs I^{78,101,106,178}. Diese bindegewebige Schicht stellt eine Verbindung zwischen dem Gefäß und dem umliegenden Gewebe her und schützt das Gefäß vor äußeren Einwirkungen (v.a. Längsdehnungen)⁷⁷. Zudem führt sie sympathische Gefäßnerven und kleinste Blutgefäße (Vasa vasorum), welche eine Blutversorgung der Tunica externa und Tunica media gewährleisten^{101,178}. Als Tunica media oder Media bezeichnet man

die mittlere Gefäßschicht, die sich durch die Membrana elastica externa von der Adventitia abgrenzt. Die Media enthält mehrere Lagen zirkulär angeordneter glatter Muskelzellen, zwischen denen elastische und kollagene Fasern eingelagert sind. Grundsätzlich kann der Anteil zwischen Muskelzellen und Fasern variieren, was sich in der Unterscheidung zwischen Arterien vom elastischen (Aa. elastotypicae) und muskulären Typ (Aa. myotypicae) widerspiegelt^{77,78}. Die Intima (Tunica interna) bildet die innerste der drei Schichten. Im Gegensatz zu den vorangegangenen Schichten wird ihre Ernährung allein durch Diffusion aus dem Blutstrom gewährleistet. Sie setzt sich aus der an die Tunica media angrenzenden Membrana elastica interna (besonders ausgeprägt bei Arterien des muskulären Typs), gefolgt von dem bindegewebigen Subendothel (Stratum subendotheliale), der Basalmembran und dem einschichtigen Endothel (Lamina endothelialis) zusammen. In der Intima sind Zellen und Fibrillen bevorzugt achsenparallel ausgerichtet⁷⁸.

Arterien des elastischen Typs weisen einen hohen Anteil elastischer Fasern in der Tunica media auf, welche durch Kontakt mit den glatten Muskelzellen dieser Schicht ein elastisch-muskuläres Netzwerk bilden. Zusätzliche Elastizität wird durch ein dickes Stratum subendotheliale mit Bindegewebsfasern erreicht, welches mit dem elastischen Gewebe der Media in Kontakt steht. Durch ihre hohe elastische Dehnbarkeit sind diese Gefäße in der Lage, die Druckspitzen des Blutkreislaufes abzdämpfen, zu „speichern“ und diese anschließend wieder kontinuierlich an das Blut abzugeben. Aufgrund dieser Eigenschaft bezeichnet man Arterien vom elastischen Typ auch als „Windkesselgefäße“⁷⁸. Sie sind herznah zu finden, wo sie sich während der Systole sehr stark aufweiten und somit die beim Herauspumpen des Blutes aus dem Herzen entstehende Druckwelle dämpfen. Hierdurch wandeln die großen, herznahen Gefäße (va. Aorta, Lungenarterien) mittels ihrer elastischen Verformungsfähigkeit (was einem temporären Speichern von Blut in der Arterie entspricht) den pulsatilen Blutfluss, der durch den Herzschlag verursacht wird, in eine kontinuierlichere Strömung um. Dieser Schutz der Peripherie vor gefährlichen Blutdruckspitzen geht bei der Arteriosklerose infolge der „Versteifung der Gefäßwände“ verloren, was zu lebensbedrohlichen Komplikationen führen kann.

Arterien des muskulären Typs weisen im Gegensatz dazu einen hohen Gehalt an glatten Muskelzellen in der Media auf. Hierdurch wird eine Aufrechterhaltung des Blutdrucks im arteriellen System gewährleistet^{77,78,106}. Arterien des muskulären Typs, welche aus mehreren dicht anliegenden ringförmigen Muskelschichten aufgebaut sind, finden sich in der Peripherie (herzfern) des Blutkreislaufes. Sie werden auch als Widerstandsgefäße bezeichnet, da sie durch eine Variation ihres Gefäßdurchmessers den Blutdruck und somit die Fließgeschwindigkeit des Blutes regulieren²²⁹.

1.1.2 Venen

Die Venen transportieren das Blut aus der Peripherie zum Herzen und führen, abgesehen vom oxygenierten Blut des Lungenkreislaufs, sauerstoffarmes Blut. Venösen Gefäßen fehlt die Möglichkeit zur Kontraktion der Gefäßwände und somit zur Durchmesservariation. Sie bilden den Hauptteil des Niederdrucksystems im Blutkreislauf. Um trotzdem einen Rückfluss des Blutes in die Peripherie zu verhindern, sind viele der größeren Venen in der unteren Körperhälfte mit Venenklappen (Valvulae venosae) ausgestattet. Die Venenklappen verschließen bei Strömungsumkehr das Gefäßlumen und verhindern damit ein Versacken des Blutes in der Peripherie⁷⁷. Im Gegensatz dazu reicht bei Arterien der Pumpdruck des Herzens aus, um dies abzuwenden²²⁹.

Der schichtartige Aufbau des Gefäßes ist bei den venösen Gefäßen deutlich geringer ausgeprägt als bei den Arterien. Bei kleineren Venen umfasst die Tunica intima lediglich das Endothel. Zudem ist diese bei größeren Venen grundsätzlich schwächer entwickelt als bei vergleichbaren Arterien⁷⁷. Darüber hinaus weisen venöse Gefäße in der Regel einen sehr niedrigen Gehalt glatter Muskelzellen in der Tunica media auf, weshalb ihre Wände eindeutig dünner sind, als die der Arterien.

1.1.3 Gegenüberstellung beider Gefäßtypen

Der unterschiedliche Aufbau der Gefäßwand von Arterien und Venen bringt klar zum Ausdruck, dass es sich bei Arterien um Druck-, bei Venen um Volumengefäße handelt.

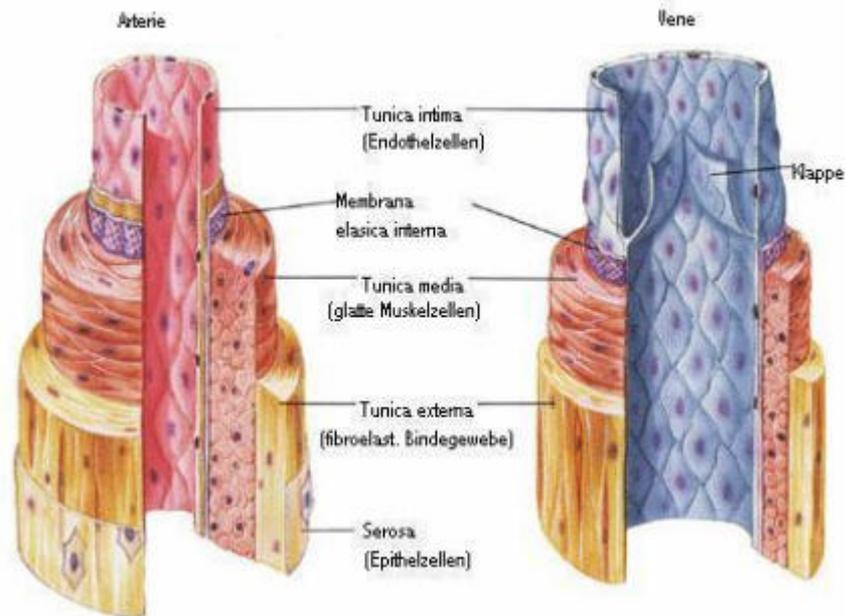


Abbildung 2: Vergleichende Darstellung des Gefäßaufbaus von Arterie und Vene. Schematische Darstellung der Schichtung der Arterien- und Venenwand (Modifiziert nach⁵⁸).

	Richtung des Blutflusses	Schutz vor Rückfluss des Blutes	Dreischichtung (Adventitia, Media, Intima)	Wandstärke	Tunica media
Arterien (Hochdruck-System)	Herz ↓ Peripherie	Pumpdruck des Herzens Muskelreiche, elastinarme Arterienwand in Peripherie	deutlich ausgeprägt scharfe Adventitia-Media-Grenze	dick	Aa. elastotypicae (Windkesselgefäße) herznah Aa. myotypicae (Widerstandsgefäße) peripher
Venen (Niederdruck-System)	Peripherie ↓ Herz	Venenklappen (Ventilwirkung)	undeutlich ausgeprägt Wandaufbau variationsreich	dünn	niedriger Gehalt glatter Muskelzellen (Pulsationen der Gefäßwand fehlen)

Tabelle 1: Grundlegende Unterschiede im Wandaufbau sowie der Funktion von Arterien und Venen.

1.2 Morphologie und Funktion von Thrombozyten

An der Entstehung von Thrombosen scheinen Thrombozyten wesentlich beteiligt zu sein. Unter Thrombozyten bzw. Blutplättchen, welche einen Durchmesser von 2 – 4 µm aufweisen, versteht man die kleinsten korpuskulären Bestandteile des zirkulierenden Blutes. Diese „anukleären Zellen“ sind durch Adhäsions- und Aggregationsreaktionen maßgeblich an der Bildung eines primären hämostatischen Thrombus beteiligt^{59,63,123}.

1.2.1 Charakteristika der Thrombozyten

Thrombozyten zeichnen sich, im Gegensatz zu Leukozyten und anderen eukaryoten Zellen, durch das Fehlen eines Zellkerns aus, wodurch ihre Fähigkeit zur Neusynthese von Proteinen eingeschränkt wird^{63,173}.

Aufgrund ihrer Ultrastruktur lassen sich Blutplättchen in vier morphologische Bereiche mit jeweils spezifischen Funktionen gliedern: periphere und strukturelle Zone, Zone der Organellen sowie der Membransysteme.

Als periphere Zone bezeichnet man die Thrombozytenoberfläche, welche sich aus der Zytoplasmamembran und der außen aufgelagerten dünnen Glykokalyx aus Proteinen und Mukopolysacchariden zusammensetzt. Charakteristischerweise ist die phospholipidreiche Zytoplasmamembran als polarisiertes „Bilayer“ mit zahlreichen integrierten Membranproteinen, welche Rezeptorfunktionen für lösliche Agonisten und Adhäsionsproteine erfüllen, organisiert. Die asymmetrische Anordnung der Phospholipide und deren Umverteilung im Rahmen der Plättchenaktivierung tragen entscheidend zur Plättchenfunktion bei.

Bei der strukturellen Zone handelt es sich um den für die Formgebung sowie für die Formveränderung des Blutplättchens verantwortlichen Bereich. Ein Netzwerk verschiedener Strukturproteine formt das Zytoskelett, welches hauptsächlich aus Aktin und Aktin-Bindungsproteinen besteht. Im Rahmen der Thrombozytenaktivierung bilden sich Filamente aus Aktin und Myosin, die durch eine Verbindung zu den Zellorganellen deren Reorganisation bewirken.

Im Zytoplasma befindet sich die Zone der Organellen, bestehend aus Mitochondrien, Glykogenspeichern und drei Formen von thrombozytenspezifischen Speichergranula. Bei diesen, für die Plättchenfunktion essentiellen Speicherorten für Proteine und andere Substanzen unterscheidet man: dichte Granula („dense bodies“), α -Granula und Lysosomen. Ähnlich den Lysosomen anderer Zellen, schließen thrombozytäre lysosomale Granula hydrolytische Enzyme ein. Dichte Granula speichern aggregationsfördernde, niedermolekulare Verbindungen wie Calcium, Adenin- und Guanin-Nukleotide, Serotonin sowie Phosphate. In den am häufigsten vorkommenden α -Granula sind unterschiedliche

Proteine enthalten, die Adhäsions- und Aggregationsvorgänge, Chemotaxis, Proliferation, Inflammations- und Koagulationsprozesse beeinflussen⁶³.

Die Zone der Membransysteme setzt sich aus dem offenen kanalikulären System und dem dichten tubulären System zusammen^{9,63}. Wie sein Name besagt, besteht das offene kanalikuläre System aus weitreichenden gewundenen Kanälen, die mit der Plasmamembran verbunden und durch Porenöffnungen vom Extrazellulärraum aus zugänglich sind^{63,226-228}. Das dichte tubuläre System ist ein Abkömmling des rauen endoplasmatischen Retikulums der Megakaryozyten. Als einer der Hauptspeicherorte für freie Kalziumionen spielt es eine zentrale Rolle im Prozess der Plättchenaktivierung und ihrer Formveränderung⁶³.

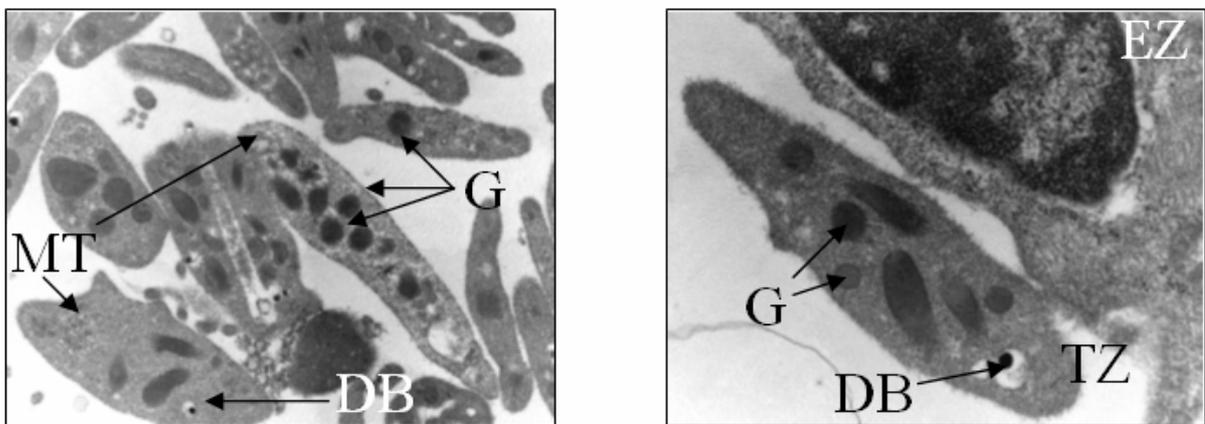


Abbildung 3: TEM-Aufnahmen von Thrombozyten (angefertigt in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie der GSF, München). Es stellen sich Mikrotubuli (MT), α -Granula (G) sowie dichte Granula (DB) dar. Links: Ansammlung einzelner Thrombozyten. Rechts: Am Endothel (EZ) der V. cava adhärenter Thrombozyt (TZ).

1.2.2 Bildung und Funktion von Thrombozyten

Blutplättchen werden im Knochenmark aus Megakaryozyten gebildet und in die periphere Blutstrombahn ausgeschwemmt^{64,173}. Die Milz dient als Speicherort für ca. ein Drittel der Gesamtmenge der Plättchen, welche im Austausch mit dem zirkulierenden Anteil stehen. Nach einer durchschnittlichen Lebensdauer von 7 bis 10 Tagen im peripheren Blutstrom erfolgt ihr Abbau im retikuloendothelialen System der Leber und der Milz^{63,64}.

Thrombozyten zeichnen sich durch sehr vielfältige Funktionen aus, welche zum Teil Parallelen zu dem Verhalten von Leukozyten aufweisen. Trotz des Fehlens eines Zellkerns, können Plättchen Bewegungen und Formveränderungen ausführen^{59,123}. Thrombozyten spielen eine entscheidende Rolle für den normalen Ablauf der Blutstillung^{64,173}. Sie tragen zur Bildung des primären hämostatischen Thrombus bei, katalysieren die Fibrinbildung und

liefern lösliche sowie membrangebundene Faktoren zur Förderung der Wundheilung^{187,216}. Sie sind in der Lage Sauerstoffradikale zu bilden^{57,105,120,123} und chemotaktische Faktoren aus den α -Granula für neutrophile und eosinophile Granulozyten sowie Monozyten abzustoßen¹²⁹. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass Thrombozyten bakterizide Wirkung auf Gram-positive Erreger haben⁸⁴ und an den Zytotoxizitätsreaktionen gegen Blutparasiten¹⁵ und Tumorzellen^{87,149} beteiligt sind.

Der Funktionszustand der Thrombozyten ist charakteristischerweise anhand ihrer Form erkennbar. Nichtaktivierte Plättchen weisen durch ihre typische diskoide Form mit ca. $8 \mu\text{m}^2$ eine deutlich geringere Oberfläche auf, als Thrombozyten nach Aktivierung. Durch Plättchenadhäsion oder lösliche Agonisten (ADP, Thrombin) stimuliert, vergrößert sich ihre Oberfläche aufgrund von Pseudopodienbildung auf bis zu $13 \mu\text{m}^2$. Als so genannte Echinosphärozyten bezeichnet man diese aktivierten Blutplättchen, die durch Ausstülpungen der Plasmamembran eine Formveränderung erfahren haben⁶³.

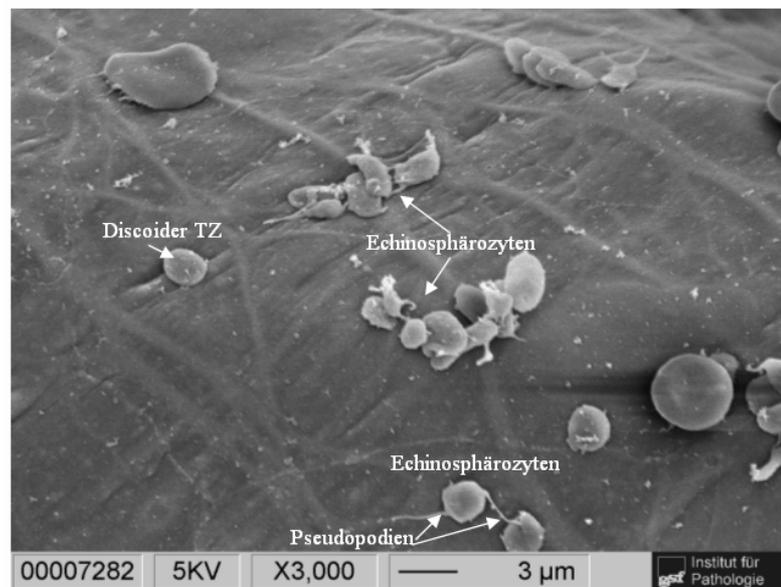


Abbildung 4: REM-Aufnahmen von Thrombozyten (angefertigt in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie der GSF, München). Ruhende und aktivierte Thrombozyten (TZ) in der V. cava 1 Stunde nach Ligatur. Darstellung adhärenter Echinosphärozyten mit ausgebildeten Pseudopodien sowie eines diskoiden ruhenden Blutplättchens (links).

1.3 Morphologie und Funktion von Leukozyten

Neben Thrombozyten stellen auch Leukozyten einen wesentlichen zellulären Bestandteil von Thrombosen dar. Als Leukozyten oder weiße Blutzellen (gr. leukos = weiß) bezeichnet man kernhaltige Zellen, die anhand ihrer Morphologie bzw. ihrer Anfärbbarkeit in Lymphozyten, Monozyten und neutrophile, eosinophile sowie basophile Granulozyten unterteilt werden. Nur ca. 5% dieser funktionell dem Abwehrsystem zuzurechnenden Zellen sind im Blut nachweisbar, da der Rest sich im Gewebe befindet. Tabelle 2 zeigt die Unterschiede im Differentialblutbild zwischen humanem und murinem Blut auf. Da bei humanem Blut die Granulozyten mehr als 50% der Leukozyten ausmachen, spricht man hier von einem granulozytären Blutbild, wohingegen bei der Maus mit mehr als 50% Lymphozyten ein lymphozytäres Blutbild vorliegt⁴⁵.

Spezies	Gesamt-leukozytenzahl (/µl)	Neutrophile (%)	Lymphozyten (%)	Monozyten (%)	Eosinophile (%)
Mensch	3000 – 11000	57 – 70	20 – 30	5 – 7	2 – 4
Maus	4000 – 12000	20 – 30	40 – 60	3 – 5	3 – 5

Tabelle 2: Gesamtleukozytenzahl/µl und Differentialblutbild in Prozent. Modifiziert nach⁴⁵.

1.3.1 Charakteristika der Leukozyten

Leukozyten können in Zellen der unspezifischen sowie der spezifischen Abwehr unterteilt werden. Zu den Zellen der unspezifischen Abwehr zählen die Granulozyten sowie die Zellen des mononukleären Phagozytensystems (MPS), welche in der Lage sind fremde Partikel aufzunehmen und zu zerstören. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Anfärbbarkeit unterteilt man Granulozyten in Neutrophile, Basophile und Eosinophile. Charakteristisch ist ihr stark segmentierter Zellkern (je nach Alter der Zellen: Neutrophile 3 – 5 Segmente; Eosinophile und Basophile 2 Segmente), ihre Größe schwankt zwischen 7µm und 15µm.

Monozyten sind 14 – 20 µm große Zellen, mit großem runden bis nierenförmigen Kern und wenig Zytoplasma, welches aber zahlreiche Granula und Vakuolen aufweist. Sie zirkulieren für mehrere Tage im Blut und wandern in das Gewebe aus, woraufhin es unter dem Einfluss lokaler Faktoren zur weiteren Differenzierung zu Makrophagen kommt.

Lymphozyten, welche die Zellen der spezifischen Abwehr darstellen, sind kleine (7 – 15 µm), runde Zellen mit großem, runden Nukleus und großer Zellkern-Zellplasma-Relation. Lymphozyten werden morphologisch in kleine (7 – 10 µm) bzw. große (11 – 15 µm) Lymphozyten eingeteilt, wobei die kleinen Lymphozyten dominieren und nach Aktivierung

eine Größenzunahme v.a. im Bereich des Zytoplasmas erfahren. Hierdurch sind sie in der Lage, sich zu teilen und ihre Funktion als „Effektorzellen“ auszuüben. Funktionell unterscheidet man zwischen B-Lymphozyten, T-Lymphozyten und „Natürlichen Killerzellen“. Mit einer Lebensdauer von mehreren Monaten bis Jahren mediiieren T-Zellen die zellvermittelten Immunreaktionen, wohingegen B-Zellen mit einer deutlich kürzeren Lebensdauer für humorale Immunreaktionen verantwortlich sind⁴⁵.

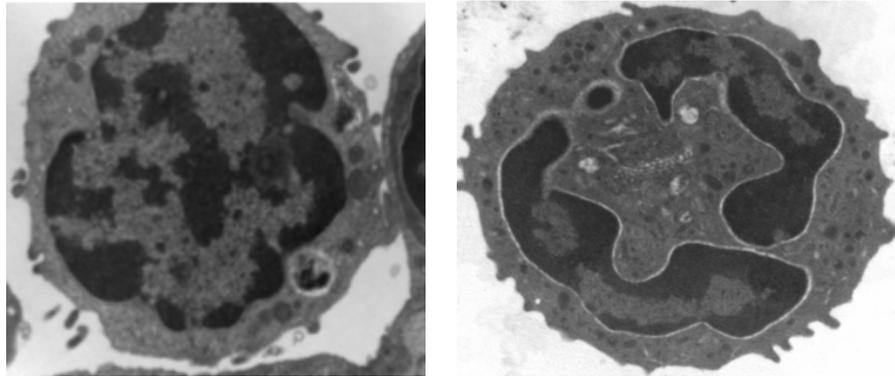


Abbildung 5: TEM-Aufnahmen von Leukozyten (angefertigt in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie der GSF). Links: Monozyt mit Pseudopodienbildung, großem rundem Zellkern und wenig Zytoplasma in der V. cava 6 Stunden nach Ligatur. Rechts: Granulozyt mit Pseudopodienbildung, segmentiertem Zellkern und granulareichem Zytoplasma in der V. cava 6 Stunden nach Ligatur.

1.3.2 Bildung und Funktion von Leukozyten

Wie alle Blutzellen entwickeln sich Leukozyten aus pluripotenten Stammzellen im Knochenmark. Zellen der spezifischen Abwehr (B- und T-Lymphozyten, Natürliche Killerzellen) stammen von lymphatischen Stammzellen ab, wohingegen sich Zellen der unspezifischen Abwehr (Granulozyten, Monozyten) wie auch Erythrozyten und Thrombozyten aus myeloischen Stammzellen entwickeln^{45,75}. Anschließend zirkulieren leukozytäre Zellen in einem Zustand geringer Adhäsionsneigung im Blut, bevor sie aktiv in die Gewebe migrieren, wo sie den Organismus vor fremden Mikroorganismen schützen, sowie Immunreaktionen und Wundheilung vermitteln⁷⁵.

Granulozyten, welche Neutrophile, Eosinophile und Basophile einschließen, sind als Zellen der unspezifischen Abwehr mit ihren hochspezialisierten Granula für die erste Immunabwehr verantwortlich¹¹¹. Neutrophile Granulozyten nehmen als wichtigste Funktion die Phagozytose, das heißt die Aufnahme und Zerstörung von Bakterien, Zelltrümmern und Fremdpartikeln in akuten Inflammationsherden im Blut und im Gewebe wahr. Nach Adhäsion über Adhäsionsmoleküle auf den Endothelzellen können diese Zellen das Blut aktiv verlassen (Diapedese) und einem chemischen Gradienten folgend in das Entzündungsgebiet einwandern

(Chemotaxis). Dort entwickeln diese kurzlebigen Zellen insbesondere nach Opsonisierung eine hohe Phagozytoseleistung und zerstören Fremdpartikel mittels lysosomaler Enzyme und reaktiver Sauerstoffverbindungen. Ähnlich verhalten sich eosinophile Granulozyten, welche jedoch nur kurz im Blutstrom zirkulieren und sofort ins Gewebe auswandern, wo sie wie Neutrophile effektiv phagozytieren. Eosinophile können zusätzlich zur Abwehr extrazellulärer Parasiten und im Rahmen allergischer Inflammation ihre Granula-Inhaltsstoffe nach außen abgeben¹¹¹. Basophile Granulozyten dagegen spielen vor allem eine Bedeutung bei pathophysiologischen Vorgängen wie allergischen Reaktionen. Die kleinste Leukozytenfraktion im Blut ist in der Lage, Immunglobuline vom IgE-Typ zu binden und daraufhin zu degranulieren. Durch die Freisetzung von Histamin und Serotonin wird der Gefäßtonus sowie die Gefäßpermeabilität moduliert und somit Entzündungsreaktionen vermittelt⁴⁵.

Monozyten dagegen sind langlebige Zellen, die sich zu Gewebsmakrophagen oder dendritischen Zellen differenzieren können¹¹¹. Charakteristischerweise zirkulieren Monozyten mehrere Tage im Blut, ehe sie sich im Gewebe zu Makrophagen differenzieren und dort phagozytieren. Ihre antimikrobiellen Mechanismen sind vergleichbar mit denen der Granulozyten. Jedoch sind sie in der Lage wiederholt und über längere Zeiträume im Rahmen chronischer bakterieller Entzündungen zu phagozytieren. Zellen des mononukleären Phagozytensystems sind zusätzlich durch Antigenpräsentation an der Regulation der spezifischen Abwehr beteiligt⁴⁵. Monozyten können mit zahlreichen entzündlichen Erkrankungen, wie zum Beispiel der Arteriosklerose in Verbindung gebracht werden¹¹¹.

Lymphozyten dagegen gewährleisten antigenspezifische erworbene Immunität und das immunologische Gedächtnis¹¹¹. Als Zellen der spezifischen Abwehr erkennen B-Lymphozyten über ihren B-Zell-Rezeptor, der ein zellmembranständiges Antikörpermolekül darstellt, das zugehörige Antigen. Durch eine Signalübertragung in das Zellinnere, kommt es zu mehreren Teilungs- und Differenzierungsvorgängen, wodurch die eigentliche Effektorzelle, die Plasmazelle, entsteht. Diese weisen eine Lebensdauer von nur wenigen Tagen auf. Dieser aktivierte B-Lymphozyt produziert im rauen endoplasmatischen Reticulum Antikörper, welche er anschließend über die Zellmembran sezerniert. Zu den Funktionen dieser Antikörper zählen: die Antigenbindung, die Markierung von Fremdstoffen (Opsonisierung), die Komplementaktivierung sowie die Aktivierung von natürlichen Killerzellen. Außerdem können sie zur Sensibilisierung von Mastzellen und Basophilen beitragen. Zudem bildet sich durch Vermittlung so genannter teilungsfähiger „Memory-Zellen“ ein immunologisches Gedächtnis aus, welches Jahre bis Jahrzehnte persistieren kann. Bei erneutem Antigenkontakt ermöglichen Gedächtniszellen eine schnellere und effektivere Immunreaktion⁴⁵.

Eine zentrale Rolle für das immunologische Gedächtnis spielen T-Lymphozyten, welche ihren Ursprung als Thymozyten im Thymus nehmen. T-Zellen, welche die Selektion im Thymus

überstehen, treten als so genannte naive T-Zellen ins Blut über, von wo aus sie den Körper pausenlos nach Antigenen absuchen, die den TCR (T-Zell-Antigenrezeptor) an ihrer Oberfläche zu stimulieren vermögen²¹³. Nach Austreten aus dem Thymus rezirkulieren naive T-Zellen kontinuierlich zwischen Blut und lymphoiden Organen, ohne jedoch in andere Gewebe zu migrieren^{20,214}. Der TCR, ein heterodimeres Glykoprotein bestehend aus 2 $\alpha\beta$ - oder $\gamma\delta$ -Ketten^{32,65} erkennt ein Peptid- oder Lipidantigen nur gebunden an einen Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) oder CD-1 an der Oberfläche einer anderen Zelle^{65,161,214}. Aufgrund der zahllosen Formen und Variationen des TCR existiert eine enorme TCR-Vielfalt. Naive T-Zellen migrieren bevorzugt in lymphoide Gewebe, ein Prozess der auch als „homing“ bezeichnet wird²⁰. CD-Zelloberflächenmoleküle („Cluster of Differentiation“) sind charakteristisch für bestimmte T-Zellpopulationen oder Differenzierungsstadien und dienen als Corezeptoren, sowie der Signalverstärkung vom TCR in das Zellinnere. CD4-Moleküle sind auf T-Helferzellen, CD8-Moleküle auf cytotoxischen T-Zellen exprimiert⁴⁸. CD4-positive Helferzellen werden wiederum in TH1- und TH2-Zellen unterteilt. TH1-Zellen sind für die Bildung von Zytokinen (IL-2, TNF- β , IFN- γ) und somit für die zellvermittelten Immunreaktionen von entscheidender Bedeutung, wohingegen TH-2-Zellen durch ihre Zytokinproduktion (IL-4, IL-5) an allergischen Erkrankungen sowie der Antikörperproduktion (humorale Immunität) beteiligt sind⁴⁵.

T-Lymphozyten sind vor allem Effektorzellen mit folgenden Hauptaufgaben: Eliminierung virusinfizierter Zellen (zytotoxische T-Zellen), Aktivierung von Makrophagen (TH-1), Mithilfe bei der Antikörperproduktion (TH-2)⁴⁵.

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind ein Teil der angeborenen Abwehr und sind in der Lage sowohl virusinfizierte Zellen als auch Tumorzellen zu erkennen und zu töten. In den ersten Tagen viraler Infektionen schütten NK-Zellen zytotoxische Faktoren aus, woraufhin die Zielzelle stark beschädigt wird und stirbt. Im Gegensatz zu zytotoxischen T-Zellen attackieren NK-Zellen Zellen, die keine MHC-Moleküle tragen. Virusspezifische zytotoxische T-Lymphozyten übernehmen nach ca. 3 Tagen die Aufgaben der NK-Zellen⁴⁵.

1.4 Physiologie der Hämostase

Unter Hämostase versteht man die Bildung eines Gefäßwandthrombus zur Blutstillung⁶³. Durch ein enges Zusammenspiel von Gefäßwand, Blutplättchen und plasmatischen Gerinnungsfaktoren verhindern die Mechanismen der Blutgerinnung einen übermäßigen Blutverlust bei Zerstörung der Gefäßwandintegrität^{63,174,198}. Entsprechend des zeitlichen Ablaufs unterscheidet man zwischen primärer (zellulärer) und sekundärer (plasmatischer) Hämostase⁶³.

1.4.1 Primäre Hämostase

Physiologischerweise zeichnet sich sowohl die Oberfläche des Gefäßendothels als auch die Oberfläche der im Blut zirkulierenden Thrombozyten durch antiadhäsive Eigenschaften aus. Aufgrund dessen kommt es im gesunden Organismus zu keiner Kontaktaufnahme zwischen der intakten Gefäßwand und den Blutzellen^{42,225}.

Um exzessive Blutungen zu verhindern, werden im Rahmen der primären Hämostase Blutplättchen im Bereich von Gefäßwandläsionen rasant rekrutiert^{63,64,198}.

1.4.1.1 Thrombozytenadhäsion u. -aggregation

Nach Gefäßverletzung mit Freilegung des Subendothels steuern thrombozytäre Membranglykoproteine die Adhäsion an spezifische Struktur- und Adhäsionsproteine der extrazellulären Matrix^{63,147,173,174}. Zu den wichtigsten Adhäsionsproteinen der extrazellulären Matrix zählen neben Kollagenen²⁷ (v. a. Typ I u. III) auch Fibronektin, Laminin und von-Willebrand-Faktor (vWF), der vom Endothel sezerniert wird und in den oberflächlichen Schichten des Subendothels an Kollagenfibrillen anhaftet^{13,35-37,63,131,174,180}. Der initiale Kontakt zirkulierender Blutplättchen wird bei hohen Scherraten über den thrombozytären Rezeptor für von-Willebrand-Faktor (Glykoprotein Ib-V-IX) mit vWF vermittelt²⁷. Weitere Adhäsionsrezeptoren aus der Familie der Integrine stabilisieren die adhären gewordenen Thrombozyten⁶³.

Im Anschluss an die initiale Plättchenadhäsion fördern Aktivierungs- und Sekretionsvorgänge (genauer erklärt unter 1.4.1.2) über eine Vielzahl von Rezeptor-Liganden-Interaktionen die homotypische Plättchenaggregation^{63,131,173,180}. Unter Aggregation versteht man den Vorgang der Koadhäsion zwischen zwei Thrombozyten. Der reversible Vorgang der primären Aggregation verbindet die Blutplättchen über „Fibrinogenbrücken“ locker miteinander, wohingegen die sekundäre Aggregation erst verzögert auftritt, sobald der Thrombozyt beginnt Granulainhaltsstoffe freizusetzen⁶³. Aktivierte Plättchen sondern während der Aggregation Ca^{2+} und Fibrinogen in das umgebende Milieu ab und tragen somit zu einer Erhöhung der Konzentration dieser aggregationsfördernden Substanzen im Plasma bei^{63,181}. Entscheidend

für den Aggregationsvorgang ist der Glykoprotein (GP) IIb-IIIa-Rezeptorkomplex auf der Oberfläche von Thrombozyten^{63,173,181}. Nur im aktivierten Zustand sind die Bindungsstellen des GP-IIb-IIIa-Rezeptors für Fibrinogen freigelegt²¹⁵. Durch die ausgeschütteten Ca^{2+} -Ionen kommt es zur Ausbildung von „Fibrinogenbrücken“ und somit zur Bildung von Plättchenaggregaten^{63,157,158,173}.

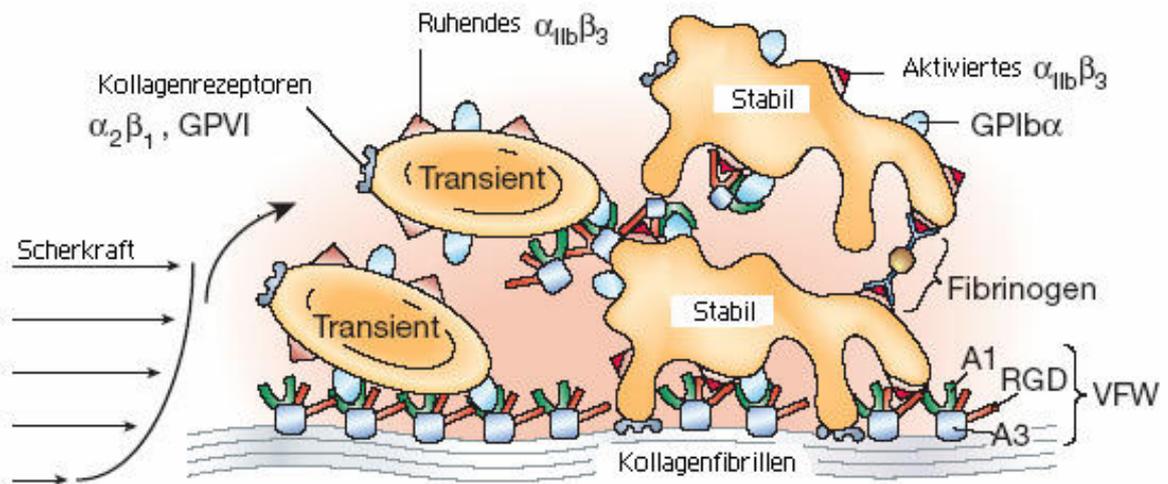


Abbildung 6: Mechanismen der Plättchenadhäsion und -aggregation modifiziert nach¹⁷³. Interaktion von zirkulierenden Blutplättchen mit kollagenimmobilisiertem vWF bzw. aktivierten adhärenen Blutplättchen. Darstellung der Plättcheninteraktionen mit den Kollagenfibrillen der extrazellulären Matrix (Adhäsion). Stabilisierung der Interaktionen durch Fibrinogenbrücken über den aktivierten GP-IIb-IIIa-Rezeptor (Aggregation).

1.4.1.2 Thrombozytenaktivierung u. -sekretion

Kollagene, welche Bestandteile des vaskulären Subendothels und der Gefäßwand sind, tragen entscheidend zur Plättchenaktivierung bei. Die Regulation der Plättchenaktivierung spielt eine Schlüsselrolle in der Abgrenzung physiologischer Hämostase von pathologischer Thrombose²⁷. Durch die Verbindung der Thrombozyten mit dem Subendothel werden morphologische und funktionelle Veränderungen in den Zellen induziert, die man als Aktivierung bezeichnet. Dieser komplexe Prozess beinhaltet Veränderungen metabolischer u. biochemischer Mechanismen, Formveränderungen der Plättchen, Aktivierung von Oberflächenrezeptoren, sowie Veränderung der Orientierung der Membranphospholipide.

Erst aktivierte Plättchen sind in der Lage, einen primären hämostatischen Thrombus vollständig auszubilden. Zahlreiche Substanzen bewirken über spezielle thrombozytäre Oberflächenrezeptoren und Signaltransduktionswege die Bildung von Signalfaktoren, was

eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nach sich zieht⁶³. Ein erhöhter Ca^{2+} -Spiegel führt wiederum zur vermehrten Bildung von Thromboxan A_2 . Dieses Eicosanoid regt, ebenso wie die Proteinkinase C, die Sekretion thrombozytärer Granula-Inhaltsstoffe^{93,223,231} an und trägt zur Aktivierung des Fibrinogenrezeptors GPIIb-IIIa bei⁶³.

Das intrazelluläre Ca^{2+} -Niveau beeinflusst auch die Formgebung der Blutplättchen. Bei Überschreitung einer bestimmten Schwellenkonzentration reagieren Thrombozyten mit Formveränderung („shape change“) durch Pseudopodienbildung⁶³.

Aktivierte Thrombozyten vergrößern so ihre Oberfläche, wodurch die Wahrscheinlichkeit weitere Interaktionen einzugehen deutlich erhöht wird.

Auf ruhenden Plättchen ist der GP-IIb-IIIa-Rezeptor nicht zur hochaffinen Ligandenbindung fähig²¹⁵. Erst nach Aktivierung entwickelt der Rezeptor hohe Bindungsaffinität für Fibrinogen und andere Adhäsionsmoleküle^{63,215}. Durch Konformationsänderung des Rezeptors wird eine Bindung von Fibrinogen an GP-IIb-IIIa und somit die Plättchenaggregation möglich²¹⁵. Die Freisetzung zusätzlicher Fibrinogenrezeptoren aus internen Speichern führt zur Erhöhung der Oberflächendichte an GP-IIb-IIIa-Molekülen⁶³.

Durch Veränderungen der Orientierung der Membranphospholipide wird eine Anlagerung von Gerinnungsfaktoren und die Bildung eines Prothrombinasekomplexes an der aktivierten Plättchenoberfläche möglich. Dies steigert die Thrombinbildung und Konsolidierung des primären hämostatischen Thrombus durch Fibrinvernetzung im Rahmen der sekundären Hämostase.

Unterdessen beginnt der Thrombozyt über zwei Wege seine gespeicherten Inhaltsstoffe in den Extrazellulärraum abzugeben. Dieser als Sekretion oder Degranulation bezeichnete Vorgang erfolgt entweder über eine Verschmelzung der thrombozytären Granula mit dem offenen kanalikulären System oder über Exozytose (Verschmelzung mit der Plasmamembran). Degranulation ist ein energieabhängiger, kalziumgesteuerter Prozess, der den Aktivierungs- und Rekrutierungsprozess verstärkt und die sekundäre irreversible Phase der Aggregation einleitet⁶³.

Der im Rahmen der primären Hämostase initial gebildete, so genannte plättchenreiche Thrombus stillt zwar vorübergehend die Blutung, ist jedoch sehr fragil und wird daher leicht von der Gefäßwandläsion abgelöst und abgeschwemmt⁶³.

1.4.2 Sekundäre Hämostase

Eine Stabilisierung des fragilen Plättchenaggregates und somit eine effiziente Blutstillung wird durch die sekundäre Hämostase mit Aktivierung der Gerinnungskaskade und anschließender Fibrinbildung herbeigeführt⁶³.

1.4.2.1 Gerinnungskaskade

Wie oben beschrieben ist die aktivierte Plättchenoberfläche entscheidend an der Aktivierung der Gerinnungskaskade beteiligt, welche aus historischen Gründen in das extrinsische sowie das intrinsische System mit gemeinsamer Endstrecke unterteilt wird. Die Gerinnungskaskade ist ein komplexes enzymatisches System, welches in Thrombin- und Fibrinbildung und somit der Konsolidierung des plättchenreichen Thrombus mündet⁶³.

Entsprechend der Namensgebung befinden sich alle Komponenten des intrinsischen Systems im Blutplasma. Man spricht in diesem Zusammenhang von einer so genannten Kontaktaktivierung, da das intrinsische System durch Bindung von vier Kontaktfaktoren an negativen Ladungen der subendothelialen Matrix und der aktivierten Thrombozytenoberfläche langsam in Gang gesetzt wird^{45,63}. Nach Kontaktaktivierung aktiviert der Faktor XIIa über Faktor XIa den Faktor IXa, der zusammen mit Faktor VIIIa die Bildung des Prothrombinaktivator Komplexes induziert^{30,116,135}.

Bei Gefäßverletzung dagegen kommt das integrale Membranprotein „Tissue Faktor“ (Gewebsthromboplastin) mit den plasmatischen Gerinnungsfaktoren im Blutstrom in Kontakt, wodurch die Blutgerinnung über das extrinsische System rasch in Gang gesetzt wird^{6,41,43,46,154,155}. Unzugänglich für Gerinnungsfaktoren im Blutfluss befindet sich das Gewebsthromboplastin in gesunden Gefäßen größtenteils in der Adventitia^{34,46,67}. Es wird von perivaskulären und epithelialen Zellen konstitutiv exprimiert und spielt eine Schlüsselrolle in der Hämostase⁶³. Auch in zirkulierenden Zellen (Leukozyten, leukozytäre Mikropartikel, Thrombozyten, thrombozytäre Mikropartikel) kann die Synthese von „Tissue Faktor“ durch spezielle Stimuli induziert werden^{34,43,46,47,150,151,164-166,235}. Das Transmembranprotein „Tissue Faktor“ hat eine sehr hohe Affinität zu der Serinprotease VIIa³⁸. Sobald die beiden Faktoren durch Zerstörung der Endothelzellschicht miteinander in Kontakt treten können, erfahren sie eine Konformationsänderung und formen einen enzymatischen Komplex^{34,119,145}, der das Zymogen Faktor X in seine aktive Form konvertiert^{6,38}. Zudem aktiviert dieser Komplex das intrinsische System über Faktor IX, wodurch die Thrombinproduktion enorm gesteigert wird¹⁷.

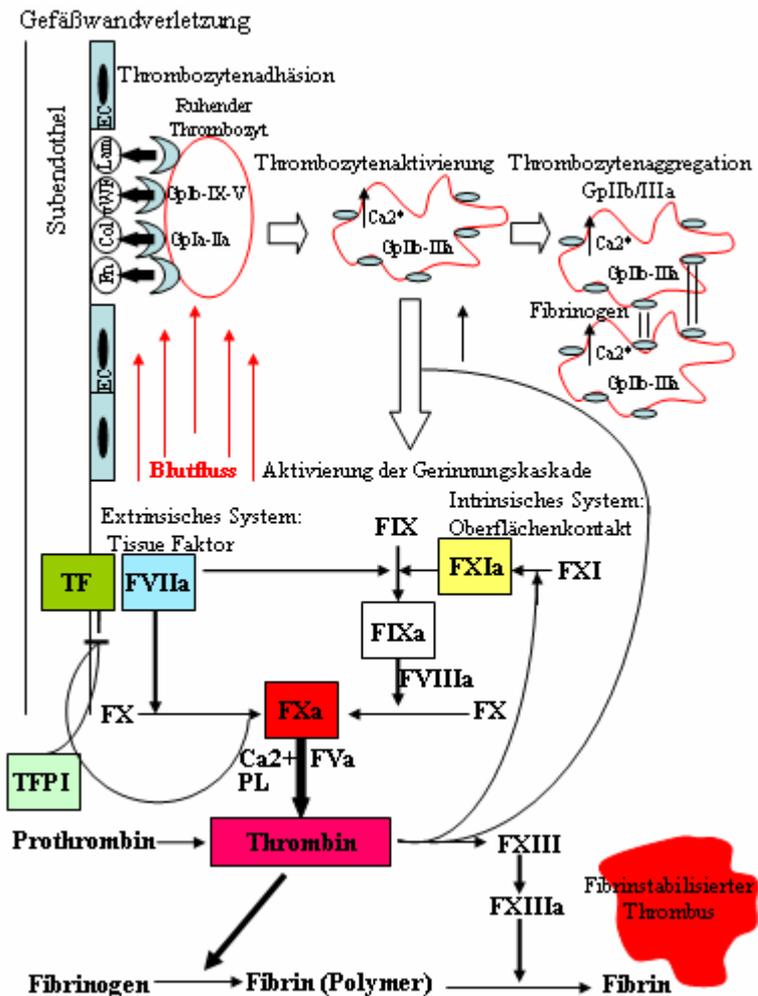


Abbildung 7: Interaktion zwischen primärer und sekundärer Gerinnung. Modifiziert nach^{113,114}. Auf die Darstellung des Faktors XII im Rahmen der Kontaktaktivierung des intrinsischen Systems wurde zur besseren Übersichtlichkeit verzichtet.

Das extrinsische und intrinsische System laufen mit Aktivierung des Prothrombin-aktivator-komplexes in einer gemeinsamen Endstrecke zusammen. Dieser Komplex aus Faktor Xa und Faktor Va konvertiert Prothrombin zu Thrombin in Abhängigkeit von Ca²⁺-Ionen und einer anionischen Phospholipidoberfläche, welche von aktivierten Plättchen bereitgestellt wird^{38,143}. Der TF/FVIIa-Komplex spielt eine zentrale Rolle bei der Entstehung arterieller und venöser Thrombosen^{102,167}.

Eine Schlüsselrolle in der Gerinnungskaskade spielt das multifunktionelle Enzym Thrombin. Es spaltet Fibrinogen zu Fibrin und aktiviert Faktor XIII zu Faktor XIIIa, wodurch quervernetztes Fibrin und somit ein stabiler Thrombus gebildet wird. Des Weiteren dient es der zusätzlichen Aktivierung von Thrombozyten und steigert durch eine positive Feedbackreaktion die Aktivierung des intrinsischen Systems. Thrombin wirkt zudem als potentes Mitogen. Es ist unter anderem verantwortlich für die Ausschüttung von Zytokinen sowie vasoaktiven Substanzen und erhöht die Permeabilität der Endothelzellschicht¹¹⁷. Eine

übermäßige, unkontrollierte Thrombinbildung kann zu Gefäßverschlüssen und in Folge dessen zu Herzinfarkt, Schlaganfall, Lungenembolien oder venöser Thrombose führen¹¹⁸.

1.4.2.2 Mögliche Bedeutung von Leukozyten

Hohe Leukozytenzahlen, sowie inflammatorische Marker stellen signifikante Risikofaktoren für Thrombosen dar². Nach Gewebsverletzungen spielen Leukozyten eine wichtige Rolle bei den daraus resultierenden Entzündungsreaktionen. Pathogene und verletzte Zellen aus dem Entzündungsgebiet locken Leukozyten mittels chemotaktischer Faktoren an¹⁹⁰. Dort rollen sie, vermittelt durch P- und E-Selektin, über das aktivierte Endothel und werden schließlich, durch Interaktion der leukozytären Integrine mit Adhäsionsrezeptoren aus der Immunoglobulin-Superfamilie, adhären¹⁴⁴. Über ein so genanntes „outside-in signaling“ findet eine Leukozytenaktivierung statt, die zur weiteren Integrinaktivierung und fester Adhäsion rollender Zellen führt²¹⁹. Diese Leukozytenaktivierung in Entzündungsgebieten bewirkt Veränderungen, welche die Gerinnungskaskade aktivieren können. Leukozyten übernehmen somit die essentielle Aufgabe, Entzündungsvorgänge mit der Aktivierung der Gerinnungskaskade zu verknüpfen². Es besteht eine enge Beziehung zwischen Entzündungs- und Gerinnungsreaktionen.

Thrombin als zentrales Enzym der Gerinnungskaskade hat zum einen selbst chemotaktische Wirkung auf Neutrophile und Monozyten und stimuliert zum anderen die Freisetzung der Interleukine IL-1 und IL-8¹⁹⁹. Entzündungsmediatoren, wie bakterielle Lipopolysaccharide, IL-1, TNF- α und thrombozytäre Membranbestandteile induzieren die „Tissue Faktor“-Synthese in Monozyten^{2,41,43,51}, die im Ruhezustand nur sehr geringe „Tissue Faktor“-Aktivitäten aufweisen^{2,51}. Des Weiteren setzen Monozyten im Zuge ihrer Aktivierung kleine Membranpartikel, so genannte Mikrovesikel oder Mikropartikel frei, die ebenfalls „Tissue Faktor“ exprimieren^{38,54,179} und somit indirekt am Thrombenwachstum beteiligt sind⁵⁰. Auch Neutrophile exprimieren „Tissue faktor“, wobei dessen Ursprung noch nicht geklärt werden konnte².

Leukozytäres Gewebsthromboplastin ist zudem an der Gerinnungsaktivierung bei Sepsis beteiligt (DIC)¹⁵¹. Arterielle thrombotische Verschlüsse aufgrund plötzlicher Ruptur atherosklerotischer Plaques sind für akute Koronarsyndrome und thrombotische Schlaganfälle verantwortlich².

Prothrombin wird unter physiologischen Bedingungen durch den Faktor Xa an aktivierten Plättchen mit Hilfe ihrer anionischen Phospholipidoberfläche (Prothrombinasekomplex) zu Thrombin konvertiert¹⁰⁴. Ein ähnlicher Prothrombinasekomplex kann auch an der Oberfläche von Monozyten gebildet werden. Dieser führt wiederum zur Thrombinbildung und ermöglicht somit einen zusätzlichen Weg der Thrombinbildung².

Zudem haben adhärenente Leukozyten prokoagulatorische und proaggregatorische Wirkungen. Neutrophile zum Beispiel können die Fibrinbildung erhöhen⁷⁰ und stellen aktivierten Plättchen Arachidonsäure für die Synthese proaggregatorischer Eicosanoide zur Verfügung²⁸. Monozyten setzen zytotoxisches TNF- α frei, wodurch Endothelzellen geschädigt werden. Von adhärenenten Leukozyten freigesetzte Sauerstoffradikale induzieren monozytäre „Tissue Faktor“-Expression und die Ausschüttung von vWF, was die Plättchenadhäsion verstärkt²¹⁰.

Glykoprotein PSGL-1, der Ligand für P-Selektin, vermittelt Interaktionen zwischen Leukozyten und aktivierten Blutplättchen oder Endothelzellen^{2,95}. Durch Interaktionen mit Thrombozyten wird in Monozyten eine erhöhte „Tissue Faktor“- und Integrin-Expression, sowie Zytokinproduktion und eine erhöhte Freisetzung von Sauerstoffradikalen induziert^{2,207}.

1.4.2.3 Physiologische Gerinnungshemmung

Derzeit sind drei Hauptwege der physiologischen Gerinnungshemmung bekannt: das Heparin-Antithrombin System, das Protein C System sowie der TFPI-Weg („tissue factor pathway inhibitor“)⁵⁰. In Studien mit Knock-out-Mäusen konnte gezeigt werden, dass alle drei Wege für ein Überleben und die Thromboseprävention essentiell sind^{86,89,90,224}.

Die antithrombotische Wirkung von Antithrombin III (AT III) ist auf eine Inaktivierung der Enzyme Thrombin, des Komplexes aus Faktor VIIa und Tissue Faktor, sowie der Faktoren Xa und IXa zurückzuführen. Die Hemmwirkung von AT III auf oben genannte Enzyme kann durch Heparin verstärkt werden.

TFPI blockiert die Tissue-Faktor abhängige Aktivierung der Faktoren X und IX, indem es mit seinen drei Kunitz-ähnlichen Domänen zum einen an Faktor Xa, zum anderen an den Tissue Faktor-Faktor VIIa Komplex und zuletzt an der negativ geladenen Phospholipidoberfläche bindet.

Der komplexeste der drei natürlichen antikoagulatorischen Mechanismen ist der Protein C Weg. Wie oben beschrieben folgt einer Gefäßwandverletzung die rasche Aktivierung der Blutgerinnungskaskade mit der Bildung des zentralen Enzyms Thrombin, welches durch Plättchenaktivierung, Fibrinbildung und positive Feedbackaktivierung der zwei regulatorischen Proteine FV und FVIII die Gerinnungskaskade weiter stimuliert. Bindet das membranständige Protein Thrombomodulin an Thrombin, so ändert sich dessen Substratspezifität dahingehend, dass es seine prokoagulatorischen Eigenschaften einbüsst und zu einem potenten Aktivator von Protein C konvertiert. Inaktives Protein C zirkuliert im Plasma und wird durch den Komplex aus Thrombin und Thrombomodulin zu aktiviertem Protein C umgewandelt. Dieses ist vereinfacht gesagt in einem Komplex mit dem Kofaktor Protein S für die proteolytische Inaktivierung der Faktoren Va und VIIIa verantwortlich⁵⁰.

1.5 Membranglykoproteine

Erst durch zahlreiche thrombozytäre membranständige Glykoproteine werden oben beschriebene Interaktionen zwischen Thrombozyten, Endothel, plasmatischen Gerinnungsfaktoren und Strukturen der extrazellulären Matrix im Rahmen der primären und sekundären Hämostase möglich⁶³. Gemäß ihrer Molekülstruktur unterteilt man thrombozytäre Adhäsionsrezeptoren in vier Gruppen: Integrine, leuzinreiche Glykoproteine, Selektine und Rezeptoren vom Immunglobulin-Typ.

1.5.1 Integrine

Hierbei handelt es sich um ubiquitäre Adhäsionsrezeptoren⁶³, die auf einer Vielzahl von Körperzellen, wie zum Beispiel Thrombozyten, Leukozyten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen exprimiert werden und entscheidend an Prozessen der Zelldifferenzierung und -entwicklung, Migration, Proliferation sowie der Zelladhäsion beteiligt sind^{63,184-186}. Sie spielen eine zentrale Rolle bei der Plättchenadhäsion und -aggregation^{147,158,186}. Charakteristischerweise sind Integrine nichtkovalent verbundene Heterodimere, die sich aus einer α - und β -Untereinheit zusammensetzen¹⁴⁷. Eine weitere Klassifizierung der Integrine erfolgt anhand der β -Untereinheit in β_1 - und β_3 -Integrine. Die β -Untereinheit dient der strukturellen Unterteilung und verbindet sich mit einer spezifischen α -Kette zu einem funktionellen Rezeptor. Bisher sind fünf thrombozytäre Integrine bekannt, von denen drei der β_1 -Klasse und zwei der β_3 -Klasse zuzuordnen sind^{185,193}.

Klassifizierung	Liganden-spezifität	Elektrophoret. Klassifizierung	CD-Nomenklatur	Rezeptorzahl pro Plättchen	Vorkommen
$\alpha_2\beta_1$ Kollagenrezeptor	Koll, Ln	GPIa-IIa	CD49b	1000	ubiquitär
$\alpha_5\beta_1$ Fibronektinrez.	Fn	GPIc-IIa	CD49c	1000	ubiquitär
$\alpha_6\beta_1$ Lamininrez.	Ln	GPIc'-IIa	CD49f	1000	ubiquitär
$\alpha_{IIb}\beta_3$ Fibrinogenrez.	Fb, Fn, Vn, vWF, TSP	GPIIb-IIIa	CD41-CD61	60 000 - 100 000	Plättchen
$\alpha_{v}\beta_3$ Vitronektinrez.	Fb, Fn, Vn, vWF	GP α_v -IIIa	CD51-CD61	100	ubiquitär

Tabelle 3: Darstellung der Integrine der β_1 -Klasse und β_3 -Klasse. Koll, Kollagen; Fb, Fibrinogen; Fn, Fibronectin; GP, Glykoprotein; Ln, Laminin; TSP, Thrombospondin; Vn, Vitronectin; vWF, von-Willebrand-Faktor.

Wie in Tabelle 3 aufgezeigt, interagieren Integrine mit einer Vielzahl von Liganden, welche Bestandteil der extrazellulären Matrix sind und zum Teil auch in löslicher Form im Plasma vorkommen. Die Ligandenbindung erfordert die Anwesenheit millimolarer Konzentrationen

divalenter Kationen wie Ca^{2+} ^{63,184}. Der Prozess der Affinitätsmodulation ermöglicht eine schnelle Integrinregulation. Durch extrazelluläre Einflüsse erfährt der Rezeptor eine Konformationsänderung von einem niedrigaffinen in einen hochaffinen Funktionszustand. Des Weiteren kann über gesteigerte Expression der Rezeptoren die Rezeptordichte auf der Zelloberfläche erhöht werden⁶³.

Als „Inside out signaling“ bezeichnet man die rezeptorvermittelte Zellaktivierung (z.B. durch Thrombin), die über eine intrazelluläre Signalübertragung die Konformationsänderung einiger Integrinrezeptoren bewirkt^{63,187}. Im Gegensatz dazu nennt man, die im Zuge der Ligandenbindung auftretende Konformationsänderung des Integrinrezeptors mit nachfolgender Aktivierung intrazellulärer Signaltransduktion „Outside in Signaling“^{186,187}.

Der thrombozytäre Fibrinogenrezeptor (GP-IIb-IIIa; $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$) stellt mit einer Oberflächenbesetzung von ca. 80 000 Rezeptoren pro Thrombozyt das häufigste Membranglykoprotein der Blutplättchen dar^{68,157-159,186,215}. Es wird ausschließlich in Megakaryozyten sowie Thrombozyten exprimiert und ist in der thrombozytären Plasmamembran, dem offenen kanalikulären System sowie den α -Granula lokalisiert.

Der erste Schritt der Thrombozytenaggregation, nämlich die Bindung von löslichem Fibrinogen an die aktivierte Oberfläche adhärenter Thrombozyten wird durch den Fibrinogenrezeptor vermittelt. Es werden verschiedene Funktionszustände des GP-IIb-IIIa-Rezeptorkomplexes unterschieden: Auf nicht aktivierten zirkulierenden Blutplättchen weist der Rezeptor einen niedrigaffinen Funktionszustand auf, der nach Thrombozytenaktivierung (z.B. durch Thrombin, ADP, Adrenalin) durch Freilegung seiner hochaffinen Fibrinogenbindungsstellen in einen hochaffinen aktivierten Zustand transformiert wird. Erst dadurch kann lösliches Fibrinogen an der Thrombozytenoberfläche gebunden werden (ligandenbesetzter Funktionszustand).

Nach Aktivierung kommt es zu einer starken Zunahme des Integrins, da intrazellulär gespeichertes GP-IIb-IIIa durch Verschmelzen der Granula mit der Zellmembran vermehrt ausgeschüttet wird.

Der Vitronektinrezeptor ($\alpha_v\beta_3$) wird auf vielen verschiedenen Zelltypen, einschließlich Plättchen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen exprimiert. Er spielt, im Gegensatz zum Fibrinogenrezeptor, nur eine sehr untergeordnete Rolle und kommt nur in geringen Mengen im Plättchen vor. Glykoprotein α_v -IIIa ist wichtig für die Plättchenadhäsion und ist an der Endothelzellmigration sowie an Mechanismen der Angiogenese, Apoptose und Proliferation beteiligt.

Die drei Rezeptoren aus der Gruppe der β_1 -Integrine (siehe Tabelle 3) sind an der primären Adhäsion der Plättchen sowie deren Aktivierung beteiligt.

1.5.2 Leuzinreiche Glykoproteine

Zu dieser Gruppe zählen die thrombozytären Membranglykoproteine GPIb-V-IX und GPIV, die sich durch einen hohen Gehalt an der Aminosäure Leuzin auszeichnen⁶³. Der aus vier Untereinheiten bestehende GPIb-V-IX-Komplex dient als Adhäsionsrezeptor für von-Willebrand-Faktor und Thrombin. Seine zentrale Rolle im Rahmen der primären Hämostase besteht in der Vermittlung der Adhäsion zirkulierender Thrombozyten an kollagen-immobilisiertem vWF, trotz der hohen Scherkräfte im arteriellen System^{63,180}. GPIb-V-IX vermittelt jedoch nur transienten Kontakt, wohingegen über GP-IIb-IIIa eine feste Verbindung zwischen Plättchen und Endothel hergestellt wird.

1.5.3 Selektine

Selektine vermitteln als vaskuläre Adhäsionsrezeptoren heterotypische Interaktionen von Zellen^{63,133,139,236}. Sie zeichnen sich durch eine extrazelluläre Lektindomäne mit benachbarter „epidermal growth factor-like“-Domäne, sowie mehrere kurze Komplementbindungsdomänen, eine Transmembrandomäne und eine zytoplasmatische Domäne aus^{61,76,103,132,139}. Benannt nach ihrem Hauptexpressionsort unterscheidet man drei Selektine mit unterschiedlichen Funktionen und Lokalisationen. E-Selektin kommt lediglich auf zytokin-aktivierten Endothelzellen vor und mediiert die Adhäsion von Granulozyten am Endothel. L-Selektin wird konstitutiv auf Leukozyten exprimiert und reguliert deren Adhäsion am Endothel^{63,139}.

P-Selektin wird auf aktivierten, adhären Plättchen sowie aktivierten Endothelzellen exprimiert. Als Speicherorte für P-Selektin dienen thrombozytäre α -Granula^{12,194} sowie Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen^{14,62,134,138,139,168}. Eine rasche Freisetzung und Oberflächenexpression von P-Selektin nach Zellaktivierung ist essentiell für die Mechanismen der sekundären Hämostase sowie vaskuläre Reparaturvorgänge¹³⁹. P-Selektin fördert die Anlagerung von Leukozyten an die Endothelläsion und induziert inflammatorische Reaktionen in Leukozyten^{139,200}. Des Weiteren vermittelt es Interaktionen zwischen Thrombozyten und Leukozyten^{152,200}.

1.5.4 Adhäsionsrezeptoren vom Immunglobulin-Typ

Bisher kennt man zwei thrombozytäre Adhäsionsrezeptoren vom Immunglobulin-Typ, deren Bedeutung für die Thrombozytenadhäsion jedoch weitestgehend ungeklärt ist. Das „Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1“ (PECAM-1) kommt auf Blutplättchen, Endothelzellen, neutrophilen Granulozyten sowie Monozyten vor, wohingegen das „intercellular adhesion molecule-2“ (ICAM-2) bisher lediglich auf Thrombozyten nachgewiesen werden konnte⁶³.

Zudem zählt man den thrombozytären Kollagenrezeptor Glykoprotein (GP) VI zu den Adhäsionsrezeptoren vom Immunglobulin-Typ^{26,91}. GP VI ist nichtkovalent an die thrombozytäre Fc γ -Kette gebunden, die für die Signaltransduktion des Rezeptors verantwortlich ist^{66,146,203}. Während GP VI die Ligandenbindung vermittelt, induziert der Fc γ -Rezeptor eine intrazelluläre Signalkaskade^{11,52,66,147,163,233}, wodurch die Aktivierung und Sekretion initiiert wird^{125,147}.

Zur Vermittlung homo- und heterotypischer zellulärer Interaktionen werden also zahlreiche Adhäsionsrezeptoren auf Blutplättchen exprimiert, die sowohl essentiell für Prozesse der Hämostase, als auch zur Vermittlung proinflammatorischer thrombozytärer Reaktionen von großer Bedeutung sind.

1.6 Pathologie der Hämostase

1.6.1 Definition und Prävalenz der Thrombose

Unter Thrombose versteht man den vollständigen oder teilweisen Verschluss von Arterien und Venen sowie der Herzhöhlen durch intravasale Blutgerinnung mit Bildung von Blutkoageln (Thromben) aus Thrombozytenaggregaten und Fibrin¹⁶².

Wie schon Rudolf Virchow 1856 in seiner klassischen Trias postulierte, führen drei Faktoren zur Thrombusbildung: herabgesetzte Blutströmungsgeschwindigkeit (Stase), erhöhte Gerinnungsbereitschaft des Blutes aufgrund veränderter Blutzusammensetzung (Hyperkoagulabilität) sowie Gefäßwandschaden (Alteration der Gefäßintima)^{7,97}.

1.6.1.1 Arterielle Thrombogenese

Hierbei handelt es sich um die Bildung eines Blutgerinnsels in einer Arterie. Der Thrombus kann im betroffenen Organ zu Durchblutungsstörungen und damit zu einem Sauerstoffmangel im Versorgungsgebiet führen. Besonders gefährdet sind u.a. die Herzkranzgefäße (Herzinfarkt), die das Gehirn versorgenden Arterien (Schlaganfall) sowie die Beinschlagadern (Arterieller Verschluss)²²⁹.

Arterielle Thrombosen bilden sich in der Regel an Lokalisationen mit veränderter bzw. verletzter Gefäßintima. Als Hauptursachen für die Entstehung arterieller Thrombosen sind daher Verletzungen des Gefäßendothels, atherosklerotische Veränderungen sowie mechanische Hindernisse im Blutstrom (z.B. künstliche Herzklappen, Gefäßersatz) zu nennen. Dementsprechend zählen Rauchen, Diabetes, Bluthochdruck und Übergewicht zu den Risikofaktoren für die Entstehung arterieller Thrombosen.

Arterielle Thromben können sowohl am Entstehungsort selbst, als auch in entfernten Gefäßabschnitten zum Verschluss und somit zu Durchblutungsstörungen führen, wohingegen venöse Thromben bei Embolisierung in der Regel erst die Lunge betreffen.

1.6.1.2 Venöse Thrombogenese

Unter einer Venenthrombose (Phlebothrombose) versteht man die Thrombenbildung in venösen Gefäßabschnitten. Im menschlichen Organismus sind hierbei überwiegend die Beine und das Becken betroffen. Sind die tief liegenden, großen Venen welche direkt zum Herzen führen, involviert, so spricht man von einer tiefen Venenthrombose (TVT).

Lebensbedrohlich werden diese Thromben meist erst, wenn sie sich an ihrer Entstehungsstelle von der Gefäßwand ablösen, mit dem Blutstrom in die Lunge abgeschwemmt werden und dort zu einer Lungenembolie führen. Der Embolus, also der vom Blutfluss durch den Körper abgeschwemmte Thrombus, bleibt in den Pulmonalarterien hängen und führt zu einem sowohl mechanischen als auch reflexartigen Gefäßverschluss, der Perfusionsdefekte nach sich zieht. Daraus resultiert eine Minderdurchblutung des Versorgungsgebietes bis hin zur Gewebsnekrose.

Bei der venösen Thrombose spricht man von einer multifaktoriellen Erkrankung. Ein Zusammenspiel genetischer (primärer) und erworbener (sekundärer) Risikofaktoren bestimmt die Anfälligkeit für venöse Thrombosen⁹⁷. Die meisten genetisch vererbaren Gerinnungsstörungen führen eher zu venöser Thromboembolisierung als zu arteriellen Thrombosen.

Die Ursachen für die Entstehung venöser Thrombosen basieren auf dem Zusammenspiel der von Rudolph Virchow aufgestellten Trias, die sich aus den Faktoren Blutstase, Hyperkoagulabilität und Endothelzellschaden zusammensetzt⁹⁷. Potentiell sind alle Situationen, welche zu einer Verlangsamung (Stase) des Blutstroms führen, ursächlich an der Bildung venöser Thromben beteiligt. Hier sind vor allem Situationen mangelnder physischer Bewegungsfähigkeit, wie zum Beispiel nach Operationen, bei Frakturen mit immobilisierenden Verbänden sowie bei Paralyse infolge eines Schlaganfalls zu nennen. Bewegungsmangel aufgrund langer Flug- oder Busreisen („Reisethrombose“ oder Economy-Class-Syndrom) sowie bei Bettlägerigkeit führen durch mangelnde Pumpfunktion der großen Muskulatur zu reduziertem Blutfluss und sogar Stase. Der Blutfluss kann jedoch auch durch äußeren Druck (Krebserkrankungen, Schwangerschaft) verlangsamt werden.

Zudem befinden sich Patienten mit venöser Thrombose häufig in einem Zustand verstärkter Gerinnungsneigung, der zum einen durch verstärkte Blutgerinnung (Östrogentherapie, orale Kontrazeptiva, Thrombophilien), zum anderen durch die verminderte Fähigkeit Blutgerinnsel aufzulösen (z.B. Gerinnungsfaktor V Mutation) hervorgerufen werden kann.

Als dritter Bestandteil der Virchowschen Trias sind Endothelverletzungen bedingt durch Trauma (Operationen, Frakturen, Quetschungen), degenerative Veränderungen (z.B. altersbedingt) oder entzündliche Venenerkrankungen zu nennen.

2 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Wie bereits erwähnt, zählen arterielle und venöse Gefäßverschlüsse zu den Haupttodesursachen in den westlichen Industrienationen. Dennoch sind die zugrunde liegenden Mechanismen noch immer nicht im Detail verstanden, was eine effektive Prävention und Behandlung deutlich erschwert. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die an der Entstehung der arteriellen und venösen Thrombosen beteiligten molekularen und zellulären Phänomene besser zu verstehen. Hierfür wurden zunächst an der Maus zwei Thrombosemodelle etabliert, die der unterschiedlichen Pathogenese der arteriellen und venösen Thrombose (Endothelzellverletzung bei der arteriellen Thrombose, Stase bei der venösen Thrombose) gerecht werden. Die unterschiedlichen zellulären Phänomene in der arteriellen und venösen Thrombose wurden mit Hilfe der Intravitalmikroskopie qualitativ analysiert. Begleitend erfolgen histologische und ultrastrukturelle *ex vivo* Analysen. Um die Beteiligung relevanter molekularer Mechanismen der Adhäsion von Leukozyten, Thrombozyten sowie der Gerinnungskaskade zu definieren, wurden transgene Mauslinien eingesetzt.

2.1 Etablierung eines arteriellen und venösen Thrombosemodells

Um die Thrombosemechanismen genauer zu untersuchen, wurden aus den zahlreichen verschiedenen Tiermodellen zur Induktion arterieller und venöser Thrombose die zwei am besten geeigneten ausgewählt und zunächst an Wildtyptieren etabliert. Entscheidend sind in diesem Zusammenhang die Reproduzierbarkeit des Modells sowie die Möglichkeit zur Durchführung intravitalmikroskopischer Untersuchungen in der frühen und späten Phase der Thrombogenese.

2.2 Charakterisierung der für die arterielle und venöse Thrombogenese verantwortlichen zellulären Mechanismen

Intravitalmikroskopische, histologische sowie elektronenmikroskopische Untersuchungen dienen der detaillierten Charakterisierung der zellulären Mechanismen im Rahmen der arteriellen und venösen Thrombogenese. Hierdurch kann der Anteil von Thrombozyten und Leukozyten an der jeweiligen Entstehung arterieller und venöser Thromben sowie ihr Zusammenspiel näher untersucht werden. Des Weiteren wird die Fibrinbildung und Mikropartikelrekrutierung in den Thromben intravitalmikroskopisch quantifiziert und deren Größe histologisch bestimmt. Über die Ultrastruktur der arteriellen und venösen Thromben sollen transmissions- und rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen Aufschluss geben.

Eine Gegenüberstellung sämtlicher Untersuchungsergebnisse dient der Durchleuchtung der Pathogenese beider Thromboseformen.

2.3 Analyse der molekularen Determinanten der arteriellen und venösen Thrombose

Ziel ist es, anhand intravitalmikroskopischer, histologischer sowie elektronenmikroskopischer Untersuchungen an verschiedenen Mäusestämmen einen Überblick über die Prozesse der Thrombogenese zu schaffen und die Unterschiede zwischen arterieller und venöser Thrombose herauszuarbeiten. Durch Mäusestämmen mit unterschiedlichen Rezeptordefekten werden die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen beider Thromboseformen erforscht. Die Bedeutung des Thrombozytenrezeptors GP-IIb-IIIa wird in Untersuchungen an GP-IIb-defizienten (GPIIb^{-/-}) Mäusen analysiert. P-Selektin^{-/-}-Mäuse dienen der Darstellung der Rolle des P-Selektin Rezeptors für die Thrombozyten-, Thrombozyten-Leukozyten- sowie Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen. Um den Einfluss des Membranproteins Tissue Factor auf die arterielle und venöse Thrombose einschätzen zu können, werden Tiere mit reduzierter (1%) TF Expression (sog. Low TF) mit Tieren mit physiologischer TF Expression (sog. HCV100) verglichen.

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Versuchstiere

Es wird in dieser Arbeit auf die Maus als Versuchstier zurückgegriffen, da sich diese Versuchstiere zum einen durch schnelle Generationszeiten, problemlose Aufzucht und kostengünstige Haltung auszeichnen. Zum anderen sind Mäuse durch ihre geringe Größe für intravitalmikroskopische Untersuchungen prädestiniert. Entscheidend für die Wahl dieses Versuchstieres ist jedoch die Verfügbarkeit diverser transgener Stämme, anhand derer die molekularen Mechanismen der Thromboseformen erforscht werden können.

Im Verlauf der Versuche wurden folgende Mäusestämme verwendet:

- C57BL/6J
- P-Selektin^{-/-} (generiert durch Beaudet AL.¹⁹)
- Glykoprotein IIb^{-/-} Mäuse (generiert durch Frampton J.⁴⁴)
- mTF defiziente, hTF transgene Mäuse mit 100% Expression des humanen „tissue factor“ Transgens (Wildtyp-Niveau von hTF) (generiert durch Mackman N.¹⁵⁴) (100% hTF)
- mTF defiziente, hTF transgene Mäuse mit 1% Expression des humanen „tissue factor“ Transgens (low TF) (generiert durch Mackman N.¹⁵⁴)

Alle verwendeten Mäusestämme basieren auf einem C57BL/6J-Hintergrund. Daher wird dieser Stamm als erste Kontrollgruppe verwendet. Sämtliche angestrebten Untersuchungen werden den von diesen Tieren ermittelten Daten gegenübergestellt.

Als zweite Kontrollgruppe dienen die so genannten HCV-Mäuse (mTF^{-/-}/HCV⁺) (HCV = human chromosomal vector)²¹¹. Dieser transgene Stamm wird hinzugezogen, um einen sinnvollen Vergleich mit den Low TF-Tieren anstellen zu können.

Um die Rolle des Adhäsionsrezeptors P-Selektin und somit die Bedeutung leukozytärer Zelladhäsion an der Entstehung der beiden Thromboseformen beurteilen und vergleichen zu können, ist der P-Selektin Knock-out-Stamm von herausragender Bedeutung. Der P-Selektin Knock-out-Stamm zeichnet sich durch einen Defekt des zur Familie der Selektine gehörenden Adhäsionsrezeptors P-Selektin (CD62P, GMP-140 Granule Membrane Protein 140) aus, der sowohl in Thrombozyten als auch in Endothelzellen lokalisiert ist¹³⁹. Diese vaskulären Adhäsionsrezeptoren vermitteln heterotypische Zell-Zell-Interaktionen^{18,200}. Dieser in

thrombozytären α -Granula und endothelialen Weibel-Palade-Körperchen gespeicherte Rezeptor wird erst nach Aktivierung der Zellen an deren Oberfläche exprimiert und vermittelt dort die Adhäsion von Leukozyten am beschädigten Endothel bzw. an den bereits adhärenenten Thrombozyten^{139,168}. Des Weiteren induziert er nach Bindung an PSGL-1 auf Leukozyten inflammatorische Reaktionen im Leukozyten und spielt eine zentrale Rolle bei sekundärer Hämostase sowie vaskulären Reparaturvorgängen.

Welche Rolle der thrombozytäre Integrinrezeptor GP-IIb-IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$ bzw. Fibrinogenrezeptor) spielt, wird anhand der GPIIb^{-/-}-Maus⁴⁴ untersucht. Da dieses Integrin im adulten Organismus ausschließlich von Thrombozyten exprimiert wird¹⁵⁷⁻¹⁵⁹, können somit Aussagen über die Rolle der Thrombozytenadhäsion und vor allem deren Aggregation getroffen werden. Da die Bindung von löslichem Fibrinogen und in deren Folge die Bildung von Fibrinogenbrücken zwischen den Blutplättchen als Voraussetzung für die Aggregation gilt, stellt der GP-IIb-IIIa-Rezeptor eine zentrale Aufgabe der Thromboseentstehung dar¹⁷⁵.

Um die Bedeutung des Membranproteins Tissue Faktor für arterielle und venöse Thrombose zu durchleuchten und zu erforschen, welchen Beitrag seine membranständige und seine lösliche Form zur Blutgerinnung im Rahmen von arteriellen und venösen Thrombosen leisten, werden die transgenen Stämme mit Tissue Faktor-Defekten herangezogen. Hierbei handelt es sich um den Low TF- (mTF^{-/-}/hTF⁺) (1% hTF Expression) und dessen HCV-Kontrollstamm (mTF^{-/-}/HCV⁺)¹⁵⁴. Der HCV-Kontrollstamm verfügt ebenso über einen Defekt des murinen Tissue-Factor-Gens, zeichnet sich aber durch das Vorhandensein von 100% humanem Tissue Faktor aus. Hier liegen also zwei Stämme vor, die eine Beurteilung der Bedeutung des Tissue Faktors für die Vorgänge der Blutgerinnung *in vivo* ermöglichen.

3.1.1 Durchführung der Mäusezucht und genetischer Hintergrund der Linien

Generell wird bei allen verwendeten Stämmen die Zucht mittels polygamer Verpaarung (Harem-System), wobei drei bis fünf Weibchen zusammen mit einem Männchen gehalten werden, durchgeführt. In manchen Fällen wählt man ein monogames Verpaarungssystem (ein Männchen und ein Weibchen). Trächtige Weibchen werden einige Tage vor der Geburt von der Gruppe getrennt, um ihnen eine stressfreie Geburt zu ermöglichen^{49,176,206}. Nach vierwöchiger Aufzuchtphase, in der Nestbau- und Brutpflegeverhalten ausgeübt wird, werden die Weibchen nach dem Absetzen der Jungtiere erneut dem polygamen System zur Verpaarung zugeführt.

3.1.1.1 Kontrollstämme

Hierbei handelt es sich um C57BL/6J, einen weit verbreiteten Inzuchtstamm (Anpaarung von Schwester x Bruder), der gemeinhin als Universalstamm verwendet wird. Generiert wurde dieser Inzuchtstamm von Dr. CC Little⁹⁹. Er dient als Hintergrundstamm für die Erzeugung kongener Tiere, die sowohl spontane als auch induzierte Mutationen tragen. Üblicherweise verwendet man diesen Stamm auch für die Generierung transgener Mäuse. C57BL/6J Mäuse werden auf vielen Forschungsgebieten eingesetzt, wie zum Beispiel der kardiovaskulären Biologie, der Reproduktions- und Neurobiologie, der Diabetes- und genetischen Forschung¹⁰⁰.

Kommerziell erworbene Geschwisterinzuchtpaare (Jackson Laboratory, Bar Harbour, Maine, USA) bilden den genetischen Ursprung der eigenen C57BL/6J-Zucht. Charakteristisch für diesen langlebigen Wildtypstamm ist der problemlose, rasche Aufzuchtserfolg, welcher mittels polygamer Verpaarung (Harem-System), erzielt wird.

3.1.1.2 Gendefiziente und transgene Mauslinien

3.1.1.2.1 P-Selektin^{-/-}

Die Verpaarung und Aufzucht der P-Selektin^{-/-}-Mäuse wird vom Tierstall Klinikum Großhadern der LMU München unter spezifiziert pathogenfreien Haltungsbedingungen durchgeführt.

Im Alter von 6 – 8 Wochen werden die Tiere nach erfolgter Genotypisierung direkt den Versuchen zugeführt. Die Tiere zeichnen sich trotz Gendefekt durch normale Fertilität aus.

3.1.1.2.2 Glykoprotein IIb^{-/-}

Diese transgene Mäuselinie stammt ursprünglich von der Arbeitsgruppe von Prof. J. Frampton (University of Oxford, Department of Pharmacology, United Kingdom)⁴⁴. Sie weisen einen Gendefekt auf dem GPIIb-Lokus auf, wodurch die Expression des thrombozytenspezifischen GP-IIb-IIIa-Rezeptors unterdrückt wird. Obwohl die Tiere wegen dysfunktionaler Blutplättchen Blutungstendenzen und somit gelegentlich Anämien aufweisen, sind homozygote GPIIb^{-/-}-Mäuse dennoch lebensfähig und fertil. Diese Mäuse stellen ein einzigartiges Hilfsmittel dar, um die Konsequenzen des Verlustes von GPIIb zu erforschen. Zur Zucht werden homozygote Männchen (GPIIb^{-/-}) werden mit heterozygoten Weibchen (GPIIb^{+/-}) verpaart, um perinatale Blutungen bei den Muttertieren zu vermeiden.

3.1.1.2.3 mTF defiziente, hTF transgene Mäuse (mTF^{-/-}/HCV100) mit 100% Expression des humanen „tissue factor“ Transgens (HCV100)

Hierbei handelt es sich um einen transgenen Stamm mit humanem chromosomalen Vektor²¹¹, von Prof. N. Mackman (Departments of Immunology and Vascular Biology, The Scripps Research Institute, La Jolla, California 92037, USA) und dessen Arbeitsgruppe generiert und zur Verfügung gestellt¹⁵⁴. Diese Tiere weisen eine normale Expression von humanem Tissue Faktor (100% humaner TF, Wildtyp-Niveau) in einem murinen Tissue Faktor Knock-out Hintergrund auf (mTF^{-/-}/HCV⁺)¹¹⁴. Sie dienen als zusätzlicher Kontrollstamm für die Low TF Mäuse (mTF^{-/-}/hTF⁺).

Drei Zuchtpaare von Prof. N. Mackman (Departments of Immunology and Vascular Biology, The Scripps Research Institute, La Jolla, California 92037, USA) dienen als Grundstock der eigenen Zucht. Man verpaart heterozygote mTF^{+/-}/HCV⁺-Weibchen mit homozygoten mTF^{-/-}/HCV⁺-Männchen um ein optimales Zuchtergebnis zu erhalten. Bei dieser Genotyp-Kombination ist die Zucht problemlos und ohne jegliche Komplikationen durchführbar.

3.1.1.2.4 mTF defiziente, hTF transgene Mäuse (mTF^{-/-}/hTF⁺) mit 1% Expression des humanen „tissue factor“ Transgens (low TF)

Um die Bedeutung des integralen Membranglykoproteins Tissue Faktor für die venöse und arterielle Thrombose zu erforschen, wurden Low TF Mäuse der Arbeitsgruppe von Prof. N. Mackman (Departments of Immunology and Vascular Biology, The Scripps Research Institute, La Jolla, California 92037, USA) herangezogen¹⁵⁴. Tissue Faktor ist der primäre Initiator der Blutgerinnungskaskade^{6,18,41}. Da Tissue Faktor während der frühen Phase der humanen und murinen Embryogenese exprimiert wird, führt die gezielte Inaktivierung des murinen Tissue Faktor Gens zu embryonaler Sterblichkeit^{18,21,112,202}. Durch die Konstruktion eines humanen Tissue Faktor (hTF) Minigens, das den humanen TF Promoter und cDNA enthält, wird den Tissue Faktor Null Embryonen ein Überleben ermöglicht¹⁵⁴. Low TF Mäuse exprimieren ein niedriges humanes TF Niveau (ca. 1% der murinen TF Expression), wodurch ihre Hämostase aufrechterhalten und ihr Überleben gesichert wird¹⁵⁴. Als Kontrolle dienen Tiere, deren hTF Minigen eine normale TF-Aktivität gewährleistet. Die Abkürzung HCV steht für human chromosomal vector (Minigen hTF⁺)²¹¹. Ausgangspunkt dieser Mäusezucht sind drei Zuchtpaare der Arbeitsgruppe von Prof. N. Mackman (Departments of Immunology and Vascular Biology, The Scripps Research Institute, La Jolla, California 92037, USA). Homozygote Zuchtböcke (mTF^{-/-}/hTF⁺) werden hierbei mit heterozygoten Weibchen (mTF^{+/-}/hTF⁺) verpaart.

3.1.2 **Haltungsbedingungen der Tiere im Experiment**

Bei der Tierhaltung sowohl im Klinikum rechts der Isar (Zentrum für präklinische Forschung), als auch im Klinikum Großhadern handelt es sich um eine so genannte spezifiziert pathogenfreie Haltungen.

Getrennt nach Stämmen werden die Tiere in durchsichtigen, leicht reinig- und sterilisierbaren Makrolonkäfigen vom Typ II (360cm²) (Ehret GmbH, Emmendingen) in zweier bis sechser Gruppen gehalten. Jedem Tier werden somit mindestens 2-3cm² pro 1g Körpermasse zur Verfügung gestellt^{169,176}. Als Einstreu wird entkeimtes, entstaubtes Weichholzgranulat (Tiereinstreu „Faser“, Fa. Altromin, Lage) verwendet, welches sich durch besondere Saugfähigkeit und weiche Beschaffenheit auszeichnet. Um Feuchtigkeit und Geruchsbelästigung vorzubeugen wird dieses zweimal wöchentlich gewechselt. Durch das Angebot von sterilisiertem Zellstoff und Kriechröhren aus Pappe wird der Spiel- und Nestbautrieb der Tiere gestillt und somit das Wohlbefinden der Tiere gesteigert. Entsprechend der Empfehlung der Gesellschaft für Versuchstierkunde (1988)^{74,176} wird das „Mikroklima“ in den Käfigen durch ein komplexes Belüftungssystem bei einer Temperatur von 20 bis 24°C und einer Luftfeuchtigkeit von 60 bis 70% konstant gehalten. Mittels Beleuchtungsanlage wird für die nachtaktiven, stressanfälligen Tiere ein geregelter zwölfstündiger Hell-Dunkel-Rhythmus sichergestellt, wobei in der Hell-Phase 50 – 100 Lux im Käfig erreicht werden. Allen Tieren stehen sterilisiertes Leitungswasser und pelletiertes, artgerechtes Futter (Nr.1324 Ratte/Maus-Haltungsdiät 10mm vierkant, Fa. Altromin, Lage) ad libitum zur Verfügung.

Das vorliegende Versuchsvorhaben ist von der Regierung von Oberbayern gemäß §8 des Deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG. in der Fassung vom 25.05.1998) genehmigt.

3.2 **Wahl und Durchführung der Narkose**

Für die Gewebeentnahme im Rahmen der Genotypisierung der Tiere wird eine Inhalationsanästhesie mit Isofluran (Isofluran Delta Select, Delta Select GmbH, Deieich) (Verdampfer: Ohmeda Isotec 3, Fa. Eickmeyer, Tuttlingen eingerichtet von Völker Vet, Völker GmbH, Kaltenkirchen) und Sauerstoff durchgeführt. Das schnelle An- und Abfluten dieses Narkosegases ermöglicht eine komplikationslose Durchführung des nur wenige Minuten dauernden Eingriffes. Da die Gewebeentnahme nur mit leichten Schmerzen verbunden ist, kann trotz der schwachen analgetischen Wirkung des Gases auf ein zusätzliches Analgetikum verzichtet werden.

Im Rahmen der Blutentnahme durch Herzpunktion (Finalversuch) wird ebenfalls eine Inhalationsanästhesie mit Isofluran angewendet.

Zur Durchführung der fluoreszenz-intravitalmikroskopischen Untersuchungen wird die Narkose zunächst durch Inhalation eines Isofluran-Sauerstoff-Gemisches eingeleitet und das chirurgische Toleranzstadium (Stadium III₂) mittels Injektionsnarkose herbeigeführt.

Da keines der heute bekannten Injektionsanästhetika die vier Kriterien, eingeschränkte Empfindung und psychische Dämpfung (Sedation), Bewusstlosigkeit (Hypnose), Schmerzfreiheit (Analgesie) und Muskelerschlaffung (Relaxation) vereint, wird auf eine Kombination dreier unterschiedlich wirkender Injektionsanästhetika zurückgegriffen^{48,79,80}. Die Einzeldosierung jedes Anästhetikums kann so deutlich reduziert werden, wodurch sich eine Minimierung der jeweiligen unerwünschten Nebenwirkungen abzeichnet, ohne einen Wirkverlust herbeizuführen. Als stark wirkender Opiatagonist erfüllt Fentanyl das Kriterium der potenten Analgesie und ergänzt die Wirkung des sedativ-hypnotischen Analgetikums Medetomidin (spezifischer α_2 -Adrenorezeptoragonist), welches wegen seiner Nebenwirkungen (ausgeprägte Bradykardie und Begünstigung von Herzarrhythmien) in möglichst geringer Dosierung eingesetzt werden soll. Die relaxierende und krampfhemmende Komponente wird durch das zur Gruppe der Benzodiazepine gehörende Midazolam gestellt.

Durch die intraperitoneale Applikation der Mischung aus 5,0 mg/kg Midazolam (Midazolam-ratiopharm[®], CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe), 0,5mg/kg Medetomidin (Dormitor[®], Pfizer GmbH, Karlsruhe) und 0,05mg/kg Fentanyl (Fentanyl-Curamed[®], CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe) wird eine risikoarme Narkose durch Injektion eingeleitet.

Um die Narkosesicherheit zusätzlich zu erhöhen, wird dem Tier über eine Nasenmaske Sauerstoff zugeführt und so die Oxygenierung sichergestellt. Bei Bedarf kann hierüber auch Isofluran zugemischt werden. In regelmäßigen Abständen wird Puls- und Atemfrequenz, Atemtyp und durch Fehlen des Flexorreflexes die Narkosetiefe überprüft.

Dem enormen Hypothermierisiko der narkotisierten Tiere wird mit einer Wärmematte (ThermoLux-Wärmematte, Fa. Dehner) begegnet.

Die unterschiedlichen Versuchsgruppen erfordern einen spezifischen Versuchsaufbau, entsprechende Narkosezeiten und -management.

Die Eingriffe zur Induktion einer arteriellen Thrombose umfassen einen Zeitraum von ca. 1,5 bis 2 Stunden und enden nach einmaliger Applikation der Tripelnarkose mit der Tötung des Tieres durch Blutentzug.

Der Versuchsaufbau zur Induktion der venösen Thrombose basiert auf einer 6 bis 7 Stunden andauernden Anästhesie. Hierfür ist eine Verlängerung der Narkose durch wiederholte Injektion des Kombinationspräparates erforderlich. Die Nachdosierung wird gemäß der Narkosetiefe (Flexorreflex) durchgeführt und verhält sich individuell unterschiedlich.

Zur Durchführung der chronischen Versuche zur venösen Thrombose, bei denen die Tiere nach Induktion einer Stromverlangsamung erst nach 48 Stunden untersucht werden, bedient man sich der vollständigen Antagonisierbarkeit der Kombinationsnarkose. Nach Durchführung des operativen Eingriffes wird die Wirkung der Injektionsanästhetika mittels subkutaner Applikation von 1,2 mg/kg Naloxon (Narcanti[®]-Vet, CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe), 0,5mg/kg Flumazenil (Anexate[®], Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) und 2,5mg/kg Atipamezol (Antisedan[®], Pfizer GmbH, Karlsruhe) vollständig antagonisiert. Naloxonhydrochlorid, ein Wirkstoff mit ausschließlich antagonistischen Wirkungen auf die Opioidrezeptoren, überwindet die Blut-Hirnschranke sehr schnell und führt zu raschem Wirkungseintritt⁴⁸. Der hochspezifische Benzodiazepin Antagonist Flumazenil wirkt über kompetitive Verdrängung der Benzodiazepine von ihren Rezeptoren im ZNS, wohingegen Atipamezol als hoch potenter, selektiver und spezifischer α_2 -Adrenorezeptorantagonist an zentralen und peripheren α_2 -Rezeptoren ansetzt. Die α_2 -rezeptorvermittelten Begleiterscheinungen Hypotonie, Bradykardie und AV-Block werden somit beseitigt. Durch seinen atemstimulierenden Effekt steigt die arterielle Sauerstoffsättigung und die unter Medetomidin entstehende Hypothermie wird hierdurch aufgehoben^{48,79,80}. 48 Stunden nach diesem Eingriff werden die Tiere erneut mittels Inhalations- und Injektionsnarkose in das chirurgische Toleranzstadium versetzt und nach intravitaler Videofluoreszenzmikroskopie endet auch dieser Versuch mit Tötung der Tiere durch Blutentzug.

Injektionsanästhetika	Medetomidin	Midazolam	Fentanyl
Dosierung	0,5 mg/kg i.p.	5 mg/kg i.p.	0,05 mg/kg i.p.
Antagonisten	Atipamezol	Flumazenil	Naloxon
Dosierung	2,5 mg/kg s.c.	0,5 mg/kg s.c.	1,2 mg/kg s.c.

Tabelle 4: Dosierungen der vollständig antagonisierbaren Anästhesie (VAA) bei der Maus (Anästhesievorschlag modifiziert nach Henke Julia, Erhardt Wolf, TU München 2003).

3.3 Technische Ausrüstung für das vorliegende Versuchsvorhaben

3.3.1 Prinzip der intravitalem Videofluoreszenzmikroskopie

Die Technik der intravitalem Videofluoreszenzmikroskopie ermöglicht eine Echtzeit-Darstellung zellulärer Vorgänge *in vivo*. Verschiedene Zellen und zelluläre Strukturen werden hierfür mit nicht-toxischen, gut verträglichen Fluoreszenzfarbstoffen *in* oder *ex vivo* beladen. Durch ein Fluoreszenz-Auflicht-Mikroskop (Axiotech^{vario} 100 HD, Fa. Zeiss, Göttingen) in Verbindung mit einer Quecksilber-Kurzbogen-Höchstdrucklampe (Hg-Höchstdrucklampe, HBO 100W, Fa. Zeiss, Göttingen) als Lichtquelle, welche kurzwelliges Anregungslicht emittiert, werden fluoreszenzmarkierte Zellen *in vivo* sichtbar gemacht.

Bei bestimmten Versuchsanordnungen (Imaging der Fibrinbildung, simultane Visualisierung von Thrombozyten und Leukozyten) wird ein Olympus BX51WI Mikroskop verwendet.

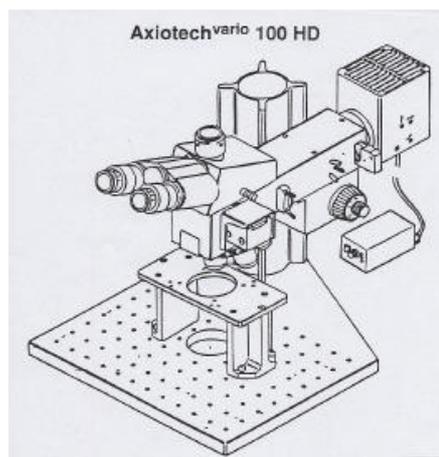


Abbildung 8: Mikroskop für die Intravitalmikroskopie: Axiotech^{vario} 100 HD (Zeiss, Göttingen)²³².

Unter Fluoreszenz versteht man den Übergang eines elektronisch angeregten Systems in einen Zustand niedrigerer Energie durch spontane Emission von Licht²²⁹.

Die optische Darstellung der Zellen wird durch Fluorophore ermöglicht, welche das Anregungslicht absorbieren und dies kurz darauf wieder in einer 20 bis 50 nm größeren Wellenlänge abstrahlen.

Bei der Absorption von Licht einer bestimmten Wellenlänge (= Anregungslicht) ist bei verschiedenen Molekülen eine gleichzeitige Emission von Licht mit größerer Wellenlänge beobachtbar. Dieses Verhalten (Absorption von kurzwelligem Licht, Emission von längerwelligem Licht) wird als Fluoreszenz bezeichnet.

Bestimmte Elektronen der fluoreszierenden Moleküle absorbieren hierbei die Photonen des kurzwelligen, also energiereicheren Lichtes.

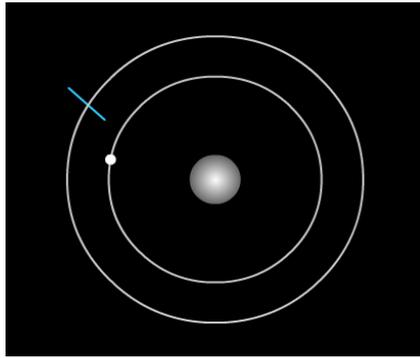


Abbildung 9: Licht kurzer Wellenlänge (Anregungslicht) kurz vor Auftreffen auf ein Elektron.

Hierdurch gelangt das Elektron auf ein höheres Energieniveau.

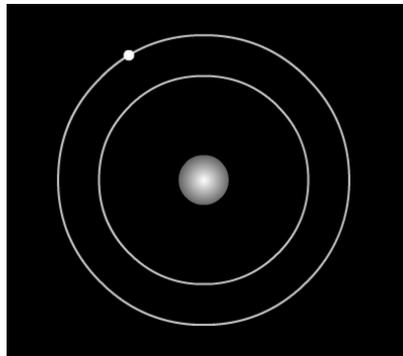


Abbildung 10: Angeregtes Elektron auf höherem Energieniveau.

Allerdings kann sich das Elektron nicht auf diesem Niveau halten und fällt deshalb praktisch augenblicklich wieder auf sein ursprüngliches Energieniveau zurück.

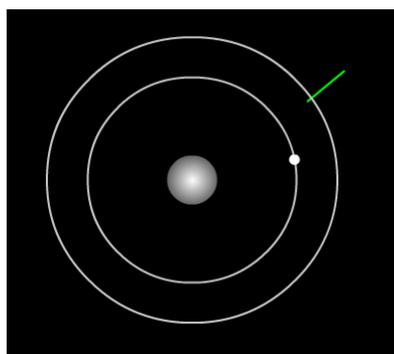


Abbildung 11: Emittiertes Licht.

Dabei setzt es die überschüssige Energie, welche kurz zuvor aufgenommen wurde, wieder frei. Diese Emission erzeugt das Fluoreszenzlicht. Allerdings wird die Energie nicht vollständig als Licht freigesetzt. Aus diesem Grunde ist das emittierte Licht etwas energieärmer als das Anregungslicht. Allerdings bedingt eine energieärmere Lichtstrahlung auch eine größere Wellenlänge und führt deshalb auch eine andere Lichtfarbe als

energiereichere Lichtstrahlung²²⁹. Für die Fluoreszenz ergibt sich hieraus die bereits eingangs erwähnte Eigenschaft (Absorption von kurzwelligem Licht, Emission von längerwelligem Licht), welche auch als Stokes-Regel bezeichnet wird (benannt nach Sir George G. Stokes)²²⁹.

Hierdurch ist es möglich, im Strahlengang des Mikroskops eine Auftrennung von Anregungslicht λ_1 (kurzwellig) und Emissionslicht λ_2 (langwelliger) durchzuführen. Das emittierte Fluoreszenzlicht besitzt oft eine um etwa 20-50 nm größere Wellenlänge als das Anregungslicht.

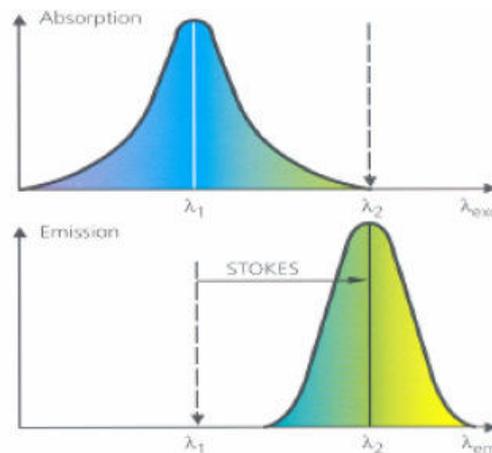


Abbildung 12: Schema der Wirkungsweise von Fluorophoren.

Die unten stehende Abbildung (Abb. 13) verdeutlicht die typische Strahlenführung in einem Epifluoreszenzmikroskop. Spezielle in den Beobachtungsstrahlengang eingesetzte Filter dienen der Trennung des schwachen Fluoreszenzlichtes vom viel stärkeren Beleuchtungslicht²²⁹ und gewährleisten somit ein definiertes Farb- bzw. Frequenzspektrum. Die starke Lichtquelle (100-W HBO Mercury lamp)¹²⁵ emittiert kurzwelliges Licht, welches durch einen Kollektor zum Anregungsfilter (Exzitationsfilter, SP = „Short pass“) geführt wird. Dieser „Short pass“-Filter hat, wie sein Name besagt, die Eigenschaft nur für kurzwelliges Exzitationslicht permeabel zu sein. Der Farbteiler unterscheidet zwischen kurzwelligem und langwelligem Licht. Das kurzwellige, das der Farbteiler reflektiert, wird über das Objektiv auf die zu untersuchenden Zellen geleitet. Das hierbei infolge der Stokes-Verschiebung entstehende langwelligere Emissionslicht lässt er ungehindert in Richtung Emissionsfilter passieren. Als Emissions- oder „Long pass“ (LP)-Filter bezeichnet man den zuletzt vor der Kamera eingeschalteten Filter. Da er nur langwelliges, d.h. nur das vom Objekt emittierte Licht passieren lässt, fungiert er als eine Art Sperrfilter, welcher die Strahlungsintensität um evtl. noch vorhandenes, störendes Restanregungslicht bereinigt. Zu beachten ist, dass das Strahlenspektrum der Lichtquelle und verwendete Fluoreszenzfarbstoffe eine Kompatibilität erfordern. Aus diesem Grund wurden in die jeweiligen Mikroskope Filterblöcke eingesetzt, die mit den verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen kompatibel sind.

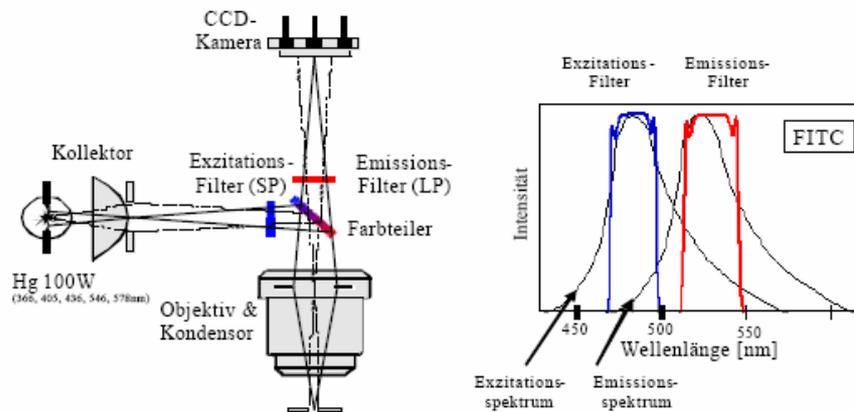


Abbildung 13: Darstellung des Strahlenganges eines Epifluoreszenzmikroskops. Links im Bild: Der Strahl aus der Lichtquelle wird durch einen Exzitationsfilter und einen Farbbeiler auf das Objekt gelenkt. Vom Objekt emittierte Strahlen gelangen durch den Emissionsfilter in die CCD-Kamera (Charged Coupled Device-Kamera). Rechts im Bild: Aufschlüsselung von Exzitations- und Emissionsspektrum zur Festlegung der Filterwahl am Beispiel des Fluoreszenzfarbstoffes FITC (Fluoresceinisothiocyanat). Modifiziert nach ^{71,232}.

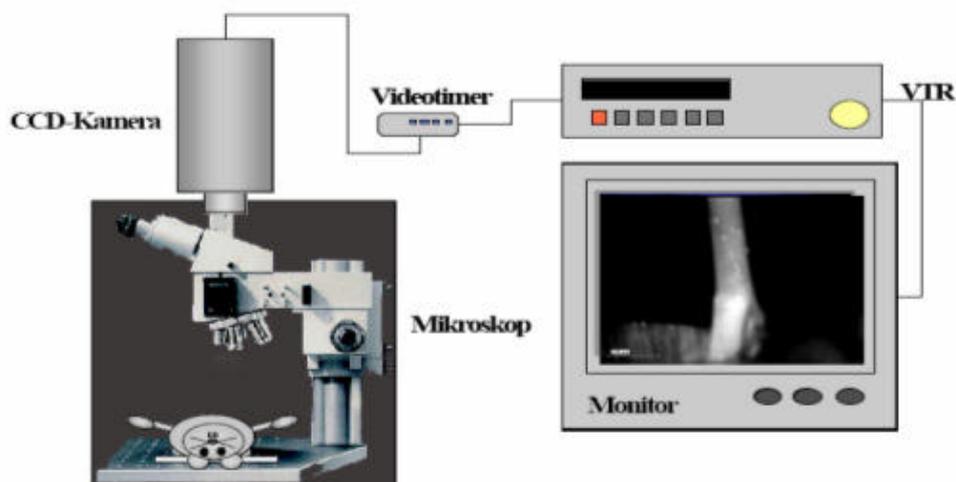


Abbildung 14: Schematische Darstellung der intravitalmikroskopischen Arbeitseinheit. Links: Präparierte Maus unter dem Fluoreszenzmikroskop. Emittierte fluoreszierende Strahlen (siehe Abb. 14) werden von der CCD-Kamera aufgenommen und über einen Videotimer an den Videorekorder weitergeben. Rechts: Auswerteeinheit, bestehend aus Videorekorder und Monitor⁷¹.

3.3.2 Fluoreszenzfarbstoffe

Zur Darstellung verschiedener Zelltypen *in vivo* stehen zahlreiche Fluoreszenzfarbstoffe zur Verfügung. Je nach Filterausstattung und Fragestellung der Versuche wird auf unterschiedliche Fluorophore zurückgegriffen. Außerdem differenziert man zwischen *in* und *ex vivo* Färbung der Zellen. Um ein Ausbleichen der gefärbten Moleküle zu verhindern, ist man bemüht die Belichtungszeiten möglichst kurz zu halten.

Farbstoff	Firma	Summenformel	Wirkungsmechanismus	Spektren
DCF, 5- (und 6)carboxy-2',7'-dichlorofluoreszeindiacetat (carboxy-DCFDA)	Molecular Probes, Eugene, USA ¹⁴²	$C_{24}H_{14}Cl_2O_9$	<i>Ex vivo</i> Färbung	Anr.: 514nm Em.: 532nm
Rhodamin 6G	Molecular Probes, Eugene, USA ¹⁴²	$C_{28}H_{31}N_2O_3Cl$	<i>In vivo</i> Färbung Nukleinsäure-Farbstoff	Anr.: 528nm Em.: 590nm
RhodaminB Isothiocyanat (RBITZ)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland ¹⁸⁹	$C_{29}H_{30}ClN_3O_3S$	<i>Ex vivo</i> Färbung Nukleinsäure-Farbstoff	Anr.: 514nm Em.: 576nm
Alexa 488, Succinimidylester	Molecular Probes, Eugene, USA ¹⁴²	$C_{25}H_{15}Li_2N_3O_{13}S_2$	<i>Ex vivo</i> Färbung Konjugation an Proteine (Fibrin-Antikörper)	Anr.: 495nm Em.: 519nm
Hoechst 33342, Trihydrochlorid, Trihydrat, (H3570)	Molecular Probes, Eugene, USA ¹⁴²		<i>Ex vivo</i> Färbung Nukleinsäure-Farbstoff (zellpermeabler	Anr.: 350nm Em.: 461nm

			Vitalfarbstoff; emittiert blaues Licht bei Bindung an dsDNA)	
Acridin-Orange 3',6-Bis- (dimethylamino)- acridin- hydrochlorid	Sigma – Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland ¹⁸⁹	C ₁₇ H ₂₀ ClN ₃ - HCl-1/2ZnCl ₂	<i>In vivo</i> Färbung DNA-Farbstoff	Ex.: 500nm Em.: 525nm

Tabelle 5: Aufstellung der eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe.

3.3.2.1 DCF - 5- (und 6)Carboxy-2',7'-Dichlorofluoreszein-Diacetat

Der Wirkungsmechanismus des Xanthen-Derivats CFDA (5- (und 6)carboxy-2',7'-dichlorofluorescein Diazetat; s. Abb.8) (Fa. Molecular Probes, Eugene, OR, USA) lässt sich wie folgt erklären: Die lipophile und somit zellpermeable Ausgangsform 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat (DCFH-DA) überwindet die Zellmembran und wird anschließend durch intrazelluläre Esterasen deacetyliert¹. In den Zellen entstehende Sauerstoffradikale oxidieren das deacetylierte 2',7'-Dichlorodihydrofluoreszein (DCFH) zu dem stark fluoreszierenden Farbstoff 2',7'-Dichlorofluoreszein (DCF)^{1,10}. Somit muss der eingesetzte Farbstoff erst intrazellulär durch chemische Reaktionen in das eigentliche Fluorophor umgewandelt werden.

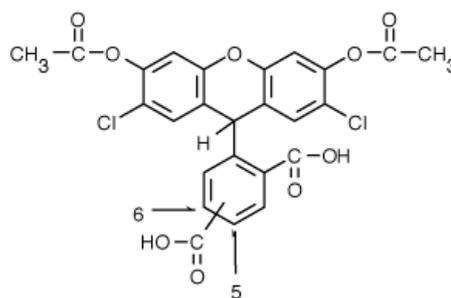


Abbildung 15: Struktur von DCF.

Zur selektiven Markierung von Thrombozyten im Gefäßsystem bedient man sich der *ex vivo* Färbung mit DCF. Das Anregungsspektrum für diesen Farbstoff liegt bei einer Wellenlänge von 514nm, die Wellenlänge der Emission dagegen bei 532nm. Um spezifisch Mikropartikel anzufärben, werden diese zunächst aus dem Gesamtblut isoliert und ebenfalls *ex vivo* mit DCF beladen.

3.3.2.2 Rhodamin 6G

Hierbei handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, der nach intravenöser Applikation eine *in vivo* Färbung von Leukozyten ermöglicht. Rhodamin 6G (Fa. Molecular Probes, Eugene, OR, USA) ist in der Lage im Gefäßsystem in den Zellkernen und Mitochondrien von lebenden Zellen selektiv zu akkumulieren^{5,8,124,177,209}. 0,1 ml Rhodamin 6G (Fa. Molecular Probes, Eugene, OR, USA) werden in einer Konzentration von 0,02% verabreicht.

Zur Anregung dieses Fluorophors ist eine Wellenlänge von 528nm erforderlich, wohingegen die Emissionswellenlänge bei 590nm liegt.

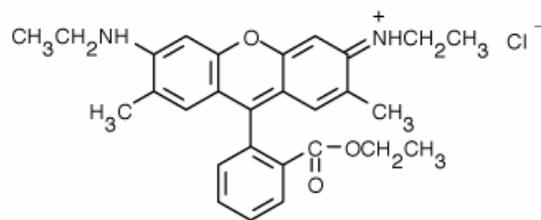


Abbildung 16: Struktur von Rhodamin 6G.

3.3.2.3 Rhodamin B

Dieser Nukleinsäurefarbstoff aus der Klasse der Rhodamine (orange-, rot-, pinkfarben) wird in einer Konzentration von 20 µg/ml zur Färbung isolierter Leukozyten *ex vivo* eingesetzt. Rhodamin B Isothiocyanat (RBITZ, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Germany) reichert sich wie das oben beschriebene Rhodamin 6G in den Zellkernen und Mitochondrien von lebenden Zellen selektiv an und wird bei 514nm angeregt, wohingegen das langwelligere Emissionslicht bei 576nm liegt.

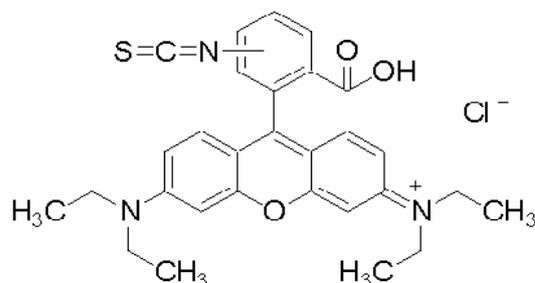


Abbildung 17: Rhodamin B.

3.3.2.4 Alexa 488

Der Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor® Succinimidyl-Ester (Fa. Molecular Probes, Eugene, OR, USA) zeichnet sich gegenüber vergleichbaren Fluorophoren durch hellere Fluoreszenz und höhere Photostabilität aus¹⁴². Diese Succinimidyl-Ester können selektiv an primäre Amine in Peptiden und Proteinen gekoppelt werden. In dieser Arbeit wird Alexa 488 an den Fibrin-Antikörper (mouse anti-fibrin IIB chain Bβ 15-42, Clone T2G1, WAK-Chemie) konjugiert und intravenös appliziert. Der Alexa gelabelte Fibrinantikörper bindet an im Gefäßsystem entstehendes Fibrin und ermöglicht somit eine Illustration der Fibrinbildung anhand intravitalmikroskopischer Untersuchungen.

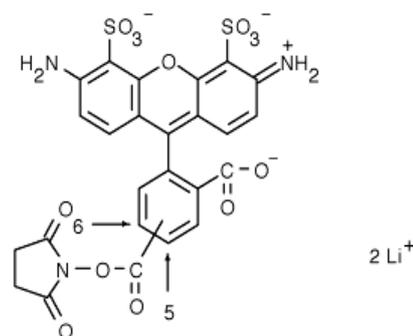


Abbildung 18: Alexa 488.

3.3.2.5 Hoechst Vitalfarbstoff

Zur Doppelfärbung isolierter Leukozyten *ex vivo* wird neben Rhodamin B zusätzlich der Farbstoff Hoechst 33342 Trihydrochlorid-Trihydrat 1:2000 in einer Konzentration von 5 µg/ml (Fa. Molecular Probes, Eugene, OR, USA) herangezogen. Dieser zellpermeable Vitalfarbstoff emittiert nach Bindung an die dsDNA blaues Fluoreszenzlicht und dient der Darstellung der leukozytären Zellkerne *in vivo*¹⁴². Dieser Fluorophor wird mit einer Wellenlänge von 350nm angeregt und emittiert daraufhin Licht mit 461nm Wellenlänge (blau).

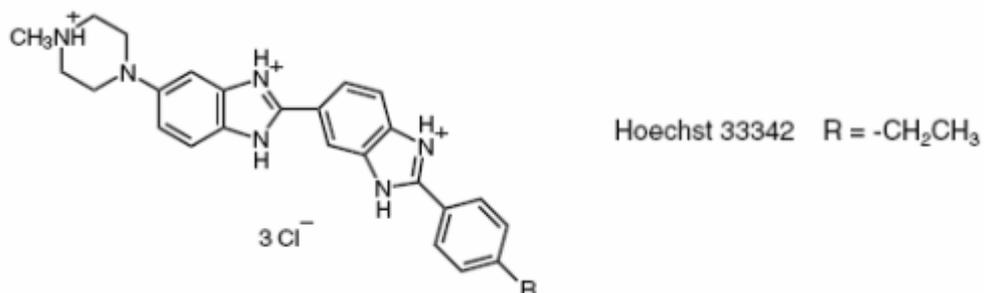


Abbildung 19: Hoechst 33342 Vitalfarbstoff.

3.3.2.6 Acridin Orange

Dieser orangegelbe, schwach acidophile DNA-Farbstoff ist in der Lage, leicht durch Zellmembranen zu diffundieren. Acridin Orange (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland)¹⁸⁹ akkumuliert in sauren Zellkompartimenten, wie zum Beispiel Lysosomen, Endosomen und dem Golgi-Apparat⁸⁸. Des Weiteren reichert es sich in Zellkernen an und schaltet sich in die DNA und RNA ein. Dementsprechend dient es ebenfalls der in vivo Färbung von Leukozyten.

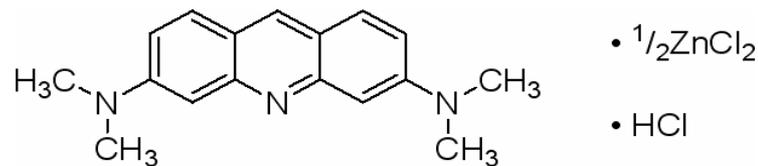


Abbildung 20: Acridin Orange.

3.4 Präparations- und Färbeverfahren

3.4.1 Verwendete Puffer

Tyrode`s Puffer

Dieser zur Thrombozyten- und Mikropartikelisolation eingesetzte Puffer wird für jeden Versuch frisch angesetzt. Die beiden Trockensubstanzen bovines Serumalbumin (0,1%, SIGMA, Taufkirchen) und D(+)-Glucose (0,1%, SIGMA, Taufkirchen) werden mittels geeichter Waage abgewogen und zu den Flüssigsubstanzen gegeben (10mM HEPES, 1,4 M NaCl, 26 mM KCl, 121 mM NaHCO₃, 0,1% BSA, 1% Glucose)¹²⁸. Nach Durchmischung der Substanzen eicht man die Flüssigkeit auf einen pH von 7,4 gießt ca. 200 ml davon ab und säuert den Rest mit 2M HCL auf einen pH von 6,5 an. Zur pH-Messung wird eine Elektrode eingesetzt, welche zwischen den einzelnen Arbeitsschritten immer wieder abgespült wird.

3.4.2 Blutentnahme

Die Blutentnahme des Spendertieres (identischer Mäusestamm und Genotyp wie Empfängertier) erfolgt, wie oben beschrieben, in narkotisiertem Zustand unter Inhalationsnarkose (s. 3.2) in Rückenlage⁷³. Da für die Präparation ca. 1,5 bis 2 ml Vollblut erforderlich sind, bedient man sich der Technik der Herzpunktion, welche eine hohe Ausbeute gewährleistet. Entsprechend der Empfehlung von SVENDSEN (1994)⁷³ handelt es sich hierbei immer um terminale Experimente, bei denen die Tiere in der Narkose durch Blutentzug versterben. Im Bereich des Herzspitzenstoßes bzw. der letzten Rippe wird der

Ventrikel punktiert und das gewonnene Blut mit 100 µl/ml Citrat (aus S-Monovetten, Sarstedt AG&Co., Nümbrecht) ungerinnbar gemacht. Dieses Blut dient der Thrombozyten- bzw. Mikropartikelisolation.

Für Blut, das zur Leukozytenisolierung und -färbung herangezogen wird, verwendet man das Antikoagulans Heparin (PicoTM 50, 2ml Spritzen, Radiometer Medical, Kopenhagen). Besonderer Wert wird auf schonendes Vorgehen gelegt, um einer möglichen Aktivierung der Blutplättchen entgegenzuwirken (s.u.)¹²⁴.

3.4.3 Färbeprotokolle

3.4.3.1 Thrombozytenpräparation und Bestimmung der Thrombozytenzahl

Bei allen Präparationsschritten muss das gewonnene Blut besonders sorgfältig und schonend verarbeitet werden, da die Gefahr besteht, die Thrombozyten zu aktivieren und somit die Versuchsergebnisse zu verfälschen. Sämtliche Flüssigkeiten lässt man langsam an den Oberflächen der verwendeten Gefäße vorsichtig abfließen. Des Weiteren ist man bemüht die Thrombozyten bei physiologischer Temperatur zu verarbeiten, was durch warme frisch angesetzte Substanzen und beheizte Zentrifugen (24°C) gelingt. Frühere Untersuchungen konnten zeigen, dass das hier verwendete Protokoll der Thrombozytenseparation keine relevante Thrombozytenaktivierung nach sich zieht^{63,124}.

Das aus dem Spendertier gewonnene Blut (ca. 1,5 bis 2 ml/Tier) wird mit Tyrode`s-Puffer pH 6,5 auf ein Volumen von 2 ml aufgefüllt. Im Anschluss zentrifugiert man dieses Gemisch bei 92g ohne Bremse für 20 Minuten (Haereus, Megafuge, Hanau).

Es entsteht ein Überstand, das so genannte plättchenreiche Plasma (PRP), welcher vorsichtig abgenommen und mit Tyrode`s-Puffer pH 6,5 auf ein Volumen von 4 ml aufgefüllt wird. Vor erneuter Zentrifugation bei 1277g ohne Bremse für 10 Minuten wird dem Tyrode`s-PRP-Gemisch 20 µl des oben beschriebenen Fluoreszenzfarbstoffes DCF (Fa. Molecular Probes, Eugene, OR, USA) zugesetzt und für 2 Minuten unter Lichtabschluss inkubiert. Das durch diese Zentrifugation entstehende Thrombozytenpellet wird nach Abgießen des Überstandes mit jeweils 250 µl des Tyrode`s-Puffer pH 6,5 und pH 7,4 erneut in Lösung gebracht.

Um ein Ausbleichen der gefärbten Thrombozyten zu verhindern, schützt man sie durch ein braunes, mit Alufolie umwickeltes Eppendorf-Gefäß vor Lichteinstrahlung.

Im Anschluss muss die genaue Thrombozytenzahl in der Suspension ermittelt werden. Dies erfolgt durch ein Zellszählgerät (Sysmex Microcellcounter XE-2100, Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt).

Als letzter entscheidender Schritt wird die Thrombozytenzahl mit Tyrode`s-Puffer (pH 6,5) auf eine Konzentration von 150000 Blutplättchen pro μl Flüssigkeit (150000/ μl) eingestellt. Jedem Empfängertier wird kurz vor Versuchsbeginn 250 μl dieser Suspension in einer Konzentration von 150000/ μl verabreicht. Somit ist gewährleistet, dass jedes Versuchstier die exakt gleiche Flüssigkeitsmenge und Zellkonzentration erhält.

3.4.3.2 Mikropartikelpräparation und Bestimmung der Mikropartikelanzahl

Für die Isolation von Mikropartikeln wird wie oben beschrieben zunächst Vollblut aus einer Spendermaus gewonnen und mittels Citrat (Menge siehe Blutentnahme) ungerinnbar gemacht. Bei den Untersuchungen zur Mikropartikelkinetik verabreicht man je einer Empfängermaus die Mikropartikelmenge, die sich aus dem Vollblut einer Spendermaus gewinnen lässt. Hierbei handelt es sich um ca. $5,3 \times 10^5$ in einem Flüssigkeitsvolumen von 150 μl .

Zur Mikropartikelisolierung und ihrer Färbung mit DCF (Fa. Molecular Probes, Eugene, OR, USA) müssen zahlreiche Zentrifugationsschritte durchlaufen werden. Die Temperatur der Zentrifugen ist bei allen Schritten auf 24°C eingestellt und man achtet dabei auf einen schonenden Umgang mit den verwendeten Flüssigkeiten.

Zunächst verdünnt man das gewonnene Vollblut 1:1 mit Tyrode`s-Puffer (pH 6,5) und zentrifugiert dieses Gemisch bei 319g für 15 Minuten ohne Bremse, wodurch ein Überstand, das so genannte plättchenreiche Plasma, kurz PRP, entsteht. Dieses wird abgenommen und bei 1700g für 20 Minuten ohne Bremse zentrifugiert. Durch wiederholen dieses Arbeitsschrittes erhält man das so genannte plättchenarme Plasma (PPP), welches abpipettiert und zu je 250 μl in Eppendorf-Gefäße gefüllt wird. Man erhält ca. 6-8 Tubes zu je 250 μl . Diese zentrifugiert man für 30 Minuten bei 17750g ohne Bremse, nimmt anschließend jeweils 225 μl Überstand ab und verwirft ihn. Jeweils zwei der verbleibenden 25 μl pro Eppendorf-Gefäß werden vereinigt. Dazu gibt man jeweils 200 μl PBS (Phosphate Buffered Saline, steril filtriert, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) und zentrifugiert erneut für 30 Minuten bei 17750g ohne Bremse. Anschließend verwirft man den kompletten Überstand, suspendiert die Pellets in 10 μl PBS, und vereinigt alle Mikropartikel.

Für den folgenden Färbeschritt inkubiert man die Mikropartikel für 10 Minuten bei Raumtemperatur und völliger Dunkelheit mit 2 μl DCF (Molecular Probes, Eugene, OR,

USA). Nach Zugabe von 50 µl PBS zentrifugiert man ein letztes Mal bei 17750g für 30 Minuten, ohne Bremse. 225 µl des entstehenden Überstands werden abgenommen und verworfen. Die verbleibenden 25 µl Mikropartikel werden mit 125 µl PBS auf 150 µl Volumen aufgefüllt und direkt im Anschluss der Empfängermaus verabreicht.

3.4.3.3 Leukozytenisolation und -doppelfärbung

Für die Leukozytenisolation aus Vollblut wird zunächst die Leukozytenkonzentration des gewonnenen Vollblutes mittels Zellzählgerät (Sysmex Microcellcounter XE-2100, Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt) ermittelt (Physiologische Leukozytenkonzentration Maus: $5,0-13,7 \times 10^3/\mu\text{l}$) und das Blut 1:12 (d.h. 1 ml Vollblut auf 12 ml Ammoniumchlorid-Lösung) mit Ammoniumchlorid-Lösung (Sterile Ammoniumchlorid-Lösung, StemCell Technologies, Vancouver) versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei 4°C, in der die Erythrozyten lysiert werden, zentrifugiert man 5 Minuten bei 546g und saugt den Überstand vorsichtig ab. Das entstandene Pellet wird in 10 ml PBS aufgenommen und erneut für 5 Minuten bei 546g zentrifugiert. Nach Absaugen bringt man das Pellet mit 1800 µl PBS in Lösung und versetzt die Flüssigkeit mit 1 µl Hoechst 33342 (H3570, Fa. Molecular Probes, Eugene, OR, USA) (d.h. Verdünnung 1:2000/ Konzentration 5µg/ml). Dieses Gemisch wird 20-30 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. 8 Minuten vor Inkubationsende fügt man 20 µl Rhodamin B Isothiocyanat (RBITZ, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Germany) (1:100) in einer Konzentration von 20 µg/ml hinzu. Durch zwei Waschschrte entfernt man den überschüssigen Farbstoff und resuspendiert das Pellet nach Entfernen des Überstands in 200 µl PBS, wodurch sich ein Restvolumen von 250 µl ergibt, welches sofort der vorbereiteten Maus intravenös appliziert wird.

3.4.3.4 Fluoreszenzmarkierung des Fibrin-Antikörpers mit Alexa 488

Zunächst wird der Fibrin-Antikörper (mouse anti-fibrin II β chain B β 15-42, Clone T2G1, WAK-Chemie) in 0,1M NaHCO₃ durch Dialyse umgepuffert. Gemäß dem mitgelieferten Protokoll löst man 1 mg Alexa 488 (Fa. Molecular Probes, Eugene, OF, USA) in 100 µl DMSO (Dimethyl Sulfoxid) und lässt es mit 100 µl Fibrin-Antikörper (1 mg/ml) bei Raumtemperatur unter Rühren inkubieren. Durch Dialyse in PBS wird nun der überschüssige Farbstoff entfernt und der Proteingehalt nach Lowry bestimmt.

Für die Versuche setzt man jeweils 10 µg des gelabelten Antikörpers ein.

3.5 Versuchsaufbau und -verlauf

Vorliegendes Versuchsvorhaben weist unterschiedliche Ansätze zur intravitalem Videofluoreszenzmikroskopie auf, da je nach Versuchsgruppe verschiedene Zellen angefärbt und untersucht werden sollen. Vorab wird jeder zur Intravitalmikroskopie verwendeten narkotisierten Maus ein Katheter in die rechte Vena jugularis gelegt. Zweck dieses Venenkatheters ist es, sowohl bei *in* als auch bei *ex vivo* gefärbten Zellen einen Zugang zur Applikation der Farbstoffe und der markierten Zellen zu gewährleisten.

Zur Analyse der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen sollen Blutplättchen selektiv angefärbt werden. Hierzu benötigt man Empfänger- und Spendertiere, da eine *in vivo* Färbung der Plättchen durch i.v.-Farbstoffapplikation nicht möglich ist. Durch intrakardiale Punktion der Spendertiere werden aus dem gewonnenen Blut Thrombozyten isoliert und gezielt angefärbt und jeweils in einer Konzentration von 150000 Thrombozyten/ μl in 250 μl Flüssigkeit dem bereits während der Thrombozytenpräparation vorbereiteten Empfängertier intravenös verabreicht.

Das Verhalten von Mikropartikeln in der Makrovaskularisation kann ebenfalls durch eine *ex vivo* Färbung mit DCF untersucht werden. Jeder Empfängermaus werden Mikropartikel aus dem Vollblut einer Spendermaus intravenös verabreicht. Dies entspricht in etwa einer Konzentration von $5,3 \times 10^5$ in einem Flüssigkeitsvolumen von 150 μl .

Eine *in vivo* Färbung mit Rhodamin 6G wird zur Darstellung der Leukozytenkinetik in der venösen Thrombose eingesetzt. Dieser Farbstoff bindet nach intravenöser Verabreichung an Leukozyten.

Zur selektiven Darstellung einzelner Leukozyten im Rahmen der arteriellen Thrombogenese werden Leukozyten aus dem Vollblut einer Maus, was ca. einer Konzentration von $5,0\text{-}13,7 \times 10^3/\mu\text{l}$ entspricht, isoliert und mittels Doppelfärbung sichtbar gemacht und intravenös appliziert.

Für die Fibrinuntersuchungen wird der Fibrinantikörper (mouse anti-fibrin II β chain B β 15-42, Clone T2G1, WAK-Chemie) mit dem Farbstoff Alexa 488 (Fa. Molecular Probes, Eugene, OF, USA) gelabelt und 10 μg davon intravenös verabreicht.

3.6 Operationsmethoden

Die Tiere werden zur Durchführung aller operativen Eingriffe mit der oben beschriebenen Narkosetechnik in das chirurgische Toleranzstadium versetzt (s. 3.2). Um einer Austrocknung der Cornea zu vorbeugen, werden die Augen mit Augensalbe (Bepanthen®

Augen- und Nasensalbe, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) bedeckt. Anschließend wird jedes Tier gewogen. Durch Prüfung des Zwischenzehenreflexes wird sichergestellt, dass eine vollständige Schmerzausschaltung gewährleistet ist. Mittels Klebeband (Transpore™, 3M Health Care, Neuss) werden die Tiere in Rückenlage auf einer Heizmatte fixiert. Nach Enthaarung der jeweiligen Operationsstellen mit Enthaarungscreme (Plica® extra soft, GlaxoSmithKline Consumer Healthcare, Bühl) wird die Haut mit Alkohol (Cutasept®F, Fa. Bode Chemie, Hamburg) entfettet und desinfiziert. Alle Präparationstechniken werden unter einem Stereomikroskop (Stemi-2000-C, Fa. Zeiss, Göttingen) in Kombination mit einer Schwanenhalslampe (Schott-Kaltlichtquelle KL200 und Schwanenhals-Lichtleiter, Fa. Zeiss, Göttingen) zur besseren Ausleuchtung des Operationsfeldes durchgeführt. Um Traumatisierungen des Gewebes und Blutungen zu vermeiden wird bei allen Präparationen möglichst schonend vorgegangen.

3.6.1 Venöser Zugang zur rechten Vena jugularis

Zur Applikation von Fluoreszenzfarbstoffen, gefärbten Zellen und Antikörpern benötigt jedes Empfängertier einen venösen Zugang. Hierzu wird die Halsregion mittels medianen Hautschnitts vom Kinnwinkel (Ramus mandibulae) bis zum Sternum eröffnet, wodurch die beiden Speicheldrüsen (Glandula mandibularis) in Erscheinung treten. Diese werden stumpf durchtrennt und nach kranial vorgelagert, um die Vena jugularis dextra darstellen zu können und sich einen Zugang zu verschaffen. Kurz vor dem rechten Unterkieferknochen (Os mandibulare) ligiert man die Jugularvene mit einem Faden (Prolene® Polypropylen, 7-0 metric, Fa. Ethicon, Norderstedt) und fixiert sie mit einer Moskitoklemme in gestreckter Lage. Durch eine kleine Inzision in die Vena jugularis wird der Polyethylene-Katheter (Katheterschlauch Portex®, Polythene Tubing, 0,28mm ID, Smiths Medical, Keene, NH, USA) rasch eingeführt und mittels Ligatur fixiert. Seine korrekte Lage prüft man durch Spülung mit isotoner Natriumchloridlösung (Isotone Kochsalzlösung, Delta Pharma GmbH, Pfullingen).

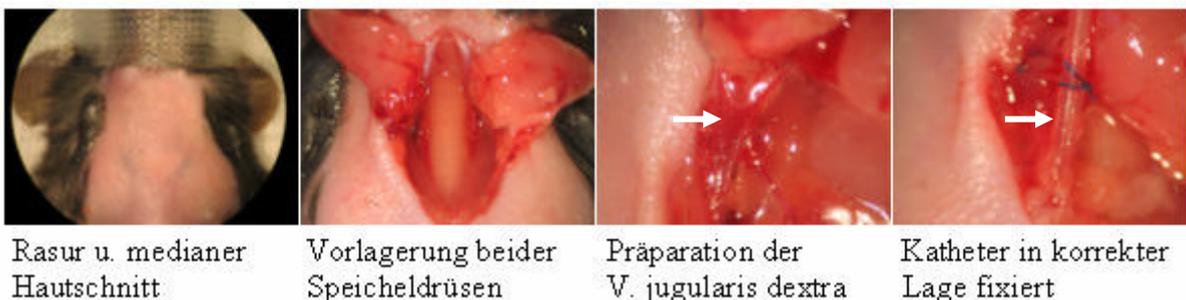


Abbildung 21: Katheterisierung der V. jugularis dextra (Operationsschritte).

3.6.2 Operationstechnik des arteriellen Thrombosemodells

Zur Induktion einer arteriellen Thrombose wird eine Endothelzelldenudation mittels Drahtmodell durchgeführt¹⁰⁷. Bei allen Empfängertieren wird die linke Arteria carotis communis denudiert, wohingegen die rechte als Kontrolle dient und somit unverletzt bleibt.

Nach Entfernung der beiden Speicheldrüsen wird die linke Arteria carotis communis vorsichtig frei präpariert und vorgelagert. Ein schwarzes flexibles Stück Plastikfolie dient als Unterlage des Gefäßes, um es besser aus der Tiefe hervortreten zu lassen und während der intravitalmikroskopischen Aufnahmen eine gute Kontrastierung zu erhalten. Um das kaudale Ende der Arteria carotis communis sowie die Arteria carotis externa wird jeweils ein Fadenzügel (Prolene® Polypropylen, 6-0 metric, Fa. Ethicon, Norderstedt) gelegt und an je einer Moskitoklemme befestigt. Sie dienen dazu das Gefäß zu spannen und eine temporäre Blutleere zu erzeugen. Die Arteria carotis interna wird an ihrem kranialen Ende mit einem Faden ligiert (Prolene® Polypropylen, 7-0 metric, Fa. Ethicon, Norderstedt), welcher als Haltezügel fungiert. Ein weiterer Faden (Prolene® Polypropylen, 7-0 metric, Fa. Ethicon, Norderstedt) wird kurz vor ihrer Einmündung in die Arteria carotis communis um die Arteria carotis interna gelegt. Nach Erzeugen einer Blutleere wird ein Angioplastiedraht (Floppy® II Guide Wire 0,014'' (0,36mm), Guidant Corporation, Diegem, Belgien) über eine kleine Inzision der Arteria carotis interna in das Lumen der Arteria carotis communis eingeführt, ca. 1 cm vorgeschoben, gedreht und wieder aus dem Gefäß entfernt. Man verschließt die vorgelegte Ligatur um die A. carotis interna und setzt den sistierenden Blutstrom wieder in Gang. Direkt im Anschluss wird die erzeugte Endothelzelldenudation intravitalmikroskopisch untersucht.



Abbildung 22: Denudation der linken A. carotis communis (Operationsschritte).

3.6.3 Operationstechnik des venösen Thrombosemodells

Bei der Vena cava handelt es sich um die große Bauchvene, die zusammen mit der Aorta den Bauchraum wirbelsäulennah durchzieht. Durch Ligatur (mit Draht als Platzhalter) der Vena cava inferior, also kaudal der beiden Nierenvenen wird eine Flussverlangsamung induziert.

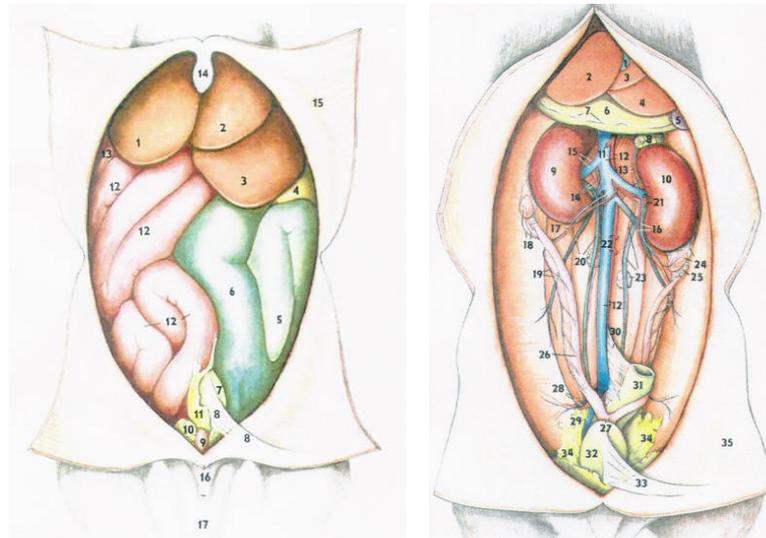


Abbildung 23: Ventralansicht der eröffneten Bauchhöhle zur Darstellung und Ligatur der V. cava caudalis. Links: Aufsicht auf Darmkonvolut und Leber (1-3 Leber, 4-6 u. 12 Darm). Rechts: Darmkonvolut entfernt, Aufsicht auf V. cava caudalis (1 Gallenblase, 2-4 Leber, 5-7 Zwerchfell, 8 Nebenniere, 9 u. 10 rechte und linke Niere, 22 V. cava, 31 Rektum, 32 Blase). Modifiziert nach¹⁶⁰.

Nachdem das Tier das chirurgische Toleranzstadium erreicht hat, wird die Bauchregion enthaart, mit Alkohol entfettet und die Maus auf einer Wärmematte fixiert. Zunächst wird ein ca. 3 cm langer medianer Hautschnitt ausgeführt, wodurch die äußere Bauchmuskulatur (M. obliquus externus abdominis) mit der Linea alba sichtbar wird. Mit einer Mikro-Federschere (Fa. Seidel®medipool, Gauting) wird die Bauchhöhle vorsichtig in der Linea alba eröffnet und das Darmkonvolut vorgelagert. Der Darm wird schonend mit sterilen Mullkompressen (sterile Kompressen 10x10 cm, NOBA Verbandmittel Danz GmbH und Co KG, Wetter) umhüllt und mittels Perfusor (Perfusor®Secura, Fa. B-Braun, Melsungen) mit körperwarmer Ringer-Lösung (Ringer-Lösung DeltaSelect, DeltaSelect GmbH, Pfullingen) benetzt. Um die sich nun wirbelsäulennah darstellende Vena cava inferior wird kaudal der beiden Nierenvenen ein Faden (Prolene Polypropylen, 0-4 metric, Fa. B-Braun Aesculap, Tuttlingen) gelegt. Dieser wird unter Verwendung eines Drahtes als Platzhalter doppelt ligiert, um sicherzustellen, dass sich die Ligatur während des ganzen Versuches nicht lösen kann. Anschließend entfernt man den Draht und beginnt mit den intravitalmikroskopischen Untersuchungen.

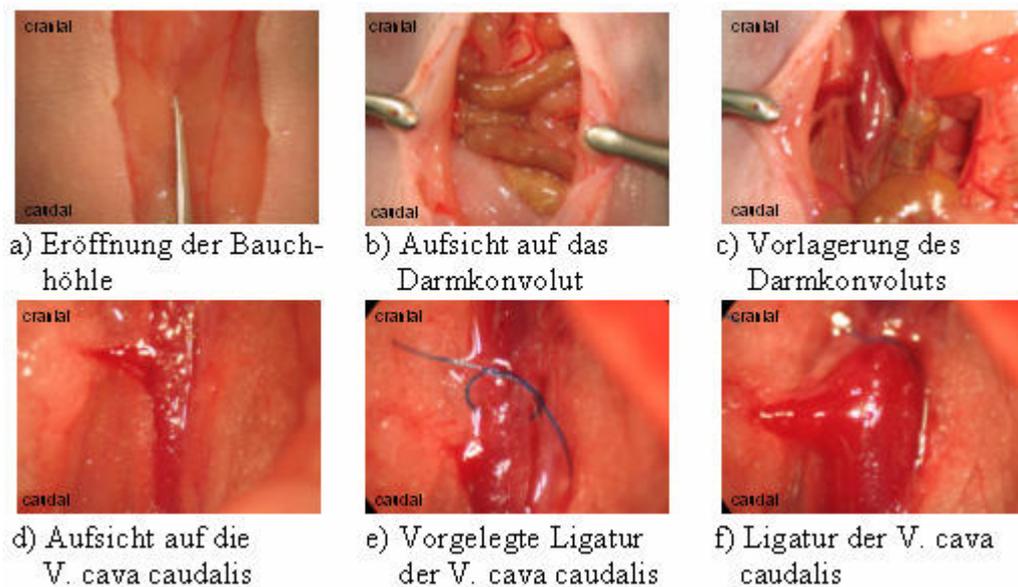


Abbildung 24: Darstellung und Ligatur der Vena cava caudalis (Operationsschritte).

3.7 Durchführung der intravitalen Videofluoreszenzmikroskopie

Zelladhäsion und -aggregation vor und nach Gefäßverletzung werden in situ durch Videofluoreszenzmikroskopie verfolgt¹²⁵⁻¹²⁷.

Untersucht werden Thrombozyten- und Leukozytenrekretierung bei allen fünf Mäusestämmen (C57BL/6J, P-Selektin^{-/-}, GPIIb^{-/-}; HCV (mTF^{-/-}/HCV⁺), Low TF (mTF^{-/-}/hTF⁺)) sowohl im Rahmen der arteriellen als auch der venösen Thrombosierung. Zusätzlich sind Mikropartikelrekretierung sowie Fibrinbildung während der venösen Thrombose von besonderem Interesse. Untersuchungen hierzu werden lediglich bei C57BL/6J Wildtypen durchgeführt. Aufgrund der unterschiedlichen Färbeverfahren dieser Zellpopulationen werden, den verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen entsprechend, zwei verschiedene Intravitalmikroskope (Axiotech^{vario} 100 HD, Fa. Zeiss, Göttingen; Olympus BX51WI Mikroskop, Fa. Olympus, Hamburg) mit kompatiblen Filtersätzen herangezogen.

Da jede Form des Thrombosemodells eine spezielle Durchführung der intravitalmikroskopischen Untersuchungen erfordert, wird im Folgenden zwischen Mikroskopie bei arterieller und venöser Thrombose unterschieden.

3.7.1 Arterielle Thrombose

3.7.1.1 Untersuchung der zellulären Mechanismen in der arteriellen Thrombose

Im Rahmen der arteriellen Thrombose werden Thrombozyten- und Leukozytenrekrutierung näher untersucht. Vor Induktion der arteriellen Thrombose wird dem Tier mittels Jugulariskatheter die Farbstofflösung appliziert, um eine Aufnahme des unverletzten Gefäßes durchführen zu können.

3.7.1.2 Thrombozytenrekrutierung

Mittels 10-facher Vergrößerung wird das Gefäß 15 Sekunden lang aufgenommen. Anhand dieser Aufnahme kann zu einem späteren Zeitpunkt der Gefäßdurchmesser ermittelt werden.

Anschließend wird, wie oben beschrieben, mittels Drahtmodell eine arterielle Thrombose der A. carotis communis induziert und direkt im Anschluss mikroskopiert. Sofort nach Entfernen des Drahtes aus dem Gefäß wird die A. carotis interna mittels Ligatur verschlossen, der Blutstrom durch Entfernen der Haltefäden wieder hergestellt und das Gefäß intravitalmikroskopisch untersucht. Eine Stunde lang werden alle 10 Minuten vier Aufnahmen mit 20-facher und jeweils eine Übersichtsaufnahme mit 10-facher Vergrößerung durchgeführt. Bei 20-facher Vergrößerung wählt man vier verschiedene Stellen der A. carotis communis aus, indem man von der Bifurkation nach caudal, also herzwärts mikroskopiert, um die Thrombusausdehnung genau darstellen zu können. Jede Lokalisation wird für 30 Sekunden mit einer 20-fachen Vergrößerung über die CCD-Kamera auf das Videoband (Axiotech^{vario} 100 HD, Fa. Zeiss) aufgenommen¹²⁵. Hierbei sind eine Darstellung der Einzelzellen, sowie ihre Interaktionen untereinander möglich. Im Anschluss werden für 15 Sekunden Aufnahmen mit 10-facher Vergrößerung durchgeführt, um später die Thrombusgröße in Relation zum Gefäßdurchmesser feststellen zu können. Um ein übermäßiges Ausbleichen der jeweiligen Farbstoffe zu verhindern, ist man bemüht die Lichtexposition möglichst kurz zu halten.

Die Aufnahmen setzen sich also folgendermaßen zusammen:

Vergrößerung	Aufnahmezeitpunkt	Aufnahmedauer	Aufnahmeart
10-fach (Objektiv 10x0,25; Carl Zeiss MicroImaging, Inc.)	Vor Ligatur + nach Ligatur alle 10 Minuten über 1 Stunde	Jeweils 15 Sekunden	Übersichtsaufnahme (Bestimmung des Gefäßdurchmessers)
20-fach (Wasserimmersionsobjektiv, W 20x0,5; Carl Zeiss MicroImaging, Inc.)	Nach Ligatur alle 10 Minuten über 1 Stunde	Jeweils 30 Sekunden	4 Lokalisationen (Zell-Zell-Interaktionen)

Tabelle 6: Aufnahmeschema der Videodokumentation bei arterieller Thrombose.

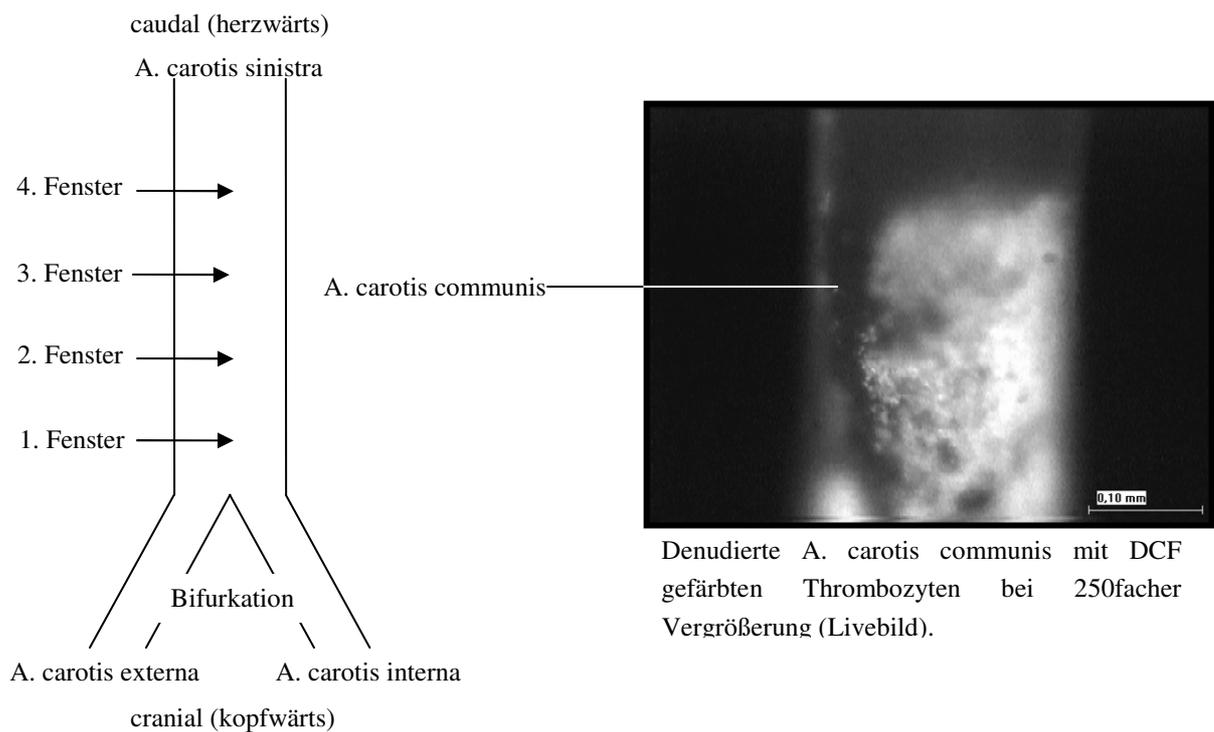


Abbildung 25: Mikroskopierschema der A. carotis communis. Links: Schematische Darstellung der A. carotis mit vier verschiedenen Aufzeichnungslokalisationen. Rechts: Ausschnitt eines Thrombus in der A. carotis communis (Livebild) bei 250-facher Originalvergrößerung.

3.7.1.3 Leukozytenrekrutierung

Zur Untersuchung der Leukozytenrekrutierung im arteriellen Thrombosemodell verwendet man die im Kapitel 3.7.1.2 beschriebenen Mikroskopierschemata und Aufnahmezeitpunkte. Dieses Vorgehen ermöglicht eine spätere Gegenüberstellung der Thrombozyten- und Leukozytenrekrutierung im arteriellen Thrombus. Die Doppelfärbung der Leukozyten mit Rhodamin B und dem Vitalfarbstoff Hoechst 33342 erfordert die Verwendung des Mikroskops Olympus BX51WI (Fa. Olympus, Hamburg, Germany). Je Lokalisation und Zeitpunkt werden Filmsequenzen sowohl mit Rhodamin B (Texas Red-Filter) als auch mit Hoechst 33342 (Fura 340 Filter) aufgezeichnet und digital gespeichert. Die zwei Filmsequenzen je Lokalisation werden später übereinander gelegt und ausgewertet. Aufnahmen bei 250-facher Vergrößerung wurden mit dem Olympus BX51WI Mikroskop nicht durchgeführt.

3.7.2 Venöse Thrombose

3.7.2.1 Untersuchung der zellulären Mechanismen in der venösen Thrombose

Um die Entstehungsmechanismen der venösen Thrombose näher zu untersuchen wird folgendes Mikroskopierschema angewandt: Die Vena cava caudalis wird in vier Stellen aufgeteilt, die bei jedem Aufnahmeblock dargestellt werden. Pro Abschnitt filmt man jeweils 30 Sekunden lang bei 500-facher Vergrößerung. Caudal beginnend tastet man sich abschnittsweise bis zur Ligatur vor. Durch dieses Verfahren können die von der Lokalisation abhängigen Unterschiede dargestellt und in der späteren Auswertung berücksichtigt werden. Man beginnt mit der Darstellung der unversehrten Vena cava caudalis vor Ligatur, um die Adhäsionsvorgänge mit diesem Ausgangszustand vergleichen zu können. Anschließend wird wie oben beschrieben eine Ligatur der Vena cava caudalis mit Restfluss induziert und jeweils nach einer, zwei, fünf und nach sechs Stunden mikroskopiert. Übersichtsaufnahmen bei 250-facher Vergrößerung sind wegen des großen Gefäßdurchmessers der Vena cava nicht möglich.

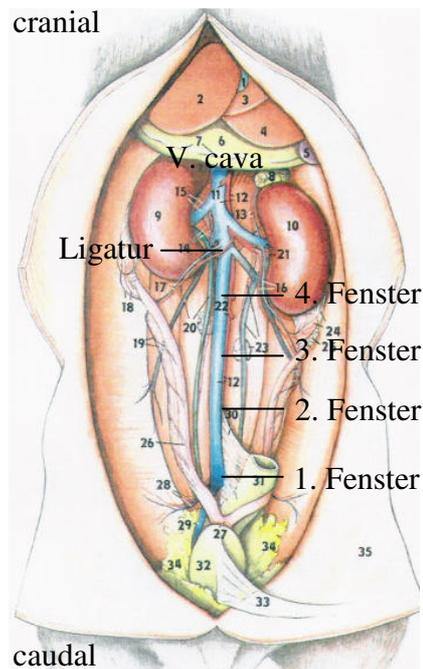


Abbildung 26: Mikroskopierverschema der V. cava caudalis. Vier Aufnahmefenster an der V. cava von caudal nach cranial (d.h. in Richtung der Ligatur). Ventralansicht der eröffneten Bauchhöhle zur Darstellung und Ligatur der V. cava caudalis. Darmkonvolut entfernt, Aufsicht auf die V. cava caudalis. Modifiziert nach¹⁶⁰.

3.7.2.1.1 Leukozyten- und Thrombozytenrekrutierung

Die Leukozytenrekrutierung in der venösen Thrombose wird bei allen oben genannten Mäusestämmen durch Applikation des Fluoreszenzfarbstoffes Rhodamin 6G mit dem Axiotech^{vario} 100 HD Mikroskop untersucht. Lediglich bei den Low TF-Mäusen wird auf den Farbstoff Acridin-Orange (Olympus BX51WI) zur simultanen Leukozyten- und Thrombozytendarstellung (Rhodamin B) zurückgegriffen.

Aufnahmelokalisationen und -zeitpunkte sind wie oben beschrieben bei allen Experimenten im Rahmen der venösen Thrombose identisch.

3.7.3 Fibrinbildung und Mikropartikelrekrutierung

Versuche zur Fibrinbildung und Mikropartikelrekrutierung werden am Olympus BX51WI Mikroskop mit Alexa gelabelten Fibrinantikörper und DCF-gefärbten Mikropartikeln durchgeführt.

3.8 Organentnahme

Nach Beendigung der Intravitalmikroskopie werden die Empfängertiere durch Ausbluten getötet. Je nach Fragestellung werden unterschiedliche Organentnahmen durchgeführt. Bei den Untersuchungen zur arteriellen Thrombose, entnimmt man die beiden Carotiden (rechts = Kontrolle; links = Denudiert), sowie das Gehirn, für die spätere histologische Weiterverarbeitung. Da eine sofortige Verarbeitung der Proben nicht möglich ist, aber auto- bzw. heterolytische Zersetzungs Vorgänge unmittelbar nach der Entnahme einsetzen, muss ein geeignetes Fixierungsmittel gewählt werden¹⁸³. Ein Teil der Organe wird für mindestens 24 Stunden in eine verdünnte und gepufferte Formaldehyd-Lösung (Formaldehyd-Lösung 4,5%, Otto Fischar GmbH, Saarbrücken) eingelegt. Dieses weit verbreitete Fixierungsmittel verleiht dem Gewebe durch Proteinvernetzung eine gummiartige Konsistenz¹⁸³. Die derart fixierten Organe werden später für Paraffinschnitte verwendet. Da die meisten Proteine durch die Formalinfixierung ihre antigenen Eigenschaften einbüßen, können immunhistologische Untersuchungen an derart fixiertem Material oft nicht durchgeführt werden. Aus diesem Grund wird der Rest der Organe für weitere Untersuchungen (Immunhistochemische Untersuchungen, mRNA-Untersuchungen) bei -80°C gefrierkonserviert.

Im Anschluss an die Untersuchungen zur venösen Thrombose werden die Gefäße nach Ausbluten mit PBS über den Venenkatheter vorsichtig gespült, um eventuell störende Erythrozyten zu entfernen. Man entnimmt die V. cava, sowie das Herz und die Lungen. Bei der Entnahme der Vena cava ist äußerste Vorsicht geboten, da dieses sehr dünne Gefäß leicht einreißt, wodurch Artefakte entstehen können. Auch hier werden die Organe zum Teil in Formalin und zum Teil bei -80°C gefrierkonserviert. Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen werden einzelne Venen gesondert behandelt und in 2%iges Glutaraldehyd eingelegt.

3.9 Dokumentation

Besonderer Wert wird auf eine lückenlose, umfangreiche Dokumentation der Versuche gelegt. Sowohl Blutentnahme, Operationsverlauf und Intravitalmikroskopie, als auch die Auswertungsverfahren werden genauestens festgehalten. Man vermerkt die Projektbezeichnung, das Versuchs- und Auswertungsdatum, die Anästhesie- und Tötungsmethode sowie eventuell auftretende Komplikationen. Die verwendeten Versuchstiere werden mit Art, Tierstamm, Geschlecht, spezifischer Tiernummer, Geburtsdatum und Gewicht genau identifiziert. So wird gewährleistet, dass die richtigen Spender- und Empfängertierkombinationen eingehalten und nachgeprüft werden können. Eingesetzte Antikoagulantien, Farbstoffe und Antikörper werden ebenfalls festgehalten. Somit können später gegebenenfalls Rückschlüsse auf die Versuchsergebnisse gezogen werden. Der

Zählerstand der Video-Aufzeichnungen wird in Verbindung mit der Angabe des Vergrößerungsobjektives festgehalten. So ist jederzeit eine Zuordnung der Aufnahmen zu der untersuchten Maus möglich.

3.10 Auswertung der Videoaufzeichnungen

Bei der Auswertung sämtlicher Videoaufzeichnungen bedient man sich eines computergestützten Bildanalyseprogramms (Cap Image 7.1, Dr. Zeintl, Heidelberg, Germany)^{96,122,123,125} sowie der Beurteilung der Sequenzen im Bild-zu-Bild-Verfahren, d.h. aller Einzelbilder nacheinander im Zeitverlauf.

3.10.1 Arterielle Thrombose

Anhand der Aufnahmen der Carotiden bei 10-facher Vergrößerung wird durch eine an den Bildschirm angepasste Maßstabschablone der Gefäßdurchmesser ermittelt. Anschließend werden einzelne adhärente Zellen, d.h. Zellen die länger als zehn Sekunden im Gefäß haften bleiben, ausgezählt^{125,127}. Hierzu bedient man sich eines Auswertungsfensters, welches bei 20-facher Vergrößerung die Seitenlängen 150 x 100 µm aufweist und auf dem Monitor fixiert werden kann.

Die Zellaggregat- und Thrombenbildung wird mittels des Computerprogramms Cap Image in mm² ausgemessen¹²⁷.

3.10.2 Venöse Thrombose

Im venösen System werden ebenfalls adhärente Zellen^{125,127} im Bild-zu-Bild-Verfahren ausgezählt. Man verwendet ein kleineres Auswertungsfenster (100 x 50 µm), welches an vier verschiedenen Stellen des Monitors zur Zellzählung aufgeklebt wird.

3.11 Histologische Untersuchungen

Die formalinfixierten Organe müssen zur weiteren Verarbeitung zunächst entwässert und anschließend in Paraffin eingebettet werden. Für sämtliche Präparate beachtet man die für den entsprechenden Färbungstyp erprobten Verfahren¹⁷⁰. Zur Herstellung der 2 µm dicken Paraffin-Schnittpräparate verwendet man ein Rotationsmikrotom (Microtom HM 335 E, MICROM GmbH, Walldorf). Die entstehenden seriellen Schnitte werden mit einem Pinsel abgehoben und in ein Warmwasserbad (Paraffin Streckbad TB 35, MEDITE Medizintechnik,

Burgdorf) übertragen, um die Schnitte zu strecken und von Falten zu befreien¹⁸³. Abschließend werden die Schnitte auf saubere und fettfreie, beschriftete Objektträger (Super Frost®Plus, Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig) aufgezogen und bis zum Färben in einem 37°C warmen Brutschrank aufbewahrt, um sie zu trocknen und ihre Haftung zu verbessern.

3.11.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.)

Hierbei handelt es sich um die gebräuchlichste Übersichtsfärbung, die auf dem Prinzip der Durchtränkung und der elektrostatischen Absorption beruht und Zellkerne und zytoplasmatische Bestandteile darstellt. Der positiv geladene Farbstoff Hämalaun färbt negativ geladene (basophile) Strukturen. Er bindet an die sauren Bestandteile der DNS und färbt hierdurch die Zellkerne blau (Kernfärbung). Eosin, welches negativ geladen ist wird regressiv gefärbt (d.h. erst überfärben, dann differenzieren) und bindet an die positiven Gewebestandteile, also die Eiweiße (Plasmafärbung), wodurch sich das Bindegewebe in verschiedenen Rottönen (Azidophilie) darstellt. Alle Arbeitsschritte werden von einem Färbeautomaten nach Standardprotokoll ausgeführt¹⁷⁰.

3.11.2 Van Gieson Färbung

Die Tirschromfärbung nach van Gieson ist eine sehr wichtige Bindegewebsfärbung, bei der die Zellkerne schwarzbraun, das Zytoplasma gelbbraun, kollagene Bindegewebsfasern rot, elastische gelb und das Bindegewebe sowie die Erythrozyten ebenfalls gelb gefärbt werden. Als Farbstoffe werden Weigerts Eisenhämatoxylin zur Anfärbung der Kerne und Pikrinsäure-Säurefuchsin zur Simultanfärbung von Bindegewebe und Muskulatur eingesetzt. Ein Färbeautomat führt sämtliche Färbeschritte nach erprobten Verfahren durch¹⁷⁰.

3.11.3 MSB-Färbung nach LENDRUM (Martius-Scarlet-Blue)

Um das entstandene Fibrin in den Thromben darstellen zu können, wählt man die Martius-Scarlet-Blue Färbung. Hierbei stellen sich die Erythrozyten gelb, Fibrin und glatte Muskelzellen rot und Kollagen sowie Zellkerne blau dar¹⁴¹. Färbezubehör und -protokoll zur manuellen Färbung der Paraffinschnitte wird von Morphisto GmbH (Frankfurt am Main, Germany) bezogen. Bei den verwendeten Färbereagenzien handelt es sich um Weigert'sches Eisenhämatoxylin zum Färben der Zellkerne, Essigsäure (1%) zum Differenzieren und Entfärben des Bindegewebes, Martius Gelb-Lösung, um Erythrozyten anzufärben, Kristallponceau-Lösung zum Färben der Muskulatur, zum Beizen des Bindegewebes Phosphowolframsäure (1%) sowie Methylblau, um eine Färbung der Kollagenfasern herbeizuführen. Im Anschluss an die manuell ausgeführten Färbeschritte werden die Schnitte dehydriert, aufgehellt und eingedeckelt.

3.11.4 Weigert'sche Fibrinfärbung

Zur Illustration der Fibrinbildung im Rahmen der venösen Thrombose wird diese Färbung herangezogen. Sie ermöglicht eine histologische Darstellung von Fibrin, welches sich blau färbt und sich deutlich gegenüber den roten Zellkernen abzeichnet. Für diese manuell durchgeführte Färbetechnik benötigt man folgende Färbelösungen: 1%iges Kernechtrot, Weigert'sche Lösung und Lugol'sche Jod-Jodkaliumlösung.

3.12 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Zur Darstellung der Ultrastruktur der entnommenen Gefäße werden elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Hierzu werden die Gefäße im Anschluss an die intravitalmikroskopischen Untersuchungen zunächst mit PBS, dann mit phosphatgepuffertem Glutaraldehyd (1% Vol/Vol) als Fixierungslösung gespült. Man eröffnet das Gefäßlumen der Länge nach, wobei besonders schonend vorgegangen werden muss, um eventuellen Präparationsartefakten vorzubeugen. Die eröffneten Gefäße werden 12 Stunden bei 4°C in 1%igem PBS-gepuffertem Glutaraldehyd fixiert^{125,126}. Bei der Raster-Elektronenmikroskopie wird die Oberfläche der Untersuchungsobjekte mit einem Elektronenstrahl abgetastet, wohingegen bei der Transmissionselektronenmikroskopie Ultradünnschnitte eines Objektes von Elektronen durchstrahlt werden.

3.12.1 Raster-Elektronenmikroskopie (REM)

Im Anschluss an die Perfusionsfixation mit 1%igem gepuffertem Glutaraldehyd (pH 7,2 – 7,4) wird das Gewebe ausgewaschen, mit gepuffertem 1-2%igem Osmiumtetroxid (pH 7,2 – 7,4) nachfixiert und erneut mit Aqua dest. ausgewaschen. Nach Entwässerung der Präparate in Ethanol werden sie in die Druckkammer eines Critical Point Trocknungsgefäßes eingebracht, wobei das Ethanol durch flüssiges CO₂ ausgewaschen wird¹²⁶. Es folgt die Trocknungsphase bei 73,8 bar und 31°C am kritischen Punkt, wo die feste Phase in die gasförmige übergeht und es zu keiner Oberflächenspannung am Präparat kommt⁹². Das CO₂ wird langsam abgelassen, woraufhin das Präparat sofort mit Leitsilber auf einen Probenträger aufgebracht und im Sputter-coating Gerät mit Platin beschichtet wird. Anschließend kann das Präparat in das REM eingebracht und untersucht werden^{92,126}. Um alle relevanten Fragestellungen beantworten zu können werden die Gefäßoberflächen sorgfältig in ihrer ganzen Flächen- ausdehnung durchgemustert und auffällige Stellen stark vergrößert.

3.12.2 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die TEM-Untersuchungen dienen der genauen Analyse der Ultrastruktur der Thromben und der Gefäße. Hiermit können die Interaktionen der verschiedenen Zellen untereinander sowie mit dem Endothel detailliert dargestellt und untersucht werden, ob und wie die Endothelzellen pathologisch verändert sind.

Hierzu werden die entnommenen Gefäße mit einer Lösung nach Karnowsky (2,5%iges gepuffertes Glutaraldehyd und 2%iges Paraformaldehyd in Phosphatpuffer pH 7,4) über Nacht bei 4°C perfusionsfixiert⁹². Anschließend werden die Gewebe in gewaschen und für 90 Minuten in 2%igem gepuffertem Osmiumtetroxid (pH 7,4) nachfixiert. Nach Entwässerung in 50%igem Aceton führt man über Nacht eine Kontrastierung mit 70% Aceton, 0,5% Uranylacetat und 1% Phosphowolframsäure bei 4°C durch. Man überführt das Gewebe über eine aufsteigende Alkoholreihe in Propylenoxyd und gibt es dann über Nacht bei 4°C in Eponlösung. Im Anschluss an die Ausbettung in frische Eponlösung, die man ca. 48 Stunden bei 65°C polymerisieren lässt, schneidet man mit dem Ultramikrotom Schnitte von 50 – 100 nm Dicke. Diese werden auf Gitternetze aufgebracht, mit 8%igem Uranylacetat nachkontrastiert und 5 Minuten in Bleicitrat verbracht. Nach Trocknung werden die Schnitte im Elektronenmikroskop im Hochvakuum untersucht^{92,123}.

3.13 Versuchsplanung und -durchführung

3.13.1 Tierzahlen

Die Versuche erfordern insgesamt 116 Tiere aus eigener Zucht. 31 davon dienen als Blutspender, die restlichen 85 Tiere dienen der Durchführung der intravitalmikroskopischen Untersuchungen.

Im Rahmen der Intravitalmikroskopie nach Induktion der arteriellen Thrombose werden 14 C57BL/6J-Kontrolltiere, 9 P-Selektin^{-/-}-Mäuse und 7 GPIIb^{-/-}-Mäuse verwendet. Als Blutspender dienen hierbei 20 Mäuse mit jeweils dem Empfängertier entsprechenden Geschlecht und Genotyp.

Für die Versuche zur venösen Thrombose werden 23 C57BL/6J-Kontrolltiere, 10 P-Selektin^{-/-}-Mäuse, 12 GPIIb^{-/-}-Mäuse, 5 HCV-100^{-/-} + -Mäuse und 8 Low TF-Tiere (mTF^{-/-}/hTF⁺) herangezogen. 8 Tiere werden hierfür insgesamt als Blutspender herangezogen.

3.13.2 Versuchsgruppen

Arterielle Thrombose: Denudation der A. carotis communis

Analyse der Thrombozytenadhäsion und -aggregation

Stamm	Anzahl	Geschlecht	Alter	Gewicht	Auswertung
C57BL/6J	n = 11	männlich	6 - 8 Wochen	18 – 23g	TZ-Adhäsion u. -aggregation
GPIIb ^{-/-}	n = 5	männlich	8 Wochen	15 – 28g	TZ-Adhäsion u. -aggregation
P-Selektin ^{-/-}	n = 7	männlich	8 Wochen	20 – 28g	TZ-Adhäsion u. -aggregation

Tabelle 7: Übersicht der TZ-Rekrutierung für die einzelnen Versuchsgruppen im Rahmen der arteriellen Thrombose.

Analyse der Adhäsion von Leukozyten

Stamm	Anzahl	Geschlecht	Alter	Gewicht	Auswertung
C57BL/6J	n = 6	männlich	6 - 8 Wochen	23 – 24g	LZ-Adhäsion
GPIIb ^{-/-}	n = 4	männlich	8 Wochen	20g	LZ-Adhäsion
P-Selektin ^{-/-}	n = 2	männlich	8 Wochen	25g	LZ-Adhäsion

Tabelle 8: Übersicht der LZ-Rekrutierung für die einzelnen Versuchsgruppen im Rahmen der arteriellen Thrombose.

Venöse Thrombose: Stromverlangsamung an der V. cava

Analyse der Leukozytenrekrutierung 6h nach Induktion der Stenose

Stamm	Anzahl	Geschlecht	Alter	Gewicht	Auswertung
C57BL/6J	n = 10	männlich	6 - 8 Wochen	20 – 24g	LZ-Adhäsion -rollen u. Aggregation
GPIIb ^{-/-}	n = 4	weiblich	6 - 8 Wochen	25 – 30g	LZ-Adhäsion -rollen u. Aggregation
P-Selektin ^{-/-}	n = 7	männlich	6 - 8 Wochen	20 – 30g	LZ-Adhäsion -rollen u. Aggregation
HCV100	n = 2	weiblich	8 Wochen	20 – 30g	LZ-Adhäsion -rollen u. Aggregation
Low TF	n = 2	weiblich	6 - 8 Wochen	15 – 20g	LZ-Adhäsion -rollen u. Aggregation

Tabelle 9: Übersicht der LZ-Rekrutierung für die einzelnen Versuchsgruppen im Rahmen der venösen Thrombose.

Analyse der Thrombozytenrekrutierung 6h nach Induktion der Stromverlangsamung

Stamm	Anzahl	Geschlecht	Alter	Gewicht	Auswertung
C57BL/6J	n = 3	männlich	6 - 8 Wochen	18 – 20g	TZ-Adhäsion
GPIIb ^{-/-}	n = 3	männlich	6 - 8 Wochen	18 – 20g	TZ-Adhäsion
HCV100	n = 2	weiblich	8 Wochen	20g	TZ-Adhäsion
Low TF	n = 2	weiblich	6 - 8 Wochen	15 – 20g	TZ-Adhäsion

Tabelle 10: Übersicht der TZ-Rekrutierung für die einzelnen Versuchsgruppen im Rahmen der venösen Thrombose.

Analyse der Mikropartikelrekrutierung 6h nach Induktion der Stromverlangsamung

Stamm	Anzahl	Geschlecht	Alter	Gewicht	Auswertung
C57BL/6J	n = 3	männlich	6 - 8 Wochen	18 – 20g	MP-Rekrutierung

Tabelle 11: Übersicht der MP-Rekrutierung im Rahmen der venösen Thrombose.

Analyse der Fibrinbildung 6h nach Induktion der Stromverlangsamung

Stamm	Anzahl	Geschlecht	Alter	Gewicht	Auswertung
C57BL/6J	n = 3	männlich	6 - 8 Wochen	18 – 20g	Fibrinbildung
Low TF	n = 2	weiblich	6 - 8 Wochen	15 – 20g	Fibrinbildung

Tabelle 12: Übersicht der Fibrinbildung für die einzelnen Versuchsgruppen im Rahmen der venösen Thrombose.

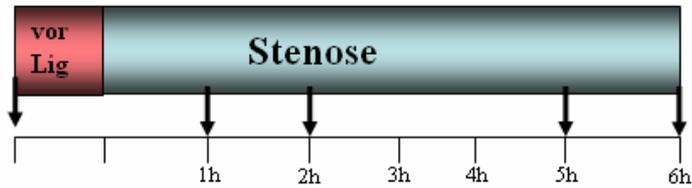
Analyse der Leukozytenrekrutierung 48h nach Induktion der Stromverlangsamung

Stamm	Anzahl	Geschlecht	Alter	Gewicht	Auswertung
C57BL/6J	n = 4	männlich	6 - 8 Wochen	23 – 24g	LZ-Adhäsion
GPIIb ^{-/-}	n = 2	männlich	8 Wochen	20g	LZ-Adhäsion
P-Selektin ^{-/-}	n = 3	männlich	8 Wochen	25g	LZ-Adhäsion
HCV100	n = 1	weiblich	8 Wochen	24g	LZ-Adhäsion
Low TF	n = 2	weiblich	6 - 8 Wochen	15 – 20g	LZ-Adhäsion

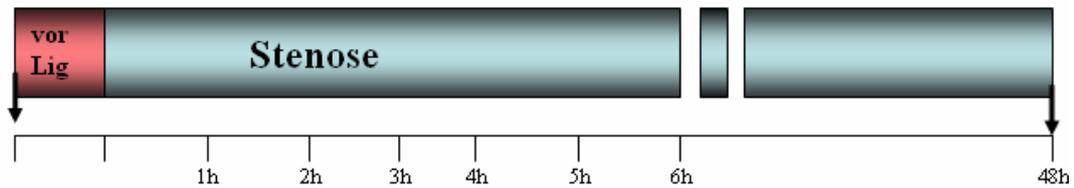
Tabelle 13: Übersicht LZ-Rekrutierung nach 48 Stunden für die einzelnen Versuchsgruppen im Rahmen der venösen Thrombose.

3.13.3 Experimentelles Protokoll

I. Akute venöse Thrombose



II. Chronische venöse Thrombose



III. Arterielle Thrombose

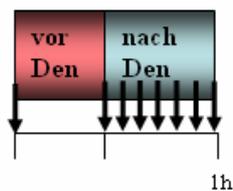


Abbildung 27: Experimentelles Protokoll. Darstellung der unterschiedlichen Zeitfenster für die Untersuchung der venösen und arteriellen Thrombose (rot: vor Thromboseinduktion; blau: nach Induktion der Thrombose; Pfeile illustrieren die jeweiligen Aufnahmezeitpunkte).

3.14 Statistische Versuchsauswertung

Da die Ergebnisse eines Versuches durch den Einfluss von Zufallsvariablen voneinander abweichen, kann oft nicht mit Sicherheit eine Aussage darüber getroffen werden, ob eine Hypothese stimmt oder nicht. Um nun dennoch eine verlässliche Aussage darüber treffen zu können, ob die gewählten Parameter bei den durchgeführten Untersuchungen bzw. die Veränderung der Versuchsparameter einen eindeutigen Einfluss auf die Versuchsergebnisse haben, müssen die Daten in geeigneter Form ausgewertet werden. Deshalb wurden in dieser Arbeit zur Datenauswertung einige Methoden der deskriptiven Statistik verwendet. Mittels dieser Statistik lassen sich eine bestimmte Menge von beobachteten Daten summarisch darstellen bzw. auswerten. In diesem Zusammenhang wird oft auch von einem Hypothesen- oder Signifikanztest gesprochen. Um eine verlässliche Aussage über die ermittelten Versuchdaten zu treffen, wird hierfür die Wahrscheinlichkeit für Fehlentscheidungen

kontrolliert. Dies entspricht einem Test zu einem vorgegebenen Signifikanzniveau. Als signifikant werden in der Statistik Ergebnisse bezeichnet, bei denen der Unterschied zwischen den Ergebnissen nur mit einer definierten geringen Wahrscheinlichkeit durch Zufall zustande gekommen ist. Die Überprüfung dieser Signifikanz geschieht mit Hilfe so genannter Signifikanztests. Hierbei wird von Beginn an eine Irrtumswahrscheinlichkeit α festgelegt. Im Allgemeinen wird ein Unterschied als signifikant bezeichnet, wenn $\alpha < 0,05$ also kleiner 5% ist. Wenn die Ergebnisse einen Wert von $\alpha < 0,003$ erreichen, spricht man von hochsignifikant. Da über die Art der Verteilung der Ergebnisse im Voraus keine eindeutige Aussage getroffen werden kann, wurden für die meisten Versuchsauswertungen zumeist nicht-parametrische bzw. parameterfreie statistische Tests verwendet. Hierbei wird nicht von vornherein eine Modellstruktur verwendet bzw. festgelegt, sondern diese erst aus den Versuchsdaten heraus bestimmt. Ein weiterer wichtiger Punkt in der statistischen Auswertung von Versuchsdaten ist, ob es sich um einen Ein-, Zwei- oder Mehrstichprobentest handelt. Bei den Zwei- und Mehrstichprobentests muss zusätzlich noch unterschieden werden, ob diese verbunden sind oder nicht. Zwei Stichproben werden als verbunden bezeichnet, wenn es zu jedem Wert aus der einen Stichprobe genau einen aus der anderen Stichprobe gibt. Zur Durchführung der Auswertung und Berechnung wurde das Softwareprogramm SigmaStat[®] verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 In vivo Darstellung zellulärer Thrombosierungsmechanismen

Intravitalmikroskopische Untersuchungen ermöglichen eine detailgetreue Echtzeitdarstellung der zellulären Thrombosierungsmechanismen. Hierdurch kann ein anschaulicher Vergleich der Entstehung zwischen arterieller und venöser Thrombose angestellt werden.

Um die Bedeutung verschiedener Rezeptoren für die Adhäsions- und Interaktionsvorgänge zu erforschen, wurden sowohl die bereits eingehend besprochenen Knock-out-Stämme, als auch der Wildtyp untersucht. Durch die Gegenüberstellung der ermittelten Daten können die Thrombosierungsmechanismen auf zellulärer Ebene erforscht werden.

4.1.1 Arterielle Thrombose

Die arterielle Thrombose wird, wie oben beschrieben, durch Denudation, d.h. Zerstörung der intakten antiadhäsiven Endothelzellschicht und Freilegung der subendothelialen kollagenen Matrix induziert. Im Rahmen der Untersuchung wurde die Thrombozyten- sowie Leukozytenadhäsion u. -aggregation jeweils in getrennten Versuchsansätzen erforscht. Aufgrund der schnellen Thromboseentstehung im arteriellen System sind vor allem die frühen Zeitpunkte (fünf bis zwanzig Minuten) von besonderer Bedeutung und werden deshalb intravitalmikroskopisch untersucht.

4.1.1.1 Analyse der Thrombozyten- sowie Leukozytenadhäsion u. -aggregation bei Wildtyptieren

Während Thrombozyten nicht mit der unverletzten Gefäßwand interagieren, zeigt sich nach Verletzung eine drastische Zunahme der Thrombozytenadhäsion u. -aggregation an der subendothelialen Matrix. Abbildung 28 verdeutlicht die Entstehung einer arteriellen Thrombose nach Carotidenudation anhand intravital-mikroskopischer Echtzeitaufnahmen. Das linke Bild zeigt die unverletzte A. carotis communis vor Denudation bei 250-facher Originalvergrößerung. Das Bild in der Mitte (10 Minuten nach Endothelverletzung bei 500-facher Originalvergrößerung) verdeutlicht das rasche Fortschreiten der arteriellen Thrombose mit Thrombozytenadhäsion und -aggregation. Es stellen sich bereits einzelne adhärente Thrombozyten sowie kleine Aggregate dar. Im rechten Bild wird der Thrombus bei 250-facher Originalvergrößerung illustriert.

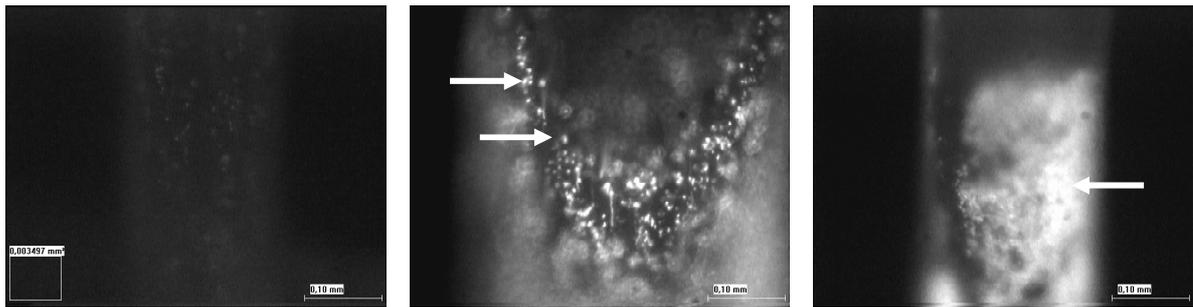


Abbildung 28: C57BL/6J Thrombozytenadhäsion und -aggregation an der subendothelialen Matrix. Links: A. carotis communis vor Denudation bei 250-facher Vergrößerung. Es finden sich keine adhärenenten Thrombozyten. Mitte: A. carotis communis nach Denudation bei 500-facher Originalvergrößerung (Thrombozytenadhäsion und beginnende Aggregation; Pfeile deuten auf adhärenente Thrombozyten). Rechts: A. carotis communis nach Denudation bei 250-facher Originalvergrößerung (Darstellung der Thrombusausdehnung/Thrombozytenaggregation an der subendothelialen Matrix; Pfeil markiert den wandständigen Thrombus).

Die Thrombozytenadhäsion (4980 ± 565 TZ/mm²) steigt bereits fünf Minuten nach Denudation rapide an, und erzielt nach 10 Minuten ein Plateau (5736 ± 523 TZ/mm² nach 10 Min.) erreicht, und ist anschließend leicht rückläufig (20 Min. 5239 ± 477 TZ/mm²; 30 Min. 4621 ± 810 ; 1 Std. 3785 ± 834 TZ/mm²). Dagegen erfährt die Thrombozytenaggregation einen kontinuierlichen Anstieg im Zeitverlauf (5 Min. $1824,2 \pm 117,9$ μ m²; 10 Min. $1985,3 \pm 128,5$ μ m²; 20 Min. $2108,0 \pm 158,4$ μ m²; 30 Min. 2044 ± 177 μ m²; 1 Std. $2109 \pm 157,6$ μ m²). Die scheinbare Abnahme der adhärenenten Thrombozyten ist nur artifiziell, da diese sich zu Aggregaten vereinigen, und somit unter Aggregation zusammengefasst werden.

Der Graph in Abbildung 29 zeigt die Anzahl der adhärenenten Einzelzellen (Thrombozyten) pro mm² denudierten Endothels bei 6–8 Wochen alten C57BL/6J Wildtyptieren.

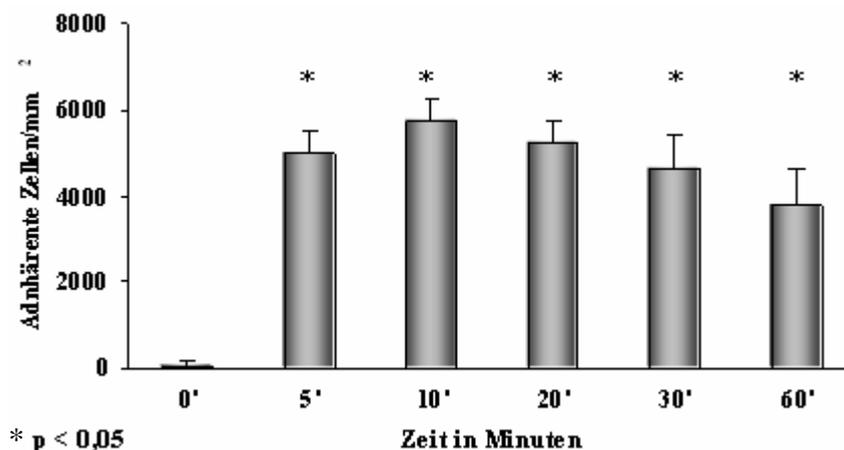


Abbildung 29: C57BL/6J Thrombozytenadhäsion nach Carotidenudation im Zeitverlauf (n = 11). * p < 0,05 vs. Basalwert 0 Minuten.

Abbildung 30 illustriert die Zunahme der Thrombusgröße im Zeitverlauf nach Carotidenudation.

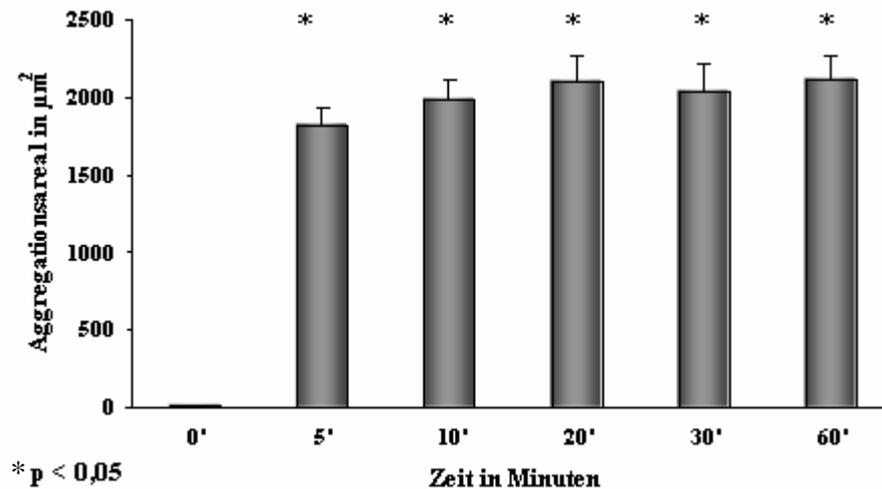


Abbildung 30: C57BL/6J Thrombusareal (μm^2) nach Carotidenudation im Zeitverlauf (n = 8). * $p < 0,05$ vs. Basalwert 0 Minuten.

Um die Leukozytenadhäsion u. -aggregation an die subendotheliale Matrix selektiv untersuchen zu können, werden *ex vivo* isolierte, gefärbte Leukozyten intravenös verabreicht und ihr Verhalten intravitalmikroskopisch beobachtet. Abbildung 31 illustriert den kontinuierlichen Anstieg der Leukozytenadhäsion an die subendotheliale Matrix.

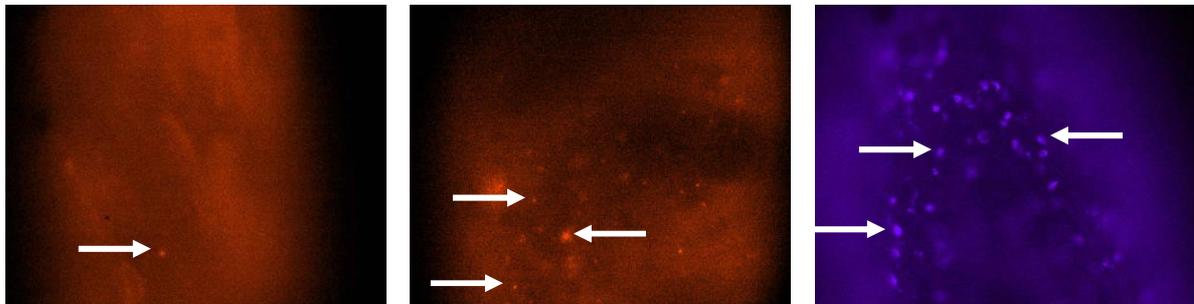


Abbildung 31: C57BL/6J Leukozytenadhäsion an der subendothelialen Matrix. Links: A. carotis communis vor Denudation bei 500-facher Originalvergrößerung (Kontrolle). Mitte u. rechts: A. carotis communis nach Denudation bei 500-facher Originalvergrößerung (Leukozytenadhäsion). Mitte u. links: TxRed-Filter: Rhodamin B gefärbte Leukozyten; Rechts: Fura 340-Filter: Hoechst (H3570) gefärbte Leukozyten (Pfeile deuten auf adhärenente Leukozyten).

Bereits fünf Minuten nach Freilegung der subendothelialen Matrix kommt es zu einer Leukozytenadhäsion (5 Min. 134 ± 6 LZ/mm²), die im Zeitverlauf minimal, aber kontinuierlich ansteigt (10 Min. 197 ± 31 LZ/mm²) und ihren Höhenpunkt 20 Minuten nach Denudation (20 Min. 248 ± 32 LZ/mm²) erreicht. Auf weitere Aufnahmen im Anschluss an diesen Zeitpunkt wurde verzichtet, da die Versuche zur Thrombozytendynamik zeigen konnten, dass bezüglich der Adhäsionsvorgänge vor allem die ersten zwanzig Minuten nach

Endothelverletzung von herausragender Bedeutung sind. Eine Leukozytenaggregation kann in diesem Zusammenhang nicht beobachtet werden.

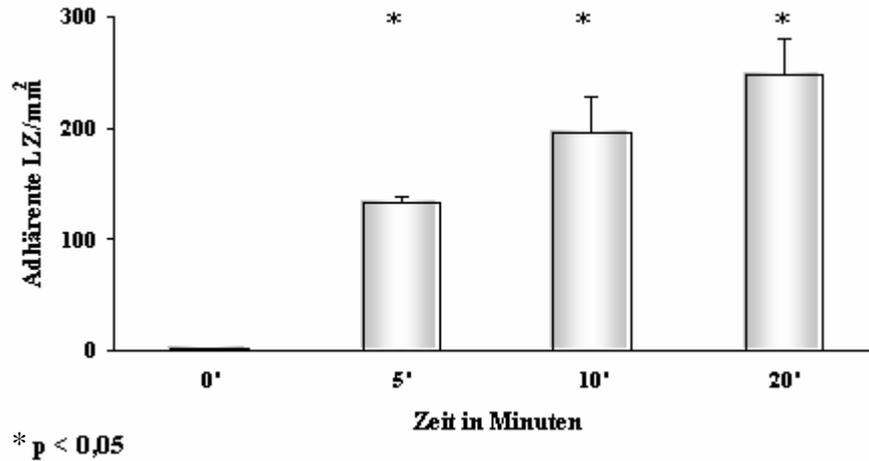


Abbildung 32: C57BL/6J Leukozytenadhäsion nach Carotidenudation im Zeitverlauf (n = 6). * p < 0,05 vs. Basalwert 0 Minuten.

Die unterschiedliche Dynamik der Thrombozyten- und Leukozytenadhäsion nach Endothelverletzung im arteriellen Hochdrucksystem wird in Abbildung 33 illustriert. Während sich im linken Bild die adhärennten Thrombozyten zahlreich darstellen und bereits Aggregate bilden, sind rechts lediglich vereinzelt adhärennte Leukozyten im Thrombus zu sehen.

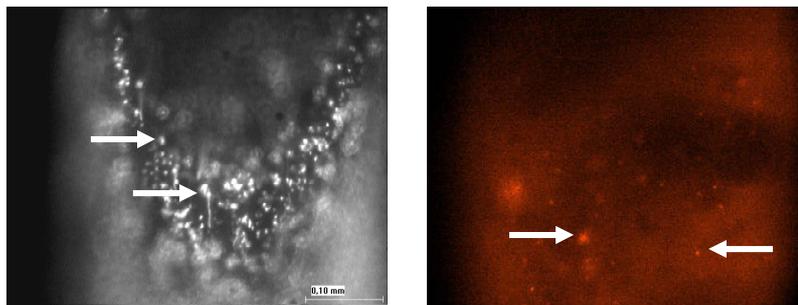


Abbildung 33: Gegenüberstellung der Thrombozyten- und Leukozytenadhäsion nach Carotidenudation bei Wildtyptieren. Links: Momentaufnahme adhärennten Thrombozyten 10 Minuten nach Denudation bei 500-facher Originalvergrößerung (DCF gefärbte Thrombozyten). Rechts: Momentaufnahme adhärennten Leukozyten 10 Minuten nach Denudation bei 500-facher Originalvergrößerung (TxRed-Filter: Rhodamin B gefärbte Leukozyten).

Die vergleichende Darstellung der Thrombozyten- und Leukozytenadhäsion in Abbildung 34 zeigt den massiven Anstieg der Thrombozytenadhäsion, wohingegen sich die Leukozytenadhäsion kaum verändert und auf einem deutlich niedrigeren Niveau abläuft.

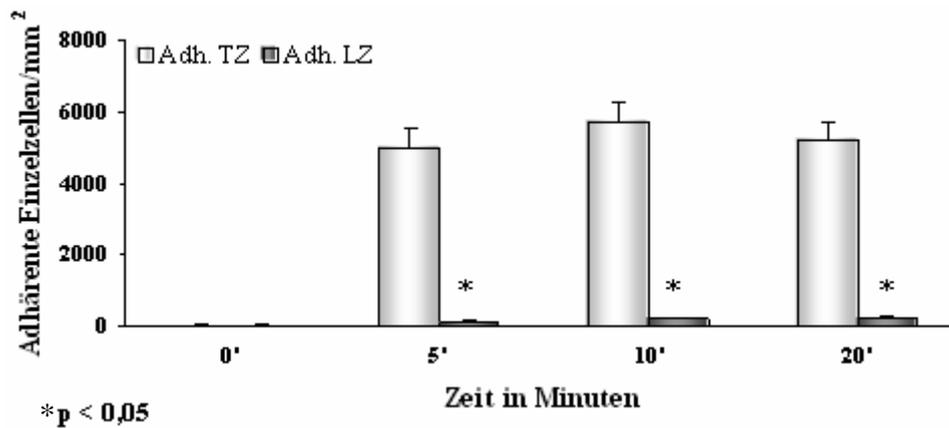


Abbildung 34: Gegenüberstellung der Thrombozyten- sowie Leukozytenadhäsion nach Carotisdenuation an der subendothelialen Matrix. * p < 0,05 adhärenzte LZ vs. Adhärenzte TZ.

4.1.1.2 Einfluss des GP-IIb-IIIa-Integrinrezeptors auf die Thrombozyten- sowie Leukozytenadhäsion u. -aggregation

GPIIb^{-/-}-Mäuse, die einen Defekt in der Thrombozytenadhäsion u. -aggregation aufweisen, entwickeln keine arterielle Thrombose nach Freilegung der subendothelialen Matrix. Die intravitalmikroskopischen Untersuchungen ergeben zum Zeitpunkt fünf Minuten nach Denudation eine um 70% verminderte Thrombozytenadhäsion (1504 ± 147 TZ/mm²) im Vergleich zu den Wildtyptieren sowie eine vollständig fehlende Thrombozytenaggregation. Nach anfänglicher Zunahme der Thrombozytenadhäsion (10 Min. 2048 ± 261 TZ/mm²; 20 Min. 2191 ± 337 TZ/mm²) fällt sie im weiteren Verlauf wieder etwas ab (30 Min. 1928 ± 279 TZ/mm²; 1 Std. 1978 ± 328 TZ/mm²). Die Abbildungen 35 und 36 illustrieren das deutlich reduzierte Adhäsionsverhalten im Vergleich zu Wildtyptieren (siehe Abb. 33 u. 48).

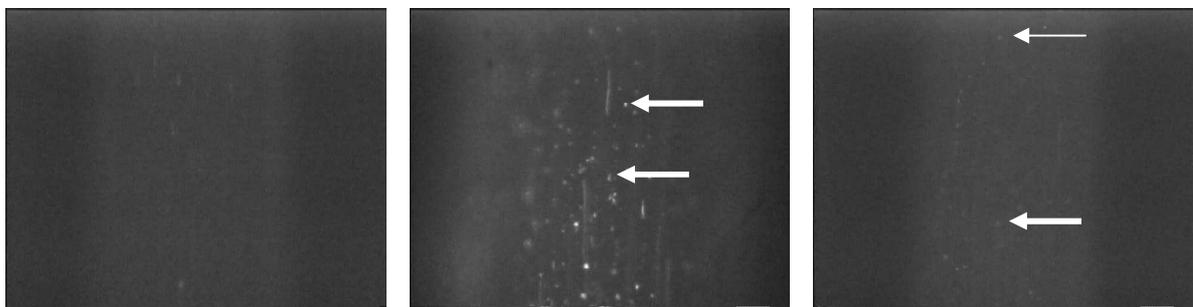


Abbildung 35: GPIIb^{-/-} Thrombozytenadhäsion an der subendothelialen Matrix. Links: A. carotis communis vor Denudation bei 250-facher Originalvergrößerung. Mitte: A. carotis communis nach Denudation bei 500-facher Vergrößerung (Thrombozytenadhäsion; Pfeile deuten auf adhärenzte Thrombozyten). Rechts: A. carotis communis nach Denudation bei 250-facher Vergrößerung (Darstellung der Thrombozytenadhäsion an der subendothelialen Matrix; Pfeil markiert adhärenzte Thrombozyten).

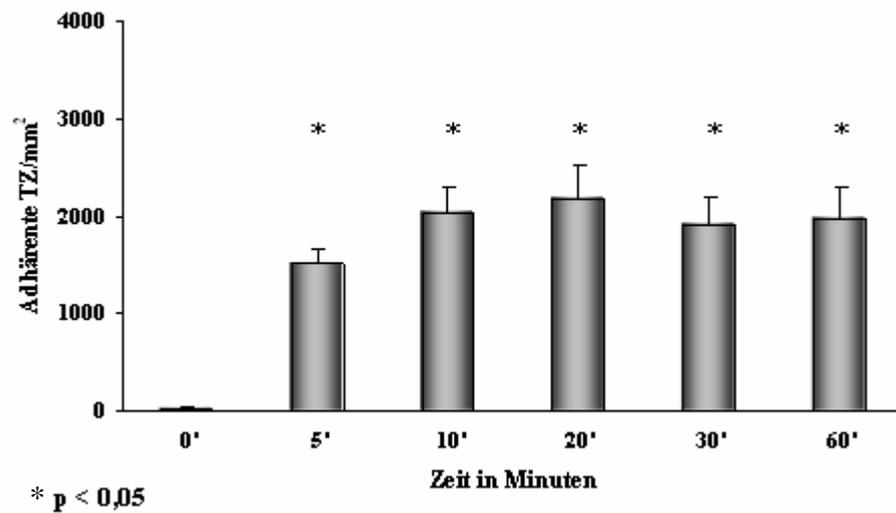


Abbildung 36: GPIIb^{-/-} Thrombozytenadhäsion nach Carotidenudation im Zeitverlauf (n = 5). * p < 0,05 vs. Basalwert 0 Minuten.

Auch die Leukozytenadhäsion ist bei GPIIb-IIIa defizienten Mäusen nach Endothelverletzung im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich, d.h. um 61%, reduziert (71 ± 13 LZ/mm²). Es kommt ähnlich der Thrombozytenadhäsion lediglich zu einem Anhaften einzelner Zellen an der subendothelialen Matrix bei vollständig fehlender Aggregation. Von anfänglichen (5 Min. post Den.) 71 ± 13 LZ/mm² nehmen die adhärenen Zellen nach zehn Minuten auf 101 ± 18 LZ/mm² und schließlich nach dreißig Minuten auf 114 ± 21 LZ/mm² zu (siehe Abbildung 38). Abbildung 37 stellt die reduzierte Leukozytenadhäsion bei GPIIb^{-/-}-Tieren heraus.

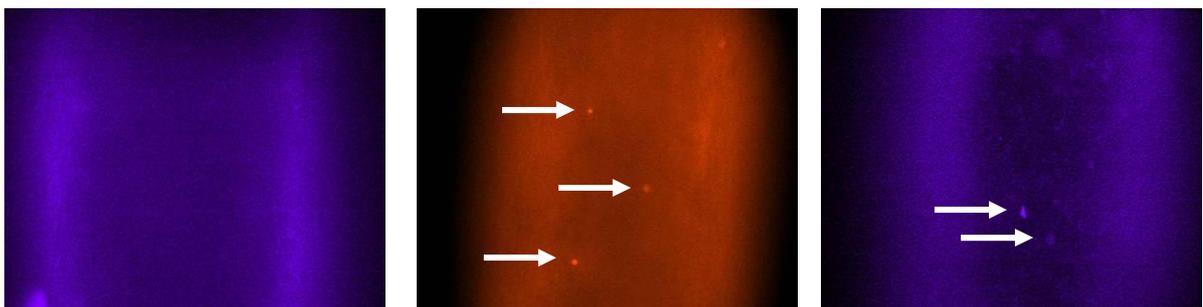


Abbildung 37: GPIIb^{-/-} Leukozytenadhäsion an der subendothelialen Matrix. Links: A. carotis communis vor Denudation bei 500-facher Vergrößerung (Kontrolle) ohne Leukozytenadhäsion. (Fura 340-Filter: Hoechst (H3570) gefärbte Leukozyten). Mitte u. rechts: A. carotis communis nach Denudation bei 500-facher Vergrößerung 10 Minuten nach Denudation (vereinzelte Leukozytenadhäsion) (Pfeile deuten auf adhärenen Leukozyten). Mitte: TxRed-Filter: Rhodamin B gefärbte Leukozyten; Rechts: Fura 340-Filter: Hoechst (H3570) gefärbte Leukozyten (Pfeile deuten auf adhärenen Leukozyten).

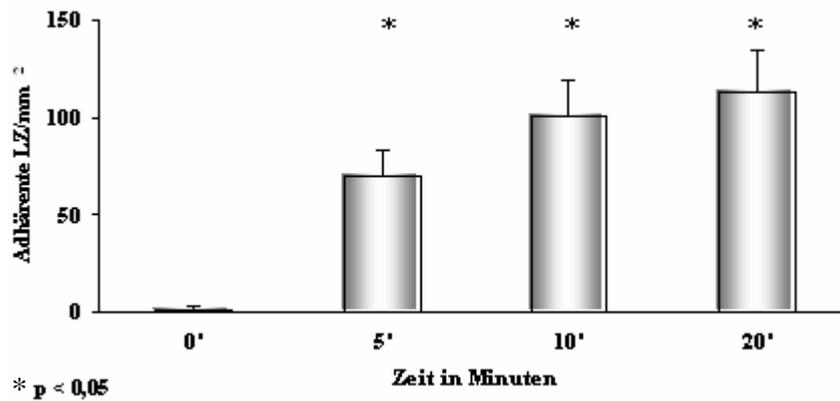


Abbildung 38: GPIIb^{-/-} Leukozytenadhäsion nach Carotidenudation im Zeitverlauf (n = 4). * p < 0,05 vs. Basalwert 0 Minuten.

In Abbildung 38 wird das Adhäsionsverhalten von Leukozyten dargestellt. Abbildung 39 veranschaulicht das deutlich herabgesetzte Adhäsionsverhalten sowohl von Thrombozyten, als auch der Leukozyten, bei GPIIb^{-/-}-Tieren. Links im Bild stellen sich wenige anhaftende einzelne Thrombozyten dar. Im Vergleich dazu handelt es sich rechts im Bild bei der Leukozytenadhäsion am Subendothel um eine noch geringere Zellzahl.

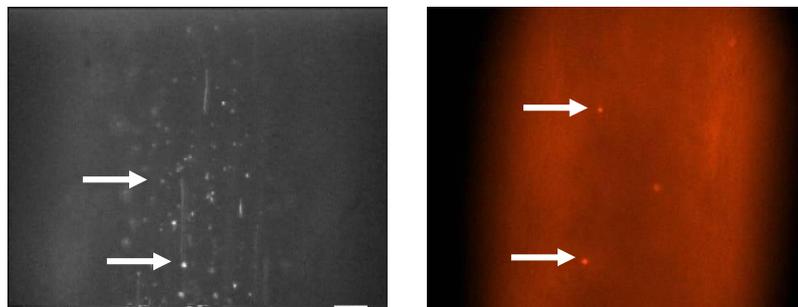


Abbildung 39: Gegenüberstellung der Thrombozyten- und Leukozytenadhäsion nach Carotidenudation bei GPIIb-IIIa defizienten Tieren. Links: Momentaufnahme adhärenter Thrombozyten 10 Minuten nach Denudation bei 500-facher Vergrößerung (DCF gefärbte Thrombozyten). Rechts: Momentaufnahme adhärenter Leukozyten 10 Minuten nach Denudation bei 500-facher Vergrößerung (TxRed-Filter: Rhodamin B gefärbte Leukozyten).

Die vergleichende Darstellung der Thrombozyten- und Leukozytenadhäsion in Abbildung 40 zeigt den raschen, verhältnismäßig starken Anstieg der Thrombozytenadhäsion, wohingegen die Leukozytenadhäsion kaum Dynamik aufweist und auf einem weitaus niedrigeren Level stagniert. Im Gegensatz zu oben dargestellten Werten in Wildtyp-tieren (siehe Abschnitt 4.1.1.1) führt der Verlust von GPIIb-IIIa zu einer deutlich reduzierten Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten sowie zu einer verminderten Leukozytenakkumulation.

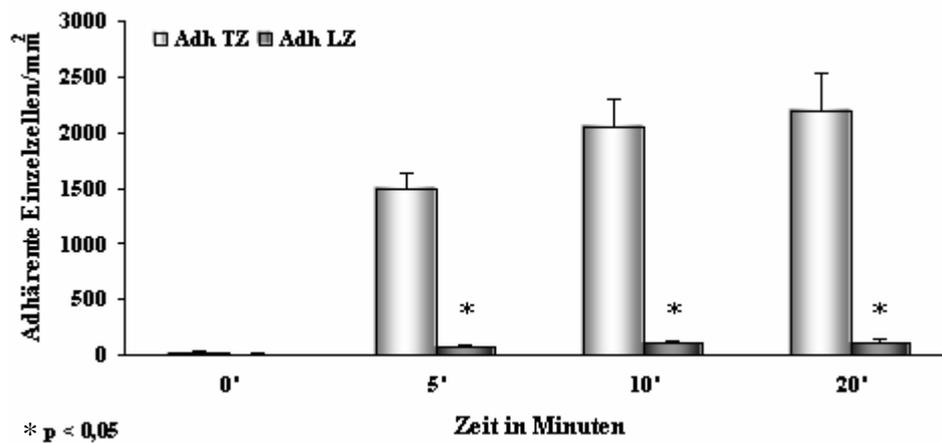


Abbildung 40: Gegenüberstellung der Thrombozyten- sowie Leukozytenadhäsion bei GPIIb-IIIa defizienten Tieren nach Carotidenudation an der subendothelialen Matrix. * p < 0,05 adhärente Leukozyten vs. Thrombozyten.

4.1.1.3 Einfluss des Membranglykoproteins P-Selektin auf die Thrombozyten- sowie Leukozytenadhäsion u. -aggregation

Anders als der Verlust von GPIIb wirkt sich der P-Selektin-Defekt initial kaum auf das Thrombozyten- u. Leukozytenverhalten in der arteriellen Thrombose aus. Die Thrombozytenadhäsion (siehe Graph in Abbildung 42) steigt im Vergleich zum Basalwert rapide innerhalb weniger Minuten signifikant (*) auf 5433 ± 770 TZ/mm² an und fällt anschließend infolge rascher Embolisierung wieder ab (10 Min. 4795 ± 409 TZ/mm²; 20 Min. 4855 ± 542 TZ/mm²; 30 Min. 3170 ± 590 TZ/mm²; 1 Std. 3228 ± 815 TZ/mm²). Bereits 30 Minuten nach Denudation zeigt sich eine signifikante Abnahme der Thrombozytenadhäsion im Vergleich zu den Werten 5 Minuten (°) nach der Verletzung. Die bei P-Selektin^{-/-} entstehenden Thromben waren im Vergleich zu Wildtyp-Thromben deutlich instabil. Abbildung 41 veranschaulicht die schnelle Entstehung eines arteriellen Thrombus in P-Selektin^{-/-}-Mäusen, sowie dessen Instabilität und Embolisierungsneigung.

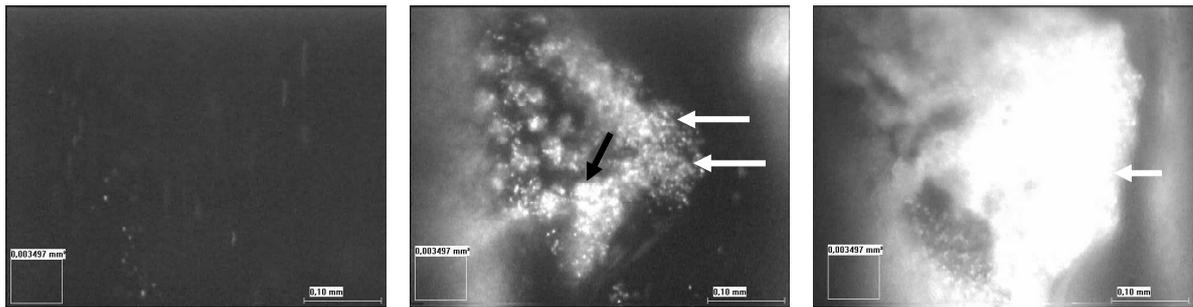


Abbildung 41: P-Selektin^{-/-} Thrombozytenadhäsion und -aggregation an der subendothelialen Matrix. Links: A. carotis communis vor Denudation bei 250-facher Originalvergrößerung. Mitte: A. carotis communis nach Denudation bei 500-facher Originalvergrößerung 5 Minuten nach Denudation (Thrombozytenadhäsion und beginnende Aggregation; weiße Pfeile deuten auf adhärenente Thrombozyten; schwarzer Pfeil bezeichnet beginnende Thrombenbildung). Rechts: A. carotis communis nach Denudation bei 500-facher Originalvergrößerung 10 Minuten nach Denudation (Darstellung der Thrombusausdehnung/Thrombozytenaggregation an der subendothelialen Matrix; Pfeil markiert Thrombus).

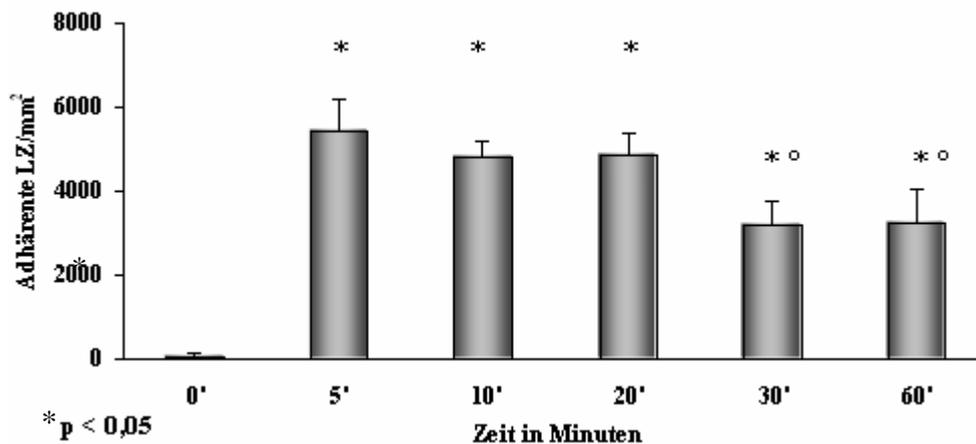


Abbildung 42: P-Selektin^{-/-} Thrombozytenadhäsion nach Carotidenudation im Zeitverlauf (n = 7). * p < 0,05 vs. Basalwert 0 Minuten; ° p < 0,05 vs. 5 Minuten.

Das Aggregationsverhalten (5 Min. $1790,3 \pm 137,3 \mu\text{m}^2$; 10 Min. $1833 \pm 259,7 \mu\text{m}^2$; 20 Min. $1662,7 \pm 242,1 \mu\text{m}^2$; 30 Min. $1463,4 \pm 260,8 \mu\text{m}^2$; 1 Std. $1290,1 \pm 289,6 \mu\text{m}^2$) weist kaum Unterschiede im Vergleich zu den Wildtyptieren auf (siehe Graph in Abbildung 43).

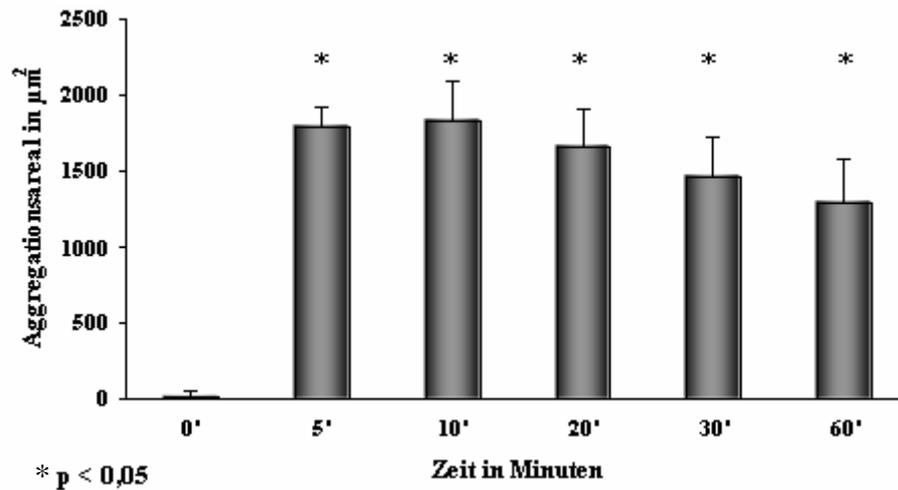


Abbildung 43: P-Selektin^{-/-} Thrombusareal (μm^2) nach Carotidenudation im Zeitverlauf (n = 7). * $p < 0,05$ vs. Basalwert 0 Minuten.

In Abbildung 44 stellt sich die Leukozytenadhäsion (Bild mitte und rechts) nach Gefäßverletzung, verglichen mit der unverletzten Arterie (Bild links) dar. 138 ± 15 LZ/mm² haften fünf Minuten nach Freilegung der subendothelialen Matrix an. Ihre Zahl steigert sich zehn Minuten nach Denudation signifikant (*) auf $185,9 \pm 15,6$ LZ/mm² und schließlich nach zwanzig Minuten auf $198,9 \pm 13,8$ LZ/mm². Die absolute Zahl adhärenter Leukozyten war zu allen Zeitpunkten signifikant geringer als bei Wildtyptieren. Ein Vergleich zwischen den verschiedenen Zeitpunkten lässt einen signifikanten Anstieg der Leukozytenzahlen 10 und 20 Minuten in Relation zu 5 Minuten nach Verletzung erkennen (siehe Graph in Abbildung 45).

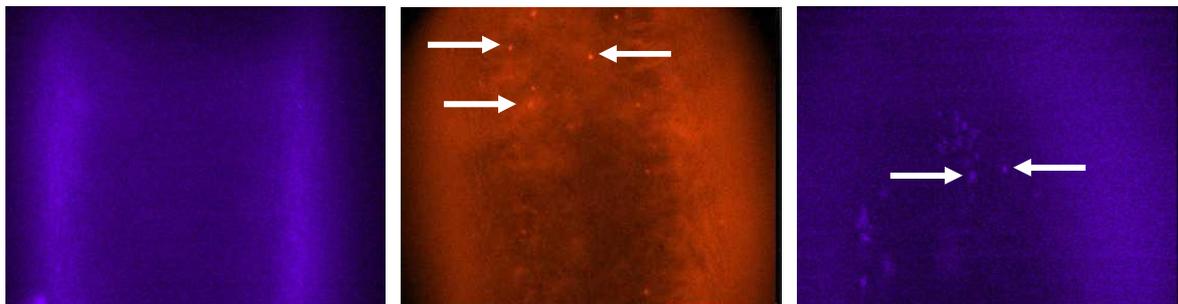


Abbildung 44: P-Selektin^{-/-} Leukozytenadhäsion nach Gefäßverletzung. Links: A. carotis communis vor Denudation bei 500-facher Originalvergrößerung (Kontrolle) ohne Leukozytenadhäsion. (Fura 340-Filter: Hoechst (H3570) gefärbte Leukozyten). Mitte u. rechts: A. carotis communis nach Denudation bei 500-facher Originalvergrößerung 10 Minuten nach Denudation (vereinzelte Leukozytenadhäsion) (Pfeile deuten auf adhärenente Leukozyten). Mitte: TxRed-Filter: Rhodamin B gefärbte Leukozyten; Rechts: Fura 340-Filter: Hoechst (H3570) gefärbte Leukozyten (Pfeile deuten auf adhärenente Leukozyten).

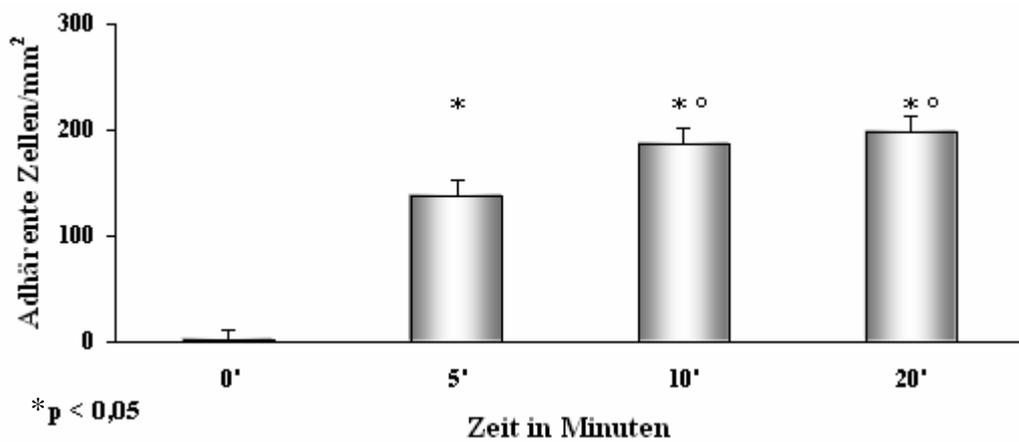


Abbildung 45: P-Selektin^{-/-} Leukozytenadhäsion nach Carotisdenuation im Zeitverlauf (n = 2). * p < 0,05 vs. Basalwert 0 Minuten; ° p < 0,05 vs. 5 Minuten.

Abbildung 46 sowie der Graph in Abbildung 47 illustrieren die massive Thrombozytenadhäsion im Vergleich zu der nur moderaten Leukozytenbindung im Rahmen der arteriellen Thrombose.

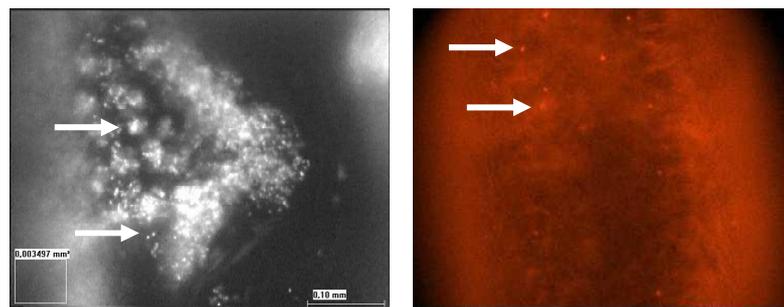


Abbildung 46: Gegenüberstellung der Thrombozyten- (links) und Leukozytenadhäsion (rechts) nach Carotisdenuation bei P-Selektin defizienten Tieren.

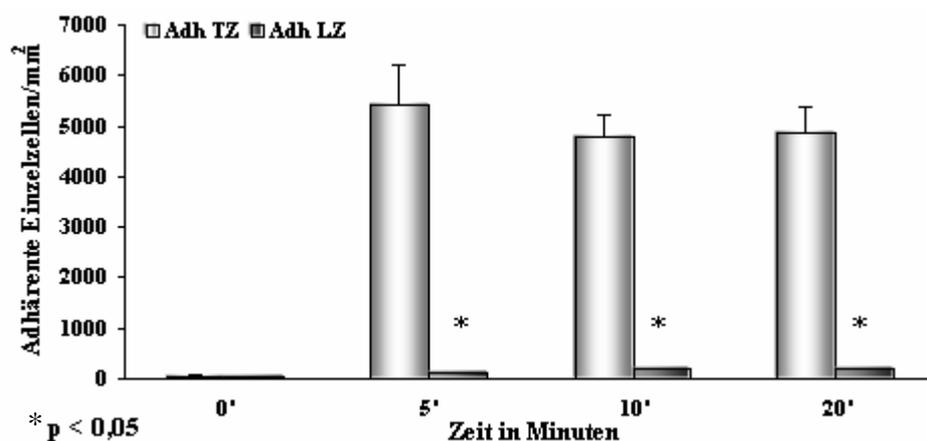


Abbildung 47: Gegenüberstellung der Thrombozyten- sowie Leukozytenadhäsion bei P-Selektin^{-/-} Tieren nach Carotisdenuation. * p < 0,05 adhäreente Leukozyten vs. adhäreente Thrombozyten.

4.1.1.4 Differentielle Bedeutung von GPIIb und P-Selektin für die Rekrutierung von Thrombozyten und Leukozyten in der *A. carotis communis*

Um die Bedeutung der einzelnen Rezeptoren zu veranschaulichen, erfolgt nachfolgend eine Gegenüberstellung der oben erläuterten Ergebnisse. Abbildung 48 und 49 illustrieren die Thrombozytenadhäsion bei Wildtyptieren, GPIIb- und P-Selektin Knock-out-Tieren. Der Verlust von P-Selektin bewirkt verglichen mit den ermittelten Kontrollwerten eine deutlich reduzierte Adhäsion von Leukozyten, bei initial unveränderter Adhäsion von Thrombozyten. Bedingt durch den P-Selektin-Defekt bildet sich ein stark instabiler Thrombus, der zur Embolisierung neigt. Dagegen induziert der Verlust von GPIIb eine signifikant reduzierte Thrombozytenadhäsion bei vollständig fehlender Aggregation.

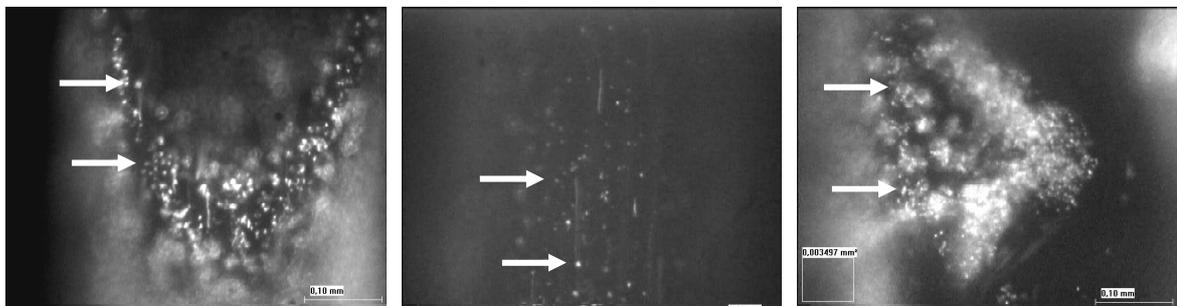


Abbildung 48: Gegenüberstellung der Thrombozytenadhäsion der verschiedenen Tierstämme 5 Minuten nach Endothelverletzung bei 500-facher Originalvergrößerung. Links: Thrombozytenadhäsion bei C57BL/6J Wildtypieren. Mitte: Vereinzelte Thrombozytenadhäsion bei GPIIb^{-/-} Tieren. Rechts: Thrombozytenadhäsion bei P-Selektin^{-/-} Tieren.

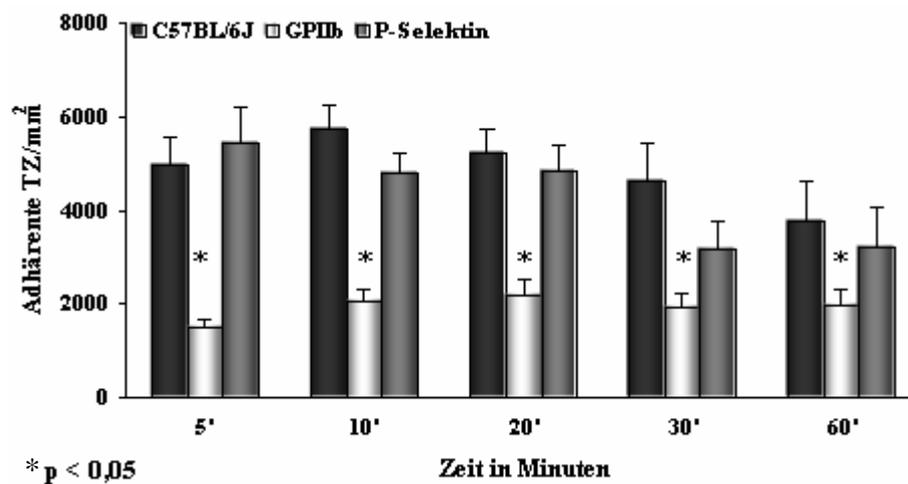


Abbildung 49: Gegenüberstellung der Thrombozytenadhäsion (Einzelzellen/mm²) von C57BL/6J, GPIIb^{-/-} und P-Selektin^{-/-} nach Carotidenudation im Zeitverlauf. * $p < 0,05$ vs C57BL/6J und P-Selektin^{-/-}.

Während die Kontrollen einen starken initialen Anstieg der Thrombozytenaggregation zeigen führt der Mangel an P-Selektin zu einer deutlichen Instabilität der sich bildenden Thromben, was eine starke Embolisierung nach sich zieht. Der Graph in Abbildung 51 veranschaulicht den massiven Anstieg der Aggregation bereits in den ersten 5 Minuten nach Endothelverletzung. Zudem macht er den Abfall der Aggregationsareale durch Embolisierung bei P-Selektin^{-/-}-Mäusen 20 Minuten nach Denudation deutlich. Verglichen mit diesen beiden Stämmen weisen GPIIb Knock-out Mäuse keinerlei Thrombozytenaggregation auf, was in Abbildung 50 und 51 herausgestellt wird.

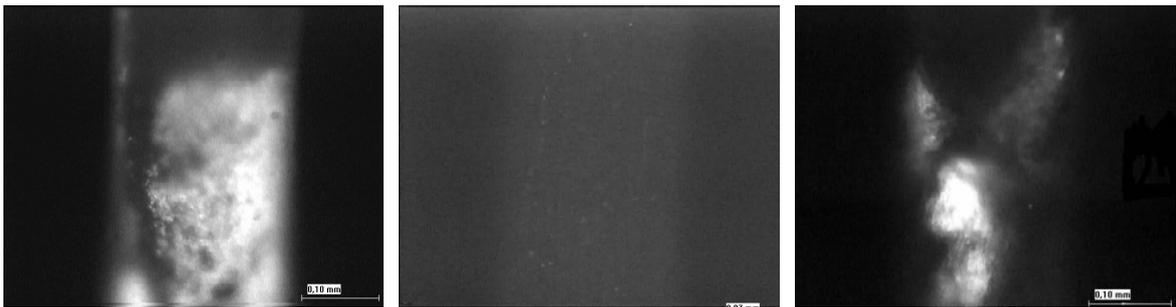


Abbildung 50: Gegenüberstellung der Thrombozytenaggregation der verschiedenen Tierstämme nach Endothelverletzung bei 250-facher Vergrößerung. Links: Thrombozytenaggregation bei C57BL/6J Wildtyp-Tieren. Mitte: Fehlende Thrombozytenaggregation bei GPIIb^{-/-} Tieren. Rechts: Thrombozytenaggregation bei P-Selektin^{-/-} Tieren.

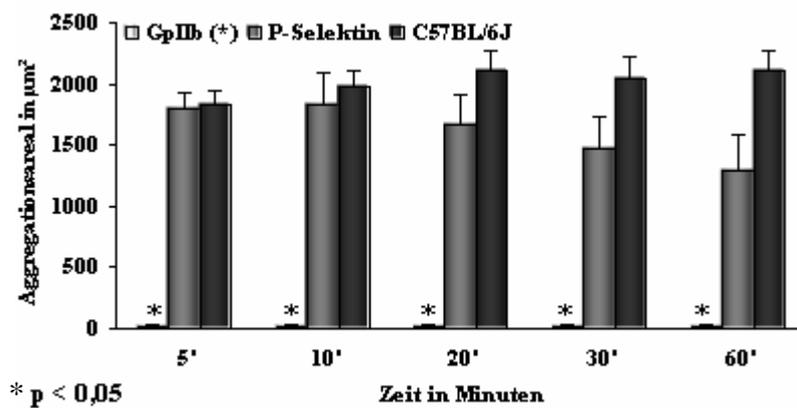


Abbildung 51: Gegenüberstellung der Thrombozytenaggregation (μm^2) nach Carotidenudation im Zeitverlauf. * $p < 0,05$ vs. C57BL/6J und P-Selektin^{-/-}.

Ein Vergleich der Leukozytenadhäsion zwischen diesen drei Stämmen weist Parallelen zwischen Wildtyp- und P-Selektin^{-/-} Mäusen, sowie deutliche Unterschiede zu GPIIb^{-/-} Tieren auf (Abbildung 52 und 53). Die starke kontinuierliche Zunahme der Leukozytenadhäsion bei Wildtypmäusen vollzieht sich bei P-Selektin Knock-out Tieren nur moderat, wodurch 20 Minuten nach Verletzung ein signifikanter Unterschied im Adhäsionsverhalten zwischen diesen beiden Stämmen zu verzeichnen ist (Abbildung 53). Im Gegensatz hierzu zeigen GPIIb^{-/-} Tiere eine signifikant reduzierte Leukozytenadhäsion (siehe Abbildung 52).

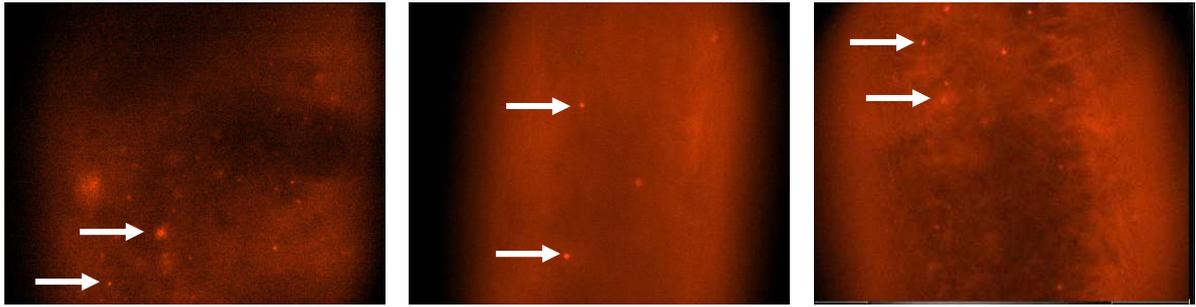


Abbildung 52: Gegenüberstellung der Leukozytenadhäsion der verschiedenen Tierstämme nach Endothelverletzung bei 500-facher Originalergrößerung. Links: Leukozytenadhäsion bei C57BL/6J Wildtyptieren. Mitte: Vereinzelte Leukozytenadhäsion bei GPIIb^{-/-} Tieren. Rechts: Leukozytenadhäsion bei P-Selektin^{-/-} Tieren.

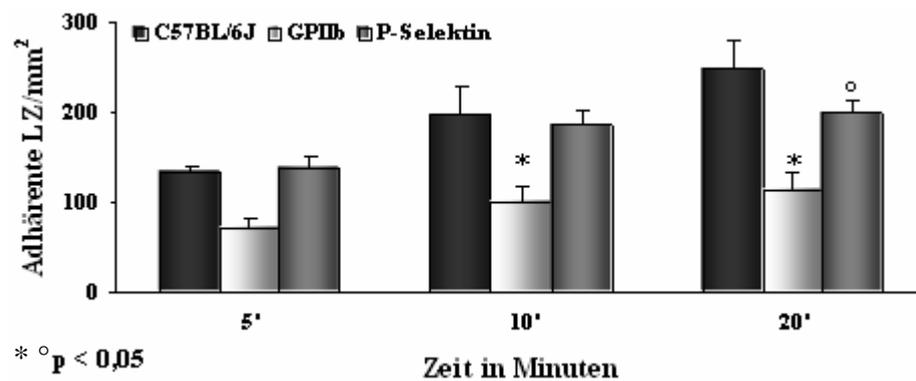


Abbildung 53: Gegenüberstellung der Leukozytenadhäsion (Einzelzellen/mm²) von C57BL/6J, GPIIb^{-/-} und P-Selektin^{-/-} nach Carotidenudation im Zeitverlauf. * ° p < 0,05 vs C57BL/6.

4.1.2 Venöse Thrombose

4.1.2.1 Thrombozytenadhäsion u. -aggregation

4.1.2.1.1 Ermittlung der Kontrollwerte für Thrombozytenadhäsion u. -aggregation im Rahmen der venösen Thrombose

C57BL/6J Wildtypiere zeigen initial eine Thrombozytenadhäsion von 445 ± 127 TZ/mm², die anschließend 2 Stunden nach Ligatur einen moderaten Anstieg auf 570 ± 126 TZ/mm² und schließlich nach 5 und 6 Stunden auf 825 ± 255 TZ/mm² sowie 775 ± 316 TZ/mm² erfährt. Die Werte zeigen zu jedem Zeitpunkt einen statistisch signifikanten Unterschied verglichen mit dem Basalwert (in Abbildung 54 gekennzeichnet mit *). Eine Thrombozytenaggregation kann zu keinem Zeitpunkt festgestellt werden.

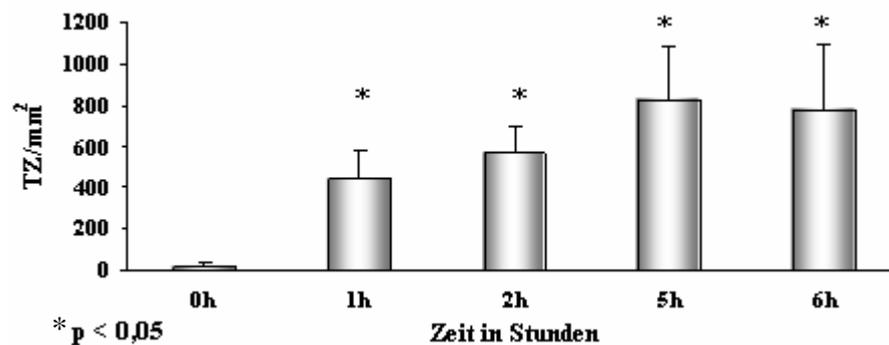


Abbildung 54: Thrombozytenadhäsion in der V. cava in C57BL/6J Kontrolltieren (n = 3) im Zeitverlauf (6h). * p < 0,05 vs. Basalwert 0 Minuten.

4.1.2.1.2 Einfluss des GPIIb-IIIa-Integrinrezeptors auf die Thrombozytenadhäsion u. -aggregation im Rahmen der venösen Thrombose

Im Gegensatz zu den oben dargestellten Werten der Thrombozytenadhäsion in Wildtypieren, bewirkt ein Defizit des GPIIb-IIIa-Integrinrezeptors eine deutliche Reduktion der Thrombozytenadhäsion bei vollständig fehlender Aggregation (nicht dargestellt). Wie in Abbildung 55 anschaulich dargestellt, findet die Adhäsion auf sehr niedrigem Niveau bei geringer Varianz der Werte untereinander statt (49 ± 3 TZ/mm²; 70 ± 7 TZ/mm²; 76 ± 6 TZ/mm²; 68 ± 4 TZ/mm²).

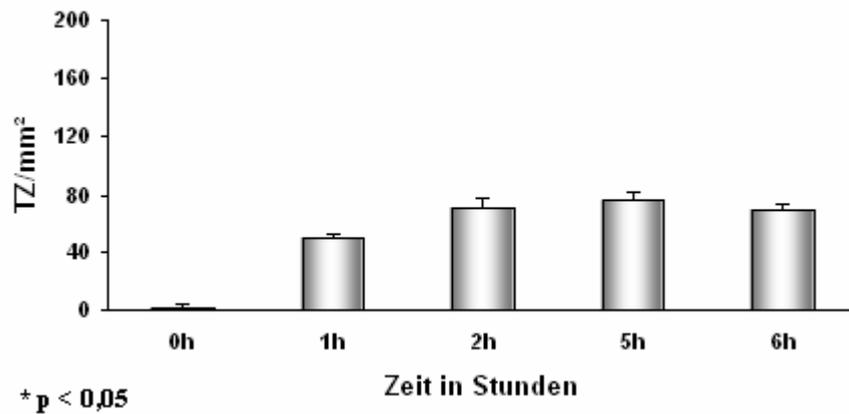


Abbildung 55: Thrombozytenadhäsion in der V. cava in GPIIb defizienten Tieren (n = 3) im Zeitverlauf (6h).

4.1.2.1.3 Einfluss des Membranglykoproteins Tissue Faktor auf die Thrombozytenadhäsion u. -aggregation im Rahmen der venösen Thrombose

Die Daten zu den Versuchen mit Tissue Faktor defizienten Tieren (Low TF-Tiere) sind vergleichbar mit denen der Wildtypiere. Bei fehlender Aggregation zeigen sie 1 Stunde nach Ligatur einen Anstieg der thrombozytären Adhäsion auf 37 ± 4 TZ/mm², der 2 Stunden nach Ligatur etwas abfällt (30 ± 6 TZ/mm²). 5 und 6 Stunden nach Stromverlangsamung steigen die Werte erneut auf 46 ± 1 TZ/mm² sowie $56 \pm 2,5$ TZ/mm² an (siehe Graph in Abbildung 56).

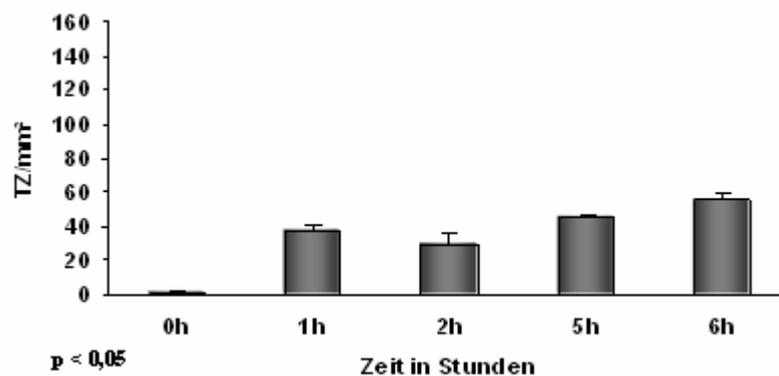


Abbildung 56: Thrombozytenadhäsion in der V. cava in Low TF Tieren im Zeitverlauf (6h) (n = 2).

4.1.2.2 Leukozytenadhäsion u. -koaggregation

4.1.2.2.1 Ermittlung der Kontrollwerte für Leukozytenadhäsion u. -koaggregation

Abbildung 57 illustriert das Leukozytenverhalten in der V. cava im Zeitverlauf bei C57BL/6J Kontrolltieren. Sowohl die Anzahl adhärenter als auch rollender Leukozyten pro mm² Gefäßfläche wird ermittelt. Da hierfür eine *in vivo* Färbung von Leukozyten mit Rhodamin 6G verwendet wurde (im Gegensatz zur *ex vivo* Färbung von isolierten Leukozyten im Rahmen der Versuche zur arteriellen Thrombose), wird nicht nur eine Fraktion, sondern alle Leukozyten angefärbt und erfasst. Anfänglich rollen 3488 ± 713 LZ/mm²/min über das Endothel. Ihre Zahl sinkt nach 2, 5 und 6 Stunden stetig auf 2234 ± 526 LZ/mm²/min, 970 ± 304 LZ/mm²/min und 1425 ± 260 LZ/mm²/min ab, da die Leukozyten zunehmend am Endothel adhären werden. Dementsprechend nimmt die Zahl adhärenter Leukozyten im Zeitverlauf kontinuierlich zu (3883 ± 1263 LZ/mm², 5029 ± 1269 LZ/mm², 10804 ± 1062 LZ/mm², 11869 ± 166 LZ/mm²). Verglichen mit dem Basalwert zeigt das Adhäsionsverhalten der Leukozyten zu jedem Zeitpunkt einen signifikanten Anstieg (*). Auch 5 und 6 Stunden nach Ligatur ist ein signifikanter Anstieg, bezogen auf den Wert 1 Stunde nach Ligatur, zu verzeichnen (°).

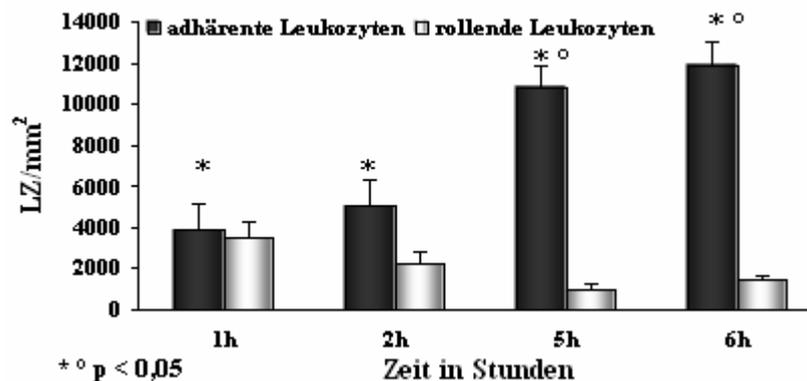


Abbildung 57: Leukozytenverhalten in der V. cava in C57BL/6J Wildtypieren im Zeitverlauf (6h) (n = 10); adhärenter Leukozyten (n/mm²), rollende LZ (n/mm²/min). * p < 0,05 vs. Basalwert 0 Stunden; ° p < 0,05 vs. 1 Stunde.

Wie in Abbildung 58 illustriert, ergibt die Gegenüberstellung der adhärenter Thrombozyten- und Leukozytenzahlen einen signifikanten Unterschied zwischen Thrombozyten- und Leukozytenadhäsion in der V. cava bezogen auf die jeweiligen Zeitpunkte (*).

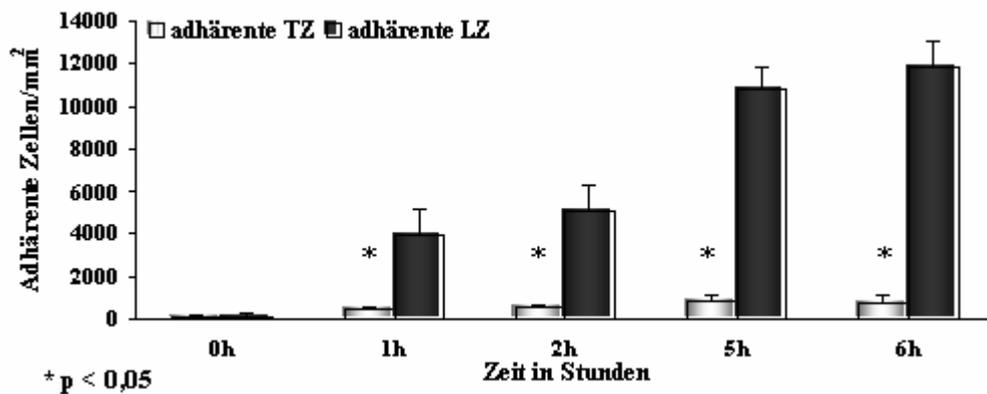


Abbildung 58: Gegenüberstellung der Thrombozyten- und Leukozytenadhäsion in der V. cava im Zeitverlauf (6h) bei Wildtyptieren. * p < 0,05 adhärente Leukozyten vs. adhärente Thrombozyten.

Mit zunehmender Leukozytenadhäsion kommt es zugleich zu einem kontinuierlichen Anstieg der Leukozytenkoaggregation im Zeitverlauf von 2286 ± 779 ; über 2961 ± 1108 ; 6199 ± 1434 auf $13367 \pm 4777 \mu\text{m}^2$ (siehe Graph in Abbildung 59).

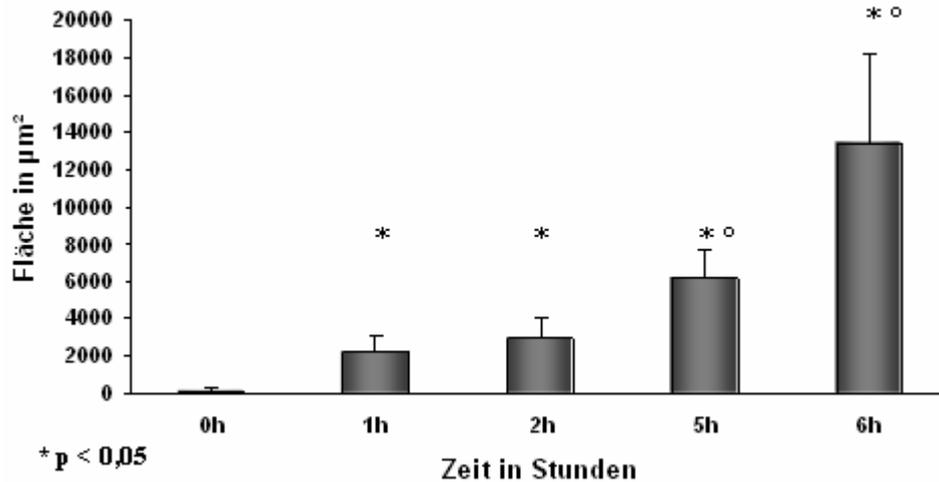


Abbildung 59: Leukozytenkoaggregation in der V. cava im Zeitverlauf (6h) bei Wildtyptieren (n = 10). * p < 0,05 vs. Basalwert 0 Stunden; [°] p < 0,05 vs 1 Stunde.

4.1.2.2.2 Einfluss des GPIIb-IIIa-Integrinrezeptors auf die Leukozytenadhäsion u. -koaggregation

Die Untersuchungen zur frühen Phase der venösen Thrombosierung (6 Stunden) in Tieren mit GPIIb-IIIa-Integrinrezeptordefekt zeigen kaum Unterschiede im leukozytären Adhäsions- und koaggregationsverhalten im Vergleich zu C57BL/6J-Tieren. Wie bei Wildtypmäusen nimmt die Zahl rollender Leukozyten im Zeitverlauf kontinuierlich ab ($8562,5 \pm 1474,5$ LZ/mm²/min; $6875,0 \pm 985,0$ LZ/mm²/min; $1900 \pm 811,8$ LZ/mm²/min; $1687,5 \pm 872,2$ LZ/mm²/min), wohingegen die Anzahl adhärenter Leukozyten stetig zunimmt ($6606,3 \pm 1083,0$ LZ/mm²; $7334,4 \pm 1819,6$ LZ/mm²; $11825,0 \pm 786,6$ LZ/mm² $16050,0 \pm 1545,7$ LZ/mm²). Verglichen mit dem Basalwert zeigen alle untersuchten Zeitpunkte einen signifikanten Anstieg (*). Der Wert 6 Stunden nach Ligatur unterscheidet sich signifikant von den Werten 1, 2 und 5 Stunden nach Ligatur (°), der Wert 5 Stunden nach Ligatur weist einen signifikanten Unterschied zu den 1 und 2 Stunden Werten auf (°) (siehe Graph in Abbildung 60).

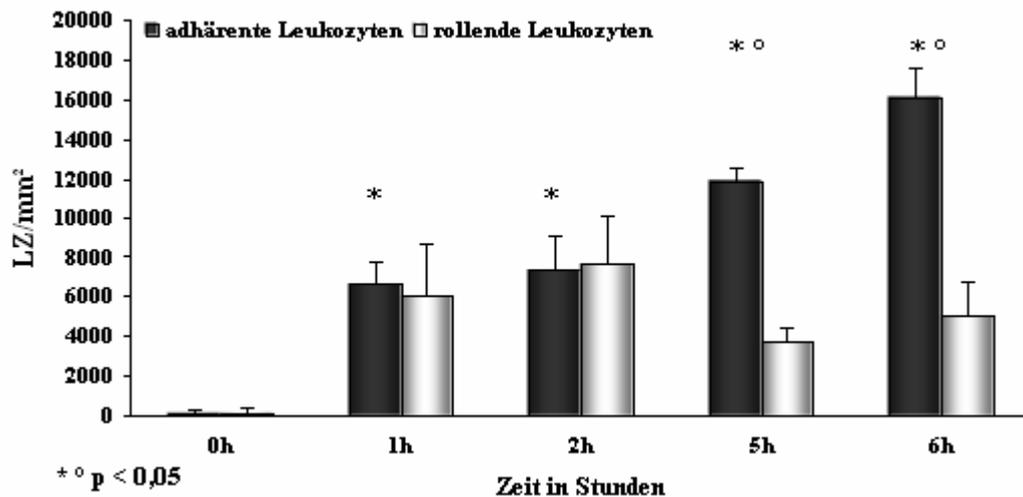


Abbildung 60: Leukozytenverhalten in der V. cava in GPIIb Knock-out-Tieren im Zeitverlauf (6h); adhären LZ (n/mm²); rollende LZ (n/mm²/min). * p < 0,05 vs. Basalwert 0 Stunden; ° p < 0,05 vs. 1, 2 bzw. 1, 2 und 5 Stunden.

Wie bei Wildtyptieren kommt es auch bei GPIIb Knock-out-Tieren mit fortschreitender Zeit zu zunehmender Leukozytenkoaggregation. Abbildung 61 veranschaulicht den Zuwachs des Leukozytenkoaggregats in μm^2 von 2187 ± 698 ; über 4088 ± 982 ; 7580 ± 952 auf 9928 ± 831 . Hierbei besteht ein signifikanter Unterschied sowohl zwischen allen Zeitpunkten und dem Basalwert, als auch zwischen dem 6, 5 und 2 Stunden Wert zu den Werten nach einer Stunde.

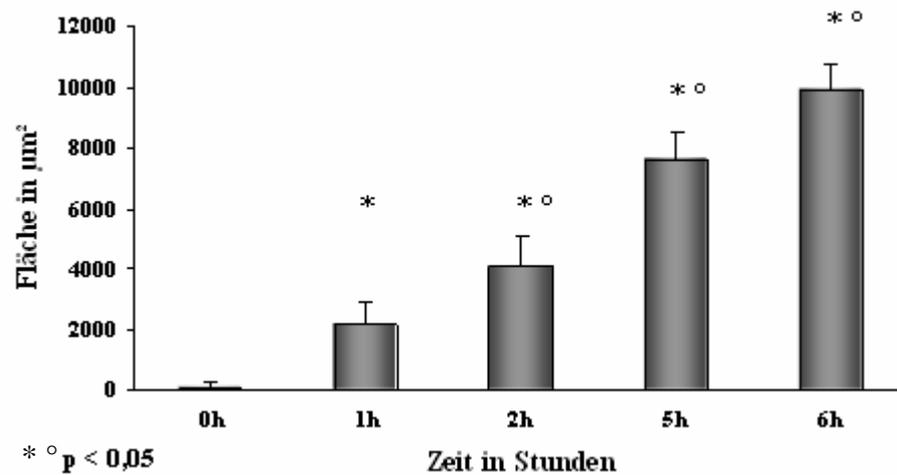


Abbildung 61: Leukozytenkoaggregation in der V. cava im Zeitverlauf (6h) bei GPIIb Knock-out-Tieren (n = 4). * $p < 0,05$ vs. Basalwert 0 Stunden; [°] $p < 0,05$ vs. 1 bzw. 2 Stunden.

4.1.2.2.3 Einfluss des Membranproteins P-Selektin auf die Leukozytenadhäsion u. -koaggregation

Das Membranprotein P-Selektin übt großen Einfluss auf die Leukozytenadhäsion sowie deren Aggregation im Rahmen der venösen Thrombose aus. Abbildung 62 illustriert die moderate, aber signifikante Zunahme adhärenter Leukozyten im Zeitverlauf von 81 ± 24 LZ/mm² über 93 ± 22 LZ/mm², 96 ± 11 LZ/mm² auf 173 ± 30 LZ/mm² gegenüber dem Basalwert von 1 ± 3 LZ/mm². Der Wert 6 Stunden nach Ligatur zeigt zudem einen signifikanten Unterschied zu den Werten 1, 2 und 5 Stunden nach Ligatur. Die Anzahl, der über das Endothel rollender Leukozyten steigt von 64 ± 19 LZ/mm²/min auf 71 ± 27 LZ/mm²/min und 143 ± 42 LZ/mm²/min 5 und 6 Stunden nach Induktion der Stase an. Leukozytenkoaggregation kann bei P-Selektin defizienten Tieren in der initialen Phase nicht beobachtet werden.

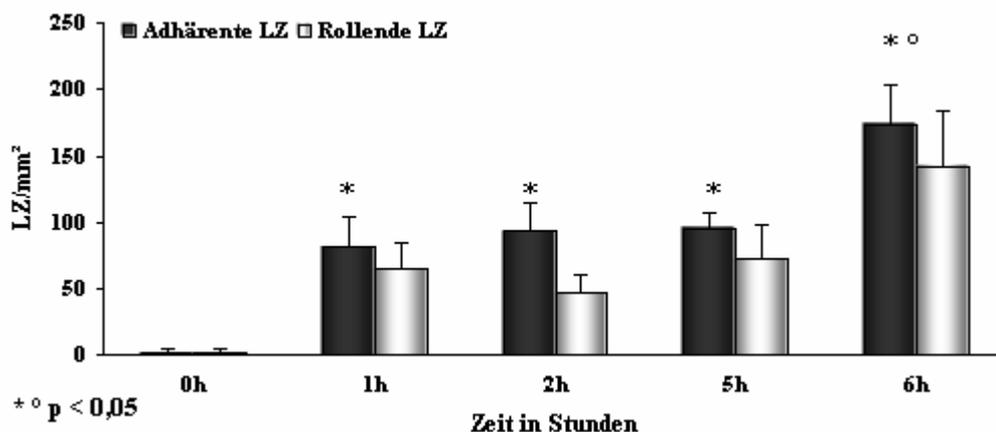


Abbildung 62: Leukozytenverhalten in der V. cava in P-Selektin Knock-out-Tieren im Zeitverlauf (6h); adhärente LZ (n/mm²); rollende LZ (n/mm²/min). * $p < 0,05$ vs. Basalwert 0 Stunden. [°] $p < 0,05$ vs. 1 Std.

4.1.2.2.4 Differentielle Bedeutung von GPIIb und P-Selektin für die Rekrutierung von Thrombozyten und Leukozyten in der V. cava

Vergleichend betrachtet zeigen sich, wie die Abbildungen 63, 64 und 65 anschaulich illustrieren, lediglich geringe bis keine Unterschiede in der leukozytären Adhäsion und Koaggregation zwischen Wildtyp- und GPIIb Knock-out-Tieren.

Andererseits wird deutlich, dass das Membranprotein P-Selektin eine wesentliche Rolle in der frühen Phase der venösen Thrombogenese spielt. P-Selektin Knock-out-Mäuse weisen ein signifikant reduziertes leukozytäres Adhäsionsverhalten bei fehlender Aggregation im Vergleich zu C57BL/6J- und GPIIb^{-/-} Mäusen auf.

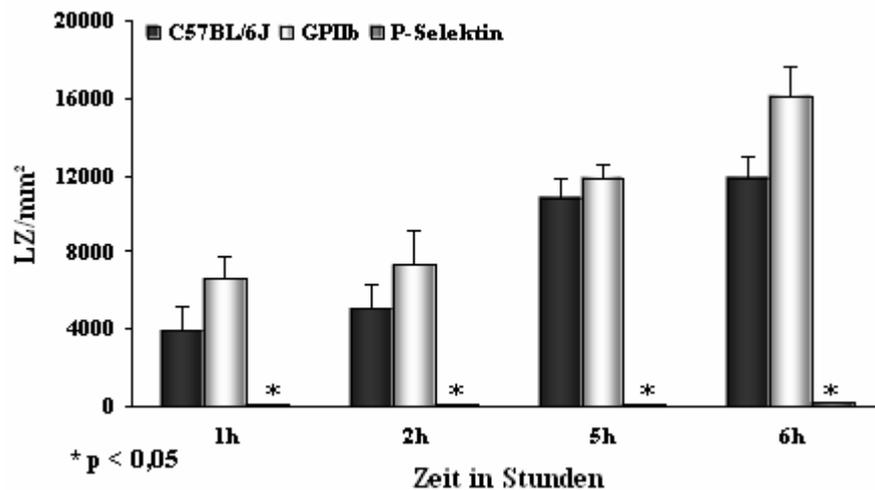


Abbildung 63: Gegenüberstellung der Leukozytenadhäsion in der V. cava zwischen C57BL/6J, GPIIb^{-/-} und P-Selektin^{-/-} im Zeitverlauf. * p < 0,05 vs. C57BL/6J und GPIIb^{-/-}.

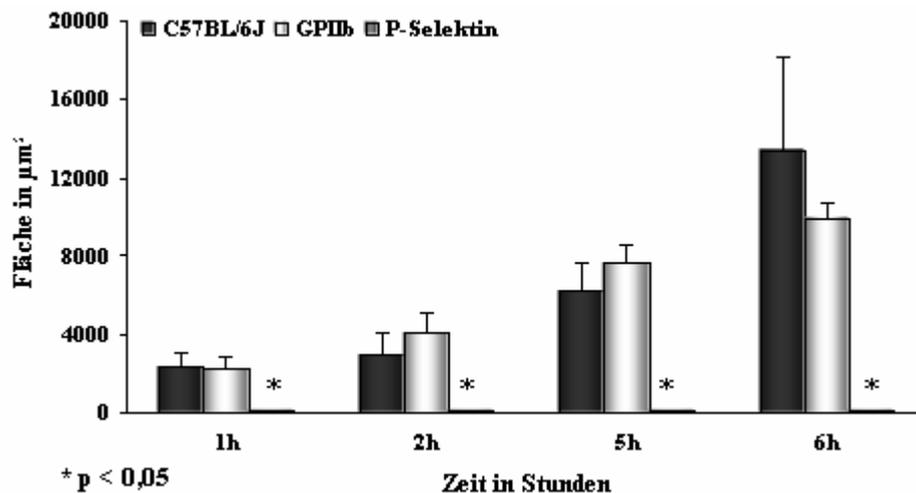


Abbildung 64: Gegenüberstellung der Leukozytenkoaggregation (µm²) in der V. cava zwischen C57BL/6J, GPIIb^{-/-} und P-Selektin^{-/-} im Zeitverlauf. * p < 0,05 vs. C57BL/6J und GPIIb^{-/-}.

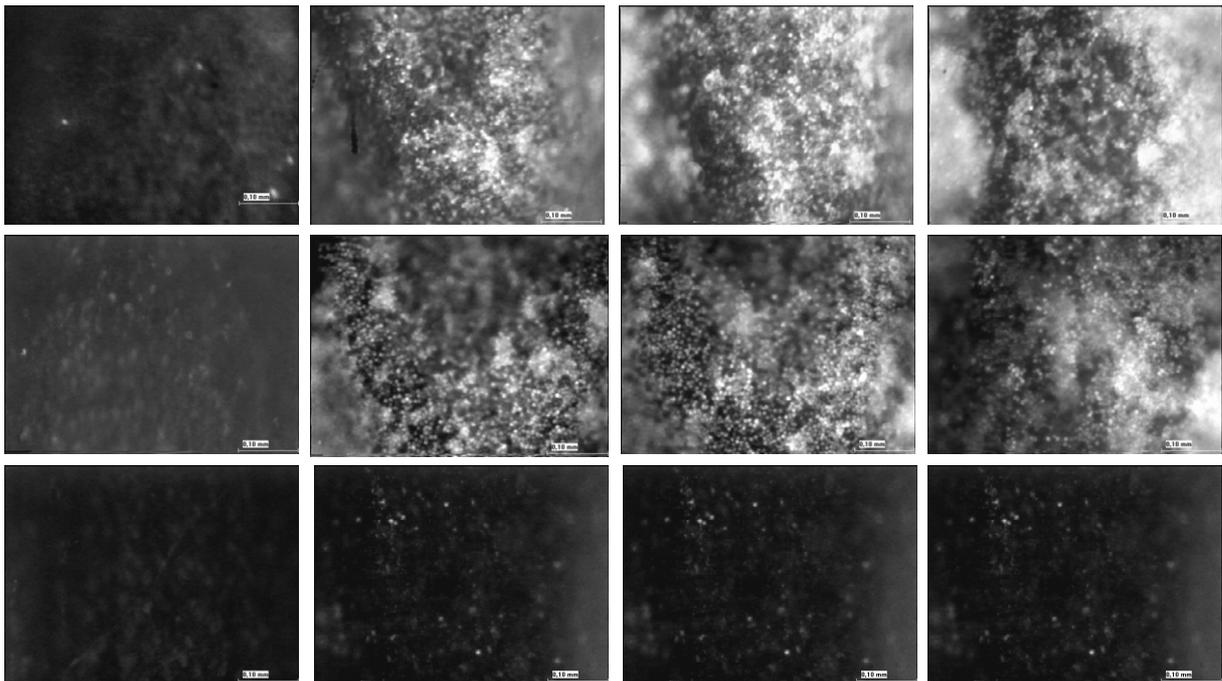


Abbildung 65: *In vivo* Darstellung der Leukozytenadhäsion und Aggregatbildung in der V. cava im Zeitverlauf in verschiedenen Tierstämmen bei 500-facher Vergrößerung. 1. Reihe: C57BL/6J Wildtyp fortschreitende Leukozytenadhäsion und Koaggregation in der V. cava im Zeitverlauf (1, 2, 5 und 6 Stunden nach Ligatur). 2. Reihe: GPIIb^{-/-} fortschreitende Leukozytenadhäsion und Koaggregation in der V. cava im Zeitverlauf (1, 2, 5 und 6 Stunden nach Ligatur). 3. Reihe: P-Selektin^{-/-} kaum Leukozytenadhäsion bei vollständig fehlender Koaggregatbildung in der V. cava im Zeitverlauf (1, 2, 5 und 6 Stunden nach Ligatur).

4.1.2.2.5 Einfluss des Membranglykoproteins Tissue Faktor auf die Leukozytenadhäsion u. -koaggregation

Der Einfluss des Membranglykoproteins Tissue Faktor auf die Leukozytenadhäsion u. Aggregatbildung wird in Versuchen mit HCV 100 Kontrolltieren und Low TF Knock-out Tieren untersucht. Wie Abbildung 66 illustriert, steigt bei Tieren mit Tissue Faktor-Defekt die Leukozytenadhäsion von anfänglich 3413 ± 168 LZ/mm² auf 3706 ± 128 und schließlich 5 und 6 Stunden nach Ligatur auf 6106 ± 323 LZ/mm² bzw. 6756 ± 225 LZ/mm². Alle Werte zeigen einen signifikanten Anstieg verglichen mit dem Basalwert 46 ± 58 LZ/mm².

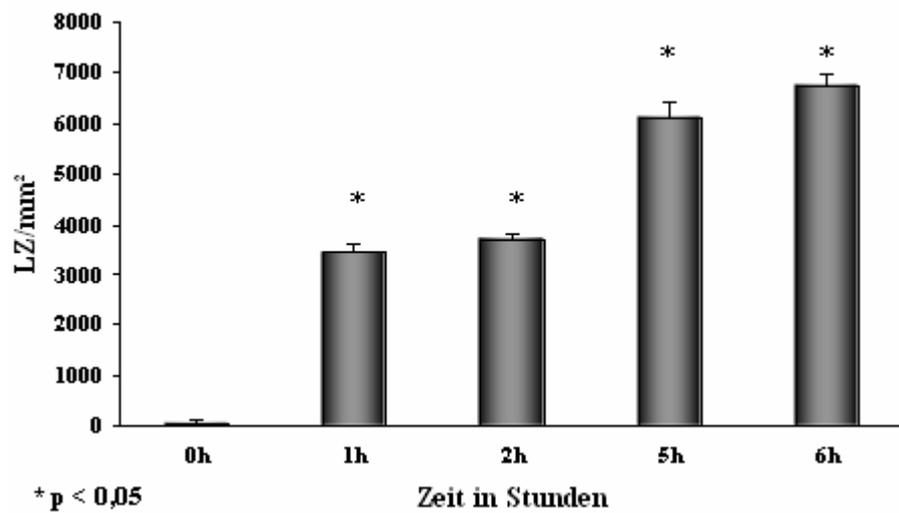


Abbildung 66: Leukozytenadhäsion in der V. cava in Low TF Tieren im Zeitverlauf (n = 2). * p < 0,05 vs. Basalwert 0 Stunden.

Stellt man oben beschriebenes Thrombozytenadhäsionsverhalten mit dem der Leukozyten in der V. cava in Low TF-Tieren im Zeitverlauf in Vergleich zueinander, so wird deutlich, dass bei Low TF (ähnlich wie bei Wildtyp-Tieren) zu jedem Zeitpunkt signifikant weniger Thrombozyten als Leukozyten adhären werden (*) (siehe Abbildung 67, 68).

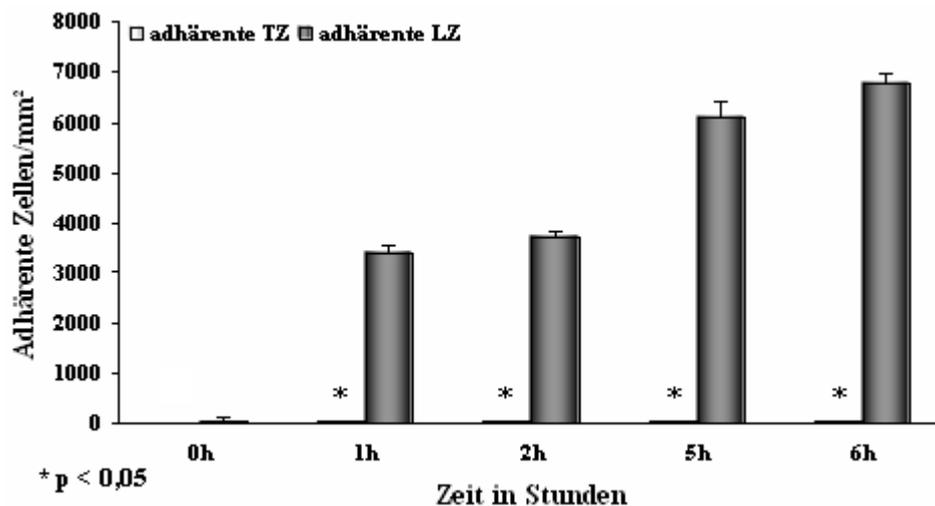


Abbildung 67: Gegenüberstellung der Thrombozyten- und Leukozytenadhäsion in der V. cava in Low TF Tieren im Zeitverlauf. * p < 0,05 vs. adhären Leukozyten.

Durch die Doppelfärbung von Leukozyten und Thrombozyten können die Interaktionen beider Zelltypen erstmals *in vivo* visualisiert werden. Abbildung 68 (rechte Spalte) illustriert anschaulich das Zusammenspiel adhärenter Blutplättchen mit leukozytären Zellen.

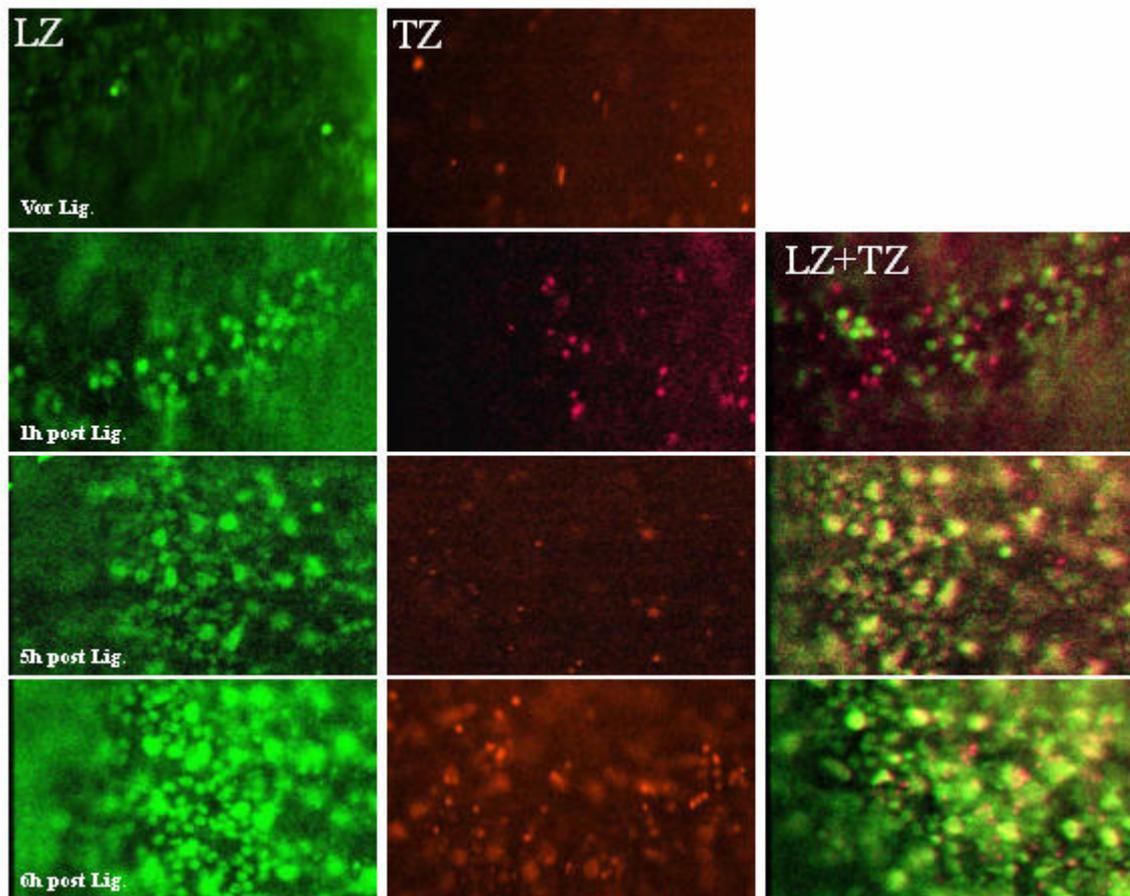


Abbildung 68: *In vivo* Darstellung der Leukozyten- und Thrombozytenadhäsion in der V. cava im Zeitverlauf in Low TF-Tieren. Linke Spalte Leukozytenadhäsion (LZ), mittlere Spalte Thrombozytenadhäsion (TZ), rechte Spalte simultan Visualisierung von Leukozyten und Thrombozytenadhäsion (LZ+TZ).

Der Kontrollstamm HCV-100 zeigt 1 und 2 Stunden nach Ligatur eine Leukozytenadhäsion von 9325 ± 1593 LZ/mm² sowie 8350 ± 1355 LZ/mm², die nach 5 und 6 Stunden jedoch auf 6331 ± 49 bzw. 6844 ± 137 LZ/mm² abfällt. Stellt man diese Werte den Ergebnissen der Low TF-Tiere gegenüber, so zeigt sich ein signifikanter Unterschied in den ersten beiden Stunden nach Ligatur, wie Abbildung 69 verdeutlicht.

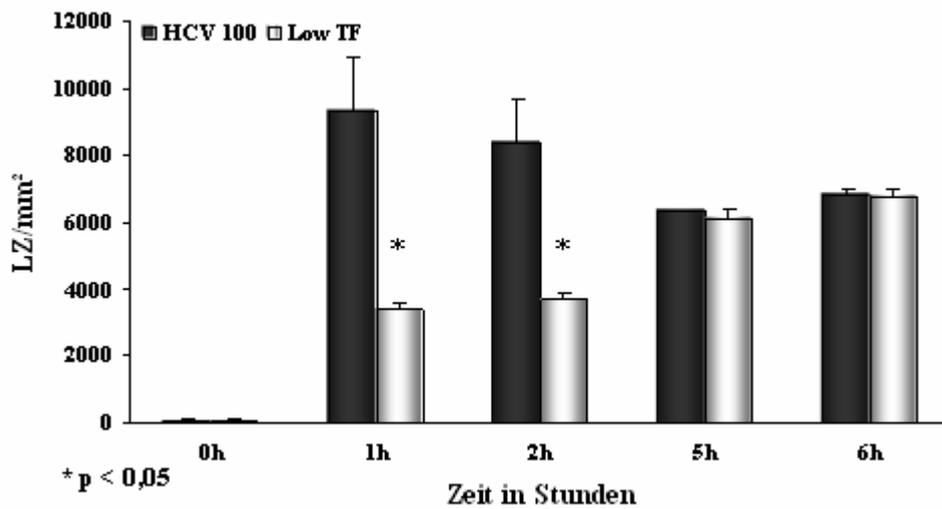


Abbildung 69: Gegenüberstellung der Leukozytenadhäsion in der V. cava zwischen Low TF- und HCV-100-Tieren im Zeitverlauf. * p < 0,05 vs. 1 u. 2 Stunden HCV-100.

Das Aggregationsverhalten differiert deutlich zwischen Low TF-Mäusen und ihrem Kontrollstamm. Während der Kontrollstamm HCV-100 bereits 1 Stunde nach Ligatur ein Aggregationsareal von $9030 \pm 4892 \mu\text{m}^2$ aufweist, das sich in den folgenden Stunden auf $20750 \pm 6055 \mu\text{m}^2$; $20936 \pm 7221 \mu\text{m}^2$ und schließlich $39890 \pm 17282 \mu\text{m}^2$ ausdehnt, zeigt der Low TF-Knock-out-Stamm lediglich eine moderate, signifikant reduzierte Koaggregatbildung $26 \pm 0 \mu\text{m}^2$; $31 \pm 3 \mu\text{m}^2$; $67 \pm 8 \mu\text{m}^2$ bzw. $142 \pm 54 \mu\text{m}^2$ (*) (siehe Graph in Abbildung 70).

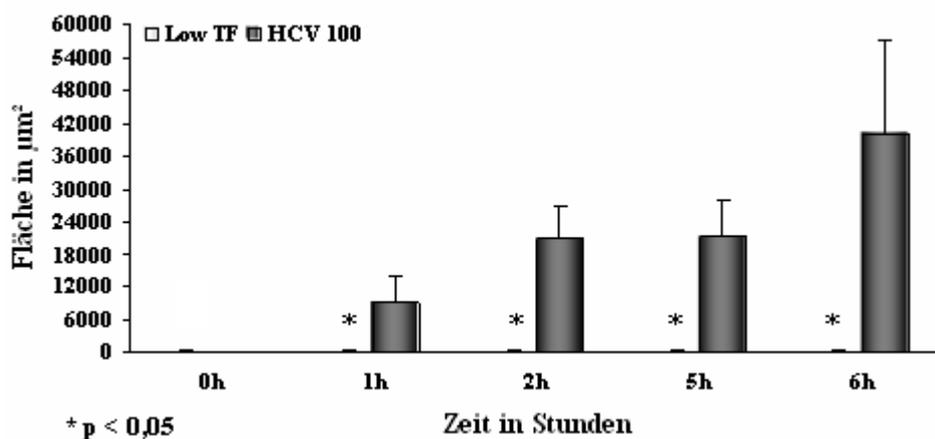


Abbildung 70: Gegenüberstellung der Koaggregatbildung in der V. cava zwischen Low TF- und HCV-100-Tieren im Zeitverlauf. * p < 0,05 vs. Basalwert 0 Stunden.

4.1.2.3 Mikropartikelrekrutierung im venösen Thrombus

Die Untersuchungen zur Mikropartikelrekrutierung in C57BL/6J-Wildtypieren in der V. cava ergeben, gemessen in Grauwertschwellen, einen deutlichen Anstieg der Mikropartikel im venösen Thrombus im Zeitverlauf (29 ± 3 ; 51 ± 2 ; 142 ± 24 ; 172 ± 11). Erst die Werte 2, 5 und 6 Stunden nach Ligatur unterscheiden sich signifikant vom Basalwert (*). Zudem zeigt der 6 Stunden Wert einen signifikanten Unterschied zu den Werten 1, 2 und 5 Stunden nach Ligatur (°). Die Werte 5 Stunden nach Ligatur sind verglichen mit den Werten nach 2 Stunden signifikant erhöht (°). Der Graph in Abbildung 71 dient der Illustrierung dieser Sachverhalte.

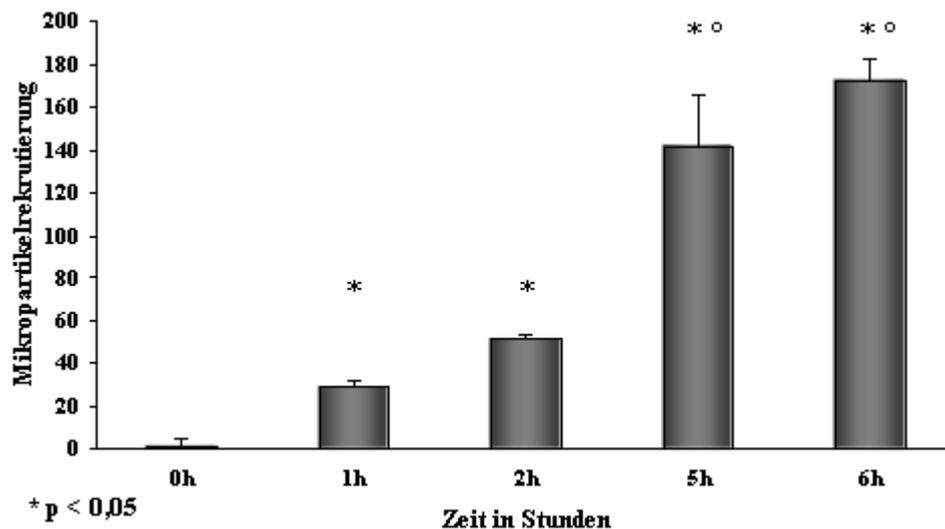


Abbildung 71: Mikropartikelrekrutierung in der V. cava in C57BL/6J Wildtypieren im Zeitverlauf (n = 3). * p < 0,05 vs. Basalwert 0 Stunden; ° p < 0,05 vs. 1 u. 2 Stunden.

4.1.3 Fibrinbildung bei arterieller und venöser Thrombosierung

In arteriellen Gefäßen kommt es nach Verletzung zu einem deutlich signifikanten Anstieg des Fibrinsignals (*) von $24,5 \pm 8,9$ auf $138,25 \pm 6,9$. Dieser Sachverhalt wird in Abbildung 72 illustriert.

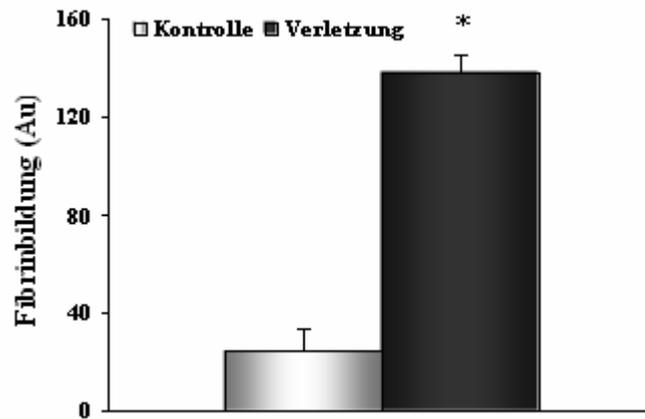


Abbildung 72: Fibrinbildung in der *A. carotis communis* in C57BL/6J Wildtyp-Tieren verglichen mit Kontrollwerten in unverletzten Gefäßen. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

Abbildung 73 verdeutlicht die Fibrinbildung im venösen System in C57BL/6J Wildtyp-Tieren. Zu allen untersuchten Zeitpunkten zeigt sich ein signifikanter Anstieg verglichen mit dem Basalwert (*). Gemessen in Grauwertschwellen steigt die Fibrinbildung im Zeitverlauf von 42 ± 7 ; über 66 ± 19 auf 96 ± 19 und schließlich 141 ± 22 Au an. Der Wert 6 Stunden nach Ligatur unterscheidet sich zudem signifikant von den 1, 2 und 5 Stunden Werten (°), wohingegen der 5 Stunden Wert lediglich gegenüber dem Wert 2 Stunden nach Ligatur einen signifikanten Anstieg zeigt (°).

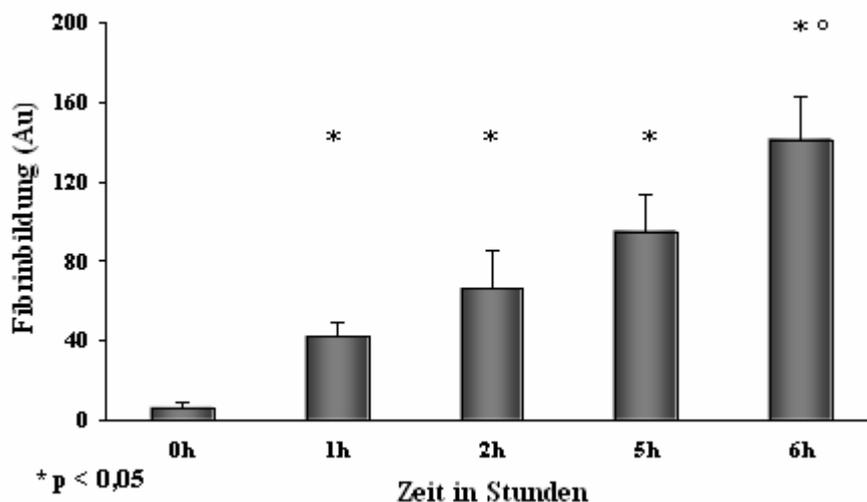


Abbildung 73: Fibrinbildung in der *V. cava* in C57BL/6J Wildtyp-Tieren im Zeitverlauf ($n = 3$) in Arbitrary units [Au]. * $p < 0,05$ vs. Basalwert 0 Stunden. ° $p < 0,05$ vs. 1, 2 u. 5 Stunden.

Im Vergleich zu den C57BL/6 Wildtyp-Tieren weisen Low TF Knock-out-Mäuse eine signifikant reduzierte Fibrinbildung in der *V. cava* nach Stromverlangsamung auf (*) (siehe Graph in Abbildung 74). Abbildung 75 veranschaulicht die unterschiedliche Fibrinbildung in den beiden Tierstämmen im Zeitverlauf. Die Fibrinbildung in Low TF-Tieren findet auf sehr

niedrigem, nur minimal schwankendem Niveau statt, ohne einen deutlichen Abfall oder Anstieg zu erfahren (27 ± 1 ; 24 ± 0 ; 28 ± 0 ; 22 ± 1).

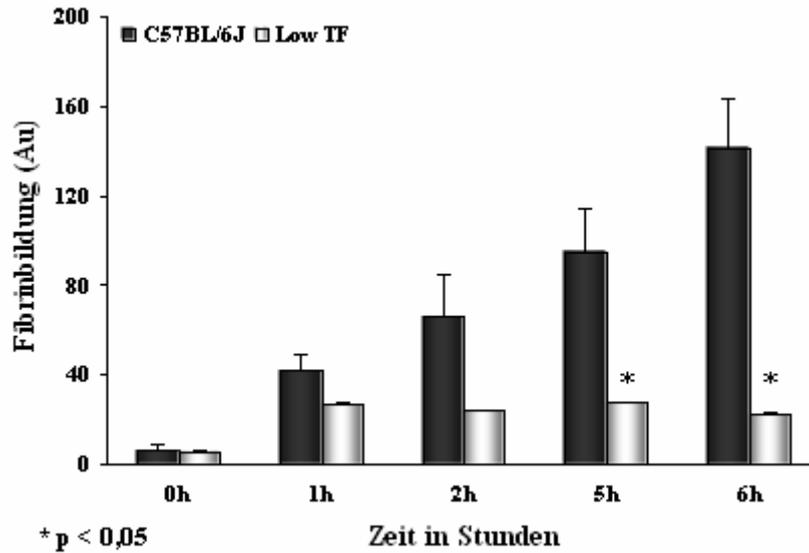


Abbildung 74: Gegenüberstellung der Fibrinbildung von C57BL/6J-Wildtyp- und Low TF-Tieren in der V. cava im Zeitverlauf. * p < 0,05 vs. C57BL/6J.

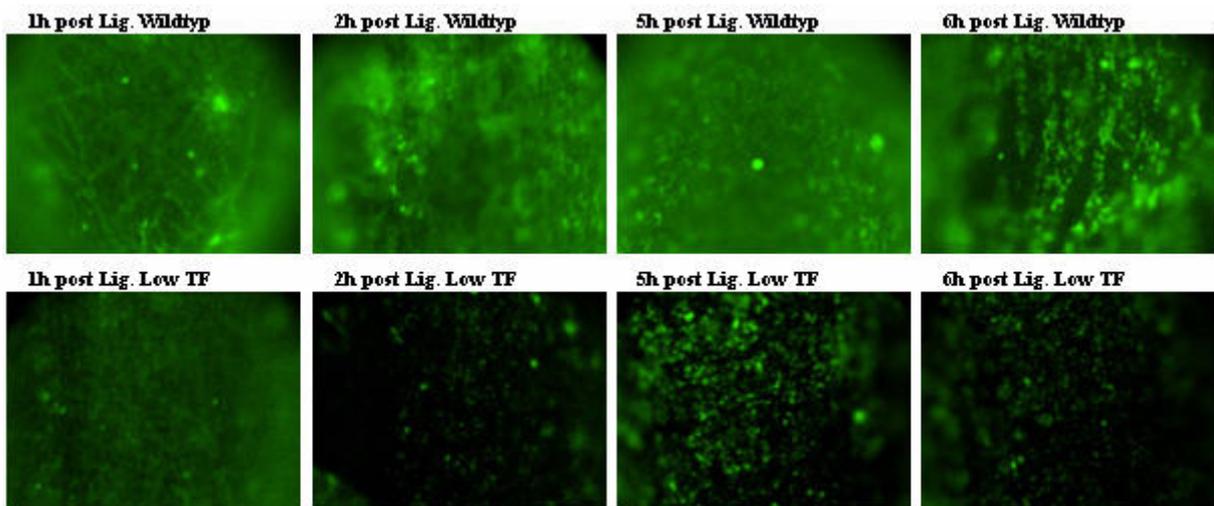


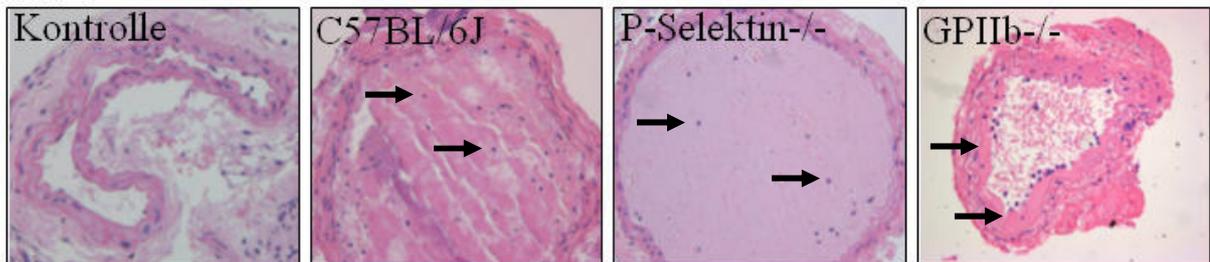
Abbildung 75: Gegenüberstellung der Fibrinbildung von C57BL/6J-Wildtyp- und Low TF-Tieren in der V. cava im Zeitverlauf. 1. Reihe: von links nach rechts Fibrinbildung in Low TF-Tieren im Zeitverlauf (1-6 Stunden). 2. Reihe: von links nach rechts Fibrinbildung in Wildtyp-Tieren im Zeitverlauf (1-6 Stunden).

4.2 Histopathologische Evaluierung der Thrombosierung

Um zu klären, welche Rolle die oben dargestellten molekularen und zellulären Phänomene funktionell für die arterielle und venöse Thrombose spielen, führten wir zusätzlich zu den oben beschriebenen intravitalmikroskopischen Untersuchungen eine histopathologische Evaluierung sowohl der arteriellen als auch der venösen Thrombosierung der unterschiedlichen Tierstämme durch. Von besonderem Interesse waren hierbei die Thrombengröße, sowie deren Zusammensetzung.

Zur Darstellung der arteriellen Thrombosierung werden die Übersichtsfärbungen H.E. und van Gieson herangezogen. Abbildung 76 zeigt Arterien der verschiedenen Tierstämme nach Denudation im Vergleich zu unverletzten Kontrollarterien. Die Bilder der ersten Reihe zeigen Schnitte in H.E.-Färbung, die der zweiten Reihe in van Gieson-Färbung, typischerweise mit dunkelvioletter Membrana elastica. Die Kontrollschnitte (links) der unverletzten Carotiden verfügen über eine intakte Endothelzellschicht, mit sich deutlich darstellenden intakten Endothelzellkernen (\rightarrow). Das Lumen dieser Kontrollgefäße ist weitgehend kollabiert.

H.E.



van Gieson

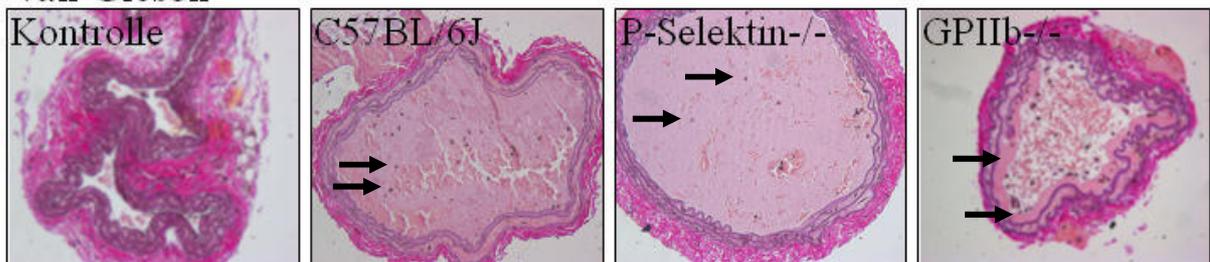


Abbildung 76: Gegenüberstellung histologischer Schnitte (H.E. u. van Gieson-Färbung) der A. carotis verschiedener Tierstämme (C57BL/6J, P-Selektin^{-/-}, GPIIb^{-/-}).

Das Lumen der denudierten Arterien aus C57BL/6J Wildtyp- und P-Selektin^{-/-}-Tieren dagegen ist vollständig mit Thrombusmasse ausgefüllt, wodurch das Kollabieren der Gefäße verhindert wird. Endothelzellkerne sind nicht mehr auszumachen, sie wurden durch die Drahtverletzung der Arterien zerstört. Innerhalb der homogenen Thrombusmasse stellen sich einzelne Leukozyten dunkelvioletts dar (\rightarrow).

Bei GPIIb Knock-out-Mäusen dagegen zeigt sich trotz verletztem Gefäßendothel mit fehlenden Endothelzellkernen nur ein schmaler Thrombussaum (→). Im teilweise kollabierten Gefäßlumen befinden sich Erythrozyten.

Die nachfolgende Abbildung 77 illustriert die histologischen Gegebenheiten in der V. cava 6 Stunden nach Ligatur. Als Übersichtsfärbungen werden H.E. (1. Reihe) und van Gieson (2. Reihe) Färbungen herangezogen. Zur speziellen Darstellung von Fibrin wird die Martius Scarlet Blue (MSB) Färbung (3. Reihe) eingesetzt. Da die Weigert'sche Fibrinfärbung lediglich als zusätzliche Kontrolle dient, wird auf ihre bildliche Darstellung hier verzichtet. Zahlreiche sich färberisch dunkelviolet, bzw. bräunlich abzeichnende Leukozyten werden sowohl bei Wildtyp-Tieren als auch bei GPIIb Knock-out-Tieren am Endothel adhären (→). Bei P-Selektin Knock-out-Tieren fehlen adhären Leukozyten, intakte Endothelzellkerne stellen sich flach und ebenfalls dunkelviolet dar (→). Das Lumen der V. cava 6 Stunden nach Ligatur ist weitgehend kollabiert. Im Lumen befinden sich zum Teil vereinzelte Erythrozyten (hellrosa bzw. hellrot). Bei C57BL/6J-Tieren zeigt sich in der MSB-Färbung zwischen den adhären Leukozyten eine hellblaue Masse (→), bei der es sich um Fibrin handelt.

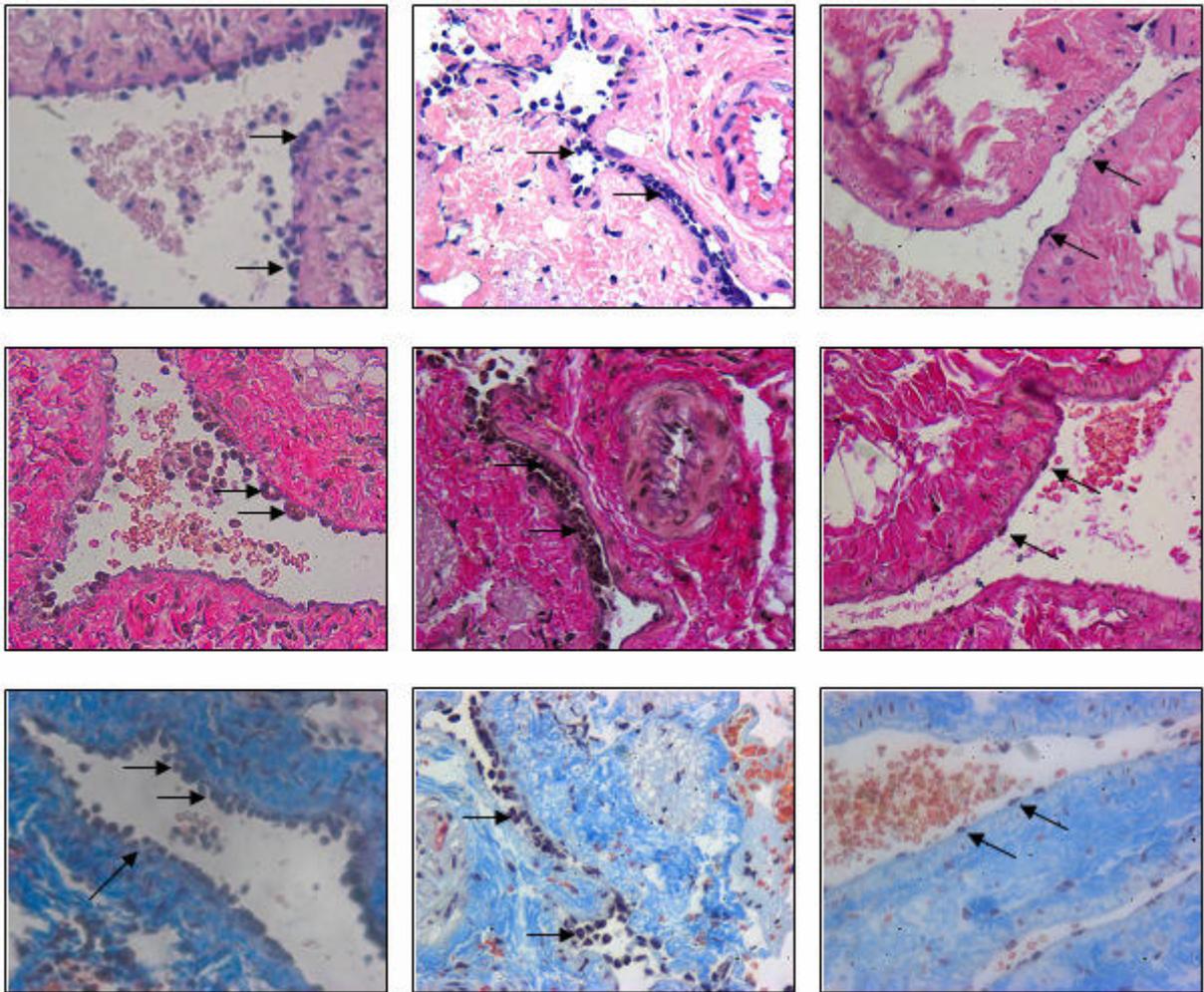


Abbildung 77: Gegenüberstellung histologischer Schnitte (H.E. sowie van Gieson-Färbung u. MSB) der V. cava verschiedener Tierstämme (C57BL/6J, GPIIb^{-/-}, P-Selektin^{-/-}). Links: V. cava des C57BL/6J-Kontrollstammes 6 Stunden nach Ligatur mit intakter Endothelzellschicht sowie zahlreichen adhären Leukozyten. Mitte: V. cava des GPIIb^{-/-}-Stammes 6 Stunden nach Ligatur mit intaktem Endothel sowie zahlreichen adhären Leukozyten. Rechts: V. cava des P-Selektin^{-/-}-Stammes 6 Stunden nach Ligatur mit intaktem Endothel und fehlender Leukozytenadhäsion.

Abbildung 78 zeigt eine Gegenüberstellung der V. cava 48 Stunden nach Ligatur der verschiedenen Tierstämme. Die Thrombusgröße wird anhand serieller Schnitte für jeden Tierstamm mittels Cap Image Programm ausgemessen. C57BL/6J-Wildtypiere entwickeln 48 Stunden nach V. cava-Ligatur einen das Gefäßlumen fast vollständig okkludierenden Thrombus, der das postmortale Kollabieren des Lumens verhindert. GPIIb^{-/-}-Tiere dagegen zeigen 48 Stunden nach Ligatur nur einen kleinen Thrombus, wohingegen P-Selektin^{-/-}-Tiere größere Thromben entwickeln. In Low TF-Mäusen bilden sich nur sehr kleine, kaum auszumachende Thromben. Der Graph in Abbildung 79 setzt die Thrombengröße der verschiedenen Tierstämme in Relation zueinander und zeigt die histologisch bestimmten unterschiedlichen Größenverhältnisse.

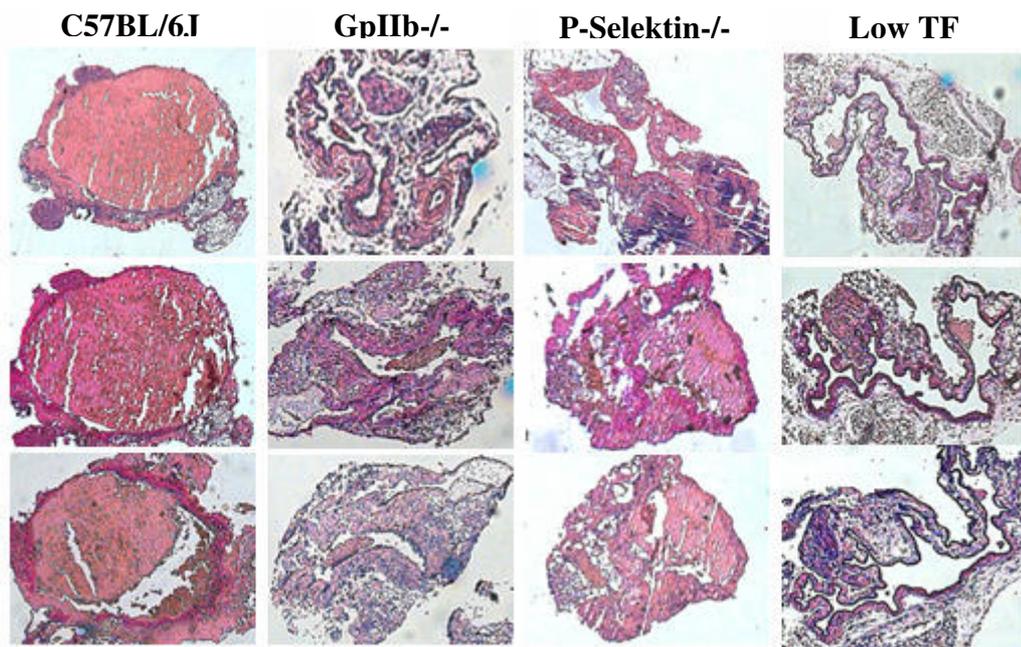


Abbildung 78: Gegenüberstellung histologischer Schnitte der V. cava verschiedener Tierstämme (C57BL/6J, GPIIb^{-/-}, P-Selektin^{-/-}, Low TF) 48 Stunden nach Ligatur.

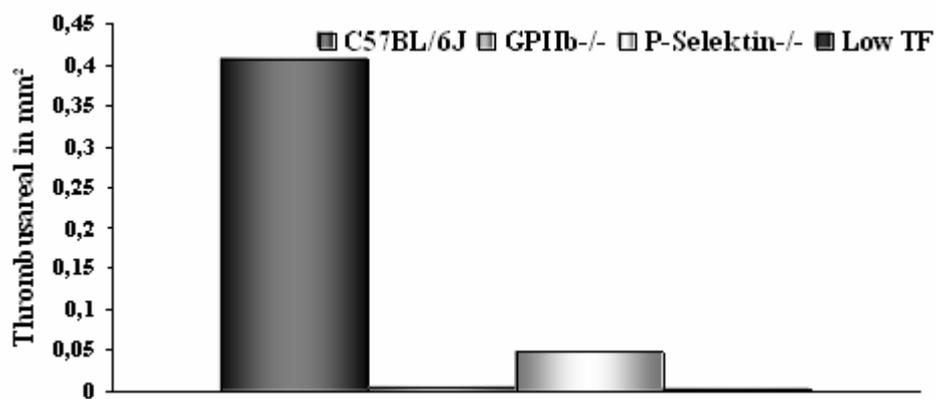


Abbildung 79: Darstellung der unterschiedlichen Thrombengrößen der verschiedenen Tierstämme in der V. cava 48 Stunden nach Ligatur.

4.3 Charakterisierung ultrastruktureller Veränderungen

Zur genauen Charakterisierung der ultrastrukturellen Veränderungen im Zuge der arteriellen und venösen Thrombose werden sowohl raster- als auch transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen an C57BL/6J-Wildtypmäußen durchgeführt.

Abbildung 80 illustriert sowohl die intakte, vollkommen unverletzte Endothelzellschicht der V. cava vor Ligatur (oben), als auch die massive Leukozytenanlagerung sowie Fibrinbildung am Endothel der V. cava 6 Stunden nach Ligatur. Diese ultrastrukturellen Untersuchungen bestätigen und vervollständigen das *in vivo* und histologisch gewonnene Bild der V. cava-Thrombose. Bei mechanisch unverletztem Endothel kommt es infolge der Stromverlangsamung neben minimaler Thrombozytenadhäsion zu einer massiven Rekrutierung leukozytärer Zellen, deren Transmigration sowie der Ausbildung dichter Fibrinnetze.

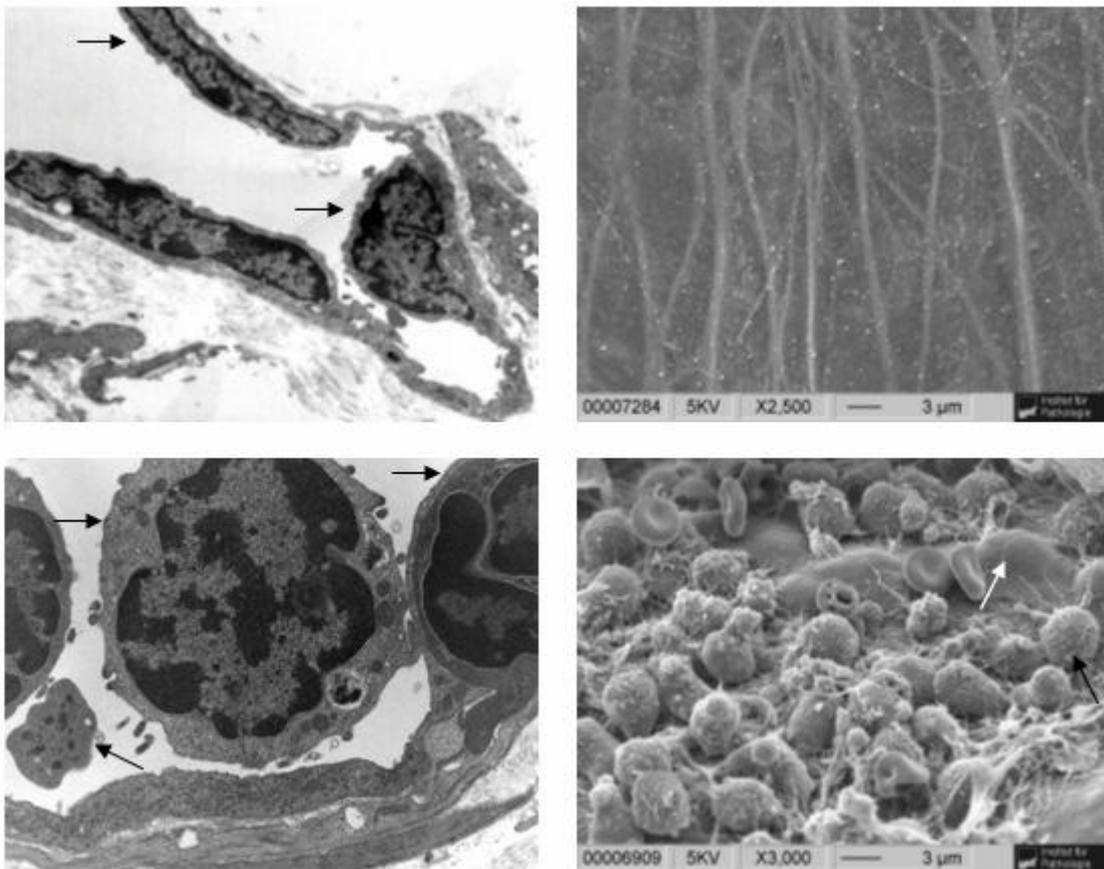


Abbildung 80: Transmissions- (links) sowie rasterelektronenmikroskopische (rechts) Aufnahmen der V. cava vor (oben) und 6 Stunden nach Ligatur (unten) (angefertigt in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie der GSF, München). Oben: Unverletztes Endothel vor Ligatur. Pfeile markieren Endothelzellkerne. Unten: Massive Leukozyteninfiltration, geringe Thrombozytenadhäsion und Ausbildung dichter Fibrinnetze 6 Stunden nach Stromverlangsamung. Schwarze Pfeile markieren Leukozyten und einen Thrombozyten, weißer Pfeil zeigt sich vorwölbenden mechanisch unverletzten Endothelzellkern im REM an.

Im Gegensatz dazu stellt Abbildung 81 transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen eines unmittelbar am Subendothel anhaftenden plättchenreichen Thrombus in der denudierten A. carotis communis dar. Durch die Drahtverletzung wurde das Endothel mit seinen Endothelzellkernen vollständig entfernt und das darunter liegende Subendothel freigelegt. Wie in oben beschriebenen intravitalmikroskopischen Untersuchungen gezeigt, werden innerhalb weniger Minuten zahlreiche Blutplättchen adhären, die sich zu einem stabilen Thrombus verbinden, in dem nur vereinzelt Leukozyten enthalten sind.

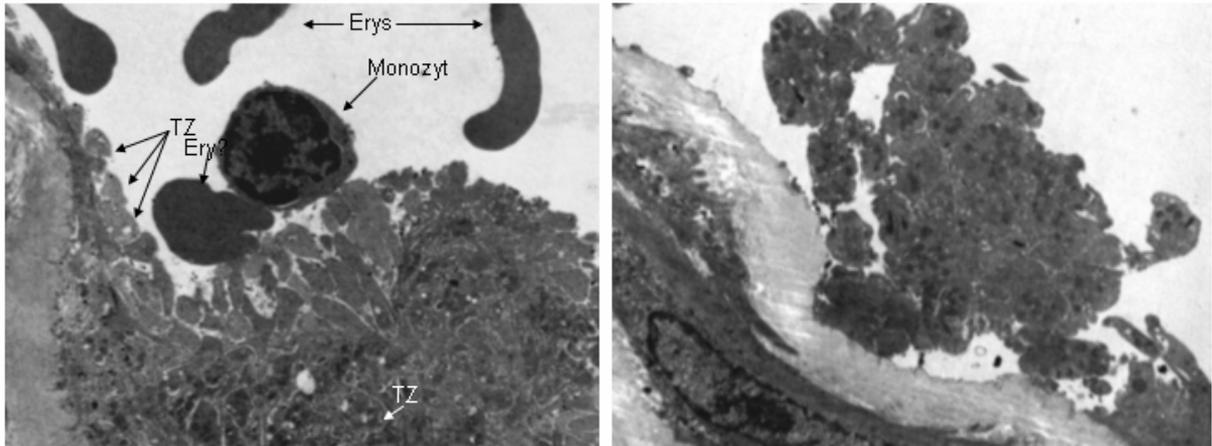


Abbildung 81: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen eines plättchenreichen Thrombus in der denudierten A. carotis communis (angefertigt in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie der GSF, München).

5 Diskussion

Vorliegende Untersuchungen zeigen, dass es im Rahmen arterieller Thrombosen zu einer massiven Adhäsion von Thrombozyten, bei nur geringer Rekrutierung von Leukozyten in den Thrombus kommt. Im Gegensatz dazu stellt die initiale Leukozytenadhäsion ein prominentes Phänomen der venösen Thrombose dar.

5.1 Wahl der Mäuselinien

Aufgrund der Verfügbarkeit zahlreicher genetisch modifizierter Mäuselinien, der technisch unkomplizierten und gut standardisierbaren Durchführung der Intravitalmikroskopie sowie der vorhandenen Thrombosemodelle, der schnellen Aufzucht und niedrigen Haltungskosten wird in diesem Versuchsansatz auf das Versuchstier Maus zurückgegriffen.

Der C57BL/6J-Stamm dient im Rahmen der Untersuchung als Kontrollstamm für alle weiteren verwendeten Mäusestämme. Anhand der C57BL/6J-Mäuse werden beide Thrombosemodelle etabliert und die Kontrollwerte für Thrombozyten- und Leukozytenadhäsion sowie deren Aggregation, Mikropartikelrekrutierung und Fibrinbildung im Thrombus ermittelt. Basierend auf diesen Ergebnissen kann später ein sinnvoller Vergleich mit den genetisch modifizierten Mäuselinien angestellt werden. Diese Wildtyplinie ist für vorliegende Versuchsreihe optimal, da alle hier verwendeten Knock-out-Linien auf einem C57BL/6J-Hintergrund gezüchtet wurden. Zudem ist der C57BL/6J-Wildtypstamm leicht und problemlos zu züchten und eine Genotypisierung der Nachzucht ist nicht erforderlich.

Die genetisch modifizierten Mäuselinien wurden nach Gesichtspunkten der an arterieller und venöser Thrombose beteiligten Mechanismen ausgewählt. Sie geben Aufschluss über den Einfluss von Thrombozyten und Leukozyten, sowie deren Oberflächenrezeptoren auf beide Thromboseformen und führen somit zu einem besseren Verständnis der Thrombosierungsmechanismen und deren medikamentösen Intervention. Mit Hilfe des GPIIb^{-/-}-Stamms wird die Bedeutung des thrombozytären Fibrinogenrezeptors auf die Entstehung der arteriellen sowie der venösen Thrombose untersucht. Die Rolle von Blutplättchen in den verschiedenen Phasen der Thrombusbildung in beiden Systemen kann damit durch diesen Stamm erforscht werden. P-Selektin defiziente Tiere werden im Gegensatz hierzu zur Darstellung der leukozytären Interaktionen mit Endothelzellen sowie mit Thrombozyten herangezogen.

Zur Erforschung der Bedeutung des integralen Membranproteins Tissue Faktor für beide Thromboseformen werden die transgenen Stämme mTF^{-/-}/HCV⁺ und mTF^{-/-}/hTF⁺ hinzugezogen. Tiere mit humanem chromosomalem Vektor (mTF^{-/-}/HCV⁺) weisen eine 100%ige Expression des humanen „tissue factor“ Transgens (100% TF) auf und dienen somit als Kontrollstamm für Untersuchungen an Low TF-Tieren, die sich durch eine Expression von nur 1% humanem Tissue Faktor auszeichnen. Diese beiden Stämme eröffnen völlig neue

Möglichkeiten zur Erforschung des Einflusses von Tissue Faktor, dem primären Initiator der Blutgerinnungskaskade auf die Thromboseentstehung.

5.2 Diskussion experimenteller *in vivo* Modelle der arteriellen und venösen Thrombose

Während der letzten 40 Jahre wurden zahlreiche Thrombosemodelle in Mäusen sowie anderen Versuchstieren zur Erforschung der Pathophysiologie von Thrombosen und deren medikamentösen Therapie entwickelt. Verschiedene Ansätze zur Thrombosegenerierung, basierend auf der Virchowschen Trias, wurden verfolgt, wobei die Anzahl arterieller Thrombosemodelle die der venösen deutlich übersteigt⁴⁰.

5.2.1 Arterielle Thrombosemodelle

Da im arteriellen System ein enger Zusammenhang zwischen Endothelverletzung, Plättchenaktivierung und Thrombusbildung besteht, basieren alle arteriellen Thrombosemodelle auf Zerstörung der intakten Endothelzellschicht. Dies geschieht auf mechanische, elektrische, photochemische oder chemische Art und Weise. Um der Pathophysiologie der Thrombosierung im Organismus möglichst nahe zu kommen und um standardisierbare, gut reproduzierbare Thrombosemodelle zu erhalten, wurden bestehende Modelle modifiziert und neue Modelle etabliert. In Mäusen verwendet man sowohl die A. carotis communis, als auch die A. femoralis zur Thrombusinduktion. Je nach Fragestellung der Untersuchungen wählt man ein geeignetes Thrombosemodell aus.

5.2.1.1 Mechanische Endothelverletzung: Ligatur und Denudation

Sowohl das Ligatur- als auch das Denudationsmodell basieren auf einer mechanischen Zerstörung der Endothelzellintegrität mit anschließender Thrombusbildung. Während mittels Ligatur lediglich ein kleiner, umschriebener Bereich an Endothelzellen zerstört wird, zielt die Denudation auf einen großen, umfassenden Endothelzellschaden mit Beteiligung der tieferliegenden Gewebsschichten ab.

Bei der Carotisligatur wird die Gefäßverletzung mit Verlust der Endothelzellschicht, durch eine fünfminütige Ligatur der A. carotis communis herbeigeführt^{125,126}. Die initialen Mechanismen der Thrombozytenadhäsion an die lokal freigelegte subendotheliale Matrix können in diesem Modell intravitalmikroskopisch untersucht werden. Ein kompletter Verschluss der A. carotis communis durch einen entstehenden Thrombus ist in diesem Modell allerdings nicht zu erwarten.

Das Denudationsmodell, bei dem ein flexibler Draht in die A. carotis communis eingeführt und die Endothelzellen durch mehrmaliges Drehen komplett zerstört werden, ist auf Lindner

et al. zurückzuführen¹⁰⁷. Der umfangreiche Endothelzellschaden zieht Plättchenadhäsion sowie -aggregation, murale Thrombose, sowie den Verlust glatter Muskelzellen der Media nach sich. Dieses Modell ist kliniknah und kann optimal zur Erforschung der Plättchenadhäsion und -aggregation während der frühen Phase der Thromboseentstehung verwendet werden. Der rasche Verschluss der A. carotis communis durch einen wandständigen Thrombus sowie die anschließende Rekanalisierung des Gefäßes kann intravitalmikroskopisch detailliert verfolgt werden. Diverse zelluläre Prozesse, wie Zelladhäsion, -migration, -proliferation, sowie Matrixremodelling können anhand dieses Modells ebenfalls untersucht werden. Durch Einsatz frischer Drähte, einer genau festgelegten Anzahl an Rotationsbewegungen des Drahtes sowie die Durchführung aller Operationen von einer Person kann die Varianz der Läsionen minimiert werden.

5.2.1.2 Elektrische Endothelverletzung

Carmeliet et al. beschreiben erstmals die Zerstörung der arteriellen Gefäßwand von außen durch Verwendung von Elektromikrokoagulation, als Folge dessen es sofort zur Bildung eines wandständigen plättchen- und fibrinreichen Thrombus kommt. Der elektrische Schaden umfasst eine komplette Denudation des intakten Endothels sowie eine Zerstörung aller glatten Muskelzellen der Media^{22,23}. Generiert wurde dieses Modell ursprünglich zur Untersuchung der Neointimaformation. Aufgrund des umfangreichen, schwer standardisierbaren Schadens und der umfassenden Gefäßwandnekrose, die alle Schichten des Gefäßes umfasst, unterscheidet sich dieses Modell von der tatsächlichen Pathophysiologie der arteriellen Thrombose beim Patienten und ist daher nur bedingt zur Erforschung der arteriellen Thrombosierungsmechanismen geeignet.

5.2.1.3 Photochemische Endothelverletzung: Laser

Unter einem photochemischen Schaden versteht man eine Kombination aus direkter Bestrahlung eines Gefäßabschnitts mit einem Laser bestimmter Wellenlänge und der intravenösen Applikation einer chemischen, photoreaktiven Substanz³³. Diese Methode hat nach Watson²²⁰⁻²²², Dietrich³⁹, Matsuno et al.¹³⁰ sowie Rosen et al.¹⁷¹ und Falati⁵³ zahlreiche Modifizierungen erfahren und findet sowohl in makro- als auch mikrovaskulären Strukturen zahlreicher Tierarten Anwendung. Als Folge der laserinduzierten Endothelläsion kommt es zu Plättchenadhäsion, Aggregation sowie Thrombusformation und später zu spontaner Thrombolysen und Intimaverdickungen. In diesem arteriellen Thrombosemodell ist durch exakte Dosierung ein genau definierter, gut standardisierbarer Schaden induzierbar, der ohne mechanischen Endothelzellschaden die Untersuchung der Thrombusformation in Echtzeitdarstellung erlaubt. Dennoch weist auch hier die Entstehungsweise des Thrombus deutliche Abweichungen von der Situation *in vivo* auf und wurde daher nicht für die vorliegende Arbeit eingesetzt.

5.2.1.4 Chemische Endothelverletzung: FeCl₃-induzierte Thrombose

Das Modell der chemisch induzierten Endothelverletzung wurde an Schweinen³ und Ratten^{16,98,204} etabliert und anschließend für Mäuse^{56,234} modifiziert. Durch Applikation eines in 10%iger FeCl₃-Lösung getränkten Filterpapierstreifens auf die sorgfältig isolierte A. carotis communis oder A. femoralis für mehrere Minuten wird die Bildung eines plättchenreichen Thrombus induziert. Nach Auftragen des Filterpapiers auf die Adventitia diffundiert die Lösung durch die Media, Intima und das Endothel, wo sie schließlich einen Endothelzellschaden durch Oxidation und Inflammation hervorruft, der zur Thrombusbildung und charakteristischerweise zum kompletten Gefäßverschluss führt⁹⁸. Die entstehenden Thromben setzen sich aus aktivierten Thrombozyten, Fibrinsträngen und Erythrozyten zusammen⁹⁸, was dem Aufbau arterieller Thromben im menschlichen Organismus sehr nahe kommt⁵⁵. Dieses Modell eignet sich zur Ermittlung der Gefäßverschlusszeit, das heißt der Zeit, die zwischen der Entfernung des Filters und dem vollständigen Verschluss des Gefäßes verstreicht. Eine gute Standardisierbarkeit dieses Modells wird durch möglichst schonende, vorsichtige Präparation der Arterien erreicht. Trotz des einfachen Präparationsverfahrens, der raschen Thrombusformation und des vollständigen Gefäßverschlusses ist dieses Modell jedoch nur bedingt einsetzbar, da hier, ähnlich wie bei den oben bereits dargestellten Modellen, die Thrombose durch eine transmurale Nekrose induziert wird.

5.2.2 Venöse Thrombosemodelle (dysfunktionales Endothel)

In der Vergangenheit wurden zahlreiche unterschiedliche Strategien zur Etablierung experimenteller venöser Thrombosemodelle verfolgt. Die pathophysiologischen Gegebenheiten, die zur venösen Thrombosierung im menschlichen Organismus führen in Labornagern sinnvoll nachzuahmen ist mit vielen Schwierigkeiten behaftet. Zunächst muss man sich die Hauptfaktoren venöser Thrombosierung vergegenwärtigen.

Venöse Thromben entstehen hauptsächlich aufgrund von Immobilität in Regionen mit langsamem Blutfluss, wie zum Beispiel den großen venösen Sinus der Waden und Oberschenkel. Verlangsamter Blutfluss bis hin zu Stase zählt demnach zweifelsohne zu den Hauptrisikofaktoren^{110,115}. Zusätzliche Dehydrierung oder erblich bedingte Störungen im Gerinnungssystem generieren einen Zustand der Hyperkoagulabilität und verschieben das Gerinnungsgleichgewicht in einen prokoagulatorischen Status. Ein direkter Endothelzellschaden ist meist auf Aktivierungsprodukte der Gerinnung und Fibrinolyse zurückzuführen, der in einer weiteren Aktivierung der Gerinnungskaskade resultiert. In den seltensten Fällen sind venöse Thrombosen auf einen klassischen mechanischen Endothelzellschaden wie im arteriellen System zurückzuführen. Das komplexe Zusammenspiel genannter Faktoren erschwert eine experimentelle Nachahmung venöser Thrombogenese im Tier. Daher gibt es

nur wenige Modelle für tiefe Venenthrombose, die für verschiedene Tierarten modifiziert und evaluiert wurden.

Die meisten Modelle basieren auf venöser Stase, entweder allein oder in Kombination mit der Injektion thrombogener Substanzen bzw. einem Endothelzellschaden, welcher durch chemische, physikalische, elektrische oder mechanische Agonisten hervorgerufen wird^{4,81,82,140,208,217,230}. Bei den meisten venösen Thrombosemodellen, handelt es sich um Modelle an Nagetieren^{29,94,108,191,197}.

1979 entwickelten Wessler et al. das so genannte Wessler Stasemodell für venöse Thrombose in Kaninchen⁶⁹, bei dem vollständige Stase durch Ligatur der V. cava zur Thrombosierung führt. Studien zur Wirksamkeit von Medikamenten beruhen hierbei auf Messungen der Thrombusmasse. Das Stasemodell findet zahlreiche Modifizierungen für unterschiedliche Tierarten (Primaten, Schweine, Hunde, Ratten, Mäuse) sowie venöse Gefäße im Organismus (V. cava, V. jugularis, V. femoralis).

Eine Kombination aus Gefäßwandschaden durch Gefäßklemmen und verlängerter Stase der V. cava führt nach Spokas und Wun nicht zu verbesserter Reproduzierbarkeit oder größerer Thrombusmasse¹⁹³. Da derartige Stasemodelle auf vollständig sistierendem Blutfluss beruhen, Thromben sich jedoch meist unter verlangsamer Strömung entwickeln, etablierten Chi et al. eine neue Methode der V. cava Thrombosierung in Kaninchen. Hierbei wird ein Katheter in die V. cava eingeführt, der die Strömungsgeschwindigkeit reduziert, eine fremde thrombogene Oberfläche liefert sowie kontinuierliche Blutflussmessungen erlaubt²⁴.

Zudem werden die Faktoren der Virchowschen Trias zur Thromboseinduktion oft auf unterschiedliche Art und Weise kombiniert. Eine Mischung aus venöser Stase und Hyperkoagulabilität erreichen Vogel et al. durch komplette Ligatur der V. cava und ihrer zuführenden Seitengefäße sowie der Applikation von Thromboplastin zur Induktion der Thrombusformation^{83,156,212}. Freund et al. dagegen kombinieren die direkte Applikation von Tissue Faktor in die V. cava mit deren anschließender Ligatur⁶⁰.

Die Methode der partiellen Stase der V. cava, bei zusätzlichem mechanischen Endothelzellschaden durch FeCl₃-Lösung ist auf Gustafsson et al. zurückzuführen⁷². Zudem gibt es Ansätze in denen die Thrombogenese durch partielle Stase und elektrischen Endothelzellschaden verursacht wird¹⁸⁸.

Singh et al. etablieren schließlich 2002 ein murines Modell für die Thrombosierung der V. cava, in dem durch Ligatur der Vene unter Einbeziehung eines Platzhalters eine Stromverlangsamung mit Restfluss erreicht wird^{136,191,192}. Diese auf Flussreduktion basierenden Modelle produzieren einen laminaren Thrombus, der große Ähnlichkeit mit humanen venösen Thromben aufweist¹⁴¹.

5.2.3 Spezifische Diskussion der verwendeten Thrombosemodelle

In vorliegender Arbeit wird das Denudationsmodell¹⁰⁷ für arterielle Thrombusinduktion sowie das Ligaturmodell mit Restfluss im venösen System^{191,192} herangezogen. Beide Modelle ermöglichen neben der vollständigen realitätsnahen Thrombosierung der Gefäße eine detailgetreue Darstellung der Thrombosierungsmechanismen *in vivo*.

Entscheidend für die Wahl des Denudationsmodells im arteriellen System ist der umfangreiche, mechanische Endothelzellschaden, der neben Plättchenadhäsion und -aggregation auch den raschen Verschluss der Arterie zur Folge hat. Ziel war es, einen dem tatsächlichen Auslöser ähnlichen Pathomechanismus der Thromboseentstehung zu wählen. Andernfalls würde es erschwert bzw. unmöglich werden, die eigentlichen Thrombosemechanismen und die sich vollziehenden Vorgänge zu untersuchen. Aus dem genannten Grund stellt das Modell mit einer Zerstörung der arteriellen Gefäßwand von außen durch Verwendung von Elektromikrokoagulation oder zur Thrombenbildung keine geeignete Methode für diese Arbeit dar, da der elektrische Schaden nicht nur eine komplette Denudation des intakten Endothels sondern zusätzlich eine Zerstörung aller glatten Muskelzellen der Media hervorruft, was nicht mit dem tatsächlichen Entstehungsweg arterieller Thromben zu vergleichen ist. Zudem ist es mit diesem Verfahren schwer, standardisierbare Schäden zu setzen. Gesagtes gilt für das Verfahren, das einen photochemischen Schaden erzeugt. Durch die Kombination aus direkter Bestrahlung eines Gefäßabschnitts mit einem Laser bestimmter Wellenlänge und der intravenösen Applikation einer chemischen, photoreaktiven Substanz wird ein Thrombus erzeugt, welcher nicht durch die eigentlichen Antriebe der arteriellen Thrombose entsteht. Somit würden Untersuchungen Mechanismen zeigen, welche nicht die pathophysiologischen Mechanismen einer normal entstehenden Thrombose darlegen. Das Modell der chemisch induzierten Endothelverletzung, die durch Applikation eines in 10%iger FeCl₃-Lösung erfolgt, bildet einen Thrombus durch Schädigung der Endothelzellen durch Oxidation und Inflammation von der Adventitia ausgehend. Es handelt sich hierbei also eher um eine Thrombose infolge einer Nekrotisierung, als um eine Thrombose infolge der Endothelschädigung. Somit stellt die mechanische Alteration, bei der der Schaden der Endothelzellen auf das Endothel und Subendothel beschränkt bleibt, das geeignetste Modell dar, da es den pathophysiologischen Geschehnissen arterieller Thrombosen entspricht¹⁰⁷. Der entstehende Schaden ist bei diesem Modell auch immer groß genug, um einen Verschluss des Gefäßes durch den Thrombus hervorzurufen. In diesem Zusammenhang sei nochmals auf die Kontrolluntersuchungen verwiesen, die alle zeigen, dass es zu einer vollständigen Verletzung des Endothels und des Subendothels mit ausnahmsloser Zerstörung der Endothelzellkerne sowie einer starken Thrombenbildung, meist mit Gefäßverschluss kommt. Somit eignet sich das Denudationsmodell optimal zur intravitalmikroskopischen Untersuchung der initialen Zelladhäsion, der Zell-Zell-Interaktionen sowie der Thrombosierung und anschließenden Rekanalisierung arterieller Gefäße.

Da, wie oben eingehend erläutert, venöse Thromben im menschlichen Organismus hauptsächlich aufgrund verlangsamer Strömung und Hyperkoagulabilität entstehen, eignen sich Modelle, basierend auf mechanischer Endothelverletzung und kompletter Stase nur bedingt zur Untersuchung tatsächlicher venöser Thrombosierungsmechanismen. In diesem Zusammenhang stellt das murine Stase-Modell der V. cava, bei der es zu einer Stromverlangsamung mit Restfluss kommt, die realen Gegebenheiten der venösen Thrombosierung am besten dar. Entscheidend hierbei ist, dass eine Flussreduktion von mindestens 80%¹³⁶ gegenüber der Ausgangsgeschwindigkeit erreicht wird. Um sicherzustellen, dass dies in den Versuchen immer gewährleistet war, wurden bei den Versuchen immer zur Standardisierung und zur Kontrolle der erzeugten Stromverlangsamung die Geschwindigkeit fließender Blutzellen (in mm/sec) im Zentralstrom des Gefäßes vor und nach Ligatur gemessen. Basierend auf diesen Messungen kann die prozentuale Stromverlangsamung berechnet werden. Sie beläuft sich auf eine Reduktion von im Mittel 80%.

Durch die Verwendung dieser beiden Thrombosemodelle können die unterschiedlichen Thrombosierungsmechanismen beider Systeme herausgearbeitet und verglichen werden. Arterielle Thrombosierung basierend auf einer rein mechanischen Endothelverletzung wird der Thrombosierung im venösen System bei veränderten Strömungsverhältnissen und mechanisch vollständig unversehrtem Endothel gegenübergestellt (siehe Abbildung 82).

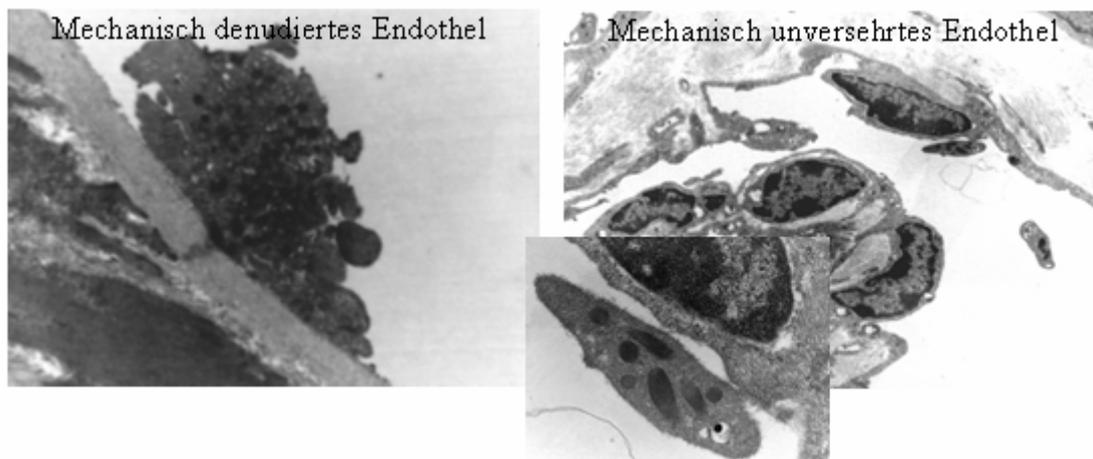


Abbildung 82: Gegenüberstellung der Thrombosierungsmechanismen im arteriellen und venösen Thrombosemodell. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der A. carotis communis (links), sowie der V. cava (rechts) (in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie der GSF, München). Links: Denudationsmodell der A. carotis communis mit mechanischer Zerstörung der Endothelzellen mittels Drahtverletzung. Dem freigelegten Subendothel haften flächige Thrombozytenaggregate an. Intakte Endothelzellkerne sind nicht mehr auszumachen. Rechts: Flussreduktionsmodell der V. cava mit intakter Endothelzellschicht und dysfunktionalem Endothel. Äußerlich unversehrte Endothelzellkerne, sowie ein einzelner adhärenter Thrombozyt stellen sich dar.

5.2.4 Charakterisierung der ablaufenden zellulären Interaktionen und der beteiligten molekularen Phänomene

Durch vorliegende Untersuchungen an oben genannten Mäusestämmen wird ein umfassendes Bild, der im Rahmen der Thrombosierung ablaufenden Mechanismen gezeichnet. Anhand der intravitalmikroskopischen Aufnahmen, können die zellulären Interaktionen in Echtzeit verfolgt werden. Erstmals werden die Abläufe der arteriellen und venösen Thrombogenese detailliert schon ab frühesten Zeitpunkten, das heißt wenige Minuten nach Thrombusinduktion *in vivo* beleuchtet und gegenübergestellt. Die anschließenden histologischen und ultrastrukturellen Analysen dienen der Evaluierung und Illustration der entstehenden Thromben.

5.2.5 Einfluss unterschiedlicher Zelltypen u. -rezeptoren auf die Thrombosierung

Eine der Hauptfragestellungen dieser Arbeit ist, welche Bedeutung Thrombozyten sowie Leukozyten in der arteriellen und venösen Thrombogenese einnehmen. Die Untersuchungen an C57BL/6J Wildtyptieren zeigen deutlich die herausragende Stellung von Blutplättchen in der arteriellen Thrombose. Innerhalb weniger Minuten nach Gefäßverletzung mit Freilegung der subendothelialen Matrix bildet sich nach initialer Plättchenadhäsion und anschließender Aggregation ein wandständiger, stabiler plättchenreicher Thrombus, der aufgrund oben beschriebener Mechanismen an Größe zunimmt^{27,125,126,175,205}. Im Vergleich dazu zeigen die Untersuchungen, daß die initiale Thrombozytenadhäsion im venösen System nur eine sehr untergeordnete Rolle spielt. Die durchgeführten Intravitalmikroskopien zeigen auf anschauliche Weise, dass eindeutig eine nur moderate Adhäsion von Blutplättchen bei vollständigem Fehlen von Plättchenaggregation in den ersten Stunden der Beobachtung, vorliegt. Im Gegensatz hierzu zeigt sich im arteriellen System schon nach wenigen Minuten ein vollständiger Gefäßverschluss durch Thrombozyten. Somit spielen diese in der initialen Phase der arteriellen Thrombose eine entscheidende Rolle. Ganz gegensätzlich sind die Ergebnisse für die venösen Thrombosierung. Selbst 6 Stunden nach Staseinduktion finden sich nur wenige adhärenente Thrombozyten.

Untersuchungen über die Bedeutung von Leukozyten in beiden Systemen lassen den umgekehrten Sachverhalt erkennen.

Während in Arterien nur wenige Leukozyten in den Thrombus einbezogen werden, kommt es in venösen Gefäßen zu einer massiven Leukozyteninfiltration.

Die Leukozytenadhäsion an das Endothel sowie an bereits adhärenente Blutplättchen und deren transendotheliale Migration spielt eine entscheidende Rolle für die Aktivierung der Gerinnungskaskade in der Pathogenese venöser Thrombosen.

Somit scheint der Vorgang der Leukozytenadhäsion im venösen System eine weitaus bedeutendere Stellung als im arteriellen System einzunehmen, was die durchgeführten Untersuchungen deutlich machen. Zwar konnte in zahlreichen klinischen Studien gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen erhöhten Leukozytenzahlen und dem Risiko für kardiovaskuläre und zerebrovaskuläre Erkrankungen besteht^{2,121}, der Einfluss exzessiver Leukozyteninfiltration im Rahmen entzündlicher Reaktionen im venösen System übersteigt jedoch allein zahlenmäßig deren Bedeutung im arteriellen System. Abbildung 83 illustriert anschaulich dieses gegensätzliche Adhäsionsverhalten thrombozytärer und leukozytärer Zellen im arteriellen und venösen makrovaskulären System.

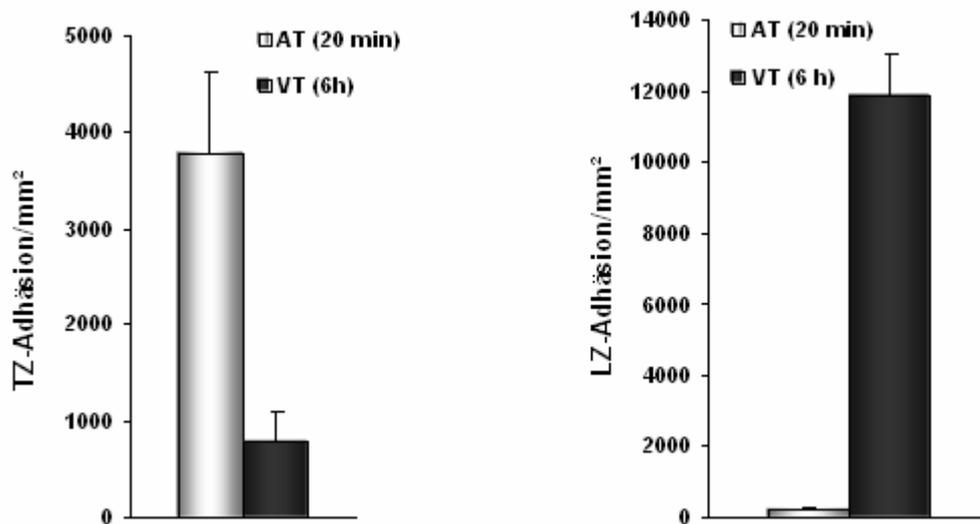


Abbildung 83: Vergleich der Thrombozyten- sowie Leukozytenadhäsion zwischen arterieller und venöser Thrombose in C57BL/6J Wildtyp-Tieren.

Die Fragestellung, welchen Einfluss unterschiedliche molekulare Rezeptoren auf die arterielle und venöse Thrombogenese ausüben, wird durch Untersuchungen an verschiedenen Knock-out-Stämmen bearbeitet. Anhand der GPIIb defizienten Maus wird bezeichnend illustriert, dass Blutplättchen zwar eine zentrale Rolle in der Entstehung arterieller Thromben spielen, diese in der frühen Phase der venösen Thrombose dagegen nur untergeordnete Aufgaben erfüllen. Die fehlende Funktionalität des GPIIb-IIIa-Integrinrezeptors bewirkt das vollständige Fehlen der Thrombozytenaggregation bei moderater Adhäsion im arteriellen System. Da dieses Plättchenintegrin essentiell für thrombozytäre Interaktionen mit der extrazellulären Matrix, Plättchenadhäsion und -aggregation während der Hämostase und arterieller Thrombose ist^{186,187}, verhindert dessen Fehlen vollständig die Thrombenbildung in Arterien. Vorliegende Untersuchungen zeigen, dass auch im venösen System in GPIIb-IIIa^{-/-}-Tieren die Thrombozytenadhäsion deutlich reduziert ist. Aufgrund der herausragenden Bedeutung leukozytärer Zellen für die venöse Thrombogenese hat das Fehlen des GPIIb-IIIa-Rezeptors in der initialen Phase jedoch kaum Einfluss auf die Größe leukozytärer Koaggregate im venösen System. Leukozytenadhäsion findet anfangs in GPIIb-IIIa

defizienten Tieren im venösen System unverändert statt. In arteriellen Gefäßen zeigt sich dagegen ein deutlich reduzierter Gehalt an leukozytären Zellen, was indirekt durch das Plättchenintegrin GPIIb-IIIa bewirkt wird. GPIIb-IIIa gewährleistet über feste Adhäsion einen engen Kontakt zwischen Thrombozyten und Leukozyten und beeinflusst so indirekt den Leukozytengehalt in Arterien nach Gefäßverletzung². Für die weitere Entwicklung venöser Thromben scheinen Thrombozyten und der GPIIb-IIIa-Rezeptor im Besonderen allerdings wichtige Funktionen zu erfüllen. Dies wird anhand der 48-Stunden Versuche zur venösen Thrombosierung herausgestellt. Verglichen mit Thromben in C57BL/6J-Wildtyp-Tieren zeigen GPIIb-IIIa^{-/-} Mäuse eine massive Reduktion der Thrombengröße, was durch die fehlende Stabilität der Thromben aufgrund fehlender Fibrinogenvernetzung erklärt werden könnte.

Die Rolle polymorphkerniger neutrophiler Leukozyten und des Adhäsionsmoleküls P-Selektin im arteriellen und venösen System wird durch Versuche mit P-Selektin Knock-out-Tieren untersucht. Während PMN wie vorliegende Daten eindrucksvoll zeigen, in der raschen Bildung arterieller Thromben kaum eine Rolle spielen, haben sie eine herausragende Stellung im Geschehen der venösen Thrombosierung. In P-Selektin^{-/-}-Tieren findet nach Gefäßverletzung im arteriellen System eine ebenso rasche und annähernd starke Thrombusbildung, wie in C57BL/6J-Wildtyp-Tieren statt. Die Thrombozytenadhäsion zeigt keinerlei Unterschiede verglichen mit den Verhältnissen in Wildtyp-Tieren. Lediglich die Aggregation von Blutplättchen und somit die Größe des Thrombusareals wird durch den Defekt beeinträchtigt. Auch die Adhäsivität leukozytärer Zellen und deren Gehalt in arteriellen Thromben nimmt in P-Selektin defizienten Mäusen nur moderat ab, da der Defekt eine herabgesetzte Rekrutierung von Leukozyten nach sich zieht und so die Bildung des hämostatischen Thrombus beeinträchtigt. Zudem wird in diesen Tieren im arteriellen System eine stärkere Rigidität und Embolisierungsneigung der Thromben aufgrund fehlender Stabilisierung der initialen GPIIb-IIIa-Fibrinogen Interaktionen durch P-Selektin beobachtet^{137,138}.

Im venösen System dagegen nimmt das Glykoprotein P-Selektin eine herausragende Stellung ein. Bei deutlich signifikanter Reduktion der Leukozytenadhäsion in der V. cava findet keinerlei Aggregat- oder Thrombenbildung in der initialen Phase venöser Thrombose in P-Selektin^{-/-}-Tieren statt, da dieses heterotypische interzelluläre Interaktionen vermittelnde integrale Membranprotein für physiologische Inflammation und vaskuläre Homeostase verantwortlich ist^{109,133,236}. In einigen Studien wurde bereits der Einfluss von P-Selektin auf die Pathogenese tiefer Venenthrombosen untersucht^{182,195,196}. Die prophylaktische Infusion monoklonaler P-Selektin Antikörper reduziert das Ausmaß der Fibrinablagerungen in Transplantatversuchen an Pavianen¹⁵³, schwächt experimentell induzierte venöse Thrombosen in Pavianen²⁰¹, Ratten und Katzen ab^{85,218}. Zudem werden erhöhte Konzentrationen an löslichem P-Selektin im Blut von Patienten mit DIC, TTP und Heparin-induzierter Thrombozytopenie, also Erkrankungen mit generalisierter Hyperkoagulabilität, festgestellt^{25,85}. Diese Arbeit zeigt erstmals in einem auf Flussverlangsamung basierenden

venösen Thrombosemodell, dass das Fehlen von P-Selektin die pathologische Thrombosebildung initial zu verhindern vermag.

Die histologischen Untersuchungen zur Thrombosierung im venösen System, 48 Stunden nach Ligatur ergeben dagegen eine reduzierte, jedoch nicht vollständig abwesende Thrombusbildung in der V. cava. P-Selektin vermag demnach zwar die initiale Thrombusbildung im venösen System zu verhindern, wird aber später durch weitere Adhäsionsmoleküle aus der Familie der Selektine kompensiert.

Sowohl die intravitalmikroskopischen, als auch die histologischen Untersuchungen illustrieren oben erläuterte Sachverhalte eindeutig. Anhand der Histologien wird zudem die Ähnlichkeit der Zusammensetzung der artifiziell erzeugten experimentellen Thromben mit den Thromben in humanen Patienten hervorgehoben¹⁴¹.

Abbildung 84 stellt abschließend nochmals die unterschiedlichen Einflüsse der verschiedenen molekularen Rezeptoren auf die Thrombengröße im arteriellen und venösen System gegenüber.

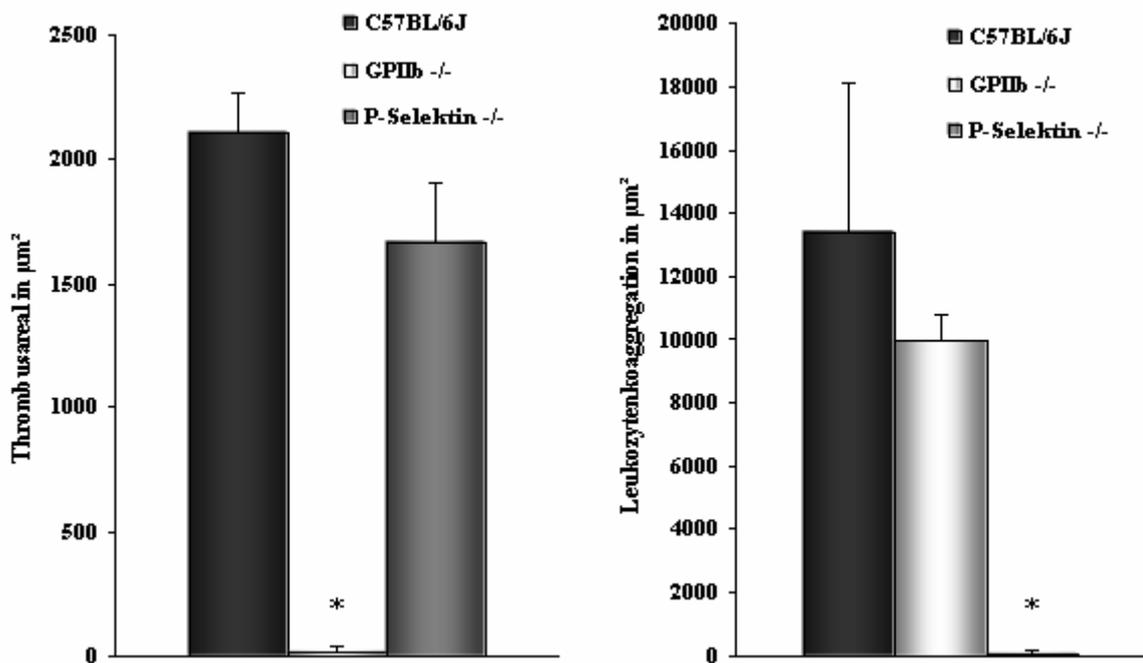


Abbildung 84: Darstellung der Einflüsse verschiedener molekularer Rezeptoren auf die Thrombengröße im arteriellen (links) und venösen System (rechts).

Neben der erstmaligen intravitalmikroskopischen Darstellung der Mikropartikelrekrutierung in Wildtyptieren in venösen Thromben und deren Zunahme im Zeitverlauf wird im Rahmen dieser Arbeit parallel dazu auch die Fibrinbildung im Kontrollstamm intravitalmikroskopisch

gemessen. Es zeigt sich, dass sowohl die arterielle als auch die frühe venöse Thrombosierung von einer vergleichbaren Fibrinbildung begleitet wird.

Des Weiteren wird der Einfluss des integralen Membranproteins Tissue Faktor auf die Entstehung venöser Thromben untersucht. Wie oben dargestellt zeigen Low TF-Tiere im Rahmen der initialen venösen Thrombose eine vergleichbar mit C57BL/6J-Tieren moderate Thrombozytenadhäsion am Endothel. Die Leukozytenadhäsion dagegen ist initial deutlich herabgesetzt und verglichen mit den Kontrollen signifikant vermindert. 48 Stunden nach Ligatur, wird schließlich das volle Ausmaß des Tissue Faktor Defekts deutlich. Wie die Auswertung der Histologien veranschaulicht, verhindert die Alteration des primären Initiators der Gerinnungskaskade eine Thrombosierung des Gefäßes. Lediglich ein kleiner, wandständiger Thrombus in der ansonsten vollständig kollabierten Vene kann gebildet werden.

5.2.6 Ultrastrukturelle Unterschiede beider Thromboseformen

Durch raster- und transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen der experimentell erzeugten Thromben wird deren Ultrastruktur genauer untersucht. Die Methoden der venösen und arteriellen Thrombusinduktion werden so beleuchtet und die vorhandenen pathologischen Alterationen können den Verhältnissen in unverletzten Kontrollgefäßen gegenübergestellt und bewertet werden. Von besonderer Bedeutung ist die Untersuchung der Gefäßwandintegrität im venösen System nach Thrombusinduktion. Es kann eindrucksvoll gezeigt werden, dass keinerlei Hinweise auf einen mechanischen Gefäßwandschaden der V. cava bestehen. Wie in den venösen Kontrollgefäßen, stellen sich sowohl im REM als auch im TEM auch nach Ligatur mechanisch unverletzte Endothelzellkerne und eine undurchbrochene Endothelzellschicht dar. Während vor Ligatur der V. cava keinerlei adhärenente Zellen am Endothel auszumachen sind, stellen sich bereits 1 Stunde nach Stromverlangsamung einzelne adhärenente, aktivierte Thrombozyten, sowie Leukozyten dar. Die Dichte dieser Zellen am Endothel nimmt im Zeitverlauf zu, bis sich schließlich 6 Stunden nach Ligatur ein regelrechter Leukozyten-Thrombozytenrasen, durchsetzt von Fibrinfäden und Erythrozyten gebildet hat. Zwischen diesen Feldern massiver Adhäsivität fallen immer wieder völlig unbeeinträchtigte Gefäßareale ohne adhärenente Zellen oder Fibrinablagerungen auf. Die transmissionselektronischen Aufnahmen illustrieren, dass es sich bei den adhärenenten Zellen überwiegend um monozytäre Zellen handelt. Deren Interaktionen untereinander, mit Thrombozyten, sowie mit dem unverletzten Endothel können ebenfalls mithilfe der TEM dargestellt und nachgewiesen werden. Des Weiteren wird die Transmigration von leukozytären Zellen beobachtet. In Gefäßen 48 Stunden nach Ligatur zeigt sich zudem eine massive Vakuolisierung und Ödematisierung des Endothels.

Die TEM-Aufnahmen der mechanisch verletzten arteriellen Gefäße, lassen eine Zerstörung der Endothelzellen mit Freilegung der subendothelialen Matrix erkennen. An den Stellen der

Endothelverletzung bilden sich massive Thrombozytenclots, in denen nur vereinzelt Leukozyten auszumachen sind.

Sämtliche intravitalmikroskopischen und histologischen Befunde können demnach anhand der Ultrastrukturanalysen bestätigt werden. Die Aufnahmen ermöglichen zudem eine bessere Illustrierung und Bewertung der Gegebenheiten in beiden Thrombosemodellen.

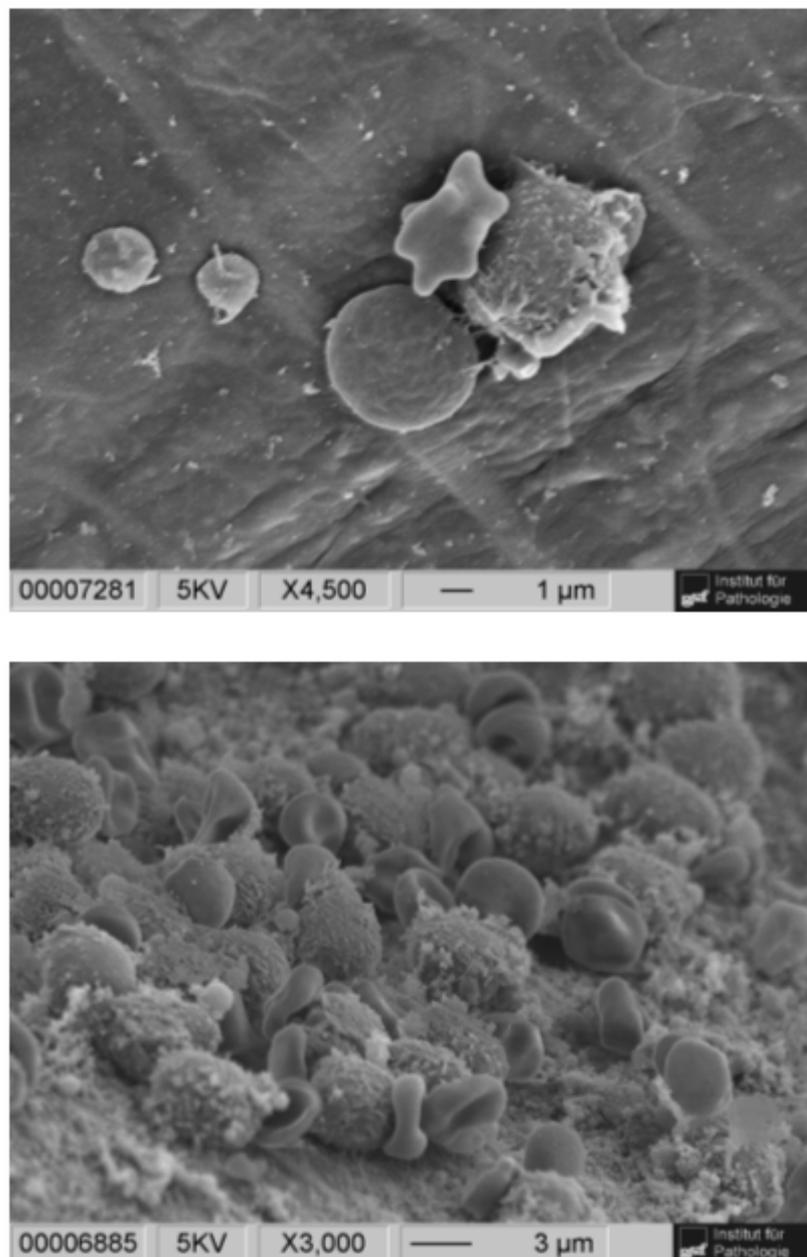


Abbildung 85: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der V. cava 1 (oben) sowie 6 Stunden nach Ligatur (unten), zur Illustration oben beschriebener Zusammenhänge (in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie der GSF, München).

5.2.7 Ausblick

Grundlage aller prophylaktischen und therapeutischen Interventionen thrombotischer Ereignisse im Organismus ist das umfangreiche Verständnis der pathologischen Thrombosierungsmechanismen. Entscheidend hierbei ist die Differenzierung zwischen arterieller und venöser Thrombosierung. Basierend auf den zellulären, molekularen und ultrastrukturellen pathologischen Veränderungen in beiden Systemen können sinnvolle neue Therapieansätze erarbeitet werden.

Diese Arbeit trägt durch die detaillierte Gegenüberstellung beider Thromboseformen zu einem neuen, umfassenden Verständnis der Thrombosierungsmechanismen bei. Sie zeigt die unterschiedlichen Entstehungsmechanismen auf und hebt hervor, dass eine mechanische Endothelzellverletzung rasch zu arterieller Thrombose führt, wohingegen die venöse Thrombose auf verlangsamten Strömungsgeschwindigkeiten ohne mechanische Alteration des Endothels beruht. Die unterschiedlichen Versuchsansätze verdeutlichen, dass sich arterielle Thromben innerhalb weniger Minuten bilden, wohingegen venöse Thromben mehrere Stunden bis hin zu Tagen für ihre Entwicklung benötigen.

Während Thrombozyten und das Membranglykoprotein GPIIb-IIIa eine herausragende Rolle in der frühen Phase arterieller Thrombogenese spielt, treten Leukozyten und das in thrombozytären α -Granula sowie Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen gespeicherte P-Selektin im arteriellen System in den Hintergrund. Im Gegensatz dazu konnte in vorliegender Arbeit die zentrale Bedeutung von P-Selektin für die Anlagerung leukozytärer Zellen in der frühen Phase venöser Thrombosierung herausgestellt werden. Während GPIIb-IIIa eine Schlüsselrolle im arteriellen System einnimmt, tritt sein Einfluss in der frühen Phase venöser Thrombosierung in den Hintergrund und gewinnt erst in der späten Phase an Bedeutung. Die herausragende Stellung des integralen Membranproteins Tissue Faktor für die Vorgänge der venösen Thrombosierung kann in dieser Arbeit erstmals *in vivo* gezeigt werden.

Somit vermitteln vorliegende Untersuchungen zum einen ein umfangreiches Bild arterieller und venöser Thrombosierung, zum anderen stellen sie die gravierenden Unterschiede zwischen beiden Thromboseformen heraus. Sie verdeutlichen, dass eine Universaltherapie keiner der beiden Thromboseformen gerecht werden kann und zeigen neue Ansätze für prophylaktische sowie therapeutische Interventionen auf, fordern aber zugleich die weitere Erforschung zugrunde liegender Mechanismen.

6 Zusammenfassung

Die exakten molekularen und zellulären Mechanismen, die zu arteriellen und venösen Thrombosen und in deren Folge zu Schlaganfall, Herzinfarkt bzw. Lungenembolien führen, sind nach wie vor nur unzureichend verstanden. In der vorliegenden Arbeit wurden daher arterielle sowie venöse Thromben im Mausmodell erzeugt, um die an der Entstehung venöser und arterieller Thromben beteiligten zellulären und molekularen Prozesse im Detail zu analysieren.

Hierzu wurden zunächst zwei Thrombosemodelle (arteriell bzw. venös) an der Maus etabliert, die - anders als die bislang bestehenden Modelle - die unterschiedliche Entstehungsweise arterieller (Endothelverletzung) und venöser Thromben (Stase bei intaktem Endothel) berücksichtigt. Neben histologischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen kam insbesondere die intravitale Videofluoreszenzmikroskopie zum Einsatz, um die zellulären und molekularen Phänomene im Rahmen der venösen und arteriellen Thrombose zu analysieren. Um gezielt die Bedeutung von Thrombozyten, Leukozyten, Fibrin sowie Mikropartikeln in beiden Thromboseformen herauszuarbeiten, wurden Wildtypiere (C57BL/6J) mit genetisch veränderten Tieren verglichen. Hierbei wurde zum einen ein Stamm mit Plättchenadhäsions- und aggregationsdefekt (Glykoprotein [GP]IIb^{-/-}) sowie ein Stamm mit defizienter Leukozytenadhäsion (P-Selektin^{-/-}) herangezogen. Zum anderen wurde der Einfluss des Blutgerinnungsproteins „Tissue Faktor“, welches den primären Initiator der Blutgerinnungskaskade darstellt, anhand „Tissue Faktor“ defizienter Tiere (Low TF, HCV100) erforscht.

Mit Hilfe der neu etablierten Modelle konnte im Rahmen der vorliegenden Untersuchung gezeigt werden, dass es bei der arteriellen Thrombose initial zur Adhäsion von Thrombozyten kommt, während nur wenige Leukozyten im Thrombus rekrutiert wurden. Demgegenüber ist die Adhäsion von Leukozyten ein prominentes Phänomen in der Initialstrecke der venösen Thrombose. Der Verlust von thrombozytärem P-Selektin im Rahmen der arteriellen Thrombose führte zu einer Reduktion der Thrombusstabilisierung, hatte jedoch keinen Effekt auf die Thrombozytenadhäsion und -aggregation *per se*. Dagegen führt der Verlust von GPIIb zu einem vollständigen Fehlen adhärenter und aggregierter Thrombozyten im Rahmen der arteriellen Thrombose. Bei der venösen Thrombose zeigten P-Selektin^{-/-}-Mäuse eine drastische Reduktion der Leukozytenakkumulation. Diese reduzierte Leukozytenadhäsion ging mit einer Reduktion der Thrombusgröße 48 Stunden nach Stase einher. Doch auch Thrombozyten scheinen zur venösen Thrombosierung beizutragen. Zwar zeigten sich in den Initialstrecken nur wenig adhärente Thrombozyten, dennoch führte der Verlust von GPIIb zu einer Reduktion der Thrombusgröße. Neben zellulären Mechanismen trägt die Expression von Tissue Faktor wesentlich zur venösen Thrombose bei. Entsprechend zeigten Low TF Mäuse eine drastisch reduzierte Thrombusgröße, während weder Thrombozytenadhäsion noch

Leukozytenadhäsion im Initialstadium durch den TF-Defekt beeinflusst wurden. Insgesamt scheinen damit Thrombozyten den zentralen Trigger der arteriellen Thrombose darzustellen, während Leukozyten eine kritische Rolle im Rahmen der venösen Thrombose spielen.

Zusammenfassend zeigen die hier dargestellten Untersuchungen erstmals die unterschiedlichen an der Entstehung von arterieller und venöser Thrombose beteiligten zellulären und molekularen Mechanismen und könnten so den Weg für die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien ebnen.

7 Summary

***In vivo* analysis of the cellular and molecular mechanisms in arterial and venous thrombosis in a mouse model**

The detailed molecular and cellular mechanisms that lead to arterial and venous thrombosis and trigger heart attack and stroke, as well as pulmonary emboli in the case of venous thrombosis, are not yet fully understood. Therefore in the present study, arterial as well as venous thrombi were created in a mouse model in order to analyse the cellular and molecular processes that contribute to arterial and venous thrombosis *in vivo*.

Two thrombosis mouse models (one arterial and one venous) were established. In contrast to existing models, these models include the diverse formation of arterial (endothelial damage) and venous thrombi (stasis with intact endothelium). In addition to histological and electron microscopic analyses intravital microscopy was performed in order to analyse the cellular and molecular phenomena in venous and arterial thrombosis. Wild type animals (C57BL/6J) were compared to genetically modified animals in order to determine the impact of platelets, leukocytes, fibrin and microparticles in both forms of thrombosis. Mice with defective platelet adhesion/aggregation (glycoprotein [GP]IIIb^{-/-}) as well as defective leukocyte adhesion (P-Selectin^{-/-}) were used. In addition to investigate the role of the coagulation cascade protein “tissue factor” (TF), the primary initiator of the coagulation cascade, we took advantage of “TF” deficient mice (Low TF, HCV 100).

By means of these newly established models, we showed that in arterial thrombosis platelets adhere rapidly, whereas few leukocytes are recruited into the thrombus. In contrast leukocyte adhesion is the prominent initial phenomena in venous thrombosis. The loss of platelet P-Selectin in arterial thrombosis reduced the stability of the thrombus, but had no effect on platelet adhesion and aggregation per se. In contrast the loss of GPIIb led to a complete lack of platelet adhesion and aggregation in arterial thrombosis.

In venous thrombosis, P-Selectin^{-/-} mice showed a massive reduction in leukocyte accumulation. The reduced leukocyte adhesion was accompanied by a reduction of the thrombus size 48 hours after stasis. However platelets also appear to contribute to venous thrombosis. While, initially very few platelets adhered to the endothelial cell layer, the loss of GPIIb did reduce thrombus size. Besides cellular mechanisms, the expression of “TF” is essential for venous thrombosis. Accordingly, low TF mice showed a dramatically reduced thrombus size, whereas neither platelet adhesion nor leukocyte adhesion initially is affected by the “TF” defect. Altogether, platelets appear to be the major trigger of arterial thrombosis, whereas venous thrombosis strictly requires the contribution of leukocytes.

Together the present study for the first time strikingly points out the diverse cellular and molecular mechanisms that contribute to arterial and venous thrombosis *in vivo*.

Consequently distinct new future strategies for prevention and therapy of both arterial and venous thrombosis are suggested.

8 Literaturverzeichnis

1. Afri M., F. A. A., Cohen Y. Active oxygen chemistry within the liposomal bilayer PartIV: Locating 2',7'-dichlorofluorescein (DCF), DCHF and DCFH-DA in the lipid bilayer. *Chemistry and Physics of Lipids 131 (2004)* 123-133 (2004).
2. Afshar-Kharghan, V. & Thiagarajan, P. Leukocyte adhesion and thrombosis. *Curr Opin Hematol* **13**, 34-9 (2006).
3. Aoki, T. et al. Comparison of the antithrombotic effects of FK633, GPIIb/IIIa antagonist, and aspirin in a guinea pig thrombosis model. *Thromb Res* **89**, 129-36 (1998).
4. Azougagh Oualane, F., Doutremepuich, F. & Doutremepuich, C. [Experimental models of venous thrombosis]. *Ann Cardiol Angeiol (Paris)* **44**, 288-98 (1995).
5. Baatz H, S. M., Harris AG, Krombach F., Kinetics of intravital white blood cell staining by intravascular administration of rhodamine 6G. *Int J Microcirculation* **15**: 85-91. Ref ID: 553 (1995).
6. Bach, R. R. Initiation of coagulation by tissue factor. *CRC Crit Rev Biochem* **23**, 339-68 (1988).
7. Bauer AW, M. K. (Hämostaseologie (92-99), 1995).
8. Beck J. in *Med.Diss* (2004).
9. Behnke, O. The morphology of blood platelet membrane systems. *Ser Haematol* **3**, 3-16 (1970).
10. Bellin C. in *Mathematisch-Naturwissenschaftliche Doktorarbeit. 2004* (2004).
11. Berlanga, O. et al. The Fc receptor gamma-chain is necessary and sufficient to initiate signalling through glycoprotein VI in transfected cells by the snake C-type lectin, convulxin. *Eur J Biochem* **269**, 2951-60 (2002).
12. Berman, C. L. et al. A platelet alpha granule membrane protein that is associated with the plasma membrane after activation. Characterization and subcellular localization of platelet activation-dependent granule-external membrane protein. *J Clin Invest* **78**, 130-7 (1986).
13. Bolhuis, P. A., Sakariassen, K. S. & Sixma, J. J. Adhesion of blood platelets to human arterial subendothelium: role of factor VIII-Von Willebrand factor. *Haemostasis* **8**, 312-23 (1979).
14. Bonfanti, R., Furie, B. C., Furie, B. & Wagner, D. D. PADGEM (GMP140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *Blood* **73**, 1109-12 (1989).
15. Bout, D. et al. Rat resistance to schistosomiasis: platelet-mediated cytotoxicity induced by C-reactive protein. *Science* **231**, 153-6 (1986).
16. Broersma, R. J., Kutcher, L. W. & Heminger, E. F. The effect of thrombin inhibition in a rat arterial thrombosis model. *Thromb Res* **64**, 405-12 (1991).
17. Brummel KE, P. S., Butenas S, Mann KG,. Thrombin functions during tissue factor-induced blood coagulation. *Blood* **100**, 148-152 (2002).
18. Bugge, T. H. et al. Fatal embryonic bleeding events in mice lacking tissue factor, the cell-associated initiator of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 6258-63 (1996).
19. Bullard, D. C. et al. P-selectin/ICAM-1 double mutant mice: acute emigration of neutrophils into the peritoneum is completely absent but is normal into pulmonary alveoli. *J Clin Invest* **95**, 1782-8 (1995).

20. Butcher, E. C. & Picker, L. J. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* **272**, 60-6 (1996).
21. Carmeliet, P. et al. Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature* **383**, 73-5 (1996).
22. Carmeliet, P. et al. Vascular wound healing and neointima formation induced by perivascular electric injury in mice. *Am J Pathol* **150**, 761-76 (1997).
23. Carmeliet, P. et al. Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice. *Nature* **368**, 419-24 (1994).
24. Chi, L. et al. A novel model of venous thrombosis in the vena cava of rabbits. *J Pharmacol Toxicol Methods* **39**, 193-202 (1998).
25. Chong, B. H. et al. Plasma P-selectin is increased in thrombotic consumptive platelet disorders. *Blood* **83**, 1535-41 (1994).
26. Clemetson, J. M., Polgar, J., Magnenat, E., Wells, T. N. & Clemetson, K. J. The platelet collagen receptor glycoprotein VI is a member of the immunoglobulin superfamily closely related to Fc α R and the natural killer receptors. *J Biol Chem* **274**, 29019-24 (1999).
27. Clemetson, K. J. & Clemetson, J. M. Platelet collagen receptors. *Thromb Haemost* **86**, 189-97 (2001).
28. Condliffe, A. M., Kitchen, E. & Chilvers, E. R. Neutrophil priming: pathophysiological consequences and underlying mechanisms. *Clin Sci (Lond)* **94**, 461-71 (1998).
29. Cox, J. S. The maturation and canalization of thrombi. *Surg Gynecol Obstet* **116**, 593-99 (1963).
30. Davie EW, R. O. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science* **145**, 1310-1312 (1964).
31. Davis, C., Fischer, J., Ley, K. & Sarembock, I. J. The role of inflammation in vascular injury and repair. *J Thromb Haemost* **1**, 1699-709 (2003).
32. Davis, M. M. & Bjorkman, P. J. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* **334**, 395-402 (1988).
33. Day, S. M., Reeve, J. L., Myers, D. D. & Fay, W. P. Murine thrombosis models. *Thromb Haemost* **92**, 486-94 (2004).
34. Day, S. M. et al. Macrovascular thrombosis is driven by tissue factor derived primarily from the blood vessel wall. *Blood* (2004).
35. de Groot, P. G., MJ, I. J. & Sixma, J. J. Platelet adhesion to the subendothelium under flow. *Methods Mol Biol* **96**, 159-70 (1999).
36. de Groot, P. G., Ottenhof-Rovers, M., van Mourik, J. A. & Sixma, J. J. Evidence that the primary binding site of von Willebrand factor that mediates platelet adhesion on subendothelium is not collagen. *J Clin Invest* **82**, 65-73 (1988).
37. de Groot, P. G. & Sixma, J. J. Platelet adhesion. *Br J Haematol* **75**, 308-12 (1990).
38. Del Conde, I., Shrimpton, C. N., Thiagarajan, P. & Lopez, J. A. Tissue factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood* (2005).
39. Dietrich, W. D., Ginsberg, M. D., Busto, R. & Watson, B. D. Photochemically induced cortical infarction in the rat. 1. Time course of hemodynamic consequences. *J Cereb Blood Flow Metab* **6**, 184-94 (1986).
40. Dorffler-Melly, J., Schwarte, L. A., Ince, C. & Levi, M. Mouse models of focal arterial and venous thrombosis. *Basic Res Cardiol* **95**, 503-9 (2000).
41. Edgington, T. S., Mackman, N., Brand, K. & Ruf, W. The structural biology of expression and function of tissue factor. *Thromb Haemost* **66**, 67-79 (1991).

42. Eichhorn, M. E., Ney, L., Massberg, S. & Goetz, A. E. Platelet kinetics in the pulmonary microcirculation in vivo assessed by intravital microscopy. *J Vasc Res* **39**, 330-9 (2002).
43. Eilertsen, K. E. & B, O. S. Tissue factor: (patho)physiology and cellular biology. *Blood Coagul Fibrinolysis* **15**, 521-538 (2004).
44. Emambokus, N. R. & Frampton, J. The glycoprotein IIb molecule is expressed on early murine hematopoietic progenitors and regulates their numbers in sites of hematopoiesis. *Immunity* **19**, 33-45 (2003).
45. Engelhardt W. *Physiologie der Haustiere* (Enke im Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart, 2000).
46. Engelmann, B. Initiation of coagulation by tissue factor carriers in blood. *Blood Cells Mol Dis* (2006).
47. Engelmann, B., Luther, T. & Muller, I. Intravascular tissue factor pathway--a model for rapid initiation of coagulation within the blood vessel. *Thromb Haemost* **89**, 3-8 (2003).
48. Erhardt W, H. J., Haberstroh J, . *Anästhesie & Analgesie beim Klein- und Heimtier* (Schattauer Verlag, Stuttgart, 2004).
49. Eskola S, K.-K. E. Nesting material and number of females per cage: effects on mouse productivity in BALB/c, C57BL/6J, DBA/2 and NIH/S mice. *Laboratory animals* **33**, 122-128 (1999).
50. Esmon, C. T. Crosstalk between inflammation and thrombosis. *Maturitas* **47**, 305-14 (2004).
51. Esmon, C. T. The interactions between inflammation and coagulation. *Br J Haematol* **131**, 417-30 (2005).
52. Ezumi, Y., Shindoh, K., Tsuji, M. & Takayama, H. Physical and functional association of the Src family kinases Fyn and Lyn with the collagen receptor glycoprotein VI-Fc receptor gamma chain complex on human platelets. *J Exp Med* **188**, 267-76 (1998).
53. Falati, S., Gross, P., Merrill-Skoloff, G., Furie, B. C. & Furie, B. Real-time in vivo imaging of platelets, tissue factor and fibrin during arterial thrombus formation in the mouse. *Nat Med* **8**, 1175-81 (2002).
54. Falati, S. et al. Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin. *J Exp Med* **197**, 1585-98 (2003).
55. Farrehi, P. M., Ozaki, C. K., Carmeliet, P. & Fay, W. P. Regulation of arterial thrombolysis by plasminogen activator inhibitor-1 in mice. *Circulation* **97**, 1002-8 (1998).
56. Fay, W. P., Parker, A. C., Ansari, M. N., Zheng, X. & Ginsburg, D. Vitronectin inhibits the thrombotic response to arterial injury in mice. *Blood* **93**, 1825-30 (1999).
57. Forde RC. Reactive oxygen species and platelet activation in reperfusion injury. *Circulation* **95**, 787 (1997).
58. Fox, S. I. Human Physiology 4th. *Brown Publishers*.
59. Frenette, P. S., Johnson, R. C., Hynes, R. O. & Wagner, D. D. Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7450-4 (1995).
60. Freund, M. et al. Inhibition by recombinant hirudins of experimental venous thrombosis and disseminated intravascular coagulation induced by tissue factor in rats. *Thromb Haemost* **63**, 187-92 (1990).

61. Furie, B. & Furie, B. C. The molecular basis of platelet and endothelial cell interaction with neutrophils and monocytes: role of P-selectin and the P-selectin ligand, PSGL-1. *Thromb Haemost* **74**, 224-7 (1995).
62. Furie, B. & Furie, B. C. Role of platelet P-selectin and microparticle PSGL-1 in thrombus formation. *Trends Mol Med* **10**, 171-8 (2004).
63. Gawaz M. *Blood platelets - physiology, pathophysiology membrane receptors, antiplatelet principles and therapy for atherothrombotic diseases* (Thieme Verlag, New York, 2001).
64. George JN. Platelets. *Lancet* **355**, 1531-1539 (2000).
65. Germain, R. N. & Stefanova, I. The dynamics of T cell receptor signaling: complex orchestration and the key roles of tempo and cooperation. *Annu Rev Immunol* **17**, 467-522 (1999).
66. Gibbins, J. M., Okuma, M., Farndale, R., Barnes, M. & Watson, S. P. Glycoprotein VI is the collagen receptor in platelets which underlies tyrosine phosphorylation of the Fc receptor gamma-chain. *FEBS Lett* **413**, 255-9 (1997).
67. Giesen, P. L. & Nemerson, Y. Tissue factor on the loose. *Semin Thromb Hemost* **26**, 379-84 (2000).
68. Ginsberg, M. H., Du, X., O'Toole, T. E. & Loftus, J. C. Platelet integrins. *Thromb Haemost* **74**, 352-9 (1995).
69. Gitel, S. N. & Wessler, S. The antithrombotic effects of warfarin and heparin following infusions of tissue thromboplastin in rabbits: clinical implications. *J Lab Clin Med* **94**, 481-8 (1979).
70. Goel, M. S. & Diamond, S. L. Neutrophil enhancement of fibrin deposition under flow through platelet-dependent and -independent mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**, 2093-8 (2001).
71. Grüner S. (LMU-München, München, 2003).
72. Gustafsson, D. et al. The direct thrombin inhibitor melagatran and its oral prodrug H 376/95: intestinal absorption properties, biochemical and pharmacodynamic effects. *Thromb Res* **101**, 171-81 (2001).
73. GV-SOLAS. (1999).
74. GV-SOLAS. (ed. Versuchstierkunde, G. f.) (1988).
75. Harris ES, M. T., Prescott SM, Zimmermann GA. The Leukocyte Integrins. *JBC* **275**, 23409-23412 (2000).
76. Hartwell, D. W. & Wagner, D. D. New discoveries with mice mutant in endothelial and platelet selectins. *Thromb Haemost* **82**, 850-7 (1999).
77. Hees/Sinowatz. *Histologie: Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie* (1992).
78. Heinzeller, T., Büsing, C.M. *Histologie, Histopathologie und Zytologie für den Einstieg* (Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 2001).
79. Henke J, E. W., Lendl C., *Narkosenotfälle: Notfälle unter Anästhesie bei Kleinsäugetern* (Enke Verlag, Stuttgart, 2002).
80. Henke J, M. D. (2005).
81. Henke, P. K. et al. Deep vein thrombosis resolution is modulated by monocyte CXCR2-mediated activity in a mouse model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, 1130-7 (2004).
82. Henke, P. K. et al. Interleukin-8 administration enhances venous thrombosis resolution in a rat model. *J Surg Res* **99**, 84-91 (2001).
83. Herbert, J. M. et al. Biochemical and pharmacological properties of SANORG 34006, a potent and long-acting synthetic pentasaccharide. *Blood* **91**, 4197-205 (1998).

84. Hirsch, J. G. Comparative bactericidal activities of blood serum and plasma serum. *J Exp Med* **112**, 15-22 (1960).
85. Hrachovinova, I. et al. Interaction of P-selectin and PSGL-1 generates microparticles that correct hemostasis in a mouse model of hemophilia A. *Nat Med* **9**, 1020-5 (2003).
86. Huang, Z. F., Higuchi, D., Lasky, N. & Broze, G. J., Jr. Tissue factor pathway inhibitor gene disruption produces intrauterine lethality in mice. *Blood* **90**, 944-51 (1997).
87. Ibele, G. M., Kay, N. E., Johnson, G. J. & Jacob, H. S. Human platelets exert cytotoxic effects on tumor cells. *Blood* **65**, 1252-5 (1985).
88. Invitrogen C. (2005).
89. Ishiguro, K. et al. Complete antithrombin deficiency in mice results in embryonic lethality. *J Clin Invest* **106**, 873-8 (2000).
90. Jalbert, L. R. et al. Inactivation of the gene for anticoagulant protein C causes lethal perinatal consumptive coagulopathy in mice. *J Clin Invest* **102**, 1481-8 (1998).
91. Jandrot-Perrus, M. et al. Cloning, characterization, and functional studies of human and mouse glycoprotein VI: a platelet-specific collagen receptor from the immunoglobulin superfamily. *Blood* **96**, 1798-807 (2000).
92. Jastrow H. (2006).
93. Kaibuchi, K. et al. Synergistic functions of protein phosphorylation and calcium mobilization in platelet activation. *J Biol Chem* **258**, 6701-4 (1983).
94. Kang, C., Bonneau, M., Brouland, J. P., Bal dit Sollier, C. & Drouet, L. In vivo pig models of venous thrombosis mimicking human disease. *Thromb Haemost* **89**, 256-63 (2003).
95. Kansas, G. S. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* **88**, 3259-87 (1996).
96. Klysz T, J. M., Jung F, Zeintl H,. CAP IMAGE: A newly developed computer aided videoframe analysis system for dynamic capillaroscopy. *Biomedizinische Technik* **42**, 168 (1997).
97. Kroegel, C. & Reissig, A. Principle mechanisms underlying venous thromboembolism: epidemiology, risk factors, pathophysiology and pathogenesis. *Respiration* **70**, 7-30 (2003).
98. Kurz, K. D., Main, B. W. & Sandusky, G. E. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride. *Thromb Res* **60**, 269-80 (1990).
99. Laboratory, J. (2005).
100. Laboratory, T. J. (2005).
101. Landesarbeitsgemeinschaft GS. (2006).
102. Lawson CA, Y. S., Yan SF, Liao H, Zhou YS, Sobel J, Kisiel W, Stern DM, Pinsky DJ. Monocytes and tissue factor promote thrombosis in a murine model of oxygen deprivation. *J Clin Invest* **99**, 1729-1738 (1997).
103. Lefer, A. M., Weyrich, A. S. & Buerke, M. Role of selectins, a new family of adhesion molecules, in ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* **28**, 289-94 (1994).
104. Lentz, B. R. Exposure of platelet membrane phosphatidylserine regulates blood coagulation. *Prog Lipid Res* **42**, 423-38 (2003).
105. Leo R. Platelet activation by superoxide anion and hydroxyl radicals intrinsically generated by platelets that had undergone anoxia and then reoxygenated. *Circulation* **95**, 885 (1997).

106. Liebich, H. G. *Funktionelle Histologie: Farbatlas und Kurzlehrbuch der mikroskopischen Anatomie der Haussäugetiere* (Schattauer Verlagsgesellschaft GmbH, Stuttgart, New York, 1993).
107. Lindner V, F. J., Reidy MA. Mouse model of arterial injury. *Circ Res* **73**, 792-796 (1993).
108. Londy, F. J. et al. Detection of perivenous inflammation in a rat model of venous thrombosis using MRV. *J Invest Surg* **12**, 151-6 (1999).
109. Lorant, D. E. et al. Inflammatory roles of P-selectin. *J Clin Invest* **92**, 559-70 (1993).
110. Lowe, G. D. Virchow's triad revisited: abnormal flow. *Pathophysiol Haemost Thromb* **33**, 455-7 (2003).
111. Luster, A. D., Alon, R. & von Andrian, U. H. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol* **6**, 1182-90 (2005).
112. Luther, T. et al. Tissue factor expression during human and mouse development. *Am J Pathol* **149**, 101-13 (1996).
113. Mackman, N. Role of Tissue Factor in Hemostasis, Thrombosis, and Vascular Development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2004).
114. Mackman N. (The Scripps Research Institute, 2006).
115. Mammen, E. F. Pathogenesis of venous thrombosis. *Chest* **102**, 640S-644S (1992).
116. Mann KG. Thrombin formation. *Chest* **124**, 4-10 (2006).
117. Mann KG. Thrombin: Can't live without it; Probably die from it. *Chest* **124**, 1-3 (2003).
118. Mann KG, B. S., Brummel K. The Dynamics of Thrombin Formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**, 17-25 (2003).
119. Mann KG, V. C., Cawthern K, Butenas S. The role of tissue factor pathway in initiation of coagulation. *Blood Coag Fibrinol* **9**, 3-7 (1998).
120. Marcus, A. J. Pathways of oxygen utilization by stimulated platelets and leukocytes. *Semin Hematol* **16**, 188-95 (1979).
121. Margolis, K. L. et al. Leukocyte count as a predictor of cardiovascular events and mortality in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Observational Study. *Arch Intern Med* **165**, 500-8 (2005).
122. Massberg S, E. G., Matos FC, Tomic LI, Leiderer R, Eisenmenger S, Messmer K, Krombach F Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo. *Blood* **94**, 3829-3838 (1999).
123. Massberg, S. et al. Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. *Blood* **92**, 507-15 (1998).
124. Massberg S, E. S., Enders G, Krombach F, Messmer K. Quantitative analysis of small intestinal microcirculation in the mouse. *Res Exp Med (Berl)*, 198 (1):23-35 (1998).
125. Massberg, S. et al. A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo. *J Exp Med* **197**, 41-9 (2003).
126. Massberg, S. et al. Soluble glycoprotein VI dimer inhibits platelet adhesion and aggregation to the injured vessel wall in vivo. *Faseb J* **18**, 397-9 (2004).
127. Massberg, S. et al. Platelet adhesion via glycoprotein IIb integrin is critical for atheroprogession and focal cerebral ischemia: an in vivo study in mice lacking glycoprotein IIb. *Circulation* **112**, 1180-8 (2005).
128. Massberg S, S. M., Klatt P, Bauer M, Pfeifer A, Siess W, Fässler R, Ruth P, Krombach F, Hofmann F. Increased Adhesion and Aggregation of Platelets Lacking Cyclic Guanosine 3',5'-Monophosphate Kinase I. *J. Exp. Med* **198**, 1255-1263 (1999).
129. Massberg, S. et al. Activated platelets trigger an inflammatory response and enhance migration of aortic smooth muscle cells. *Thromb Res* **110**, 187-94 (2003).

130. Matsuno, H., Uematsu, T., Nagashima, S. & Nakashima, M. Photochemically induced thrombosis model in rat femoral artery and evaluation of effects of heparin and tissue-type plasminogen activator with use of this model. *J Pharmacol Methods* **25**, 303-17 (1991).
131. McCarty, O. J. et al. Evaluation of the role of platelet integrins in fibronectin-dependent spreading and adhesion. *J Thromb Haemost* **2**, 1823-33 (2004).
132. McEver, R. P. Selectin-carbohydrate interactions during inflammation and metastasis. *Glycoconj J* **14**, 585-91 (1997).
133. McEver, R. P. Leukocyte-endothelial cell interactions. *Curr Opin Cell Biol* **4**, 840-9 (1992).
134. McEver, R. P., Beckstead, J. H., Moore, K. L., Marshall-Carlson, L. & Bainton, D. F. GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest* **84**, 92-9 (1989).
135. McFarlane RG. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism and its function as a biochemical amplifier. *Nature* **202**, 498-499 (1964).
136. McGuinness, C. L. et al. Recruitment of labelled monocytes by experimental venous thrombi. *Thromb Haemost* **85**, 1018-24 (2001).
137. Merten, M., Chow, T., Hellums, J. D. & Thiagarajan, P. A new role for P-selectin in shear-induced platelet aggregation. *Circulation* **102**, 2045-50 (2000).
138. Merten, M. & Thiagarajan, P. P-selectin expression on platelets determines size and stability of platelet aggregates. *Circulation* **102**, 1931-6 (2000).
139. Merten M, T. P. P-selectin in arterial thrombosis. *Z Kardiol* **93**, 855-863 (2004).
140. Millet, J., Vaillot, M., Theveniaux, J. & Brown, N. L. Experimental venous thrombosis induced by homologous serum in the rat. *Thromb Res* **81**, 497-502 (1996).
141. Modarai B, B. K., Humphries J, Waltham M, Smith A,. The role of neovascularisation in the resolution of venous thrombus. *Thromb Hemost* **801-9**, 801-9 (2005).
142. Molecular Probes. (2006).
143. Monroe DM, R. H., Hoffmann M,. Platelet procoagulant complex assembly in a tissue factor-initiated system. *Br J Haematol* **88**, 364-371 (1994).
144. Muller, W. A. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol* **24**, 327-34 (2003).
145. Nemerson Y. Tissue factor and hemostasis. *Blood* **71**, 1-8 (1988).
146. Nieswandt, B., Bergmeier, W., Rackebrandt, K., Gessner, J. E. & Zirngibl, H. Identification of critical antigen-specific mechanisms in the development of immune thrombocytopenic purpura in mice. *Blood* **96**, 2520-7 (2000).
147. Nieswandt, B. et al. Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen. *Embo J* **20**, 2120-30 (2001).
148. Nour, M., Slama, F. B., Maaroufi, R. M., Hammami, M. & Mahjoub, T. Factor VII polymorphisms associated with plasma factor VII coagulant activity levels in healthy Tunisians. *East Mediterr Health J* **11**, 102-8 (2005).
149. Okada, M., Sagawa, T., Tominaga, A., Kodama, T. & Hitsumoto, Y. Two mechanisms for platelet-mediated killing of tumour cells: one cyclo-oxygenase dependent and the other nitric oxide dependent. *Immunology* **89**, 158-64 (1996).
150. Osterud, B. The role of platelets in decrypting monocyte tissue factor. *Semin Hematol* **38**, 2-5 (2001).
151. Osterud, B. Tissue factor expression in monocytes: in vitro compared to ex vivo. *Thromb Haemost* **84**, 521-2 (2000).

152. Ott, I., Neumann, F. J., Gawaz, M., Schmitt, M. & Schomig, A. Increased neutrophil-platelet adhesion in patients with unstable angina. *Circulation* **94**, 1239-46 (1996).
153. Palabrica, T. et al. Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets. *Nature* **359**, 848-51 (1992).
154. Parry, G. C., Erlich, J. H., Carmeliet, P., Luther, T. & Mackman, N. Low levels of tissue factor are compatible with development and hemostasis in mice. *J Clin Invest* **101**, 560-9 (1998).
155. Pawlinski, R., Pedersen, B., Erlich, J. & Mackman, N. Role of tissue factor in haemostasis, thrombosis, angiogenesis and inflammation: lessons from low tissue factor mice. *Thromb Haemost* **92**, 444-50 (2004).
156. Peternel, L. et al. Evaluation of two experimental venous thrombosis models in the rat. *Thromb Res* **115**, 527-34 (2005).
157. Phillips DR, C. I., Parise LV, Fitzgerald LA,. The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood* **71**, 831-843 (1988).
158. Phillips DR, C. I., Scarborough RM. GpIIb-IIIa: the responsive integrin. *Cell* **65**, 359-362 (1991).
159. Plow EF, D. S. S., Ginsberg MH. Ligand binding to GPIIb-IIIa: a status report. *Semin Thromb Hemost* **18**, 324-332 (1992).
160. Popesko P, R. V., Horak J., *A colour Atlas of Anatomy of small laboratory animals – Mouse* (Wolfe Publishing Ltd, 1992).
161. Porcelli, S. A. & Modlin, R. L. The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. *Annu Rev Immunol* **17**, 297-329 (1999).
162. Pschyrembel. *Klinisches Wörterbuch* (Walter de Gruyter, Berlin, New York:, 1998).
163. Quek, L. S. et al. Fyn and Lyn phosphorylate the Fc receptor gamma chain downstream of glycoprotein VI in murine platelets, and Lyn regulates a novel feedback pathway. *Blood* **96**, 4246-53 (2000).
164. Rauch, U. et al. Transfer of tissue factor from leukocytes to platelets is mediated by CD15 and tissue factor. *Blood* **96**, 170-5 (2000).
165. Rauch, U. & Nemerson, Y. Tissue factor, the blood, and the arterial wall. *Trends Cardiovasc Med* **10**, 139-43 (2000).
166. Rauch, U. & Nemerson, Y. Circulating tissue factor and thrombosis. *Curr Opin Hematol* **7**, 273-7 (2000).
167. Rauch U, O. J., Fuster V, Badimon JJ, Fayad Z, Chesebro JH,. Thrombus formation on atherosclerotic plaques: pathogenesis and clinical consequences. *Ann Intern Med* **134**, 224-238 (2001).
168. Reinhardt PH, K. P. Differential leucocyte recruitment from whole blood via endothelial adhesion molecules under shear conditions. *Blood* **92**, 4691-4699 (1998).
169. Richtlinie, E. (ed. EG) (1986).
170. Romeis B. *Mikroskopische Technik* (München, 1989).
171. Rosen, E. D. et al. Laser-induced noninvasive vascular injury models in mice generate platelet- and coagulation-dependent thrombi. *Am J Pathol* **158**, 1613-22 (2001).
172. Rosendaal, F. R. Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet* **353**, 1167-73 (1999).
173. Ruggeri, Z. M. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med* **8**, 1227-34 (2002).
174. Ruggeri, Z. M. Platelet interactions with vessel wall components during thrombogenesis. *Blood Cells Mol Dis* **36**, 145-7 (2006).
175. Ruggeri ZM. Mechanisms initiating platelet thrombus formation. *Thromb Haemost* **78**, 611-616 (1997).

176. Rusch, T. in *Institut für Tierschutz und Verhalten (Heim-, Labortiere und Pferde)* 1-103 (Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover, 2003).
177. Saetzler RK, J. J., Lehr HA, Philips CM, Vasthare U, Arfors KE, Tuma RF. Intravital Fluorescence microscopy: Impact of Light-induced phototoxicity on adhesion of fluorescently labeled leucocytes. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **Vol. 45**, 505-514 (1997).
178. Sangershausen. (2006).
179. Satta, N. et al. Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide. *J Immunol* **153**, 3245-55 (1994).
180. Savage, B., Almus-Jacobs, F. & Ruggeri, Z. M. Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell* **94**, 657-66 (1998).
181. Scarborough, R. M., Kleiman, N. S. & Phillips, D. R. Platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonists. What are the relevant issues concerning their pharmacology and clinical use? *Circulation* **100**, 437-44 (1999).
182. Schaub, R. G., Simmons, C. A., Koets, M. H., Romano, P. J., 2nd & Stewart, G. J. Early events in the formation of a venous thrombus following local trauma and stasis. *Lab Invest* **51**, 218-24 (1984).
183. Schuhmann P. (2006).
184. Shattil, S. J. Function and regulation of the beta 3 integrins in hemostasis and vascular biology. *Thromb Haemost* **74**, 149-55 (1995).
185. Shattil, S. J. & Ginsberg, M. H. Integrin signaling in vascular biology. *J Clin Invest* **100**, S91-5 (1997).
186. Shattil, S. J., Kashiwagi, H. & Pampori, N. Integrin signaling: the platelet paradigm. *Blood* **91**, 2645-57 (1998).
187. Shattil, S. J. & Newman, P. J. Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets. *Blood* **104**, 1606-15 (2004).
188. Sigel, B. et al. Intimal hyperplasia producing thrombus organization in an experimental venous thrombosis model. *J Vasc Surg* **19**, 350-60 (1994).
189. Sigma-Aldrich Co. (2006).
190. Simon, S. I. & Green, C. E. Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation. *Annu Rev Biomed Eng* **7**, 151-85 (2005).
191. Singh, I. et al. Failure of thrombus to resolve in urokinase-type plasminogen activator gene-knockout mice: rescue by normal bone marrow-derived cells. *Circulation* **107**, 869-75 (2003).
192. Singh, I. et al. Antithrombotic effects of controlled inhibition of factor VIII with a partially inhibitory human monoclonal antibody in a murine vena cava thrombosis model. *Blood* **99**, 3235-40 (2002).
193. Spokas, E. G. & Wun, T. C. Venous thrombosis produced in the vena cava of rabbits by vascular damage and stasis. *J Pharmacol Toxicol Methods* **27**, 225-32 (1992).
194. Stenberg, P. E., McEver, R. P., Shuman, M. A., Jacques, Y. V. & Bainton, D. F. A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J Cell Biol* **101**, 880-6 (1985).
195. Stewart, G. J., Ritchie, W. G. & Lynch, P. R. Venous endothelial damage produced by massive sticking and emigration of leukocytes. *Am J Pathol* **74**, 507-32 (1974).
196. Stewart, G. J., Stern, H. S., Lynch, P. R., Malmud, L. S. & Schaub, R. G. Responses of canine jugular veins and carotid arteries to hysterectomy: increased permeability and leukocyte adhesions and invasion. *Thromb Res* **20**, 473-89 (1980).

197. Stirling, G. A., Tsapogas, M. J. & Girolami, P. L. Organization of thrombi. *Br J Surg* **53**, 232-5 (1966).
198. Subramaniam, M. et al. Defects in hemostasis in P-selectin-deficient mice. *Blood* **87**, 1238-42 (1996).
199. Suk, K. & Cha, S. Thrombin-induced interleukin-8 production and its regulation by interferon-gamma and prostaglandin E2 in human monocytic U937 cells. *Immunol Lett* **67**, 223-7 (1999).
200. Theilmeier G, L. T., Remacle C, Collen D, Vermynen J, Hoylaerts MF. Circulating activated platelets assist THP-1 monocytoïd/endothelial cell interaction under shear stress. *Blood*, 94:2725-2734 (1999).
201. Toombs, C. F. et al. Pretreatment with a blocking monoclonal antibody to P-selectin accelerates pharmacological thrombolysis in a primate model of arterial thrombosis. *J Pharmacol Exp Ther* **275**, 941-9 (1995).
202. Toomey, J. R., Kratzer, K. E., Lasky, N. M., Stanton, J. J. & Broze, G. J., Jr. Targeted disruption of the murine tissue factor gene results in embryonic lethality. *Blood* **88**, 1583-7 (1996).
203. Tsuji, M., Ezumi, Y., Arai, M. & Takayama, H. A novel association of Fc receptor gamma-chain with glycoprotein VI and their co-expression as a collagen receptor in human platelets. *J Biol Chem* **272**, 23528-31 (1997).
204. van Giezen, J. J., Wahlund, G., Nerme & Abrahamsson, T. The Fab-fragment of a PAI-1 inhibiting antibody reduces thrombus size and restores blood flow in a rat model of arterial thrombosis. *Thromb Haemost* **77**, 964-9 (1997).
205. van Zanten, G. H. et al. Increased platelet deposition on atherosclerotic coronary arteries. *J Clin Invest* **93**, 615-32 (1994).
206. Van Zutphen LFM, B. V., Beynen AC,. *Grundlagen der Versuchstierkunde* (Stuttgart, 1995).
207. Vandendries, E. R., Furie, B. C. & Furie, B. Role of P-selectin and PSGL-1 in coagulation and thrombosis. *Thromb Haemost* **92**, 459-66 (2004).
208. Varma, M. R. et al. Neutropenia impairs venous thrombosis resolution in the rat. *J Vasc Surg* **38**, 1090-8 (2003).
209. Villringer A., D. U., Them A., Schurer L., Krombach F., Einhaupl K.M. Imaging of leucocytes within the rat brain cortex in vivo. *Microvasc Res* **42(3)**, 305-315 (1991).
210. Vischer UM, J. L., Wollheim CB, Theler JM,. Reactive oxygen intermediates induce regulated secretion of von Willebrand factor from cultured human vascular endothelial cells. *Blood* **85**, 3164-3172 (1995).
211. Voet, T. et al. Efficient male and female germline transmission of a human chromosomal vector in mice. *Genome Res* **11**, 124-36 (2001).
212. Vogel, G. M., Meuleman, D. G., Bourgondien, F. G. & Hobbelen, P. M. Comparison of two experimental thrombosis models in rats effects of four glycosaminoglycans. *Thromb Res* **54**, 399-410 (1989).
213. von Andrian, U. H. Immunology. T cell activation in six dimensions. *Science* **296**, 1815-7 (2002).
214. von Andrian, U. H. & Mackay, C. R. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N Engl J Med* **343**, 1020-34 (2000).
215. Wagner, C. L. et al. Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. *Blood* **88**, 907-14 (1996).
216. Wagner, D. D. & Burger, P. C. Platelets in inflammation and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**, 2131-7 (2003).

217. Wakefield, T. W. et al. Neovascularization during venous thrombosis organization: a preliminary study. *J Vasc Surg* **30**, 885-92 (1999).
218. Wakefield, T. W. et al. P-selectin and TNF inhibition reduce venous thrombosis inflammation. *J Surg Res* **64**, 26-31 (1996).
219. Wang, L., Fuster, M., Sriramarao, P. & Esko, J. D. Endothelial heparan sulfate deficiency impairs L-selectin- and chemokine-mediated neutrophil trafficking during inflammatory responses. *Nat Immunol* **6**, 902-10 (2005).
220. Watson, B. D., Dietrich, W. D., Busto, R., Wachtel, M. S. & Ginsberg, M. D. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann Neurol* **17**, 497-504 (1985).
221. Watson, B. D., Dietrich, W. D., Prado, R. & Ginsberg, M. D. Argon laser-induced arterial photothrombosis. Characterization and possible application to therapy of arteriovenous malformations. *J Neurosurg* **66**, 748-54 (1987).
222. Watson, B. D., Prado, R., Dietrich, W. D., Ginsberg, M. D. & Green, B. A. Photochemically induced spinal cord injury in the rat. *Brain Res* **367**, 296-300 (1986).
223. Watson, S. P., McNally, J., Shipman, L. J. & Godfrey, P. P. The action of the protein kinase C inhibitor, staurosporine, on human platelets. Evidence against a regulatory role for protein kinase C in the formation of inositol trisphosphate by thrombin. *Biochem J* **249**, 345-50 (1988).
224. Weiler-Guettler, H. et al. A targeted point mutation in thrombomodulin generates viable mice with a prethrombotic state. *J Clin Invest* **101**, 1983-91 (1998).
225. Weiss, H. J. & Turitto, V. T. Prostacyclin (prostaglandin I₂, PGI₂) inhibits platelet adhesion and thrombus formation on subendothelium. *Blood* **53**, 244-50 (1979).
226. White, J. G. & Clawson, C. C. The surface-connected canalicular system of blood platelets--a fenestrated membrane system. *Am J Pathol* **101**, 353-64 (1980).
227. White, J. G. & Clawson, C. C. Effects of large latex particle uptake on the surface connected canalicular system of blood platelets: a freeze-fracture and cytochemical study. *Ultrastruct Pathol* **2**, 277-87 (1981).
228. White, J. G. & Clawson, C. C. Effects of small latex particle uptake on the surface connected canalicular system of blood platelets: a freeze-fracture and cytochemical study. *Diagn Histopathol* **5**, 3-10 (1982).
229. Wikipedia. (2006).
230. Xie, H. et al. Staging deep venous thrombosis using ultrasound elasticity imaging: animal model. *Ultrasound Med Biol* **30**, 1385-96 (2004).
231. Yamanishi, J. et al. Synergistic functions of phorbol ester and calcium in serotonin release from human platelets. *Biochem Biophys Res Commun* **112**, 778-86 (1983).
232. Zeiss. Mikroskopieren von Anfang an. Informationsbroschüre. Zeiss, ZEISS. 2002. Ref ID: 3314. (2002).
233. Zheng, Y. M. et al. Expression of the platelet receptor GPVI confers signaling via the Fc receptor gamma -chain in response to the snake venom convulxin but not to collagen. *J Biol Chem* **276**, 12999-3006 (2001).
234. Zhu, Y., Carmeliet, P. & Fay, W. P. Plasminogen activator inhibitor-1 is a major determinant of arterial thrombolysis resistance. *Circulation* **99**, 3050-5 (1999).
235. Zillmann A, L. T., Muller I. Platelet-associated tissue factor contributes to the collagen-triggered activation of blood coagulation. *Biochem Biophys Res Commun* **281**, 603-609 (2001).
236. Zimmerman, G. A., Prescott, S. M. & McIntyre, T. M. Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules. *Immunol Today* **13**, 93-100 (1992).

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Grundlegende Unterschiede im Wandaufbau sowie der Funktion von Arterien und Venen

Tabelle 2: Gesamtleukozytenzahl/ μl und Differentialblutbild in Prozent

Tabelle 3: Darstellung der Integrine der β_1 -Klasse und β_3 -Klasse

Tabelle 4: Dosierungen der vollständig antagonisierbaren Anästhesie bei der Maus

Tabelle 5: Aufstellung der eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe

Tabelle 6: Aufnahmeschema der Videodokumentation bei arterieller Thrombose

Tabelle 7: Übersicht der TZ-Rekrutierung für die einzelnen Versuchsgruppen im Rahmen der arteriellen Thrombose

Tabelle 8: Übersicht der LZ-Rekrutierung für die einzelnen Versuchsgruppen im Rahmen der arteriellen Thrombose

Tabelle 9: Übersicht der LZ-Rekrutierung für die einzelnen Versuchsgruppen im Rahmen der venösen Thrombose

Tabelle 10: Übersicht TZ-Rekrutierung für die einzelnen Versuchsgruppen im Rahmen der venösen Thrombose

Tabelle 11: Übersicht der MP-Rekrutierung im Rahmen der venösen Thrombose

Tabelle 12: Übersicht der Fibrinbildung für die einzelnen Versuchsgruppen im Rahmen der venösen Thrombose

Tabelle 13: Übersicht der LZ-Rekrutierung nach 48 Stunden für die einzelnen Versuchsgruppen im Rahmen der venösen Thrombose

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Bauplan der Blutgefäße

Abbildung 2: Vergleichende Darstellung des Gefäßaufbaus von Arterie und Vene

Abbildung 3: TEM-Aufnahmen von Thrombozyten

Abbildung 4: REM-Aufnahmen von Thrombozyten

Abbildung 5: TEM-Aufnahmen von Leukozyten

Abbildung 6: Mechanismen der Plättchenadhäsion und -aggregation

Abbildung 7: Interaktion zwischen primärer und sekundärer Gerinnung

Abbildung 8: Mikroskop für die Intravitalmikroskopie: Axiotech^{vario} 100 HD

Abbildung 9: Licht kurzer Wellenlänge kurz vor Auftreffen auf Elektron

Abbildung 10: Angeregtes Elektron auf höherem Energieniveau

Abbildung 11: Emittiertes Licht

Abbildung 12: Schema der Wirkungsweise von Fluorophoren

Abbildung 13: Darstellung des Strahlenganges eines Epifluoreszenzmikroskops

Abbildung 14: Schematische Darstellung der intravitalmikroskopischen Arbeitseinheit

Abbildung 15: Struktur von DCF

Abbildung 16: Struktur von Rhodamin 6G

Abbildung 17: Rhodamin B

Abbildung 18: Alexa 488

Abbildung 19: Hoechst 33342 Vitalfarbstoff

Abbildung 20: Acridin Orange

Abbildung 21: Katheterisierung der V. jugularis dextra (Operationsschritte)

Abbildung 22: Denudation der linken A. carotis communis (Operationsschritte)

Abbildung 23: Ventralansicht der eröffneten Bauchhöhle

Abbildung 24: Darstellung und Ligatur der Vena cava caudalis (Operationsschritte)

Abbildung 25: Mikroskopierschema der A. carotis communis

Abbildung 26: Mikroskopierschema der V. cava caudalis

Abbildung 27: Experimentelles Protokoll

Abbildung 28: C57BL/6J Thrombozytenadhäsion und -aggregation an der subendothelialen Matrix

Abbildung 29: C57BL/6J Thrombozytenadhäsion nach Carotidenudation im Zeitverlauf

Abbildung 30: C57BL/6J Thrombusareal (mm²) nach Carotidenudation im Zeitverlauf

Abbildung 31: C57BL/6J Leukozytenadhäsion an der subendothelialen Matrix

Abbildung 32: C57BL/6J Leukozytenadhäsion nach Carotidenudation im Zeitverlauf

Abbildung 33: Gegenüberstellung der Thrombozyten- und Leukozytenadhäsion nach Carotidenudation bei Wildtyptieren

Abbildung 34: Gegenüberstellung der Thrombozyten- sowie Leukozytenadhäsion nach Carotidenudation an der subendothelialen Matrix

Abbildung 35: GPIIb^{-/-} Thrombozytenadhäsion an der subendothelialen Matrix

Abbildung 36: GPIIb^{-/-} Thrombozytenadhäsion nach Carotidenudation im Zeitverlauf

Abbildung 37: GPIIb^{-/-} Leukozytenadhäsion an der subendothelialen Matrix

Abbildung 38: GPIIb^{-/-} Leukozytenadhäsion nach Carotidenudation im Zeitverlauf

Abbildung 39: Gegenüberstellung der Thrombozyten- und Leukozytenadhäsion nach Carotidenudation bei GPIIb-IIIa defizienten Tieren

Abbildung 40: Gegenüberstellung der Thrombozyten- sowie Leukozytenadhäsion nach Carotidenudation an der subendothelialen Matrix

Abbildung 41: P-Selektin^{-/-} Thrombozytenadhäsion und -aggregation an der subendothelialen Matrix

Abbildung 42: P-Selektin^{-/-} Thrombozytenadhäsion nach Carotidenudation im Zeitverlauf

Abbildung 43: P-Selektin^{-/-} Thrombusareal nach Carotidenudation im Zeitverlauf

Abbildung 44: P-Selektin^{-/-} Leukozytenadhäsion an der subendothelialen Matrix

Abbildung 45: P-Selektin^{-/-} Leukozytenadhäsion nach Carotidenudation im Zeitverlauf

Abbildung 46: Gegenüberstellung der Thrombozyten- und Leukozytenadhäsion nach Carotidenudation bei P-Selektin defizienten Tieren.

Abbildung 47: Gegenüberstellung der Thrombozyten- sowie Leukozytenadhäsion nach Carotidenudation an der subendothelialen Matrix

Abbildung 48: Gegenüberstellung der Thrombozytenadhäsion der verschiedenen Tierstämme 5 Minuten nach Endothelverletzung

Abbildung 49: Gegenüberstellung der Thrombozytenadhäsion (Einzelzellen/mm²) von C57BL/6J, GPIIb und P-Selektin nach Carotidenudation

Abbildung 50: Gegenüberstellung der Thrombozytenaggregation der verschiedenen Tierstämme nach Endothelverletzung bei 10facher Vergrößerung

Abbildung 51: Gegenüberstellung der Thrombozytenaggregation (mm²) nach Carotidenudation im Zeitverlauf

Abbildung 52: Gegenüberstellung der Leukozytenadhäsion der verschiedenen Tierstämme nach Endothelverletzung

Abbildung 53: Gegenüberstellung der Leukozytenadhäsion (Einzelzellen/mm²) von C57BL/6J, GPIIb und P-Selektin nach Carotidenudation im Zeitverlauf

Abbildung 54: Thrombozytenadhäsion in der V. cava in C57BL/6J Kontrolltieren im Zeitverlauf (6h)

Abbildung 55: Thrombozytenadhäsion in der V. cava in GPIIb defizienten Tieren (n = 3) im Zeitverlauf (6h)

Abbildung 56: Thrombozytenadhäsion in der V. cava in Low TF Tieren im Zeitverlauf (6h)

Abbildung 57: Leukozytenverhalten in der V. cava in C57BL/6J Wildtyptieren im Zeitverlauf (6h)

Abbildung 58: Gegenüberstellung der Thrombozyten- und Leukozytenadhäsion in der V. cava im Zeitverlauf (6h) bei Wildtyptieren

Abbildung 59: Leukozytenkoaggregation in der V. cava im Zeitverlauf (6h) bei Wildtyp-Tieren

Abbildung 60: Leukozytenverhalten in der V. cava in GPIIb Knock-out-Tieren im Zeitverlauf (6h)

Abbildung 61: Leukozytenkoaggregation in der V. cava im Zeitverlauf (6h) bei GPIIb Knock-out-Tieren

Abbildung 62: Leukozytenverhalten in der V. cava in P-Selektin Knock-out-Tieren im Zeitverlauf (6h)

Abbildung 63: Gegenüberstellung der Leukozytenadhäsion in der V. cava zwischen P-Selektin, GPIIb und C57BL/6J im Zeitverlauf

Abbildung 64: Gegenüberstellung der Leukozytenkoaggregation in der V. cava zwischen P-Selektin, GPIIb und C57BL/6J im Zeitverlauf

Abbildung 65: *In vivo* Darstellung der Leukozytenadhäsion und -koaggregation in der V. cava im Zeitverlauf in verschiedenen Tierstämmen

Abbildung 66: Leukozytenadhäsion in der V. cava in Low TF Tieren im Zeitverlauf

Abbildung 67: Gegenüberstellung der Thrombozyten- und Leukozytenadhäsion in der V. cava in Low TF Tieren im Zeitverlauf

Abbildung 68: *In vivo* Darstellung der Leukozyten- und Thrombozytenadhäsion in der V. cava im Zeitverlauf in Low TF-Tieren

Abbildung 69: Gegenüberstellung der Leukozytenadhäsion in der V. cava zwischen Low TF- und HCV-100-Tieren im Zeitverlauf

Abbildung 70: Gegenüberstellung der Leukozytenkoaggregation in der V. cava zwischen Low TF- und HCV-100-Tieren im Zeitverlauf

Abbildung 71: Mikropartikelrekrutierung in der V. cava in C57BL/6J Wildtyp-Tieren im Zeitverlauf

Abbildung 72: Fibrinbildung in der A. carotis communis in C57BL/6J Wildtyp-Tieren verglichen mit Kontrollwerten in unverletzten Gefäßen

Abbildung 73: Fibrinbildung in der V. cava in C57BL/6J Wildtyp-Tieren im Zeitverlauf

Abbildung 74: Gegenüberstellung der Fibrinbildung von C57BL/6J-Wildtyp- und Low TF-Tieren in der V. cava im Zeitverlauf

Abbildung 75: Gegenüberstellung der Fibrinbildung von C57BL/6J-Wildtyp- und Low TF-Tieren in der V. cava im Zeitverlauf

Abbildung 76: Gegenüberstellung histologischer Schnitte

Abbildung 77: Gegenüberstellung histologischer Schnitte (H.E. sowie van Gieson-Färbung u. MSB) der V. cava verschiedener Tierstämme (C57BL/6J, P-Selektin, GPIIb)

Abbildung 78: Gegenüberstellung histologischer Schnitte der V. cava verschiedener Tierstämme (C57BL/6J, P-Selektin, GPIIb)

Abbildung 79: Darstellung der unterschiedlichen Thrombengrößen der verschiedenen Tierstämme in der V. cava 48 Stunden nach Ligatur

Abbildung 80: Transmissions- (links) sowie rasterelektronenmikroskopische (rechts) Aufnahmen der V. cava vor (oben) und 6 Stunden nach Ligatur (unten)

Abbildung 81: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen eines plättchenreichen Thrombus in der denudierten A. carotis communis

Abbildung 82: Gegenüberstellung der Thrombosierungsmechanismen im arteriellen und venösen Thrombosemodell

Abbildung 83: Vergleich der Thrombozyten- sowie Leukozytenadhäsion zwischen arterieller und venöser Thrombose in C57BL/6J Wildtyptieren

Abbildung 84: Darstellung der Einflüsse verschiedener molekularer Rezeptoren auf die Thrombengröße im arteriellen und venösen System

Abbildung 85: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der V. cava 1 sowie 6 Stunden nach Ligatur

11 Abkürzungsverzeichnis

A.: Arteria (lat.)

Aa.: Arteriae (lat.)

Abb.: Abbildung

Abk.: Abkürzung

ADP.: Adenosindiphosphat

Anr.: Anregung

AT III: Antithrombin III

°C: Grad Celsius

ca.: circa

CD: Cluster of differentiation

cm: Zentimeter

DB: Dense Bodies

DIC: Disseminierte Intravasculäre Coagulopathie

d. h.: das heißt

Em.: Emission

DMSO: Dimethyl Sulfoxid

Evtl.: Eventuell

EZ: Endothelzellen

F: Faktor

Fa.: Firma

Fb.: Fibrinogen

FB: Fibrin

Fn.: Fibronektin

g: Gramm

g: Erdbeschleunigung

G: α -Granula

GP.: Glykoprotein

h: Stunde

HCV: Human Chromosomal Vector

ICAM-2: Intercellular adhesion molecule-2

IFN: Interferon

IL: Interleukin

i.p.: intraperitoneal

Koll.: Kollagen

kg: Kilogramm

Ln.: Laminin

LP: Long Pass

LZ: Leukozyten

μ g: Mikrogramm

μ l: Mikroliter

μ m: Mikrometer

m: Meter

mg: Milligramm

MHC: Major Histocompatibility Complex

min: Minuten

ml: Milliliter

mm: Millimeter

MP: Mikropartikel

MT: Mikrotubuli

MW: Mittelwert

n: Anzahl

NK: Natürliche Killerzelle

nm: Nanometer

PBS: phosphate buffered saline

PCAM-1: Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1

PMN: Polymorphkernige Neutrophile Leukozyten

PPP: platelet poor plasma

PRP: platelet rich plasma

PSGL-1: P-Selektin Glykoprotein Ligand 1

REM: Rasterelektronenmikroskopie

s.c.: subkutan

SP: Short Pass

TA: Thrombusareal

Tab.: Tabelle

TEM: Transmissionselektronenmikroskopie

TCR: T-Zell-Rezeptor

TF: Tissue Faktor

TFPI: Tissue Faktor Pathway Inhibitor

TH1 und TH2: T-Helfer-Zelle 1 und 2

TNF: Tumor Nekrose Faktor

TSP: Thrombospondin

TZ: Thrombozyten

V: Vena (lat.)

VAA: vollständig antagonisierbare Anästhesie

Vn.: Vitronektin

vWF: von Willebrand Faktor

W: Watt

z.B.: zum Beispiel

12 Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. med. vet. W. Schmahl bedanke ich mich für die Übernahme der Arbeit, deren Durchsicht und Einreichung an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. S. Massberg für die interessante Themenstellung, die kompetente wissenschaftliche Projektbetreuung sowie seine Anregungen, Hilfestellungen und Diskussionsbereitschaft bei allen auftretenden Fragen.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei meiner Arbeitsgruppe, Dr. med. vet. Marie-Luise von Brühl, Dr. med. vet. Susanne Sauer, Dr. med. vet. Ildiko Konrad, Elisabeth Kennerknecht, Dr. med. vet. Katrin Schürzinger, Dr. med. Christian Schulz, Michael Lorenz, Sandra Kerstan und Lena Orschiedt für die herzliche, liebevolle Arbeitsatmosphäre, die unvergleichliche, hervorragende Betreuung, sowie kompetente Hilfestellung, freundliche Unterstützung und Motivation. Bei meiner Betreuerin, Frau Dr. med. vet. Marie-Luise von Brühl möchte ich mich besonders bedanken, dass sie nie müde wurde mit mir zu diskutieren, mich zu unterstützen und aufzumuntern.

Sehr herzlich bedanke ich mich bei Frau Luise Jennen, Frau Helga Wehnes und Herrn Dr. med. A. Walch, für die hervorragende Hilfe und Ermöglichung der ultrastrukturellen Untersuchungen.

Besonders danken möchte ich Prof. J. Frampton mit Arbeitsgruppe für die Bereitstellung der GPIIb^{-/-}C57BL/6J-Mäuse sowie Prof. N. Mackman und dessen Arbeitsgruppe für die Überlassung der mTF^{-/-}/HCV⁺- sowie der mTF^{-/-}/hTF⁺-Mäuse.

Besonders danken möchte ich Roswitha Bergmeier, Maren Bathge und allen Tierpflegern für die äußerst verantwortungsvolle und zuverlässige Tierpflege.

Mein herzlicher Dank gilt meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglicht und mir mit liebevoller, familiärer Hilfe, Unterstützung und großem Interesse immer zur Seite gestanden haben. Bei meinem Freund Holger Kaßner möchte ich mich für seine Unterstützung, Motivation und Diskussionsbereitschaft sowie sein außerordentliches Verständnis, mit dem er mich durch diese Arbeit begleitet hat, bedanken.

13 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Maria Köllnberger
Geburtsdatum	15.02.1980
Geburtsort	Landau an der Isar

Schulische Ausbildung

09/86 - 08/90	Grundschule Pilsting
09/90 - 07/99	Gymnasium Landau an der Isar
07/99	Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

10/99 - 01/05	Studium der Tiermedizin an der Ludwig Maximilians Universität München
02/05	Approbation als Tierärztin
Seit 02/05	Promotionsstudium an der Ludwigs-Maximilians-Universität München als Stipendiatin des DFG Graduiertenkollegs 438 (Vaskuläre Biologie in der Medizin)

Postgraduelle Ausbildung

02/05 - 10/06	Promotionsstudentin an der Ludwig Maximilians Universität München mit dem Thema: „Molekulare und zelluläre Mechanismen der arteriellen und venösen Thrombose“
02/05	Stipendiatin des Graduiertenkollegs 438 „Vaskuläre Biologie in der Medizin“, gefördert durch die Deutsche Forschungsgesellschaft am Deutschen Herzzentrum München
07/06 – 12/06	Forschungsaufenthalt an der Harvard Medical School, Boston, MA, USA