

Aus dem Zentrum für klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter Leitung von Prof. Dr. Rüdiger Wanke

Angefertigt am Deutschen Herzzentrum München
(Prof. Dr. Steffen Massberg)

**Die Rolle von Leukozyten in der Entstehung der venösen
Thrombose
- *in vivo* Untersuchungen im Mausmodell**

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

von **Alexander Clemens Steinhart**

aus Augsburg

München, 2012

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Wanke

Korreferent/en: Priv.-Doz. Dr. Reese
Univ.-Prof. Dr. Hartmann
Univ.-Prof. Dr. Knubben-Schweizer
Univ.-Prof. Dr. Stangassinger

Tag der Promotion: 11. Februar 2012

I. Einleitung	7
II. Literaturübersicht.....	8
1. Venöse Thrombose.....	8
1.1 Definition	8
1.2 Venen – Morphologie und Funktion	8
1.3 Virchowsche Trias.....	9
1.4 Entstehung der venösen Thrombose	9
1.4.1 Stase	9
1.4.2 Endothelschaden.....	10
1.4.3 Hyperkoagulabilität.....	11
1.5 Modelle zur Entstehung der venösen Thrombose	11
2. Leukozyten	13
2.1 Rolle von Leukozyten bei der Entstehung der venösen Thrombose	13
2.2 Subpopulationen.....	13
2.2.1 Monozyten.....	13
2.2.2 Neutrophile Granulozyten	14
2.3 Adhäsionskaskade	14
3. Thrombozyten	15
3.1 Rolle von Thrombozyten bei der Entstehung der venösen Thrombose	15
4. Zelladhäsionsrezeptor P-Selektin.....	16
4.1 Rolle in der venösen Thrombose.....	16
5. Tissue Factor	17
5.1 Gerinnungskaskade	17
5.2 Lokalisation	18
5.3 Rolle in der venösen Thrombose.....	19
III. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	20
1. Standardisierung und Evaluation eines neu etablierten Mausmodells zur Entstehung der venösen Thrombose.....	20
2. <i>In vivo</i> Untersuchungen zur Rolle von Leukozyten und Thrombozyten bei der Entstehung der venösen Thrombose	20
IV. Material und Methoden	21
1. Versuchstiere	21
1.1 Wildtyp-/Kontrollstämme	21
1.1.1 C57Bl6/J.....	21

1.1.2 SV129S1.....	21
1.2 Transgene Stämme	22
1.2.1 LysM-eGFP	22
1.2.2 CX ₃ CR1-eGFP	22
1.2.3 P-Selektin-Knockout	22
1.2.4 TF ^{flox/flox} xLysM-Cre	23
2. Tierhaltung und Zucht	23
3. Narkosedurchführung	24
4. Operationsverfahren	26
4.1 Katheterisierung der Vena jugularis dextra.....	27
4.2 Mausmodell der venösen Thrombose	29
5. Haltungsbedingungen der Tiere im Experiment	32
5.1 Monitoring / Scoresystem	32
5.2 Postoperatives Management.....	32
6. Präparation zur Isolierung von Thrombozyten.....	33
6.1 Kardiale Blutentnahme.....	33
6.2 Thrombozyten-Isolierung.....	33
6.2.1 Tyrode's Puffer	34
7. Erstellen von Blutbildern	34
8. Verwendete Farbstoffe und Antikörper.....	34
8.1 Fluoreszenzfarbstoffe	34
8.1.1 Rhodamin 6G	35
8.1.2 Acridin-Orange.....	36
8.2 Fluoreszenzmarkierter Antikörper X488 anti-GPIIb.....	36
8.3 Neutrophile Granulozyten-depletierender Antikörper anti-Ly-6G	37
9. Intravitale Videofluoreszenzmikroskopie (IVM).....	37
9.1 Prinzipien der IVM.....	37
9.2 Geräte	39
9.2.1 Videokassettensystem	39
9.2.2 Olympus Cell^R	39
9.3 Durchführung der IVM	40
9.4 Auswertung der IVM	41
9.4.1 Flussgeschwindigkeitsbestimmung.....	41
9.4.2 Auszählen adhärenter Zellen	41

9.4.3 Bestimmung der Aggregationsflächen rekrutierter Zellen am Endothel.....	42
10. Computertomographische Untersuchung.....	42
11. Bestimmung des Thrombusgewichts	42
11.1 Entnahme der Vena cava caudalis.....	43
11.2 Leergewichtsbestimmung.....	44
11.3 Auswertung	44
12. Dokumentation	45
13. Histologische Untersuchungen.....	45
13.1 Paraffinpräparate	46
13.1.1 Präparation	46
13.1.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE).....	46
13.1.3 Van Gieson-Färbung	47
13.2 Immunfluoreszenz.....	47
13.2.1 Präparation	47
13.2.2 Färbeprotokoll	48
13.3 Auswertung der histologischen Präparate	50
14. Versuchsplanung und Durchführung	50
14.1 Tierzahlen.....	50
14.2 Versuchsgruppen.....	51
14.2.1 Standardisierung des Mausmodells zur venösen Thrombose	51
14.2.2 Initiale Phase (1-6h) der venösen Thrombose.....	52
14.2.3 Späte Phase (48h) der venösen Thrombose.....	53
14.3 Experimentelles Protokoll.....	54
14.3.1 Initiale Phase (1-6h) der venösen Thrombose.....	54
14.3.2 Späte Phase (48h) der venösen Thrombose.....	54
15. Statistische Versuchsauswertung	55
V. Ergebnisse	56
1. Standardisierung des Modells zur venösen Thrombose.....	56
1.1 Bestimmung der Flussgeschwindigkeit.....	56
1.2 Bestimmung des Thrombusgewichts	56
1.3 Diagnose der venösen Thrombose in vivo durch computertomographische Untersuchung	58
2. Makroskopische und histologische Beschreibung des venösen Thrombus	59
3. Rolle von Leukozyten und Thrombozyten bei der Entstehung der venösen Thrombose	62

3.1 In der initialen Phase der Entstehung der venösen Thrombose werden mehr Leukozyten als Thrombozyten an die Endothelwand rekrutiert	62
4. Analyse der Leukozyten-Subpopulationen in der initialen Phase der venösen Thrombose	63
4.1 Monozyten.....	63
4.2 Neutrophile Granulozyten	66
4.3 In der initialen Phase der Entstehung der venösen Thrombose werden in einem aktiv stattfindenden Prozess vermehrt neutrophile Granulozyten rekrutiert.....	70
5. Abhängigkeit der venösen Thrombose von neutrophilen Granulozyten.....	71
6. Leukozytäre Mechanismen bei der Entstehung der venösen Thrombose	73
6.1 Bedeutung des endothelial und thrombozytär gespeicherten P-Selektins.....	73
6.2 Die Rolle des von myeloiden Zellen bereitgestellten Tissue Factors bei der Entstehung der venösen Thrombose	74
VI. Diskussion	75
1. Wahl der Mauslinien	75
2. Physiologische Thrombusinduktion durch Stase am Tiermodell.....	76
3. Neutrophile Granulozyten und Monozyten tragen durch eine sterile Inflammation aktiv zur venösen Thrombose bei.....	78
4. Aktivierung der Blutgerinnung durch Tissue Factor rekrutierter myeloider Zellen	80
5. Ausblick	82
VII. Zusammenfassung	83
VIII. Summary	84
IX. Abkürzungsverzeichnis	85
X. Abbildungsverzeichnis	87
XI. Tabellenverzeichnis	89
XII. Literaturverzeichnis	90
XIII. Danksagung	99

I. Einleitung

Die tiefe Venenthrombose und ihre Komplikation, die Lungenembolie, stellen die dritthäufigste akute Gefäßerkrankung nach Herzinfarkt und Schlaganfall dar^{25,74}. Die Inzidenz beträgt etwa 100 Personen pro 100.000 pro Jahr und steigt exponentiell mit dem Alter der Patienten (ca. 500 : 100.000 bei 80-Jährigen)¹¹⁴. Im Hinblick auf die demographische Entwicklung einer immer älter werdenden Bevölkerung in den Industrienationen, wird die Bedeutung der tiefen Venenthrombose noch zunehmen.

Dennoch ist es bisher nicht gelungen, die pathophysiologisch stattfindenden Vorgänge vollständig zu entschlüsseln, was vor allem daran liegt, dass es bislang kein Tiermodell gibt, welches diese komplex ineinanderspielenden Vorgänge entsprechend nachzuahmen vermag.

Die *in vivo* stattfindenden pathologischen Vorgänge zu verstehen ist deshalb von enormer Bedeutung, weil dies neue Möglichkeiten der medikamentösen Therapie und Prävention hervorbringen könnte. Der bisherige Therapieansatz mit Gerinnungshemmern²⁵ geht mit einer erhöhten Blutungsneigung einher und ist daher in seiner Anwendung limitiert.

II. Literaturübersicht

1. Venöse Thrombose

1.1 Definition

Als venöse Thrombose bezeichnet man eine intravitale Blutgerinnung in Venen. Die Thrombose ist die pathologische Form der Hämostase, welche physiologischerweise zur Blutstillung und Reparatur von Gefäßwandschäden führt. Sie führt zum Verschluss von Gefäßen und kann durch eine Dislokation des Thrombus zur Lungenembolie führen.

1.2 Venen – Morphologie und Funktion

Die Venenwand hat einen dreischichtigen Aufbau. Von innen nach außen sind das die Tunica intima, Tunica media und Tunica externa. Die Tunica intima besteht aus Endothel und Bindegewebe. In der Tunica media finden sich ringförmig angeordnete Muskelfasern, kollagene Faserbündel und elastische Netze. Die Tunica externa besteht aus längs angeordneten kollagenen Faserbündeln und netzartig verzweigten Bündeln glatter Muskulatur. In mittleren und großen Venen befinden sich in der Tunica intima zweiteilige Venenklappen. Sie sind in den Hohlvenen, sowie den Venen von Leber, Niere und Gehirn nicht vorhanden⁴⁶.

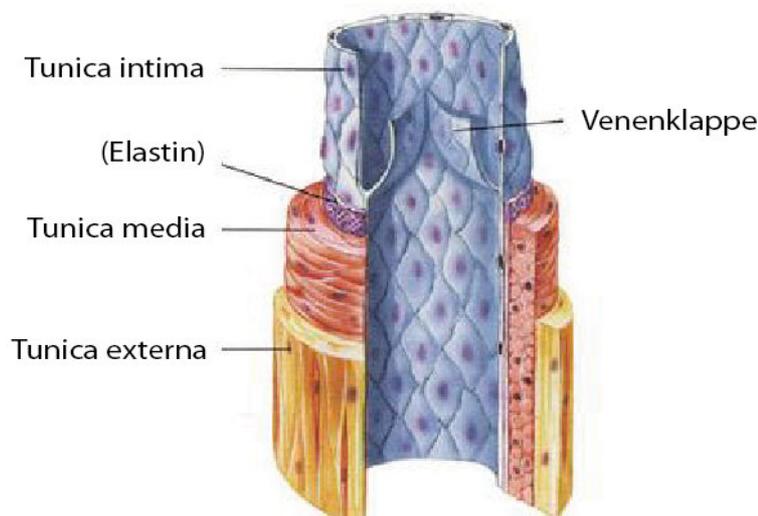


Abbildung 1: Aufbau einer Vene, modifiziert nach ³⁶

Die Aufgaben der Venen bestehen in der Rückführung des Blutes zum Herzen und der Speicherung eines großen Blutvolumens. Etwa 70 % des Blutes befinden sich im venösen System. Das Blut wird durch passive Mechanismen zum Herzen transportiert. Der wichtigste Mechanismus hierbei ist die sogenannte Muskelpumpe. Durch die Kontraktion der Skelettmuskulatur werden die Venen zusammengepresst und das Blut dabei herzwärts transportiert, da ein Fluss in Richtung Peripherie durch die Venenklappen verhindert wird. Diese liegen bei herzwärts gerichtetem Blutstrom der Wand an, bei einer Stromumkehr entfalten sie sich, verschließen das Gefäß und verhindern somit einen Rückstrom. Des Weiteren fördert die Atmung den Rückfluss von Blut zum Herzen. Während der Inspiration sinkt der intrathorakale Druck und die intrathorakalen Venen werden gedehnt, während der Druck auf das Abdomen durch das Senken des Zwerchfells erhöht wird. Das führt zu einem Bluteinstrom aus den extrathorakalen in die intrathorakalen Venen³⁰.

1.3 Virchowsche Trias

Virchow hat die ursächlichen Faktoren, die zur Bildung eines venösen Thrombus führen 1856 beschrieben. Er führt dabei Veränderungen an der Gefäßwand (Endothelschaden), der Blutzusammensetzung (Hyperkoagulabilität) und der Blutströmungsgeschwindigkeit (Stase) als Auslöser an³², auf die im folgenden genauer eingegangen wird.

1.4 Entstehung der venösen Thrombose

1.4.1 Stase

Dass ein Wegfall der Muskelpumpe, z.B. durch Gehunfähigkeit nach einer Operation, zu verlangsamtem venösen Blutfluss führt, zeigte Wright bereits 1951¹¹⁵. Der Zusammenhang zwischen verlangsamter Blutflussgeschwindigkeit und venöser Thrombose ist auch schon seit langem anhand klinischer Beobachtungen bekannt. So entwickelte sich bei Patienten mit Schlaganfall und halbseitiger Lähmung in 53 % eine venöse Thrombose in der gelähmten Gliedmaße, wohingegen sich diese bei nur 7 % in der nicht gelähmten Extremität entwickelte¹¹³. Weiterhin gelten Ruhigstellung nach Frakturen, anhaltende Bettlägerigkeit und verlängerte Immobilisierung während Langstreckenflügen als Risikofaktoren für die

Entstehung einer venösen Thrombose^{18,72,104}. Dass die alleinige Verringerung der venösen Blutflussgeschwindigkeit ausreicht um eine venöse Thrombose zu entwickeln, zeigte Köllnberger 2007 mit dem von ihr neu etablierten Mausmodell⁶². Für die Entstehung einer venösen Thrombose durch Verlangsamung der Flussgeschwindigkeit wird Hypoxie als Mechanismus angenommen. Hypoxie wiederum ist ein potenter Stimulus für endotheliale Dysfunktion^{45,71}. Die Endothelzellen werden lokal aktiviert, ohne dass eine Verletzung der Gefäßwand stattgefunden hat. Die durch Hypoxie aktivierten Endothelzellen setzen den Inhalt ihrer Weibel-Palade-Körperchen frei⁹⁴. Weibel-Palade-Körperchen sind Speichergranula und enthalten von Willebrand Faktor (vWF) sowie P-Selektin^{6,82,111}, die somit in das Plasma freigesetzt werden (vWF), oder auf der endothelialen Oberfläche exprimiert werden (P-Selektin). Thrombozyten binden über ihren Glykoprotein (GP)Ib-IX-V-Komplex an vWF und werden am Endothel adhären¹⁰³. Leukozyten binden über den P-Selektin Glykoprotein Ligand 1 (PSGL-1) an P-Selektin⁸⁰. Dadurch kommt es zum Rollen von Leukozyten über das Endothel, was wiederum deren Aktivierung ermöglicht. Die Hypoxie führt also über die Endothelaktivierung zu einer Entzündungsreaktion, was die Rekrutierung von Leukozyten und Thrombozyten zur Folge hat.

1.4.2 Endothelschaden

Zu Verletzungen der innersten Schicht eines Gefäßes kommt es bei Traumata verschiedenster Ursachen, wie z.B. Frakturen oder chirurgischen Eingriffen. Die Exposition der subendothelialen Matrix bietet eine thrombogene Oberfläche, was mit einem erhöhten Thromboserisiko einhergeht⁴⁹. Bei den meisten Fällen der tiefen Beinvenenthrombose kommt es allerdings zu sogenannten spontanen Thrombosen, bei denen ein Trauma als Auslöser ausgeschlossen werden kann.

Welche Rolle der Endothelschaden zur spontanen Entstehung der venösen Thrombose in den meisten klinischen Fällen beiträgt, ist unklar. Sevitt¹⁰⁵ hat 1974 histologische Untersuchungen zur Struktur und Zusammensetzung von nicht traumatisch entstandenen humanen Thromben in Venenklappen der Oberschenkelvenen durchgeführt. Die Thromben hatten rote und weiße Regionen. Sie bestanden hauptsächlich aus Fibrin sowie Erythrozyten und einem unterschiedlichen Maß an Thrombozyten und Leukozyten. Er fand aber keine Hinweise auf eine Verletzung der Gefäßintima, das Endothel im Bereich der Thromben schien intakt zu sein. Die offenkundige Läsion des Endothels mit Exposition der subendothelialen Matrix

scheint deshalb nicht der entscheidende Stimulus für die Entstehung der venösen Thrombose zu sein. Es wird angenommen, dass durch die endotheliale Dysfunktion die antikoagulatorischen Eigenschaften des Endothels verloren gehen und dass die venöse Thrombusbildung meist ohne Endothelschaden abläuft. Die Entstehung der venösen Thrombose unter Ausschluss eines Endothelschadens, soll in der vorliegenden Arbeit weitergehend untersucht werden.

1.4.3 Hyperkoagulabilität

Der Ausdruck „hyperkoagulabiler Zustand“ wird verwendet, um Verhältnisse der gesteigerten Gerinnbarkeit des Blutes durch Imbalancen in den hämostatischen Mechanismen zu bezeichnen. Entsprechend stellen genetisch bedingte Thrombophilien oder erworbene Defekte in der Antikoagulation, wie Mangel an Antithrombin III und Protein C bzw. Faktor V Leiden, oder in der Fibrinolyse bekannte Risikofaktoren für die venöse Thrombose dar¹⁵, da sich aktivierte Koagulationsfaktoren vor allem an Stellen mit reduziertem Blutfluss ansammeln können, die sonst abtransportiert und im Kapillarbett der Lunge inaktiviert werden würden⁷⁰. Hyperkoagulabilität alleine reicht aber nicht aus, um spontane Thrombosen hervorzurufen, sie erhöht jedoch das Risiko einer Thrombose etwa bei Immobilisierung erheblich. Des Weiteren steigert die Freisetzung von Tissue Factor durch geschädigte Gewebe oder Tumoren das Risiko einer venösen Thrombose.

1.5 Modelle zur Entstehung der venösen Thrombose

Modelle zur Erforschung der Entstehung der venösen Thrombose sind aus verschiedenen Tierarten wie Kaninchen, Ratten und Mäusen bekannt^{47,50,116}. Ein großer Teil dieser Modelle sind Abwandlungen von Tiermodellen zur Entstehung der arteriellen Thrombose, deren Hauptausgangspunkt die Ruptur von atherosklerotischen Plaques und die daraus resultierende Endothelverletzung ist. Da sich die arterielle und die venöse Thrombose jedoch sowohl in der Art des Thrombus (weißer Thrombus bei arterieller, roter Thrombus bei venöser Thrombose), als auch im Hinblick auf die medikamentöse Behandlung (Plättcheninhibition vs. Hemmung der Gerinnungskaskade) unterscheiden, kann man diese Modelle nur für Patienten mit Endothelschaden als geeignete Abbildung der Vorgänge während der Entstehung der venösen

Thrombose *in vivo* ansehen. Die Ergebnisse dieser Studien lassen sich nur bedingt auf die Pathomechanismen der tiefen Venenthrombose bei den meisten Patienten übertragen, die ohne Endothelschäden entstanden sind.

Hollenbach führt ein Stück Baumwollfaden in die Vena cava caudalis von Kaninchen⁵⁰ ein und erzeugt damit eine thrombogene Oberfläche, verbunden mit einem Endothelschaden. Pierangeli setzt mit einer Pinzette eine standardisierte Quetschung an der Vena femoralis⁹³, was ebenfalls zu einer Verletzung der Endothelwand führt. Diaz erzeugt venöse Thromben, indem er eine, mit einer Kathode versehene Kanüle in die kaudale Hohlvene einführt. Die Anode wird subkutan platziert²⁴. Eine weitere Methode ist die Injektion von photoreaktiven Substanzen, wie Bengalrosa, die sich in der Lipid-Doppelschicht von Endothelzellen einlagern²⁸. Durch die Bestrahlung mit Licht wird eine photochemische Reaktion gestartet, die zur Bildung von Sauerstoffradikalen führt und somit das Endothel beschädigt. Alle diese Modelle haben eine Verletzung der Endothelintegrität mit Exposition der subendothelialen Matrix zur Folge.

Für einen Grossteil der venöse Thrombose-Patienten, welche eine Thrombose infolge von Immobilität und venöser Flussverlangsamung ohne Endothelschaden entwickeln, sind Tiermodelle, die versuchen die verlangsamte Blutströmungsgeschwindigkeit nachzuahmen, besser geeignet. Myers sowie Henke^{47,87} verwenden dazu Stase-Modelle, bei denen die V. cava caudalis und teilweise auch deren seitliche Zuflüsse mittels Faden komplett ligiert werden. Durch den sistierenden Blutfluss entsteht die oben beschriebene Hypoxie mit ihren Folgen für das Endothel. Da der Blutfluss allerdings komplett unterbunden wird und somit auch keine Blutzellen und sonstige gelöste Substanzen herantransportiert werden können, spiegeln diese Modelle nur bedingt die tatsächlichen Vorgänge (siehe oben) wider.

Köllnberger hat 2007 ein neues Modell zu Entstehung der venösen Thrombose bei bestehendem, jedoch verlangsamten Blutfluss etabliert⁶². Dabei wird die V. cava caudalis verengt, was zu einer reduzierten Flussgeschwindigkeit des Blutes im Bereich vor der Engstelle führt.

2. Leukozyten

2.1 Rolle von Leukozyten bei der Entstehung der venösen Thrombose

Welche Rolle die Leukozyten bei der Entstehung der venösen Thrombose spielen, ist weitestgehend unbekannt. Sie sind aber in humanen Thromben gefunden worden¹⁰⁵ und Wakefield konnte in einem Rattenmodell einen Zusammenhang zwischen venöser Thrombose und Inflammation nachweisen¹¹². Ebenso sind die Inflammationsmarker Interleukin 6 und c-reaktives Protein bei Patienten mit venöser Thrombose erhöht^{10,102}. Ob und mit welchen Mechanismen sie letztendlich zur Thromboseentstehung beitragen, ist nicht vollständig geklärt.

Köllnberger konnte bei intravitalmikroskopischen Aufnahmen in ihrem Stenose-Modell erstmals zeigen, dass es in der initialen Phase der Thrombusentstehung zu einer massiven Rekrutierung von Immunzellen an die Endothelwand kommt⁶².

2.2 Subpopulationen

2.2.1 Monozyten

Monozyten sind die größten weißen Blutzellen. Sie halten sich im Blut ca. ein bis zwei Tage auf, wandern in das Bindegewebe aus und differenzieren zu Makrophagen (z.B. Alveolarmakrophagen, Kupffersche Sternzellen). Sie sind in der Lage große Partikel zu phagozytieren, zu zerstören und Antigene auf ihrer Oberfläche zu präsentieren. In ihrer Zellmembran sind außerdem Rezeptoren für Immunglobuline und Komponenten des Komplementsystems vorhanden.

Sie werden mit venöser Thrombose in Verbindung gebracht, weil sie nicht nur zur Entzündungsreaktion beitragen, sondern auch prokoagulatorische Fähigkeit haben. In aktiviertem Zustand exprimieren sie Tissue Factor⁷⁷ und können so auch in Abwesenheit eines Endothelschadens die Blutgerinnung induzieren. Hypoxie ist in der Lage Monozyten zu aktivieren⁶⁶, was die Bereitstellung von Tissue Factor durch Monozyten bei der venösen Thrombose erklärt. Weiterhin geben sie sog. zirkulierenden Tissue Factor in Form von Mikropartikeln (MP) in das Blut ab, wodurch sie ebenfalls zur Thrombusbildung beitragen können³³.

2.2.2 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten bilden bei Tieren mit granulozytärem Blutbild den Hauptteil der Leukozyten. Sie enthalten in ihrem Zytoplasma spezifische, neutrophile Granula. Charakteristisch ist ihr segmentierter Zellkern. Sie sind in der Lage, kleine Partikel aufzunehmen (Mikrophagen) und mittels lysosomaler Enzyme abzubauen. Außerdem können sie nach Kontakt mit phagozytierbarem Material, den Inhalt ihrer Granula nach außen abgeben und somit extrazellulär verdauen.

Auch können sie über die Bereitstellung von Tissue Factor prokoagulatorisch wirken. Ihre Fähigkeit Tissue Factor zu exprimieren wird in Forscherkreisen allerdings kontrovers diskutiert^{88,89}, die Expression von Tissue Factor durch neutrophile Granulozyten konnte aber in verschiedenen Krankheitsbildern gezeigt werden^{48,79,100,109}. Zusätzlich wird angenommen, dass neutrophile Granulozyten dazu befähigt sind, Tissue Factor über Mikropartikel aufzunehmen¹¹⁰. Außerdem konnte in *in vitro*-Versuchen³⁸ gezeigt werden, dass sogenannte Neutrophil extracellular traps (NETs) die Thrombose unterstützen. Es handelt sich dabei um eine neue Form des Zelltods (NETosis), die der Immunabwehr dient. Dabei werden Chromatin und granuläre Proteine wie Netze ausgeschleudert, um unter anderem Bakterien auf ihrer Oberfläche zu binden und abzutöten^{8,39}. Zudem ist bekannt, dass aktivierte Endothelzellen in der Lage sind NETosis zu induzieren⁴².

2.3 Adhäsionskaskade

Leukozyten werden über einen mehrstufigen Prozess am Endothel adhären. Dieser Vorgang wird als Adhäsionskaskade bezeichnet. Die Kaskade wird in drei Schritte unterteilt: 1. in die Selektin-vermittelte Rollen, 2. in die Chemokin-gesteuerte Aktivierung und 3. in die Integrin-abhängige Adhäsion⁶⁷. Neuere Erkenntnisse der letzten Dekade lassen die Vorgänge besser verstehen und führten zu einer weitergehenden Unterteilung.

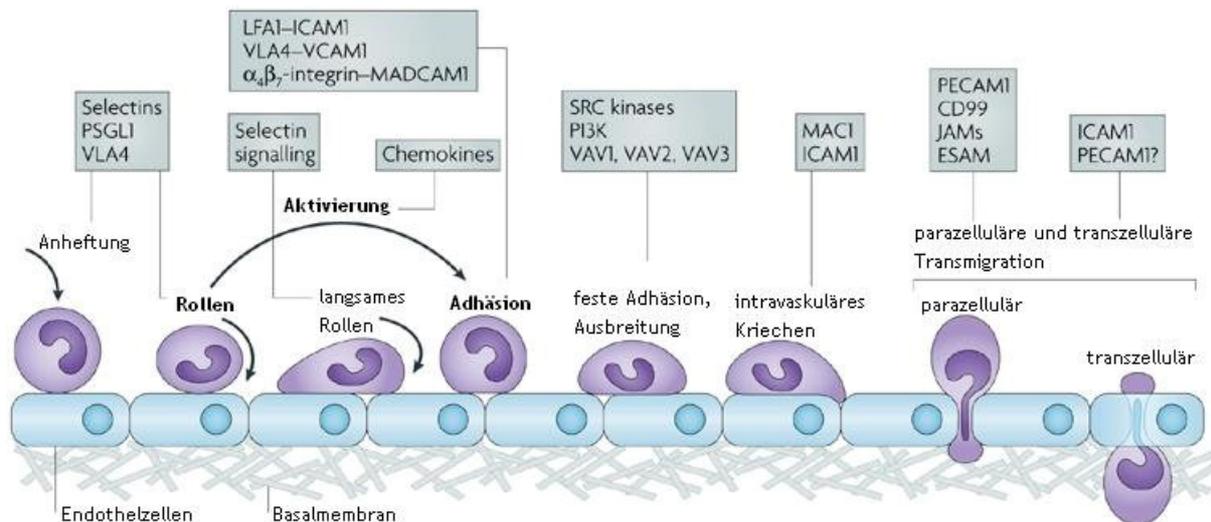


Abbildung 2: Adhäsionskaskade, modifiziert nach ⁶⁷

Wie erwähnt wird das Rollen auf dem Endothel durch Selektine vermittelt. Dabei kann man zwischen L-Selektin, E-Selektin und P-Selektin unterscheiden, wobei P-Selektin die wichtigste Rolle spielt. P-Selektin interagiert mit seinem Counter-Rezeptor P-Selektin Glycoprotein Ligand 1 (PSGL-1) auf Leukozyten^{59,81}. Während des Rollens werden die Leukozyten schnell durch Chemokine aktiviert und binden über ihre induzierten Integrine an Adhäsionsrezeptoren des Endothels z.B. intrazelluläres Adhäsionsmolekül 1 (ICAM1) was zum festen Anhaften der Zellen führt (Adhäsion). Die Chemokine können sowohl von aktivierten Endothelzellen, als auch von aktivierten Blutplättchen sezerniert werden^{13,51,83}. Mit Hilfe von Knockout-Mäusen, die defizient für P-Selektin sind, kann dessen Rolle bei der Entstehung der venösen Thrombose untersucht werden (siehe 4.1).

3. Thrombozyten

3.1 Rolle von Thrombozyten bei der Entstehung der venösen Thrombose

Thrombozyten sind spindelförmige, zelluläre Blutbestandteile ohne Zellkern, die im Knochenmark von ihren Vorläuferzellen, den Megakaryozyten, gebildet und abgeschnürt werden. Sie dienen der Blutgerinnung, indem sie an verletztem Endothel anhaften, den Defekt somit verschließen und die lokale Fibrinbildung induzieren.

Dass Blutplättchen in humanen venösen Thromben vorhanden sind, beschreibt Sevitt 1974¹⁰⁵. Wie erwähnt, werden Thrombozyten über die Interaktion ihres GPIb-IX-V-Komplexes mit von Willebrand Faktor des aktivierten Endothels adhären. Dies führt über einen intrathrombozytären Signalmechanismus zur festen Adhäsion via GPIIb-IIIa – vWF Interaktion⁶³. Köllnberger hat die Dynamik dieses Vorgangs mittels Intravitalmikroskopie untersucht. So werden bei Wildtyp-Tieren 6 Stunden nach Induktion der venösen Thrombose bis zu 1000 Blutplättchen pro mm² adhären. Ein Knockout des GPIIb-III-Rezeptors führt zu nur etwa 80 Blutplättchen pro mm². Ein makroskopisch sichtbarer Thrombus ist bei diesen Knockout-Tieren nicht vorhanden⁶². Brill untersuchte diesen Zusammenhang ausgehend von dem multimeren Glykoprotein von Willebrand Faktor. Ist kein vWF vorhanden und infolgedessen keine Thrombozytenadhäsion möglich, unterbleibt die Entwicklung einer venösen Thrombose⁷.

Blutplättchen tragen außerdem zur Leukozytenrekrutierung bei. In ihren α -Granula speichern sie P-Selektin⁸⁰. Dieses wird nach Thrombozytenaktivierung auf ihrer Zelloberfläche exprimiert. Somit können sie einerseits Leukozyten binden und zu deren Rekrutierung mit beitragen. Andererseits können auch Thrombozyten adhären werden, da ihr GPIIb α -Rezeptor ebenfalls an P-Selektin binden kann¹⁰¹.

4. Zelladhäsionsrezeptor P-Selektin

4.1 Rolle in der venösen Thrombose

Der Zelladhäsionsrezeptor P-Selektin ist der größte der drei Selektine. Er wird in thrombozytären α -Granula⁸⁰ sowie endothelialen Weibel-Palade-Körperchen^{6,82} gespeichert und nach Aktivierung dieser Zellen an deren Zelloberfläche verlagert⁶⁷.

P-Selektin spielt eine wichtige Rolle in der akuten und chronischen Inflammation⁶⁸ und wird darüber hinaus seit einigen Jahren in seiner Bedeutung für die Hämostase und die Thrombose diskutiert¹². Seine Hauptaufgabe besteht in der Vermittlung von Kontakt zwischen Leukozyten und dem Endothel. Hierbei ist die Interaktion von P-Selektin mit PSGL-1 für den ersten Schritt der Adhäsionskaskade, dem sogenannten Rollen⁸⁰ von Leukozyten auf dem Endothel, verantwortlich. Über den gleichen Mechanismus können Leukozyten außerdem an adhären, aktivierten Thrombozyten anhaften und rollen⁸⁰. Endotheliales P-Selektin

unterstützt darüber hinaus auch das Rollen von Thrombozyten an der Gefäßwand³⁷, da diese über ihren GPIIb/IIIa-Rezeptor ebenfalls interagieren können.

Durch die Verwendung von P-Selektin-Knockout-Mäusen kann die Rolle von P-Selektin bei der Entstehung der venösen Thrombose analysiert werden. Die Rekrutierung von Leukozyten während der initialen Phase der Thrombusentstehung ist in P-Selektin-Knockout-Mäusen signifikant vermindert. Dies hat eine deutliche Reduktion der Thrombusfläche in der V. cava im Thrombosemodell der eigenen Arbeitsgruppe zur Folge⁶². Dies deutet darauf hin, dass die Rekrutierung von Leukozyten durch P-Selektin einen wichtigen Beitrag zur Thromboseentstehung leistet. *In vitro* konnte schon gezeigt werden, dass durch P-Selektin aktivierte Monozyten Tissue Factor produzieren können¹⁴. Des Weiteren können Tissue Factor-positive Mikropartikel über PSGL-1 an P-Selektin binden³³ und somit zur Thromboseentwicklung beisteuern.

Köllnberger hat in ihren Untersuchungen die bedeutende Funktion von P-Selektin in der initialen Phase der Thrombose gezeigt, allerdings ist bisher unklar, ob hierbei P-Selektin endothelialen oder thrombozytären Ursprungs die entscheidende Rolle im Thrombosegeschehen spielt.

5. Tissue Factor

5.1 Gerinnungskaskade

Die Gerinnungskaskade wird in drei Wege unterteilt: den intrinsischen, den extrinsischen (auch Tissue Factor Pathway genannt) und den gemeinsamen Weg. Dabei werden inaktive Vorstufen durch proteolytische Spaltung aktiviert, die dann wiederum als Proteasen fungieren und nachgeschaltete Faktoren aktivieren. Am Ende der Kaskade steht die Bildung eines Fibrinnetzes, welches als eine Art Gewebekleber fungiert.

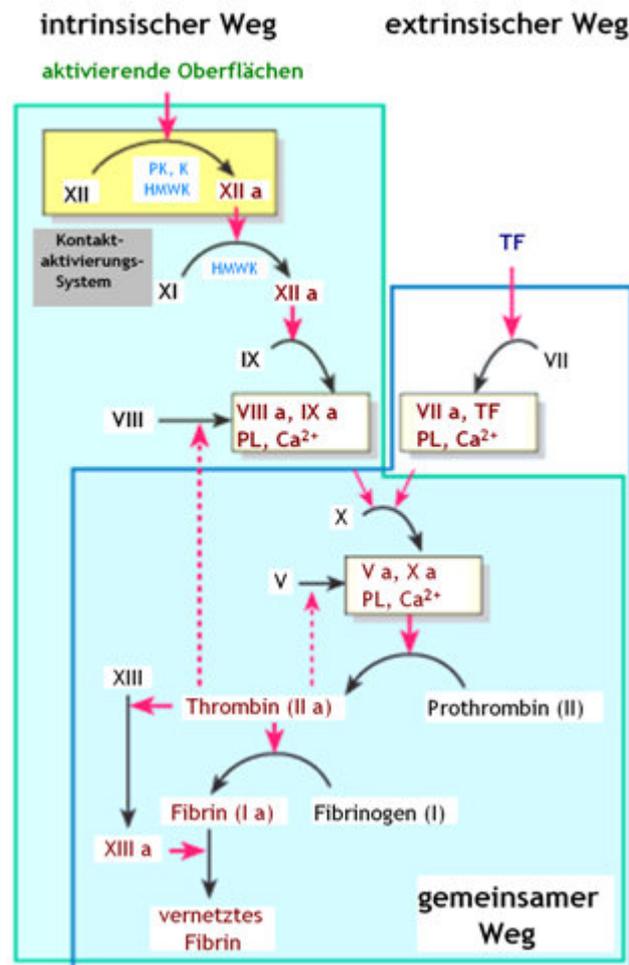


Abbildung 3: Koagulationskaskade, modifiziert nach ²³

Das Glykoprotein Tissue Factor (TF) gilt als primärer Initiator der Koagulationskaskade^{4,27}. Wenn TF Kontakt zu Faktor VIIa hat entsteht der TF:F.VIIa-Komplex. Dieser aktiviert Faktor X zu Xa, welches mit seinem Kofaktor Va als Prothrombinase-Komplex Prothrombin zu Thrombin spaltet, was die Fibrinbildung zur Folge hat. Die entstehenden Fibrinfäden werden durch F.XIIIa quervernetzt und ein stabiler Thrombus entsteht^{73,92,97}.

Die Bildung des TF:F.VIIa-Komplexes wird durch den Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) inhibiert⁹.

5.2 Lokalisation

Tissue Factor kommt im Körper auf zwei Arten vor. Überwiegend befindet er sich in der Tunica media sowie Tunica adventitia von Blutgefäßen⁷⁷. Hier liegt er in aktiver Form vor.

Da der TF hierbei aber keinen Kontakt zum zirkulierenden Blut hat, wird eine Koagulation ohne Gefäßschaden verhindert. Zum anderen ist sogenannter zirkulierender Tissue Factor im Gefäßsystem bekannt. Dieser kann von aktivierten Zellen (Monozyten, Thrombozyten, Endothelzellen) exprimiert werden¹⁴, oder sich auf Mikropartikeln befinden⁹⁸. Die TF-haltigen Mikropartikel können von aktivierten oder apoptotischen Zellen ausgesandt werden^{76,95}. Dieser TF befindet sich aber in einer kryptischen (verschlüsselten), nicht koagulatorischen Konformation¹ und muss erst durch die, von aktivierten Thrombozyten freigesetzte, Proteindisulfid-Isomerase (PDI) in die aktive Form überführt werden^{1,99}.

5.3 Rolle in der venösen Thrombose

Die Rolle von Tissue Factor bei der venösen Thrombose ist nach wie vor weitestgehend unklar. Da das vaskuläre Endothel in der Mehrzahl der Fälle intakt ist, scheint Tissue Factor aus der Gefäßwand keine entscheidende Rolle zu spielen. Der Großteil von physiologischerweise zirkulierendem TF befindet sich auf Mikropartikeln⁷⁷. TF-haltige Mikropartikel, die von Leukozyten abstammen, exprimieren auch PSGL-1 auf ihrer Oberfläche und können somit an P-Selektin von aktivierten Endothelzellen oder Thrombozyten binden⁹⁵. Ebenso konnte gezeigt werden, dass aktivierte Zellen (Monozyten, neutrophile Granulozyten, Thrombozyten, Endothelzellen) TF exprimieren können^{14,76,91,97,117}. Wenn diese Zellen durch Flussverlangsamung an das aktivierte Endothel rekrutiert werden, können sie durch die Bereitstellung von TF zur Thrombusbildung beitragen. Daher soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, welche Rolle zirkulierender, intravaskulärer Tissue Factor bei der Stase-induzierten Thrombose in Abwesenheit eines Endothelschadens spielt.

III. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

1. Standardisierung und Evaluation eines neu etablierten Mausmodells zur Entstehung der venösen Thrombose

Das noch nicht vollständig charakterisierte murine Modell zur Entstehung der venösen Thrombose, bei dem durch eine stenosierende Ligatur ein verlangsamter, aber bestehender Blutfluss in der Vena cava caudalis erzeugt wird, soll weiter optimiert und standardisiert werden durch:

- Bestimmung der Flussgeschwindigkeit
- Quantifizierung der Thrombusgröße anhand der Bestimmung des Thrombusgewichts
- *In vivo* Diagnose mittels computertomographischer Untersuchung

2. *In vivo* Untersuchungen zur Rolle von Leukozyten und Thrombozyten bei der Entstehung der venösen Thrombose

Mit Hilfe der Intravitalmikroskopie und der Verwendung von selektiven Farbstoffen sollen alle zirkulierenden Thrombozyten und Leukozyten erfasst werden und die Rekrutierung der Zellpopulationen miteinander verglichen werden. Des Weiteren soll mittels Intravitalmikroskopie unter Verwendung von transgenen Mäusen das Verhalten der leukozytären Subpopulationen, Monozyten und neutrophile Granulozyten, während der Entstehung der venösen Thrombose im Detail analysiert werden.

IV. Material und Methoden

1. Versuchstiere

Für diese Arbeit wurde die Maus als Versuchstier verwendet. Sie zeichnet sich durch schnelle Generationszeiten, problemlose Aufzucht und kostengünstige Haltung aus. Ihre geringe Größe qualifiziert die Maus für intravitalmikroskopische Untersuchungen. Durch die Verfügbarkeit von transgenen Stämmen, konnten die an der venösen Thrombose beteiligten Zelltypen sowie eventuelle molekulare Mechanismen untersucht werden.

1.1 Wildtyp-/Kontrollstämme

Wildtypiere fungierten als Kontrolltiere für behandelte Wildtypiere (z.B. mit Antikörpern) und für transgene Tiere, die auf diesem Hintergrund erzeugt wurden.

1.1.1 C57Bl6/J

Der C57Bl6/J-Stamm ist der am häufigsten verwendete Inzuchtstamm⁵⁶. C57Bl6/J-Tiere kamen als native Kontrolltiere sowie behandelte Versuchstiere zum Einsatz. Sie stellen außerdem den Wildtyphintergrund für alle verwendeten transgenen Stämme dar^{11,34,40,54,55,58,92,97}.

1.1.2 SV129S1

Im Zuge der Standardisierung des neu etablierten Modells zur Entstehung der venösen Thrombose wurde ein weiterer Wildtypstamm eingeführt^{35,57}. Durch die Überprüfung der Übertragbarkeit auf einen weiteren Wildtypstamm wurde die anschließende Verwendung von weiteren transgenen Linien ermöglicht.

1.2 Transgene Stämme

Die Verwendung von transgenen Stämmen ermöglichte es, gezielt das Verhalten bestimmter Moleküle und Zelltypen in der Entstehung der venösen Thrombose zu erforschen. Mittels Gen-Knockout konnte die Expression spezieller Rezeptoren oder Proteine ausgeschaltet werden. Durch den Vergleich der Ergebnisse mit denen der Kontrolltiere konnten Rückschlüsse über die Funktion der Rezeptoren und Proteine gewonnen werden.

1.2.1 LysM-eGFP

In diesem transgenen Stamm fluoreszieren die neutrophilen Granulozyten⁴⁰. Das wird durch einen Knock-in des Gens für grün fluoreszierendes Protein (enhanced GFP) in den Locus für das murine Lysozym M (lys) erzeugt³⁴. Das Lysozym M wird auch von einem Teil der Monozyten exprimiert, der sich aber auf nur ca. 2 % beläuft und somit vernachlässigbar ist. Die Verwendung dieses Stammes ermöglichte somit, das Verhalten von neutrophilen Granulozyten bei der Entstehung der venösen Thrombose zu erforschen.

1.2.2 CX₃CR1-eGFP

CX₃CR1 ist ein relativ spezifischer Rezeptor auf Monozyten. Im Blut besitzt ihn noch eine sehr kleine Population natürlicher Killerzellen. Über den Knock-in von grün fluoreszierendem Protein (eGFP) in den CX₃CR1-Locus gelingt es, Monozyten mittels grüner Fluoreszenz sichtbar zu machen⁵⁸. Somit konnte ihr Verhalten während der Entstehung der venösen Thrombose untersucht werden.

1.2.3 P-Selektin-Knockout

Durch genetische Veränderung exprimieren die P-Selektin-Knockout Mäuse weder auf Endothelzellen noch auf Thrombozyten diesen Rezeptor¹¹. Durch die intravenöse Injektion von nativen Wildtyp-Thrombozyten in diese Mäuse untersuchte man, ob, und wenn ja welche

Lokalisation (endothelial vs. thrombozytär) von P-Selektin für die Entstehung der venösen Thrombose von entscheidender Bedeutung sein könnte.

1.2.4 TF^{flox/flox}xLysM-Cre

Mangels eines geeigneten Knockout-Modells konnte die Tissue Factor Expression von neutrophilen Granulozyten nicht singular betrachtet werden. Durch die Verwendung von TF^{flox/flox}xLysM-Cre-Mäusen konnte die Rolle von Tissue Factor aus myeloiden Zellen (neutrophilen Granulozyten und Monozyten) bei der Entstehung der venösen Thrombose erforscht werden, da durch die genetische Veränderung bei diesen Mäusen keine Expression von Tissue Factor in neutrophile Granulozyten und einem Teil der Monozyten stattfindet^{92,97}.

2. Tierhaltung und Zucht

Die in den Versuchen verwendeten Tiere stammten aus der Tierhaltung des Deutschen Herzzentrum München. Es handelt sich um eine sogenannte spezifiziert pathogenfreie Haltung.

Hier werden die Mäuse getrennt nach Stämmen in gleichgeschlechtlichen Gruppen von 2 bis 6 Tieren gehalten. Lediglich Zuchtböcke werden nach dem Zuchteinsatz einzeln gehalten⁴⁴.

Die Haltung erfolgt in durchsichtigen, leicht reinig- und sterilisierbaren einzelbelüfteten Käfigen (IVCs = Individually Ventilated Cages) vom Typ III, erhöhte Ausführung (ca. 825 cm²) (TECNIPLAST, Hohenpeißenberg). Als Einstreu wird spezielles Labortiereinstreu (LIGNOCEL® BK 8-15, J. Rettenmaier & Söhne, Rosenberg) verwendet. Durch die Einzelbelüftung kommt es pro Käfig und Stunde zu ca. 50 Luftwechsell. Dadurch können Feuchtigkeit und Schadgase besser abtransportiert werden. Dennoch wird die Einstreu einmal wöchentlich gewechselt um Gesundheits- und Haltungsprobleme bei der dabei stattfindenden Einzeltierkontrolle zu erkennen. Über das komplexe Belüftungssystem werden die Temperatur bei 20 – 24°C und die Luftfeuchtigkeit bei 60 – 70% konstant gehalten. Rückzugsmöglichkeiten für die Mäuse bei gleichzeitiger Sichtbarkeit werden durch autoklavierbare Häuschen aus transparentem, roten Plastik (Mouse House, TECNIPLAST, Hohenpeißenberg) geschaffen. Des Weiteren wird den Mäusen Zellstoff als Nestbaumaterial

zu Verfügung gestellt. Eine Beleuchtungsanlage sorgt für einen geregelten zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus. Während der Hell-Phase werden im Käfig 50 bis 100 Lux erreicht. Allen Mäusen stehen sterilisiertes Leitungswasser und pelletiertes, nagergerechtes Futter (#1320 Ratte/Maus Haltdungsdiät, Altromin, Lage) ad libitum zu Verfügung.

Die Zucht erfolgt ab einem Alter von 10 Wochen mittels polygamer Verpaarung. Hierfür werden zwei Weibchen mit einem Männchen zusammen gehalten. Nach Sichtbarwerden der Trächtigkeit der Weibchen, werden diese vom Männchen getrennt. Nach der Geburt kommt es zu einer vierwöchigen Aufzuchtphase. Im Anschluss werden die Jungtiere abgesetzt und das Muttertier kann erneut dem polygamen System der Verpaarung zugeführt werden.

3. Narkosedurchführung

Die Einleitung der Narkose erfolgte durch Inhalationsnarkose mit Isofluran (Forene 100%, Abott, Wiesbaden). Die Maus wurde hierfür in eine Röhre gesetzt, in die mittels eines Isofluranverdampfers (Cyprane, Keighley, UK) ein dreiprozentiges Isofluran-Sauerstoff-Gemisch eingeleitet wurde. Nach Ausfall der Stellreflexe wurde die Maus aus der Röhre entnommen und eine voll antagonistisierbare Injektionsnarkose intraperitoneal verabreicht.

Da keines der Injektionsanästhetika in therapeutischer Dosierung alleine alle Kriterien der Allgemeinanästhesie, Bewusstlosigkeit (Hypnose), Einschränkung der Schmerzempfindung (Analgesie) und Muskeler schlaffung (Relaxation), erfüllt, müssen unterschiedliche Substanzen miteinander kombiniert werden³¹.

Dadurch kann man die Einzeldosierungen reduzieren und Nebenwirkungen minimieren. Fentanyl erfüllt als stark wirkender Opiatantagonist das Kriterium der potenten Analgesie und ergänzt die Wirkung des sedativ-hypnotischen Analgetikums Medetomidin (spezifischer α_2 -Adrenozeptoragonist). Dieses wird wegen seiner Nebenwirkungen von ausgeprägter Bradykardie und Begünstigung von Herzarrhythmien in möglichst geringer Dosierung eingesetzt. Das Benzodiazepin Midazolam hat eine relaxierende und krampfhemmende Wirkung.

Durch intraperitoneale Applikation einer Mischung aus 0,5 mg/kg Medetomidin (Dorbene vet 1mg/ml, Fort Dodge, Würselen), 0,05 mg/kg Fentanyl (Fentanyl-Janssen 0,5 mg, Janssen-

Cilag, Neuss) und 5,0 mg/kg Midazolam (Midazolam-Actavis 5 mg/ml, Actavis, Langenfeld) wurde bei den Versuchstieren eine risikoarme Narkose eingeleitet.

Nach etwa 20 min wurde das für chirurgische Eingriffe notwendige Narkosestadium der chirurgischen Toleranz III₂ erreicht³¹.

Über eine Kopfkammer wurde den Mäusen Sauerstoff zugeführt und so die Oxygenierung sichergestellt. Bei Bedarf konnte Isofluran beigemischt werden. Die verbrauchten Atemgase wurden von einem Abzug (Matrx, Orchard Park, USA), welcher über einen Schlauch an der Kopfkammer befestigt war, abgeleitet. In regelmäßigen Abständen wurden die Narkosetiefe mittels Kontrolle des Zwischenzehenreflexes sowie Atemfrequenz und -typ überprüft.

Die Kontrolle und Aufrechterhaltung der Körpertemperatur erfolgte durch ein intraoperatives Tierbewärmungssystem (IOW-3704, FMI, Seeheim-Ober Beerbach). Hierbei wurde mit einer Rektalsonde die Körpertemperatur gemessen und in Abhängigkeit davon die Wärmeplatte, auf welcher die Maus fixiert war, beheizt.

Da bei den Versuchen zur frühen Phase der Entstehung der venösen Thrombose eine bis zu acht Stunden andauernde Narkose erforderlich war, wurde die Narkose durch wiederholte Injektion des Kombinationspräparates aufrecht erhalten. Die Nachdosierung erfolgte individuell unterschiedlich in Abhängigkeit von der Narkosetiefe (Zwischenzehenreflex).

Um die späte Phase der Entstehung der venösen Thrombose nach 48 Stunden untersuchen zu können, bediente man sich der vollständigen Antagonisierbarkeit der Injektionsnarkose. Hierfür wurde der Maus eine Kombination aus 2,5 mg/kg Atipamezol (Antisedan, Pfizer, Karlsruhe), 1,2 mg/kg Naloxon (Naloxon-hameln 0,4mg/ml, hameln pharmaplus, Hameln) und 0,5 mg/kg Flumazenil (Flumazenil Delta Select 0,1mg/ml, DeltaSelect, Dreieich) subkutan injiziert.

Atipamezol ist ein hochpotenter, selektiver und sehr spezifischer Antagonist an zentralen und peripheren α_2 -Adrenozeptoren. Es beseitigt die α_2 -vermittelten Erscheinungen Hypotonie, Bradykardie und AV-Block. Außerdem lässt es die arterielle Sauerstoffversorgung durch seinen atemstimulierenden Effekt ansteigen. Die unter Medetomidin entstehende Hypothermie wird aufgehoben. Naloxon antagonisiert die Wirkung der Agonisten (Fentanyl) an den Opioid-Rezeptoren. Flumazenil hebt die Wirkung von Benzodiazepinen durch kompetitive Verdrängung von ihren Rezeptoren im ZNS auf³¹.

Für die Entnahme der entstandenen Thromben nach 48 Stunden wurde die Maus erneut mittels Inhalations- und Injektionsnarkose in das Narkosestadium der chirurgischen Toleranz versetzt.

Injektionsanästhetika	Dosierung	Applikationsweise
Medetomidin	0,5 mg/kg	intraperitoneal
Midazolam	5,0 mg/kg	
Fentanyl	0,05 mg/kg	
Antagonisten		
Antagonisten	Dosierung	Applikationsweise
Atipamezol	2,5 mg/kg	subkutan
Flumazenil	0,5 mg/kg	
Naloxon	1,2 mg/kg	

Tabelle 1: Dosierungen der vollständig antagonisierbaren Anästhesie (VAA) bei der Maus, modifiziert nach ³¹

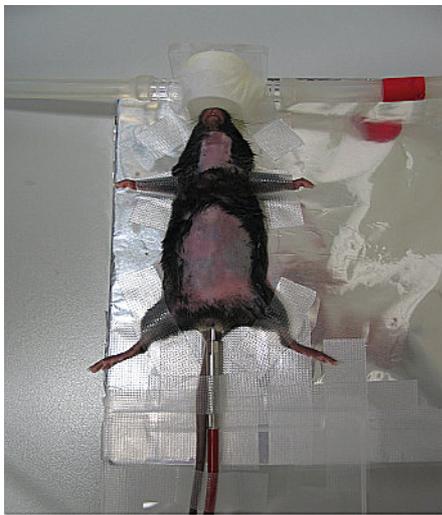
4. Operationsverfahren

Für die Durchführung von chirurgischen Eingriffen wurden die Mäuse mit der oben beschriebenen Narkosetechnik in das Narkosestadium der chirurgischen Toleranz versetzt. Durch das Aufbringen von Augensalbe (Bepanthen Augen- und Nasensalbe, Bayer, Leverkusen) wurde dem Austrocknen der Kornea vorgebeugt. Anschließend wurden die Tiere gewogen. Als nächstes wurden die Operationsbereiche an Hals und Abdomen vorbereitet. Hierzu wurde am Hals der Bereich vom Kieferwinkel bis zum Brustbein mit einer Haarschneidemaschine (ermila Magnum Handy, Wahl, Unterkirnach) geschoren. Am Abdomen erfolgte dies vom kaudalen Brustbein bis zum Becken. Diese Bereiche wurden durch die Verwendung von Enthaarungcreme (Pilca, Sodalco, Mailand, IT) vollständig enthaart.

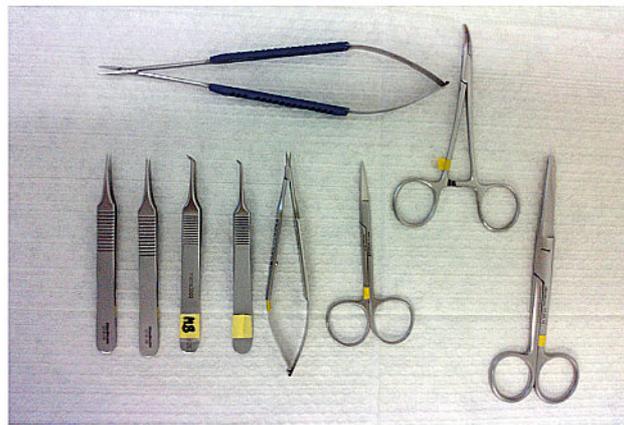
Auf der Wärmeplatte wurde die Maus in Rückenlage mittels Klebeband (Transpore, 3M, Neuss) fixiert. Die Nase der Maus befand sich in einer Kopfkammer, über welche die Versorgung mit Sauerstoff sichergestellt wurde und Isofluran zugeführt werden konnte. Um die Körpertemperatur zu messen, wurde die Sonde des Tierbewärmungssystems im Rektum der Maus platziert. Damit der Hals gestreckt wird, legte man der Maus eine 1 ml Spritze

(B.Braun, Melsungen) in den Nacken. Als letzter Schritt der Operationsvorbereitung wurde die Haut im Operationsgebiet mittels Alkohol (Cutasept F, Bode, Hamburg) entfettet und desinfiziert.

Alle Operationstechniken wurden unter einem Stereomikroskop (Stemi 2000, Zeiss, Jena) in Kombination mit einer Schwanenhalslampe (Schott Kaltlichtquelle KL200 und Schwanenhals-Lichtleiter, Zeiss, Jena) zur besseren Ausleuchtung des Operationsfeldes durchgeführt. Als Operationsbesteck wurde mikrochirurgisches Instrumentarium (micro2000, Medicon, Tuttlingen) eingesetzt.



zur Operation vorbereitete Maus



verwendetes mikrochirurgisches Instrumentarium

Abbildung 4: zur Operation vorbereitete Maus und Instrumentarium

4.1 Katheterisierung der Vena jugularis dextra

Für die Applikation von Fluoreszenzfarbstoffen, Antikörpern und Zellen wurde ein venöser Zugang benötigt. Durch die Platzierung eines Katheters in die rechte Vena jugularis erhielt man einen venösen Zugang, der stabil lag, auch nach Umlagerung z.B. unter das Intravitalmikroskop. Über ihn konnten den gesamten OP-Zeitraum hindurch definierte Volumina vollständig verabreicht werden.

Der Katheter bestand aus einer 2 ml Spritze, einem Drei-Wege-Hahn (Discofix C, B.Braun, Melsungen) und einem Polyäthylenschlauch (Portex Polythene Tubing, 0,28mm ID 0,61mm OD, Smiths Medical International, Hythe, UK).

Für diesen Eingriff wurde die Maus mit dem Kopf in Richtung des Operateurs gelagert. Man eröffnete die Haut rechts paramedian vom rechten Kieferwinkel (*Angulus mandibulae*) bis zum Sternum durch geraden Schnitt, wodurch die rechte Speicheldrüse (*Glandula mandibularis*) in Erscheinung trat (Abb. 5.1-5.5). Durch stumpfe Präparation mit den geraden Pinzetten wurde diese mobilisiert und kranial verlagert. Somit hatte man Sicht auf die *Vena jugularis dextra*. Diese wurde nun stumpf frei präpariert. Mit einem Faden (Prolene 7-0 metric, Ethicon, Norderstedt) ligierte man die Jugularvene kaudal der vorgelagerten Speicheldrüse und fixierte sie mit einer Mosquitoklemme in gestreckter Lage. Nun wurden drei Ligaturen vorgelegt: eine doppelte Ligatur am kaudalen Ende der *V. jugularis dextra* und kranial davon zwei einfache Ligaturen. Die doppelte Ligatur diente dazu den Katheter in der Vene zu fixieren. Die folgende einfache Ligatur verkleinerte das Loch, welches in das Gefäß geschnitten wurde, die dritte Ligatur sollte den Blutfluss aus seitlichen Zuflüssen unterbinden. Nachdem der Katheterschlauch spannungsfrei neben der rechten Jugularvene positioniert war, griff man diese mit der Pinzette und schnitt mit der Mikroschere eine kleine Inzision zwischen den vorgelegten Ligaturfäden hinein. Hier wurde der Katheter rasch eingeführt und mittels der vorgelegten, doppelten Ligatur fixiert. Anschließend wurden die kranialen Ligaturen zugezogen. Die korrekte intravasale Lage überprüfte man durch Spülen mit isotonomischer Natriumchlorid-Lösung (Diacor, Trieste, IT). Schließlich wurde der Katheterschlauch noch mittels Klebeband an der Kopfkammer fixiert (Abb. 5.5-5.8).

Damit das Gewebe nicht austrocknete, wurde es mit isotonomischer NaCl-Lösung befeuchtet, die Speicheldrüse zurückgelagert und der Operationsbereich mit Parafilm (Pechiney, Chicago, USA) abgedeckt.

Nach Entfernung des Katheters wurde das Gefäß durch die doppelte Ligatur verschlossen. Die Hautwunde wurde mittels Einzelheften genäht.

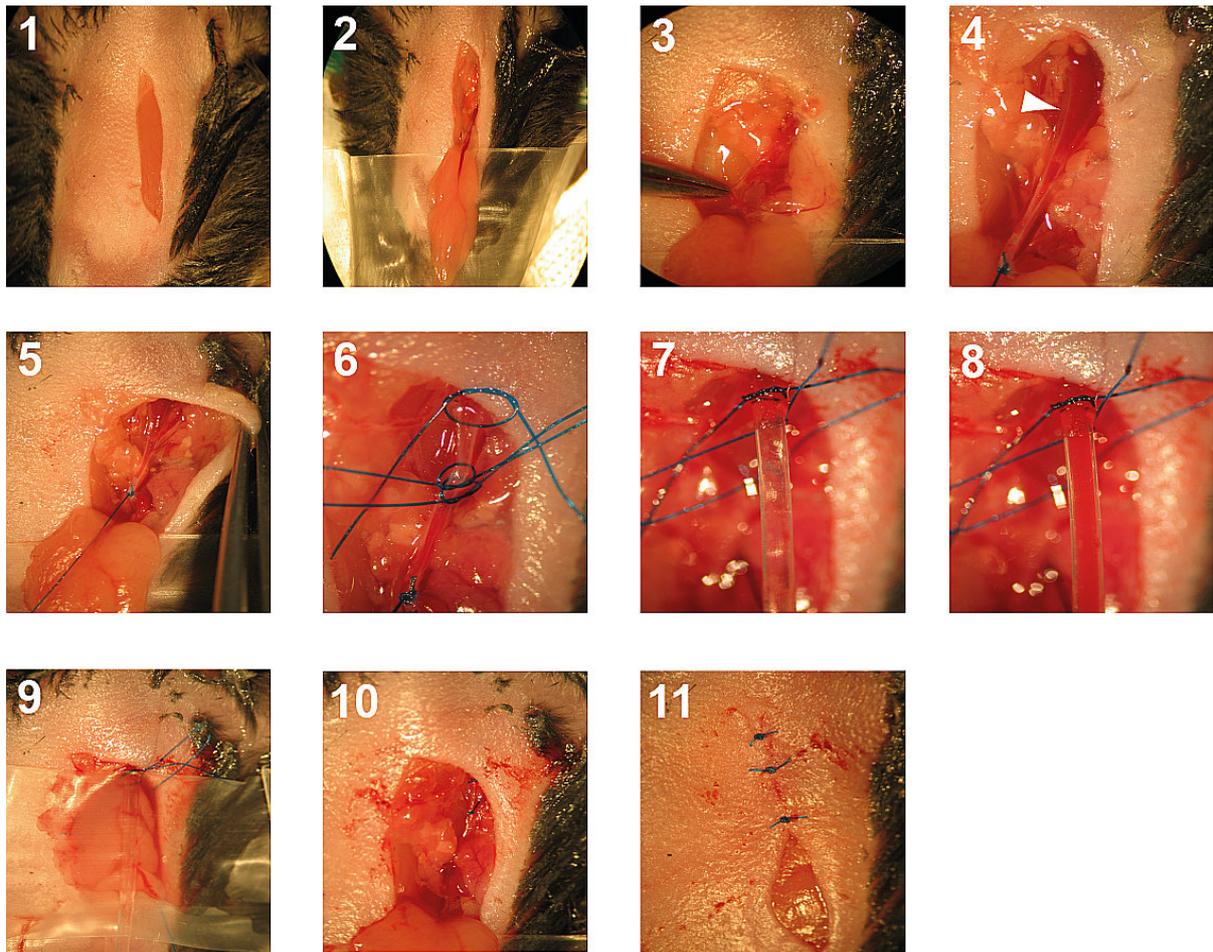


Abbildung 5: Operationsschritte für den venösen Zugang zur V. jugularis dextra

1. Hautschnitt paramedian vom Kieferwinkel bis zum Brustbein, 2. Kraniallagerung der Gl. mandibularis dextra, 3. Präparation der V. jugularis dextra, 4. Ligatur der V. jugularis dextra (Pfeil) mit Haltefaden, 5. Sicht auf die V. jugularis mit seitlichen Zuflüssen, 6. vorgelegte Ligaturen für den Katheter, 7. fixierter Katheter, 8. Katheter mit aspiriertem Blut, 9. zurückgelagerte Gl. mandibularis mit Parafilm abgedeckt, 10. ligiertes Gefäß nach entferntem Katheter, 11. Naht der Haut mit Einzelheften

4.2 Mausmodell der venösen Thrombose

Die Vena cava caudalis führt das Blut der hinteren Körperhälfte zum Herzen zurück. Sie verläuft im Bauchraum ventral der Wirbelsäule rechts der Aorta (Abb. 6). Für das Modell zur Entstehung der venösen Thrombose wurde diese Vene durch eine Ligatur mit einem Draht als Platzhalter kaudal der linken Nierenvene verengt.

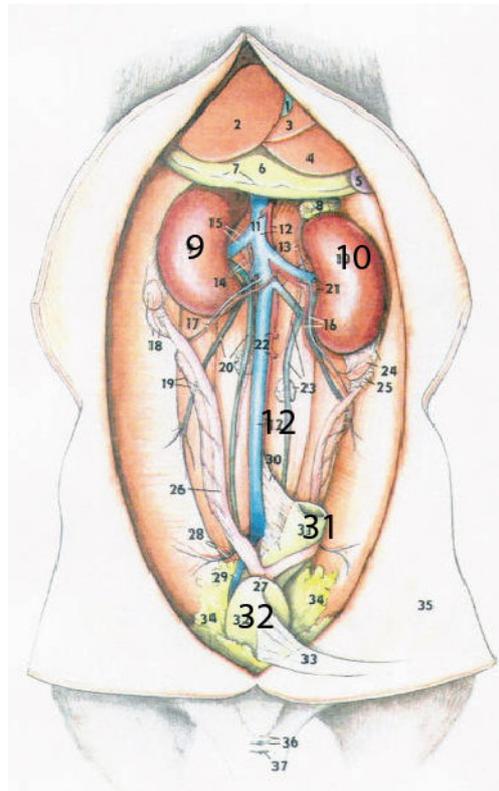


Abbildung 6: Aufsicht auf die V. cava caudalis im Abdomen, (9 = rechte Niere, 10 = linke Niere, 12 = V. cava caudalis, 31 = Rektum, 32 = Blase); modifiziert nach ⁹⁶

Für den operativen Eingriff wurde die Maus mit den Hintergliedmaßen in Richtung Operateur gelagert, der Kopf zeigte von ihm weg. An die linke Bauchseite legte man einen Käfig für Histologieproben (Tissue-Loc Cassettes, Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, USA). Die Haut wurde median durch einen ca. drei cm langen Schnitt eröffnet. Als nächstes eröffnete man die Bauchhöhle in der Linea alba. Auf den Histologieproben-Käfig wurde ein Stück Parafilm und darauf sterile Gaze (Gazin Mullkompressen, Lohmann & Rauscher, Rengsdorf) gelegt und mit angewärmter isotonischer Natriumchlorid-Lösung befeuchtet. Mit zwei angefeuchteten Q-Tips griff man den Darm und lagerte ihn nach links auf die Gaze aus. Das Darmkonvolut wurde mit steriler Gaze bedeckt und befeuchtet. Durch die Auslagerung des Darmkonvoluts wurde die Sicht auf die Vena cava caudalis freigegeben. Diese wurde kaudal des Zuflusses der Vena renalis sinistra mit den geraden Pinzetten stumpf von umliegendem Gewebe freipräpariert. Besonders war dabei auf die Trennung von V. cava caudalis und Aorta abdominalis zu achten. Anschließend wurde mit der gewinkelten Pinzette unter der Hohlvene ein Kanal freipräpariert um den Faden (Premilene 8/0, B. Braun, Melsungen) für die Ligatur durchzuführen. Man legte eine doppelte Ligatur vor. Dann wurde der Platzhalter

(Drahtstück von einem humanen Herzkatheter) auf der Hohlvene unter der Ligatur platziert. Die Ligatur wurde zugezogen und mit einem weiteren Knoten gesichert. Die Entfernung des Platzhalters führte zur Stenosierung der Vena cava im Bereich der Ligatur und ließ somit einen verlangsamten Blutfluss durch das entstehende Restlumen zu (Abb. 7).

Nach Beendigung der intravitalmikroskopischen Untersuchungen über 6 h oder direkt nach Ligatur wurde der Darm in die Bauchhöhle zurückgelagert. Peritoneum und die Muskulatur wurden mittels einer fortlaufenden Naht (Prolene 7-0 metric) vereint. Die Naht der Haut erfolgte durch Einzelhefte.

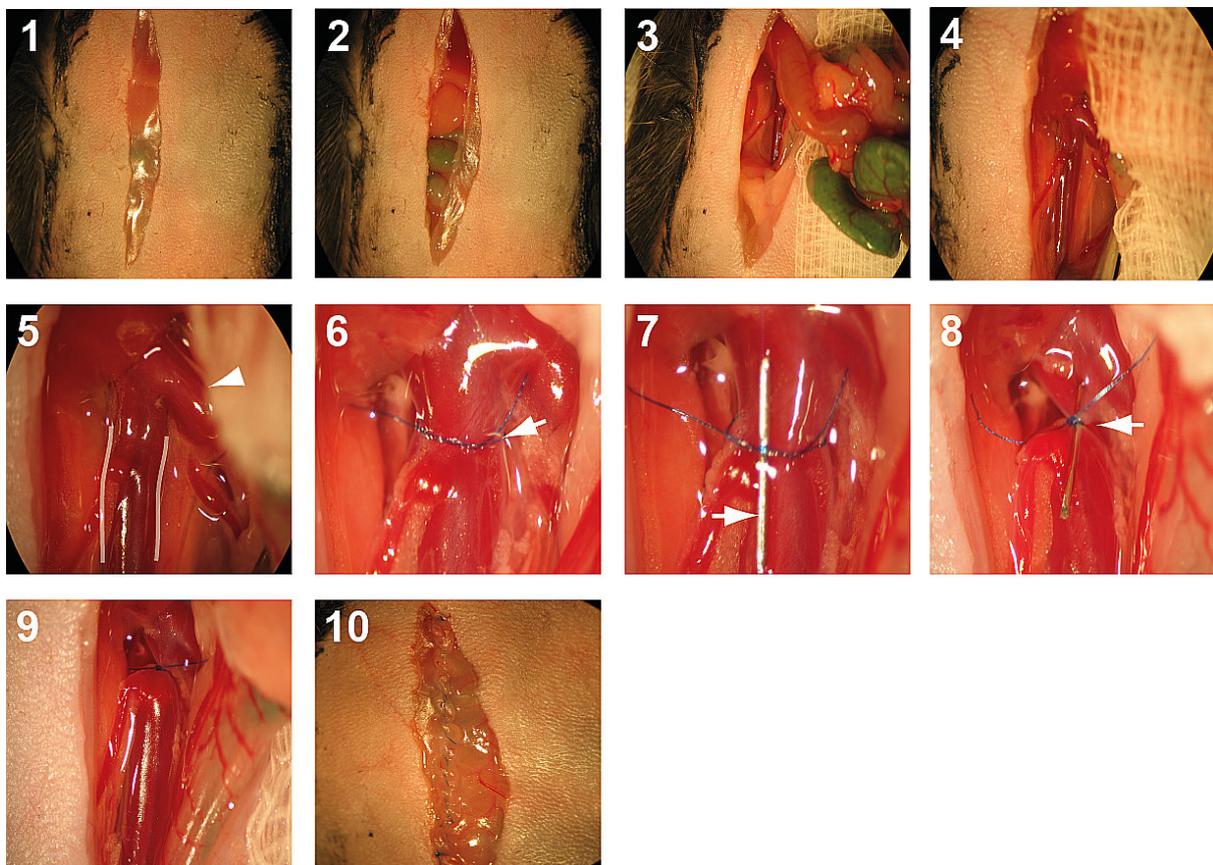


Abbildung 7: Operationsschritte zum Modell der venösen Thrombose

1. medianer Hautschnitt, 2. Eröffnung der Bauchhöhle in der Linea alba, 3. Auslagern des Darmkonvoluts, 4. Umhüllen des Darmkonvoluts mit befeuchteter Gaze, 5. Aufsicht auf die V. cava caudalis (Linien; Pfeilspitze = V. renalis sinistra), 6. präparierte V. cava caudalis mit vorgelegter doppelter Ligatur (Pfeil), 7. Platzierung des Platzhalters (Pfeil), 8. zugezogene Ligatur mit Platzhalter (Pfeil), 9. verengte V. cava caudalis, 10. fortlaufende Naht von Peritoneum sowie Bauchmuskulatur

5. Haltungsbedingungen der Tiere im Experiment

Bei den durchgeführten Untersuchungen handelte es sich um chronische Versuche mit Wiedererwachen der Tiere. Nach 48 Stunden wurde die V. cava caudalis im Hinblick auf den entstandenen venösen Thrombus weitergehend untersucht. Während dieses Zeitraums mussten die Tiere bezüglich ihres Allgemeinbefindens überwacht werden und erfuhren ein postoperatives Management.

5.1 Monitoring / Scoresystem

Nach durchgeführter Operation wurden die Mäuse für 48 Stunden in Käfigen auf weichen Pflgetüchern (Kimtech, Kimberley-Clark, Koblenz) mit Kosmetiktüchern (Kleenex, Kimberley-Clark, Koblenz) als Nestbaumaterial gehalten. Damit man die Tiere unter ständiger Beobachtung hatte, wurden sie in einem speziellen Tierhaltungsschrank (Ventilated Cabinet, TECNIPLAST, Hohenpeißenberg) untergebracht. Dieser ermöglichte die Haltung unter optimalen klimatischen Bedingungen. Durch eine rote Glasscheibe konnten die Tiere jederzeit in Augenschein genommen werden, ohne sie zusätzlichem Stress auszusetzen.

Mittels eines Scoresystems wurde der Zustand der Versuchstiere anhand von allgemeinem Befinden, Nahrungsaufnahme, Bewegungsaktivität, Verhalten, Kot- und Urinabsatz überprüft und schriftlich dokumentiert. Die Versuchsabbruch-Kriterien wurden vor Versuchsbeginn festgelegt. Bei einem Score von 2 oder dreimal nacheinander 1 wurde der Versuch abgebrochen und die Maus euthanasiert.

5.2 Postoperatives Management

Damit die Versuchstiere eine postoperative Schmerzlinderung erfahren konnten, wurde ihnen subcutan 0,1 mg/kg Buprenorphin (Temgesic, Reckitt Benckiser, Hull, UK) injiziert.

Die Applikation erfolgte perioperativ. Da die Wirkung nach 20 bis 30 Minuten eintritt, wurde es 30 Minuten vor Antagonisierung der Narkose gegeben. Durch seine feste Bindung an den μ -Rezeptor kann es durch Naloxon nicht antagonisiert werden und erreicht eine Wirkdauer von 8 bis 12 Stunden³¹. Aufgrund seiner Wirkdauer wurde Buprenorphin jeweils morgens und abends verabreicht.

6. Präparation zur Isolierung von Thrombozyten

6.1 Kardiale Blutentnahme

Die Herzpunktion wurde eingesetzt um ein Maximalvolumen von ca. 800 – 1500 μ l Vollblut zu erreichen. Es handelt sich hierbei um eine terminale Entnahmemethode, bei der die Mäuse in Narkose durch Blutentzug versterben⁴³. Hierfür wurde die Maus unter Isofluran-Narkose in Rückenlage fixiert. Nach Desinfektion des Thoraxbereichs punktierte man das Herz auf Höhe der zweiten Rippe links paramedian mit einer senkrecht geführten Spritze. Die Größe der Kanüle war 26 G (BD Microlance, Becton Dickson, Heidelberg). Man aspirierte langsam, damit kein zu großer negativer Druck entstehen konnte, der das Herz kollabieren lassen würde. Das gewonnene Blut wurde mit 100 μ l/ml Citrat (aus S-Monovetten, Sarstedt, Nümbrecht) ungerinnbar gemacht.

6.2 Thrombozyten-Isolierung

Das entnommene Blut wurde vorsichtig in Zentrifugenröhrchen überführt, um eine Aktivierung der Thrombozyten zu vermeiden und mit Tyrode's Puffer pH 6,5 auf ein Volumen von 2 ml aufgefüllt. Anschließend wurde es 20 min bei 68g ohne Bremse zentrifugiert (Megafuge, Heraeus, Buckinghamshire, UK).

Durch die Zentrifugation entstand ein Überstand von plättchenreichem Plasma (PRP). Dieser wurde mit einer Pipette vorsichtig abgenommen und in ein Zentrifugenröhrchen überführt.

Mit Tyrode's Puffer pH 6,5 wurde auf 4 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Anschließend wurde für 10 min bei 1277g mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und ein Thrombozytenpellet blieb zurück. Das Pellet wurde durch Zugabe von 250 μ l Tyrode's Puffer pH 6,5 resuspendiert. Danach wurden 250 μ l Tyrode's Puffer pH 7,4 zugefügt.

Im Anschluss wurde die Thrombozytenzahl in der Suspension mittels eines hämatologischen Analysegeräts (Sysmex XE-2100, Sysmex, Norderstedt) bestimmt. Frühere Untersuchungen konnten zeigen, dass das hier verwendete Protokoll zur Thrombozytenisolierung keine relevante Thrombozytenaktivierung nach sich zog⁷⁸.

6.2.1 Tyrode's Puffer

Der bei der Thrombozyten-Isolierung eingesetzte Puffer wurde für jeden Versuch frisch angesetzt. Um die Blutplättchen in möglichst physiologischen Verhältnissen zu halten, wurde er auf 37°C erwärmt und sollte immer mindestens Raumtemperatur haben. Für die Herstellung von 100 ml Puffer wurden zuerst je 0,1 g von den Trockensubstanzen bovines Serumalbumin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) und D(+)-Glucose (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) mittels einer geeichten Waage abgewogen und in ein Becherglas gegeben. Es wurden 90 ml Aqua bidest und 1 ml HEPES (Invitrogen, Darmstadt) sowie 10 ml eines vorbereiteten Tyrodes 10-fach-Konzentrats dazu gegeben. Für die Herstellung der Tyrodes 10-fach-Lösung wurden 80 g NaCl (VWR International, Darmstadt), 10,15 g NaHCO₃ (VWR International, Darmstadt) sowie 1,95 g KCl (VWR International, Darmstadt) in 1000 ml Aqua bidest gelöst. Nach Sterilfiltration wurde diese Lösung im Kühlschrank aufbewahrt. Der fertige Puffer wurde gut durchmischt und durch Zugabe von 2 mM HCl und NaOH auf die pH-Werte 6,5 und 7,4 eingestellt. Die pH-Wertmessung erfolgte mittels einer Elektrode, die zwischen den Arbeitsschritten immer wieder abgespült wurde.

7. Erstellen von Blutbildern

Die Erstellung von Blutbildern erfolgte nach kardialer Blutentnahme (siehe 6.1) an einem hämatologischen Analysegerät (Sysmex XE-5000, Sysmex, Norderstedt).

8. Verwendete Farbstoffe und Antikörper

8.1 Fluoreszenzfarbstoffe

Bei Bestrahlung mit kurzwelligem Licht geben bestimmte Moleküle längerwelliges Licht ab. Wenn diese induzierte Eigenstrahlung nur während der Anregungsbeleuchtung zu sehen ist, spricht man von Fluoreszenz⁴⁶. Bestimmte Elektronen der fluoreszierenden Moleküle absorbieren dabei die Photonen und gelangen somit auf ein höheres Energieniveau. Dort

können sie sich aber nicht halten, fallen auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück und setzen dabei die aufgenommene Energie in Form von Fluoreszenzlicht frei. Da die Energie aber nicht nur als Licht freigesetzt wird, ist das emittierte Licht etwas energieärmer als das Anregungslicht und hat somit eine größere Wellenlänge, was in einer anderen Lichtfarbe resultiert. Diese Eigenschaft (Absorption von kurzwelligem Licht, Emission von längerwelligem Licht) wird als Stokes-Regel bezeichnet⁶⁹.

Um alle kernhaltigen Zellen im Blut von Wildtyptieren und transgenen Tieren in der Intravitalmikroskopie visualisieren zu können, wurden sie mit Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt.

8.1.1 Rhodamin 6G

Rhodamin 6G (Molecular Probes, Invitrogen, Darmstadt) ist ein zellpermeabler, kationischer, orange fluoreszierender Farbstoff, der sich in den Mitochondrien von lebenden Zellen ansammelt⁵³. Für die Anregung des Fluorophors ist eine Wellenlänge von 528 nm erforderlich. Das Emissionsmaximum liegt bei 551 nm (Abb. 8).

Durch die intravenöse Applikation wird eine *in vivo* Färbung von Leukozyten ermöglicht. Hierfür wurden 0,1 ml Rhodamin 6G in einer Konzentration von 0,02 % verabreicht.

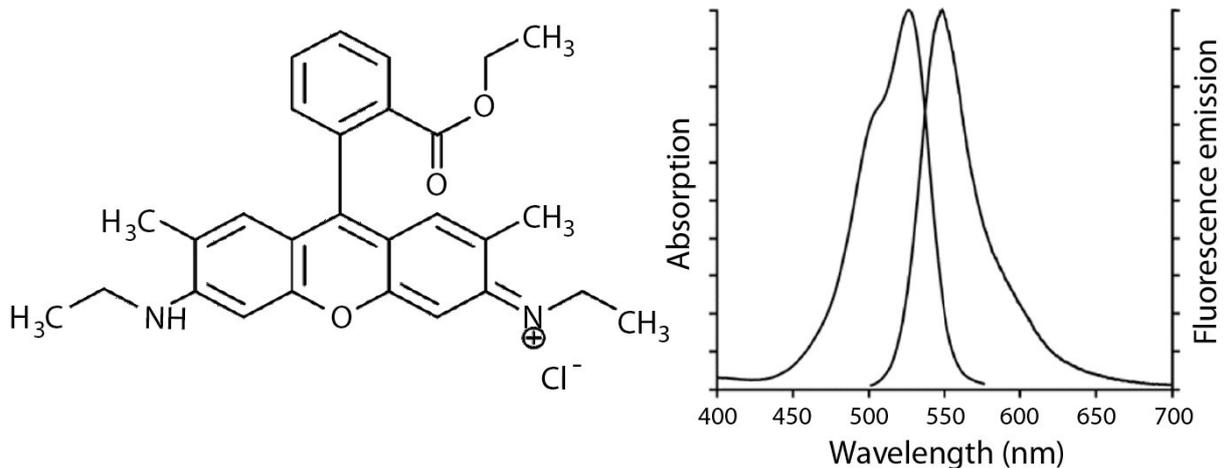


Abbildung 8: Strukturformel und Absorptions-/Emissionsspektrum von Rhodamin 6G

8.1.2 Acridin-Orange

Acridin-Orange (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) ist ein ungeladener, lipophiler Fluoreszenzfarbstoff und kann deshalb leicht durch Zellmembranen diffundieren²⁰. Aufgrund der sehr niedrigen benötigten Farbstoffkonzentration eignet er sich gut zu Vitalfärbung, da die Zellfunktionen kaum beeinträchtigt werden⁸⁵. Er reichert sich im Zellkern an und schaltet sich in die DNA und RNA ein. Bei Anregung emittiert er grüne Fluoreszenz⁵². Für die Anregung ist eine Wellenlänge von 495 nm erforderlich. Das Emissionsmaximum liegt bei 530 nm (Abb. 9). Außerdem akkumuliert er in sauren Zellkompartimenten wie Lysosomen, Endosomen und dem Golgi-Apparat²⁰. Für die Intravitalmikroskopie wurden 0,05 ml Acridin-Orange in einer Konzentration von 0,05 % intravenös appliziert.

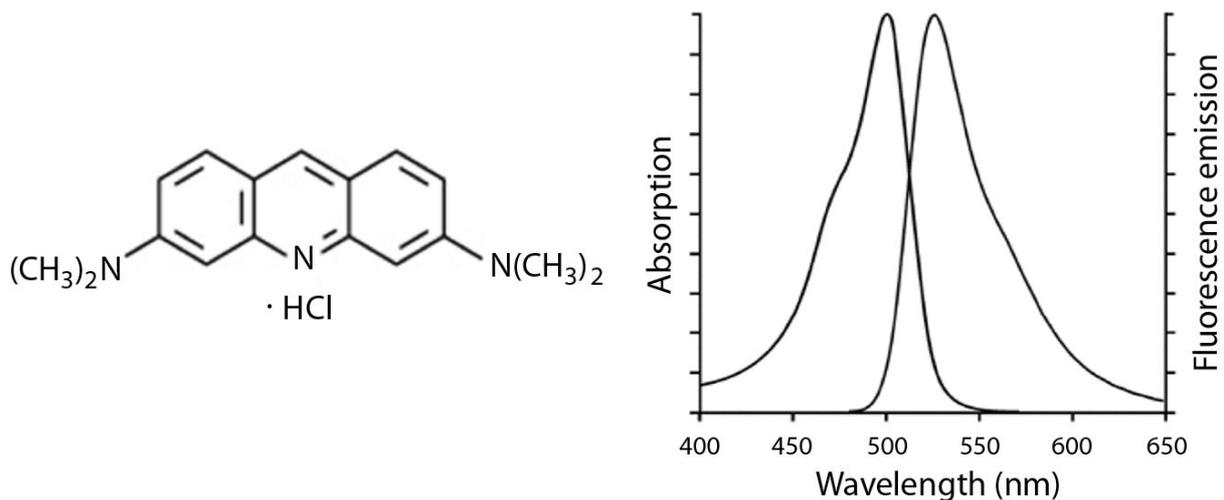


Abbildung 9: Strukturformel und Absorptions-/Emissionsspektrum von Acridin-Orange

8.2 Fluoreszenzmarkierter Antikörper X488 anti-GPIIb

Bei den bisherigen Untersuchungen zur Entstehung der venösen Thrombose mit dem Modell der Flussverlangsamung bei intaktem Endothel wurden nur *ex vivo* fluoreszenzmarkierte Thrombozyten verabreicht⁶². Dabei konnte nur ein Bruchteil der tatsächlich in der Maus zirkulierenden Blutplättchen intravitalmikroskopisch sichtbar gemacht werden.

Durch die Verwendung des nicht blockierenden X488 Antikörpers (Emfret Analytics, Eibelstadt) war es nun möglich, alle zirkulierenden Blutplättchen in der Maus einfach und

stabil *in vivo* zu markieren²⁹ und intravitalmikroskopisch zu erfassen. Der Antikörper wurde in einer Dosierung von 0,1 mg/kg intravenös verabreicht.

8.3 Neutrophile Granulozyten-depletierender Antikörper anti-Ly-6G

Um zu untersuchen, ob neutrophile Granulozyten bei der Entstehung der venösen Thrombose eine Rolle spielen, wurden diese mit Hilfe eines depletierenden Antikörpers (Anti-Mouse Ly-6G (Gr-1), eBioscience, Frankfurt) aus dem zirkulierenden Blut entfernt²⁶. Daley zeigte 2008, dass dieser Antikörper auch einen Teil der Monozytensubpopulation, nämlich solche, die geringgradig Gr-1 exprimieren, depletiert¹⁹. Hierfür wurde die Antikörperlösung mit einer Dosierung von 5 mg/kg intra peritoneal verabreicht. Nach 24 Stunden waren die neutrophilen Granulozyten aus dem Blut entfernt und die venöse Thrombose wurde durch Operation induziert. Nach weiteren 48 Stunden wurde die Maus durch Blutentzug getötet und die V. cava caudalis weitergehend untersucht. Die Depletion der neutrophilen Granulozyten wurde durch ein Blutbild bestätigt.

9. Intravitale Videofluoreszenzmikroskopie (IVM)

9.1 Prinzipien der IVM

Diese Technik ermöglicht es, zelluläre Vorgänge *in vivo* in Echtzeit darzustellen. Hierfür werden verschiedene Zellen und zelluläre Strukturen mit nicht-toxischen, gut verträglichen Fluoreszenzfarbstoffen *in vivo* oder *ex vivo* beladen und können somit im Fluoreszenz-Auflicht-Mikroskop mit der entsprechender Anregung im lebenden Präparat sichtbar gemacht werden. So lassen sich Lebendproben in ihrem physiologischen Zustand erfassen und aufzeichnen⁸⁵.

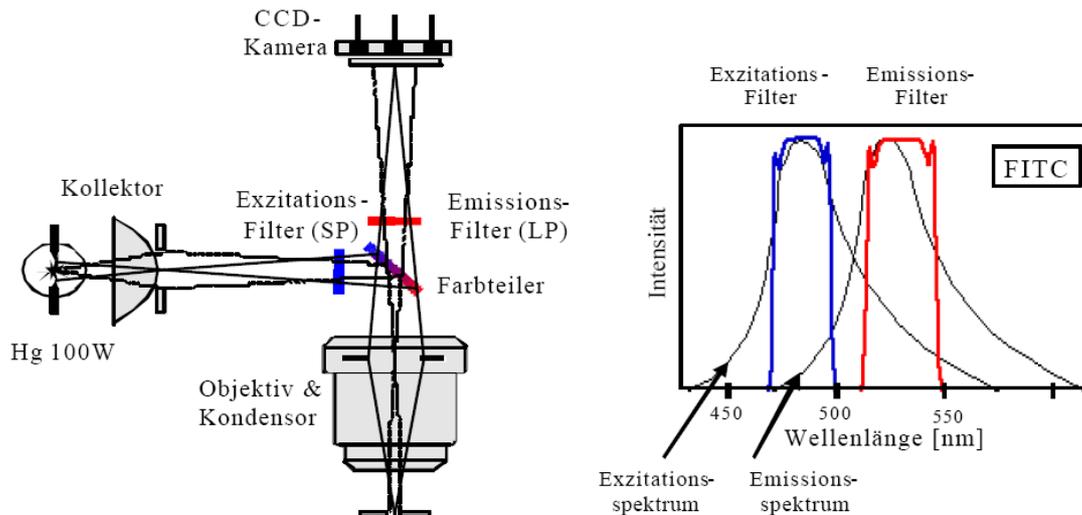


Abbildung 10: Strahlengang im Epifluoreszenzmikroskop. Links im Bild: Der Strahl aus der Lichtquelle wird durch einen Exzitationsfilter und einen Farbteiler auf das Objekt gelenkt. Vom Objekt emittierte Strahlen gelangen durch den Emissionsfilter in die CCD-Kamera (Charged Coupled Device-Kamera). Rechts im Bild: Aufschlüsselung von Exzitations- und Emissionsspektrum zur Festlegung der Filterwahl am Beispiel des Fluoreszenzfarbstoffes FITC (Fluoresceinisothiocyanat).

modifiziert nach ⁴¹

Die oben stehende Abbildung verdeutlicht die typische Strahlenführung in einem Epifluoreszenzmikroskop. Spezielle in den Beobachtungsstrahlengang eingesetzte Filter dienen der Trennung des schwachen Fluoreszenzlichtes vom viel stärkeren Beleuchtungslicht und gewährleisten somit ein definiertes Farb- bzw. Frequenzspektrum (Abb. 10). Eine starke Lichtquelle emittiert weißes Licht, welches durch einen Kollektor zum Anregungsfilter (Exzitationsfilter, SP = „Short pass“) geführt wird. Dieser „Short pass“-Filter hat die Eigenschaft nur für kurzwelliges Exzitationslicht permeabel zu sein. Der Farbteiler unterscheidet zwischen kurzwelligem und langwelligem Licht. Das kurzwellige, welches der Farbteiler reflektiert, wird über das Objektiv auf die zu untersuchenden Zellen geleitet. Das hierbei infolge der Stokes-Verschiebung entstehende langwellige Emissionslicht lässt er ungehindert in Richtung Emissionsfilter passieren. Als Emissions- oder „Long pass“ (LP)-Filter bezeichnet man den zuletzt vor der Kamera geschalteten 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 eventuell 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 sind⁶².

9.2 Geräte

Die intravitalmikroskopischen Untersuchungen wurden an zwei Intravitalmikroskopiesystemen durchgeführt.

9.2.1 Videokassettensystem

Das Videokassettensystem bestand aus folgenden Komponenten: Das Anregungslicht wurde durch eine Quecksilber-Kurzbogen-Höchstdrucklampe (HBO 100, Zeiss, Göttingen) erzeugt. Gesteuert wurde diese durch ein regelbares Vorschaltgerät (FluoArc, Leistungselektronik, Jena). Das Mikroskop war das Modell Axiotech vario 100HD (Zeiss, Jena). Das verwendete Immersionsobjektiv (Zeiss, Jena) hatte eine 20-fache Vergrößerung. Das emittierte Signal wurde von einer CCD-Kamera (Horn Imaging, Aalen) erfasst, über einen Monitor (Dell, Frankfurt) angezeigt und durch einen Videorekorder (AG-7355, Panasonic, Hamburg) auf VHS-Kassetten gespeichert.

9.2.2 Olympus Cell[^]R

Das Olympus Cell[^]R System bestand aus dem Multifunktions-Beleuchtungssystem MT20 (Olympus, Hamburg) und enthielt eine Xenon-Lampe. An dem Mikroskop (BX51WI, Olympus, Hamburg) befand sich ein 20x Immersionsobjektiv (Olympus, Hamburg). Das Emissionssignal wurde über eine CCD-Kamera (ORCA-ER, Hamamatsu, Herrsching am Ammersee) an einen Computer gesendet. Die gesamte Erfassung, Dokumentation, Bearbeitung und Auswertung erfolgte mit der Software Cell[^]R (Olympus, Hamburg).

9.3 Durchführung der IVM

Die Durchführung der intravitalmikroskopischen Untersuchung erfolgte vor (für die Erfassung des Basalzustandes) und in einem Zeitraum bis sechs Stunden nach Induktion der venösen Thrombose um die zellulären Vorgänge während der initialen Phase der Entstehung der venösen Thrombose zu erfassen.

Für die intravitalmikroskopischen Aufnahmen wurde der Bereich der Vena cava caudalis zwischen stenosierender Ligatur kranial und den Zuflüssen der Venae iliacae communes kaudal in vier gleich große Bereiche unterteilt. Daraus ergaben sich vier Aufnahmefenster (Abb. 11).

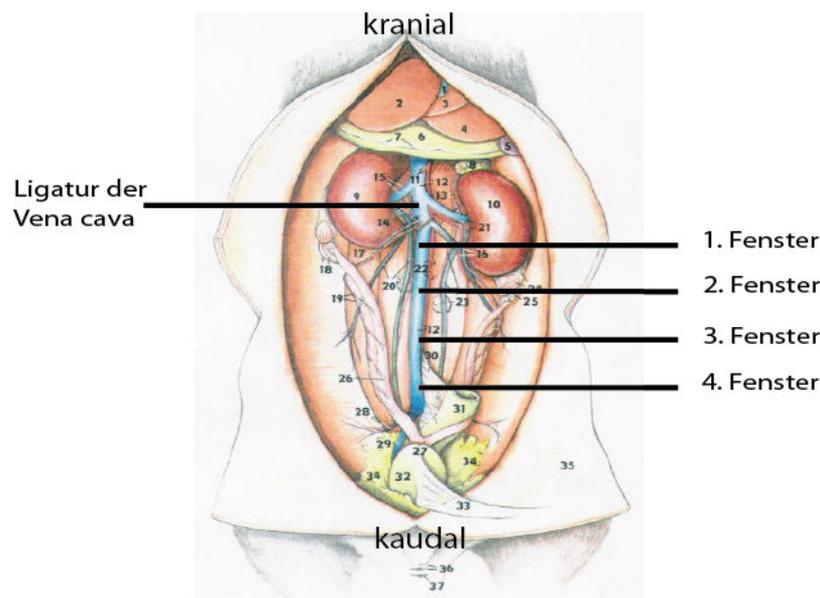


Abbildung 11: Mikroskopierschema, modifiziert nach ⁹⁶

Die Aufnahmen erfolgten mit 200-facher Vergrößerung unter Flüssigkeitsimmersion. Hierfür wurde körperwarme Natriumchlorid-Lösung in die Bauchhöhle getropft. Für die Bestimmung der Flussgeschwindigkeit im Zuge der Standardisierung des Modells erfolgte die Aufnahme mittels Videokassettensystem. Dabei wurden vor und nach Verengung der V. cava caudalis jeweils vier Aufnahmefenster von je 30 Sekunden Dauer aufgenommen.

Die IVM zur Untersuchung der Zell-Rekrutierung erfolgte mit Olympus Cell[^]R. Hierbei wurden pro Fenster jeweils 100 Einzelaufnahmen erstellt, die je nach Belichtungszeit einen Film von ca. zehn Sekunden Länge ergaben.

Zwischen den einzelnen Aufnahmezeitpunkten (1, 2, 5 und 6 Stunden) wurde das Darmkonvolut zurückgelagert, die Bauchhöhle mit erwärmter Spüllösung befeuchtet und mit Parafilm abgedeckt.

Bei den transgenen Stämmen LysM-eGFP und CX₃CR1-eGFP wurden nach den 6-Stunden-Aufnahmen zusätzlich Aufnahmen nach Acridin-Orange-Injektion angefertigt, um den Anteil der neutrophilen Granulozyten bzw. Monozyten an den Gesamtleukozyten beurteilen zu können.

9.4 Auswertung der IVM

9.4.1 Flussgeschwindigkeitsbestimmung

Im Zuge der Standardisierung dieses Modells zur Entstehung der venösen Thrombose sollte die durch die Stenosierung der V. cava caudalis entstehende Verlangsamung des Blutflusses erfasst werden. Hierfür wurden die Aufnahmen auf VHS-Kassetten mithilfe eines speziellen Computerprogramms (Cap Image, Dr. Zeintl, Heidelberg)⁶⁰ ausgewertet. In der sogenannten Frame-to-Frame Methode wurde eine Blutzelle über mehrere Einzelbilder verfolgt und daraus die Flussgeschwindigkeit errechnet. Pro Aufnahmefenster erfolgte diese Geschwindigkeitsbestimmung sechsmal. Aus den Einzelwerten wurde ein Mittelwert gebildet.

9.4.2 Auszählen adhärenter Zellen

Um den Verlauf der Rekrutierung bestimmter Zellen (z.B. neutrophile Granulozyten und Monozyten) zu erfassen, wurden die adhärent gewordenen Zellen ausgezählt. Diese Auswertung erfolgte mit der Software Cell[^]R. Dabei wurden in die intravitalmikroskopischen Aufnahmen je vier Auswertungsfenster von 50 x 100 µm Größe eingeblendet. Als adhärent galt eine Zelle, wenn sie die gesamte Zeit des Films über in stationärer Lage verblieb. Die einzelnen Zellen pro Auswertungsfenster wurden ausgezählt und pro Aufnahmezeitpunkt summiert. Anschließend wurde die Anzahl adhärenter Zellen pro mm² errechnet.

9.4.3 Bestimmung der Aggregationsflächen rekrutierter Zellen am Endothel

Die Bestimmung von Aggregationsflächen zum 6-Stunden Zeitpunkt erfolgte in dem Programm Cap Image. In Schwarz-Weiß-Bildern der 6-Stunden-Aufnahmen wurde ein Fenster von $0,02 \text{ mm}^2$ Größe eingefügt. Das Endothel stellte sich schwarz dar, angefärbte Zellen weiß. Durch Einstellung von minimalem und maximalem Grauwert wurde die Aggregationsfläche in $\text{mm}^2/0,02\text{mm}^2$ ermittelt und schließlich in mm^2/mm^2 umgerechnet.

10. Computertomographische Untersuchung

Zur Bestätigung der Thrombusbildung *in vivo* wurde bei einigen Mäusen nach Induktion der venösen Thrombose eine computertomographische Untersuchung durchgeführt. Die CT-Untersuchung wurde mit einem Inveon SPECT Module (Siemens, München) durchgeführt. Den anästhesierten Mäusen wurde hierbei 0,1 ml jodhaltiges Kontrastmedium (eXIA 160-XL, Binitio Biomedical Inc., Ottawa, CAN) intravasuklär injiziert. Die Einstellungen des Geräts beinhalteten eine Belichtungszeit von 400 ms, eine Röntgenröhrenspannung von 80 kV und ein Anodenstrom von $400 \mu\text{A}$. Die Computertomographie lieferte 270 Projektionen. Die CT-Bilder wurden mittels eines modifizierten Feldkampalgorithms rekonstruiert.

11. Bestimmung des Thrombusgewichts

48 Stunden nach Stenosierung der V. cava caudalis wurden die Versuchstiere getötet und die kaudale Hohlvene inklusive dem enthaltenen Thrombus entnommen. Um die verschiedenen Versuchsgruppen miteinander vergleichen zu können, wählte man den Parameter Thrombusgewicht. Für dessen Bestimmung wurde in dieser Arbeit die folgende Methode entwickelt.

11.1 Entnahme der Vena cava caudalis

Nach Ablauf von 48 Stunden wurden die Versuchstiere durch Inhalations- und Injektionsnarkose in das Stadium der chirurgischen Toleranz III₂ versetzt. Die Fixation erfolgte in Rückenlage. Mittels spitzer Schere wurde die Bauchhöhle neben der Hautnaht eröffnet. Mit zwei Q-Tips wurde der Darm nach links ausgelagert. Damit ergab sich freie Sicht auf die V. cava caudalis (Abb. 12). Kranial der stenosierenden Ligatur wurde mit einer Federschere eine Inzision in das Gefäß gesetzt. Anschließend wurde das gesamte Blutgefäßsystem durch intrakardiale Punktion mit 5 – 6 ml Natriumchlorid-Lösung gespült und die Maus entblutet. Dadurch wurde verhindert, dass in den Fällen, in denen sich kein Thrombus gebildet hatte, post mortem Blut in der kaudalen Hohlvene verblieb und gerann.

Das Gefäß wurde vorsichtig mit den spitzen Pinzetten freipräpariert, wobei die Aorta abdominalis nicht von der Hohlvene getrennt wurde. Das erfolgte im Bereich der verengenden Ligatur bis zu den Zuflüssen der Venae iliacae communes. Auf Höhe der Zuflüsse wurde die V. cava caudalis mit einem Faden (Prolene 7-0 metric) ligiert. Damit war der entnommene Abschnitt standardisiert, d.h. er enthielt immer eine annähernd gleiche Gewebemenge (V. cava caudalis, Aorta abdominalis) mit dem Thrombus als einzige Variable.

Kaudal beginnend wurde das Gebilde unter leichtem Zug mit der Federschere abgetrennt und auf ein genormtes Stück Filterpapier für die anschließende Gewichtsbestimmung gelegt.

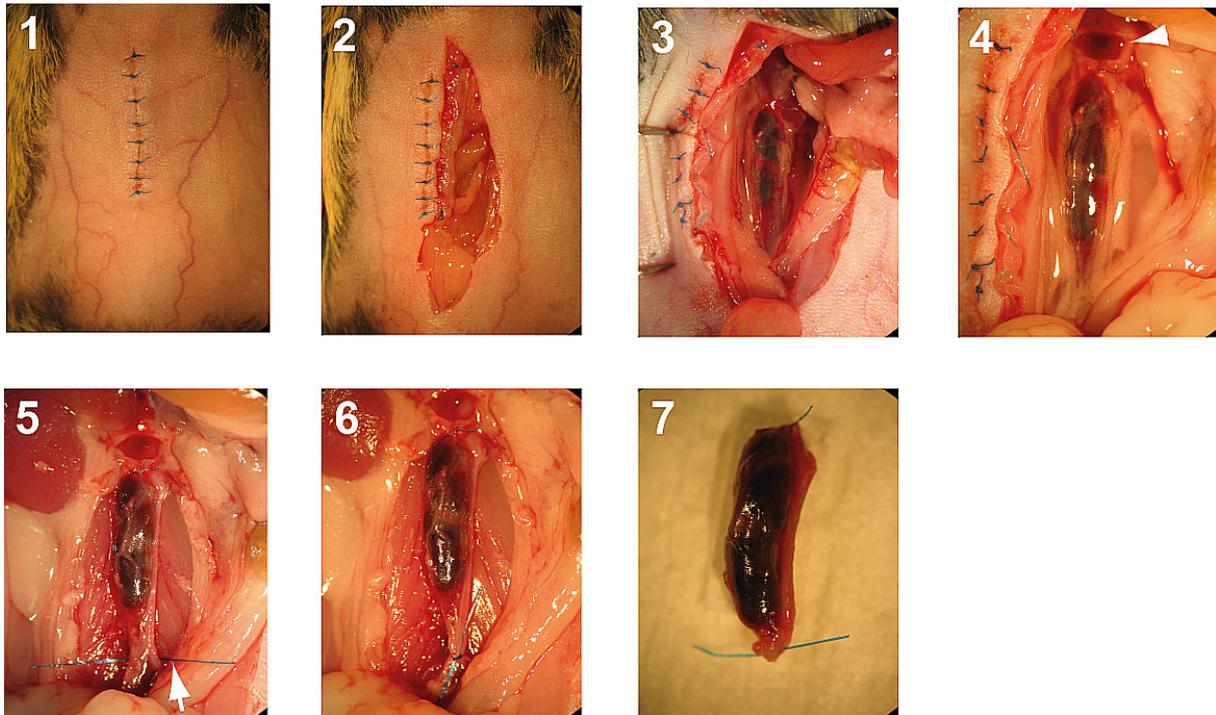


Abbildung 12: Entnahme der Vena cava caudalis

1. Blick auf Abdomen mit Hautnaht, 2. Eröffnung der Bauchhöhle, 3. Aufsicht auf die thrombosierte V. cava caudalis, 4. Inzision kranial der Stenose (Pfeilspitze), 5. Präparierte V. cava caudalis mit vorgelegtem Faden (Pfeil), 6. kaudal ligierte V. cava caudalis, 7. entnommener Thrombus

11.2 Leergewichtsbestimmung

Um für die Auswertung das reine Thrombusgewicht heranziehen zu können, wurde das Gewicht der umgebenden Strukturen, V. cava caudalis und Aorta abdominalis, sowie den beiden Ligaturen und dem Filterpapier ermittelt und von dem Gesamtgewicht abgezogen.

Deshalb wurde bei $n = 6$ C57Bl6/J-Wildtyp-Tieren das Leergewicht bestimmt und der Mittelwert gebildet. Die kaudale Hohlvene wurde ligiert und dann sofort nach vorgenannter Art und Weise entnommen. Mit einer Waage (AE 260 DeltaRange, Mettler, Giesen) wurde das Gewicht ohne vorhandenen Thrombus bestimmt.

11.3 Auswertung

Die Auswertung erfolgte nach zwei Gesichtspunkten. Makroskopisch wurde beurteilt, ob sich ein sichtbarer Thrombus gebildet hat. Hieraus konnte dann für die unterschiedlichen

Versuchsgruppen eine prozentuale Angabe bezüglich makroskopisch vorhandenem oder nicht vorhandenem Thrombus erfolgen.

In einem zweiten Schritt wurde das Thrombusgewicht bestimmt. Das geschah durch Abzug des ermittelten Mittelwerts der Leergewichtsbestimmung vom jeweiligen Gesamt-Thrombusgewicht. Somit erhielt man für die einzelnen Versuchsgruppen reine Thrombusgewichte in mg. Anhand der Thrombusgewichte konnten die einzelnen Versuchsgruppen auf signifikante Unterschiede im Hinblick auf die Entstehung der venösen Thrombose getestet werden.

12. Dokumentation

Um die Ergebnisse der Versuche auch nach längerer Zeit noch nachvollziehen zu können, wurden für jeden Versuch schriftliche Protokolle angefertigt. Hier wurden Versuchsdatum, Tierstamm und -nummer, Geschlecht, Alter, Gewicht und Verlauf des Versuches sowie eventuelle Komplikationen erfasst. Ebenso wurden die verwendeten Substanzen mit ihren Konzentrationen und die Applikationsweise niedergeschrieben.

Durch einen Vermerk konnte jedes Tier, bei dem intravitalmikroskopische Untersuchungen durchgeführt wurden, genau mit den dazugehörigen Aufnahmen in Zusammenhang gebracht werden.

Um die Daten doppelt zu sichern und leichter bearbeiten zu können, erfolgte außerdem nach Abschluss des Versuchs ein Eintrag in ein Tabellenkalkulationsprogramm.

13. Histologische Untersuchungen

48 Stunden nach Induktion der venösen Thrombose sollte neben der Ermittlung des Gewichts des entstandenen Thrombus auch dessen Zusammensetzung überprüft werden. Dies erfolgte durch histologische Untersuchung.

Durch Hämatoxylin-Eosin- bzw. durch Van-Gieson-Färbung⁶⁵ erhielt man einen Überblick über die Verteilung der zellulären Bestandteile im Thrombusgewebe. Durch die indirekte

Immunmarkierung⁸⁵ konnten die einzelnen zellulären Bestandteile spezifisch charakterisiert werden.

13.1 Paraffinpräparate

13.1.1 Präparation

Für die Herstellung von Paraffinpräparaten wurde der Thrombus mit den umgebenden Geweben nach der Entnahme für 24 Stunden mit 4%igem Phosphat-gepuffertem Formaldehyd (Thermo Scientific, Rockford, USA) in Eppendorf-Reaktionsgefäßen fixiert. Nach Umlagerung in Einbettkapseln aus Plastik (Histoscreen Cassettes, Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, USA) und 15 minütigem Waschen mit Leitungswasser kamen die Thromben in 70%iges Ethanol. Das Entwässern der Präparate in aufsteigender Alkoholreihe, Einbringen in ein Intermedium und Durchtränken mit dem Einbettmittel (Paraffin, Type 9, Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, USA) erfolgte durch einen Einbettautomat (STP-120, Microm, Walldorf) nach etabliertem Protokoll⁸⁵. An einer Ausgießstation (AP 280-2, Microm, Walldorf) wurden die Thromben entweder senkrecht mit dem kranialen Ende nach unten für Querschnitte oder waagrecht für die Anfertigung der Längsschnitte in Paraffin eingebettet. Das rasche Abkühlen des Paraffins wurde durch eine Kälteplatte (Tissue Cool Plate COP20, Medite, Burgdorf) gewährleistet.

Die 5 µm dicken histologischen Schnitte wurden an einem Rotationsmikrotom (HM 340 E, Microm, Walldorf) angefertigt und per Pinsel in ein angewärmtes Wasserbad (HI 1210, Leica, Nussloch) übertragen um die seriellen Schnitte zu strecken und von Falten zu befreien. Abschließend wurden sie auf beschichtete Objektträger (Superfrost Plus, Menzel, Braunschweig) aufgezogen und bis zum Färben im Brutschrank bei 37°C aufbewahrt um sie zu trocknen und die Haftung zu verbessern.

13.1.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)

Die HE-Färbung ist die gebräuchlichste Übersichtsfärbung. Sie dient der Unterscheidung von Zellkernen und Zytoplasma. Die Färbestandteile sind Hämalaun nach Mayer und wässriges Eosin 0,1%. Die Färbeschritte wurden von einem Färbeautomaten (TST 44, Medite,

Burgdorf) nach Standardprotokoll durchgeführt. Das Ergebnis lieferte Zellkerne in blau und Zytoplasma sowie Erythrozyten in rot⁸⁵.

13.1.3 Van Gieson-Färbung

Die Van Gieson-Färbung ist eine Dreifachfärbung. Als Farbstoffe werden Eisenhämatoxylin nach Weigert, Pikrinsäure und Säurefuchsin verwendet. Ein Färbeautomat führte die Färbeschritte nach erprobtem Verfahren durch. Als Ergebnis erhielt man Zellkerne in schwarzbraun, das Zytoplasma in gelbbraun, kollagene Bindegewebsfasern in rot, elastische in gelb und das Bindegewebe sowie Erythrozyten ebenfalls in gelb⁸⁵.

13.2 Immunfluoreszenz

Die immunhistologische Untersuchung erfolgte per indirekter Immunmarkierung. Hierbei ist nicht der gegen das zu lokalisierende Antigen gerichtete Primärantikörper markiert, sondern der Sekundärantikörper, der an den Primärantikörper bindet. Diese Antikörper sind fluorochromgekoppelt und daher unter einem Fluoreszenzmikroskop gut erkennbar. Die immunhistologischen Färbungen wurden an Kryostatschnitten durchgeführt⁸⁵.

Für diese Arbeit wurde auf Thrombozyten (CD41⁶⁴), Leukozyten (CD45⁶⁴) sowie neutrophile Granulozyten (neutrophile Elastase NE⁵) und Monozyten (F4/80³) gefärbt.

13.2.1 Präparation

Für die Herstellung von Kryostatschnitten wurde die entnommene V. cava caudalis mit beinhaltendem Thrombus in ein Schlauchstück mit Einbettmedium (Tissue-Tek O.C.T. Compound, Sakura, Alphen aan den Rijn, NL) für Kryoschnitte gelegt und auf Trockeneis tiefgefroren. An dem Schlauchstück war das kaudale Ende des Thrombus durch eine Markierung gekennzeichnet. In einem beschrifteten Falcon Tube wurde der Thrombus bis zum Schneiden bei -80°C aufbewahrt.

Das Schneiden erfolgt mit einem Kryostat (CM 1850, Leica, Nussloch). Die Temperatur des Geräts war auf -25°C eingestellt. Der Thrombus wurde so positioniert, dass man vom

kranialen Ende her zu schneiden begann. Hierbei wurden 5 µm dicke Einzelschnitte erzeugt, die mit dem beschichteten Objektträger (Superfrost Plus, Menzel, Braunschweig) einzeln abgenommen werden. Bis zum Färben wurden die Objektträger im Gefrierschrank bei -20°C aufbewahrt.

13.2.2 Färbeprotokoll

Die immunhistochemischen Färbungen erfolgten (bis auf die gekennzeichneten Ausnahmen) nach folgendem Protokoll⁸⁵

1. Fixierung mit 4% Phosphat-gepuffertem Formaldehyd (Thermo Scientific, Rockford, USA) für 3 min
 - *(1.2 Waschen mit PBS und 2% Glycin (Roth, Karlsruhe) für CD41-Färbung)
2. Waschen mit PBS pH 7,4 10× (Invitrogen, Darmstadt) und 0,1% Tween20 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
 - *(2.2 Permeabilisieren der Zellen mit PBS und 0,2% TritonX-100 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) für 30 min
 - 2.3 Waschen mit PBS und 0,1% Tween20 für CD41-Färbung)
3. Blocken mit 1% Bovinem Serum Albumin (PAA Laboratories, Pasching, A) und 5 µg/ml Fc-Block (Anti-mouse DD16/32 blocks Fc binding, eBioscience, San Diego, USA) für 30 min
4. Abschütten
5. Inkubation mit Primärantikörper (siehe Tabelle 2) für 1 h
6. Waschen mit PBS und 0,1% Tween20
7. Inkubation mit Sekundärantikörper (siehe Tabelle 2) für 1h
8. Abschütten
9. Inkubation mit 1µg/ml DAPI (Invitrogen, Darmstadt) für 30 s
10. Waschen mit PBS und 0,1% Tween20
11. Eindecken mit Fluorescence Mounting Medium (Dako, Hamburg)

Antigen	Primärantikörper	Klon	Konzentration	Verdünnung	Anbieter
CD41	rat	MWReg30	0,5mg/ml	1:25	BD Bioscience
CD45	rat	30-F11	0,5mg/ml	1:1000	eBioscience
NE	rabbit	ab68672	1mg/ml	1:200	Abcam
F4/80	rat	BM8	0,2mg/ml	1:100	eBioscience
Antigen	Sekundärantikörper	Konzentration	Verdünnung	Anbieter	
CD41	donkey anti-rat Alexa 594	2mg/ml	1:200	Invitrogen	
CD45	donkey anti-rat Alexa 594	2mg/ml	1:200	Invitrogen	
NE	goat anti-rabbit Alexa 594	2mg/ml	1:200	Invitrogen	
F4/80	Anti-R-Phycoerythrin	1mg/ml	1:200	Rockland	

Tabelle 2: Primär- und Sekundärantikörper für Immunhistologie

Protokoll für die neutrophile Elastase-F4/80-DAPI Dreifachfärbung

1. Fixierung mit 4% Phosphat-gepuffertem Formaldehyd für 3 min
2. Waschen mit PBS und 0,1% Tween20
3. Blocken mit 1% BSA und 5 µg/ml Fc-Block
4. Inkubation mit neutrophile Elastase-Antikörper (ab68672, Abcam, Cambridge, USA) für 1 h
5. Waschen mit PBS und 0,1% Tween20
6. Inkubation mit Sekundärantikörper Alexa Fluor 488 (A-11008, Invitrogen, Darmstadt) für 1 h
7. Waschen mit PBS und 0,1% Tween20
8. Blocken mit 1% BSA und 5 µg/ml Fc-Block
9. Inkubation mit Anti-Mouse F4/80 Antigen PE (12-4801-82, eBioscience) für 1 h
10. Waschen mit PBS und 0,1% Tween20
11. Inkubation mit Sekundärantikörper Anti-R-Phycoerythrin, Rhodamine conjugated (600-100-387, Rockland, Gilbertsville, USA) für 1 h
12. Abschütten
13. Inkubation mit 1µg/ml DAPI für 30 s
14. Waschen mit PBS und 0,1% Tween20

15. Eindecken mit Fluorescence Mounting Medium

13.3 Auswertung der histologischen Präparate

Die Auswertung der Histologien erfolgte qualitativ. Durch die Übersichtsfärbungen HE und Van Gieson erhielt man einen Eindruck von der Verteilung der zellulären Bestandteile im Thrombus. Die Kernmorphologie erlaubte hier Rückschlüsse auf die beteiligten kernhaltigen Zellarten, die durch die spezifischen immunhistologischen Färbungen genau definiert wurden. Eine quantitative Auswertung zum prozentualen Anteil von neutrophilen Granulozyten und Monozyten erfolgte anhand der NE-F4/80-DAPI Dreifachfärbung.

14. Versuchsplanung und Durchführung

14.1 Tierzahlen

Die Versuche erforderten insgesamt 99 Tiere aus eigener Zucht. Für die Standardisierung des kürzlich etablierten Modells zur Entstehung der venösen Thrombose wurden 46 Tiere verwendet. 27 C57Bl6/J-Wildtypiere dienten der Ermittlung von Thrombusgewicht und Flussgeschwindigkeit. Bei 4 SV129S1-Tieren wurde ebenfalls das Thrombusgewicht erhoben. 6 C57Bl6/J-Tiere wurden für die Leergewichtbestimmung herangezogen und bei 4 C57Bl6/J-Mäusen wurde eine computertomographische Untersuchung durchgeführt. Von weiteren 5 C57Bl6/J-Tieren wurde ein Blutbild erstellt.

An 20 Tieren wurden intravitalmikroskopische Aufnahmen erstellt. Hierbei wurden 9 LysM-eGFP-, 6 CX₃CR1-eGFP- und 5 C57Bl6/J-Tiere verwendet. Die Depletion der neutrophilen Granulozyten wurde an 5 C57Bl6/J- und 1 LysM-eGFP-Maus vollzogen. Die Rolle der Bereitstellung von Tissue Factor durch neutrophile Granulozyten wurde anhand von 12 TF^{flox/flox}xLysM-Cre -Tieren untersucht. Für die Bestimmung der entscheidenden Lokalisation von P-Selektin bei der Entstehung der venösen Thrombose wurden 10 P-Selektin-Knockouts und 6 C57Bl6/J-Wildtypthrombozytenspendertiere herangezogen. 6 P-Selektin-Knockout-Mäusen wurden die Thrombozyten der Wildtypiere injiziert; 4 P-Selektin-Knockouts wurden als Kontrollgruppe verwendet.

Die Auswertung erfolgte nur an den Versuchstieren, bei denen es während der Operationsdurchführung zu keinerlei Blutung und somit Endothelläsion gekommen war. Die Durchführung des Tierversuchsvorhabens erfolgte mit Genehmigung der Regierung von Oberbayern.

14.2 Versuchsgruppen

14.2.1 Standardisierung des Mausmodells zur venösen Thrombose

Bestimmung der Flussgeschwindigkeit vor und nach Induktion der venösen Thrombose:

Stamm	Anzahl	Geschlecht	Alter	Gewicht
C57Bl6/J	n = 16	15m / 1w	8-11 Wo	18,9 - 29,6 g

Tabelle 3: Tiere für die Bestimmung der Flussgeschwindigkeit

Bestimmung des Thrombusgewichts bei den Wildtyp-/ Kontrolltieren:

Stamm	Anzahl	Geschlecht	Alter	Gewicht
C57Bl6/J	n = 19	10m / 9w	7-12 Wo	16,4 - 27,2 g
SV129	n = 4	2m / 2w	8 Wo	16,9 - 22,3 g

Tabelle 4: Tiere für die Bestimmung des Thrombusgewichts

Bestimmung des Leergewichts:

Stamm	Anzahl	Geschlecht	Alter	Gewicht
C57Bl6/J	n = 6	5m / 1w	8-9 Wo	17,8 - 25,6 g

Tabelle 5: Tiere für die Bestimmung des Leergewichts

Computertomographische Untersuchung:

Stamm	Anzahl	Geschlecht	Alter	Gewicht
C57Bl6/J	n = 4	3m / 1w	7-10 Wo	17,3 - 24,1 g

Tabelle 6: Tiere für die computertomographische Untersuchung

Anfertigung von Blutbildern:

Stamm	Anzahl	Geschlecht	Alter	Gewicht
C57Bl6/J	n = 5	3m / 2w	8-9 Wo	22,7 - 25,6 g

Tabelle 7: Tiere für die Feststellung der Verteilung der Leukozytensubpopulationen im Blut

14.2.2 Initiale Phase (1-6h) der venösen Thrombose

Bestimmung von Adhäsion und Aggregationsflächen in der initialen Phase der Entstehung der venösen Thrombose:

Stamm	Anzahl	Geschlecht	Alter	Gewicht
C57Bl6/J	n = 5	3m / 2w	8 Wo	17,5 - 25,2 g
LysM-eGFP	n = 8	5m / 3w	8-15 Wo	20,9 - 29,9 g
CX ₃ CR1-eGFP	n = 6	2m / 4w	8-10 Wo	17,2 - 25,0 g

Tabelle 8: Tiere für intravitalmikroskopische Untersuchungen

14.2.3 Späte Phase (48h) der venösen Thrombose

Ermittlung der Bedeutung von P-Selektin endothelialen und thrombozytären Ursprungs:

Stamm	Anzahl	Geschlecht	Alter	Gewicht
P-Selektin-Knockout	n = 6	4m / 2w	8-9 Wo	18,0 - 29,0 g
C57Bl6/J	n = 6	4m / 2w	8-9 Wo	18,6 - 27,8 g
P-Selektin-Knockout	n = 4	2m / 2w	8 Wo	18,0 - 26,0 g

Tabelle 9: Tiere für Ermittlung der Bedeutung von P-Selektin verschiedenen Ursprungs

Depletion der neutrophilen Granulozyten:

Stamm	Anzahl	Geschlecht	Alter	Gewicht
C57Bl6/J	n = 5	m	8 Wo	17,5 - 21,8g
LysM-eGFP	n = 1	m	12 Wo	28,8g

Tabelle 10: Tiere, an denen die Depletion der neutrophilen Granulozyten durchgeführt wurde

Bereitstellung von Tissue Factor durch neutrophile Granulozyten:

Stamm	Anzahl	Geschlecht	Alter	Gewicht
TF ^{fl/fl} xLysM-Cre	n = 12	5m / 7w	6-9 Wo	12,9 - 25,2g

Tabelle 11: Tiere für die Untersuchung des von neutrophilen Granulozyten bereitgestellten Tissue Factors

14.3 Experimentelles Protokoll

14.3.1 Initiale Phase (1-6h) der venösen Thrombose

In Anlehnung an die Untersuchungen von Köllnberger⁶² wurde das experimentelle Protokoll für die Untersuchung der initialen Phase der venösen Thrombose übernommen. Hierbei wurden vor (für die Ermittlung des Basalwerts) sowie 1, 2, 5 und 6 Stunden nach Stenosierung der V. cava caudalis intravitalmikroskopische Aufnahmen erstellt um die Rekrutierung der einzelnen Zelltypen an die Endothelwand zu analysieren (Abb. 13).

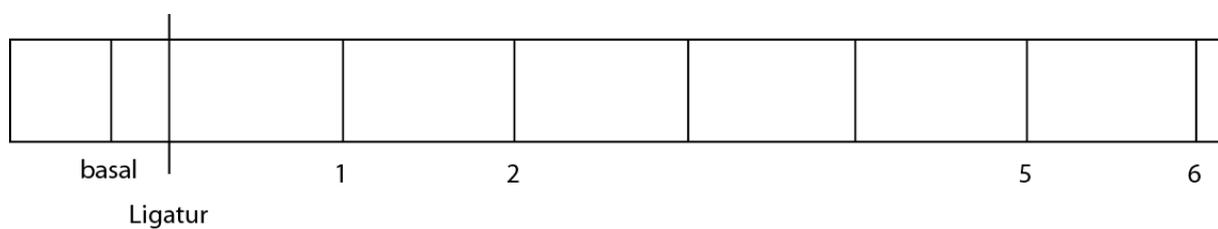


Abbildung 13: schematische Darstellung der Aufnahmezeitpunkte der in vivo Untersuchungen

14.3.2 Späte Phase (48h) der venösen Thrombose

Für die Untersuchungen zur späten Phase der venösen Thrombose ließ man die Tiere nach Induktion der venösen Thrombose wieder erwachen. Nach 48 Stunden, in denen die Tiere unter genauer Beobachtung standen, wurden die Tiere in Narkose entblutet und die V. cava caudalis mitsamt dem Thrombus entnommen und gewogen. Anhand der Thrombusgewichte wurden die unterschiedlichen Gruppen miteinander verglichen. Die Thromben wurden anschließend für histologische Untersuchungen aufbewahrt (Abb. 14).

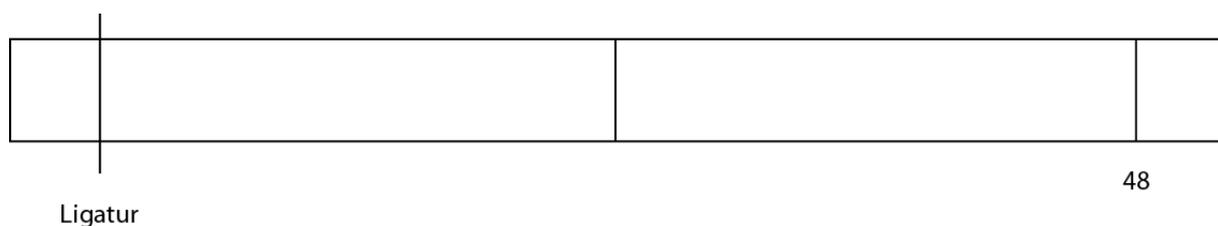


Abbildung 14: Protokoll für die späte Phase der venösen Thrombose

15. Statistische Versuchsauswertung

Die statistische Versuchsauswertung erfolgte mit dem Softwareprogramm SigmaPlot 11.0 (Systat, Erkrath). Die Ergebnisse wurden als Einzelwerte (dot plots) oder Mittelwerte \pm s.e.m. dargestellt, die aus den Einzelwerten pro Tier errechnet wurden. Die statistische Signifikanz wurde für einen p-Wert $< 0,05$ angenommen. Für die Flussgeschwindigkeit sowie die Aggregationsflächen wurde der p-Wert mittels t-Test errechnet. Die Thrombusgewichte der verschiedenen Gruppen wurden durch den Mann-Whitney-U-Test verglichen.

V. Ergebnisse

1. Standardisierung des Modells zur venösen Thrombose

1.1 Bestimmung der Flussgeschwindigkeit

Vor und nach Stenosierung der Vena cava caudalis wurden die Blutzellen im Bereich kaudal der einengenden Ligatur mittels Intravitalmikroskopie erfasst, um deren Geschwindigkeit mit Hilfe der Software Cap Image zu bestimmen. Die basale Flussgeschwindigkeit des Blutes betrug $0,916 \pm 0,068$ mm/s. Nach Stenosierung der V. cava caudalis wurde der Blutfluss auf $0,201 \pm 0,023$ mm/s verlangsamt (Abb. 15). Dies entspricht einer hochsignifikanten ($p < 0,001$) Reduktion der Flussgeschwindigkeit um 76,2 %.

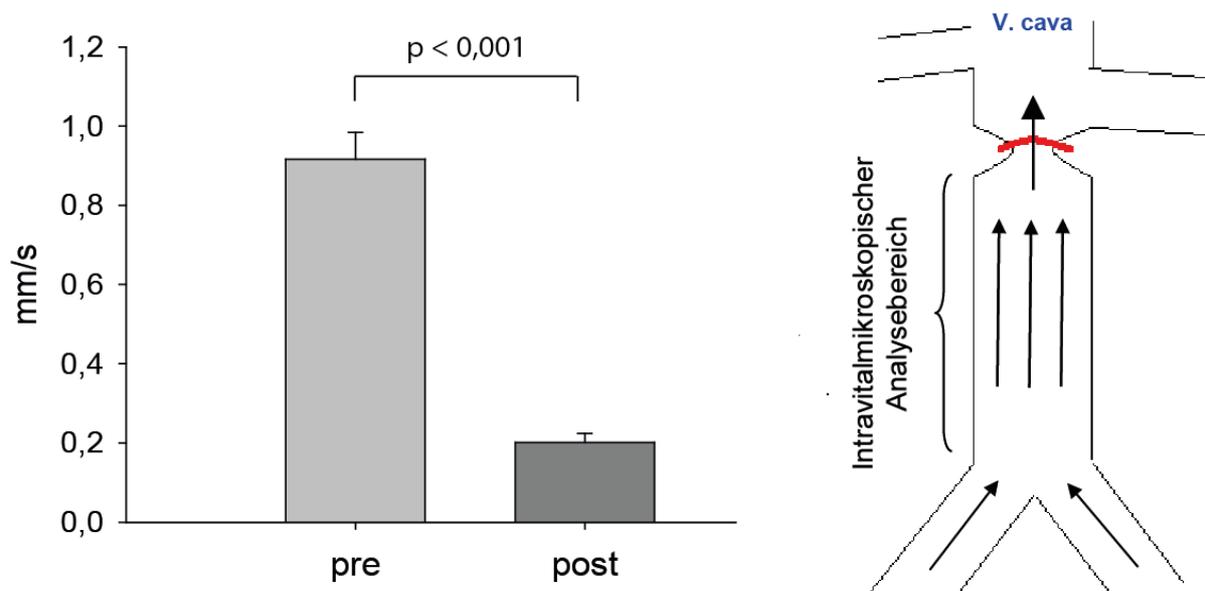


Abbildung 15: Flussgeschwindigkeit vor und nach Stenosierung der V. cava caudalis (n =16)

1.2 Bestimmung des Thrombusgewichts

Um die entstandenen Thromben, bzw. das Ausmaß der venösen Thrombose der unterschiedlichen genetisch veränderten Mausstämmen oder medikamentös behandelten Tiere nicht nur über die aufwendige Methode der histologischen Flächenbestimmung vergleichen

zu können, wurde die unter IV. 11. beschriebene Methode zur Bestimmung des Thrombusgewichts entwickelt.

Da bei dieser Methode der Thrombus in der Hohlvene verbleibt, muss das mittlere Taragewicht bestimmt werden und vom jeweiligen gewogenen Bruttogewicht abgezogen werden. Dafür wurden sham-Operationen an sechs C57Bl6/J-Kontrolltieren durchgeführt. Diese Leergewichtsbestimmung ergab einen Mittelwert von 5,3 mg für die, den Thrombus umgebenden, Strukturen von V. cava caudalis, Aorta abdominalis, den beiden Ligaturen sowie dem unterliegenden Filterpapier. Das ermittelte mittlere Leergewicht wurde von allen gewogenen Bruttowerten abgezogen um das tatsächliche Thrombusgewicht zu erhalten.

Makroskopisch wurde das Vorhandensein oder Fehlen eines Thrombus qualitativ festgestellt und somit eine prozentuale Angabe zur Thrombosierung gemacht. Bei 63,2 % der verwendeten C57Bl6/J-Kontrolltiere war nach 48 h ein venöser Thrombus vorhanden. Bei 36,8 % war keine makroskopisch sichtbare Thrombosierung feststellbar. Das Gewicht der Thromben betrug $9,753 \pm 2,362$ mg.

Zudem wurde hier zusätzlich auch die Thrombosierung an dem gängigen Hintergrundstamm SV129S1 untersucht, um die Validität der ermittelten Kontrollwerte abzusichern und transgene Mausstämme für den C57Bl6/J- sowie für den SV129S1-Hintergrundzuchtstamm vergleichen zu können (Abb. 16). Von den SV129-Tieren entwickelten 75,0 % nach 48 h eine Thrombose, das mittlere Thrombusgewicht betrug $12,875 \pm 4,703$ mg. Zwischen den Wildtypstämmen C57Bl6/J und SV129S1 ergeben sich keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$) im Gewicht der generierten Thromben.

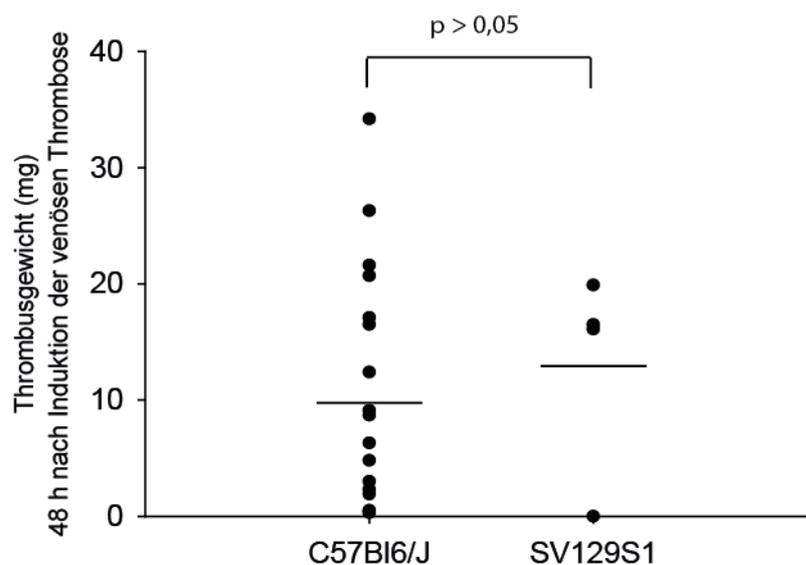


Abbildung 16: Vergleich des Thrombusgewichts von C57Bl6/J (n = 19) und SV129S1 (n = 4),
Querbalken = Mittelwert

1.3 Diagnose der venösen Thrombose *in vivo* durch computertomographische Untersuchung

Um sicherzugehen, dass es sich bei den venösen Thromben nicht um postmortale Blutgerinnsel handelt und um die Thrombusausdehnung *in vivo* zu beurteilen wurden *in vivo* Computertomographien mit intravenösem Kontrastmittel an anästhesierten Mäusen durchgeführt. Hierbei konnten die postmortalen Befunde sowohl hinsichtlich der Thrombusausdehnung kaudal der verengenden Ligatur, als auch die Thromboserate von 75% bei C57Bl6/J-Tieren 48 h nach Thromboseinduktion bestätigt werden. Die Thrombusbildung wird durch die Kontrastmittelaussparung in der Vena cava caudalis bestätigt (siehe Abb. 17 links). Bei dem einen Tier, welches keine Thrombose entwickelte, ist die verengende Ligatur bei erhaltenem Blutfluss auf der CT-Aufnahme zu erkennen (siehe Abb. 17 rechts).

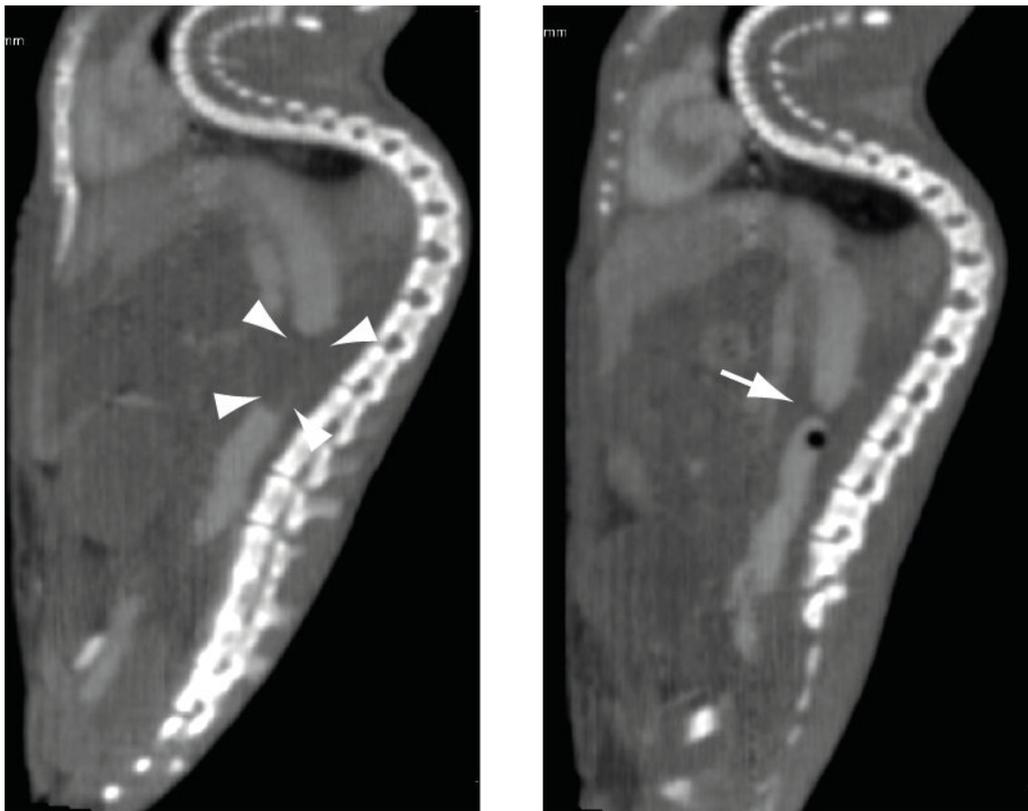


Abbildung 17: Computertomographische Aufnahmen mit Kontrastmittel, Sagittalschnitt durch den Rumpf, Pfeilspitzen links: Thrombose, Pfeil rechts: einengende Ligatur

2. Makroskopische und histologische Beschreibung des venösen Thrombus

Die mit diesem Modell (siehe II. 1.5 und IV. 4.2) generierten venösen Thromben wiesen makroskopisch einen geschichteten Aufbau auf. Es wechselten sich rote und weiße Bezirke ab. Am kranialen Ende des Thrombus direkt an der Engstelle der V. cava caudalis befand sich immer ein roter Bereich.

Diese Schichtung ist auch am HE-gefärbten histologischen Längsschnitt erkennbar. Deutlich sieht man Bereiche mit Anhäufungen von blau gefärbten Zellkernen.

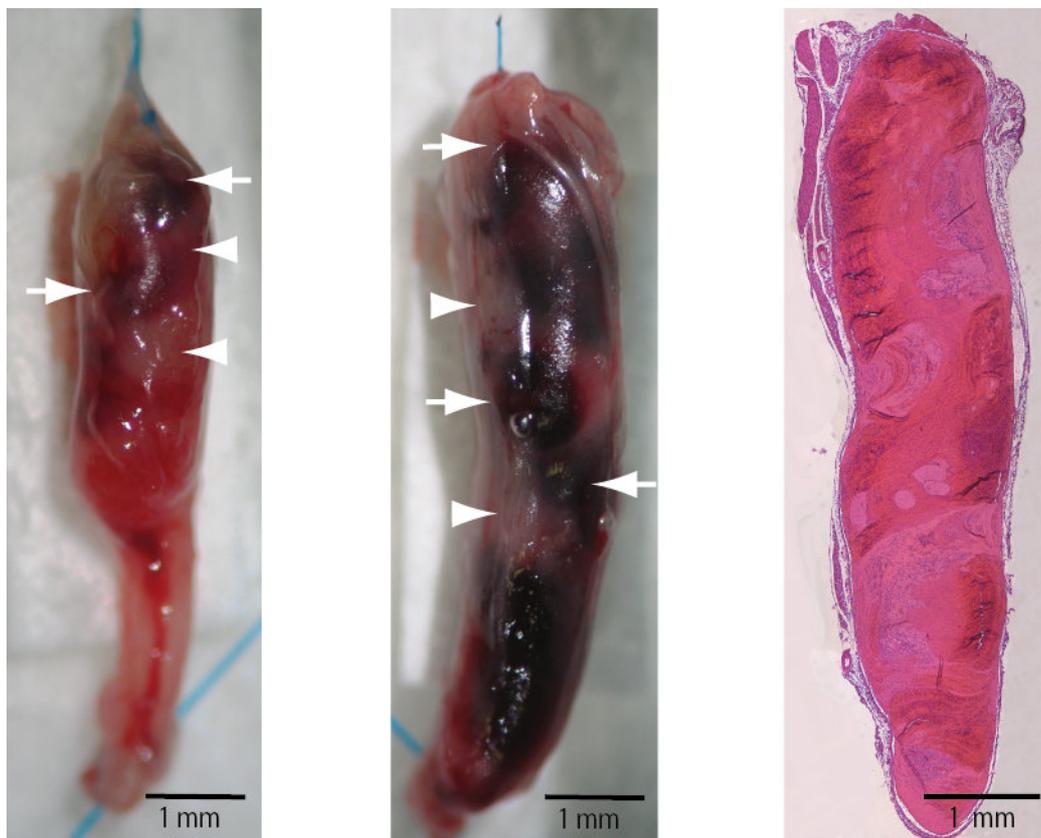


Abbildung 18: Makroskopie und Mikroskopie des venösen Thrombus

Thromben von C57Bl6/J (links), SV129S1 (mittig) sowie Längsschnitt in HE (rechts) 48 h nach Induktion der venösen Thrombose; Pfeile = rote Thrombusbereiche, Pfeilspitzen = weiße Thrombusbereiche

An den histologischen Querschnitten erkennt man eine laminare Struktur im Aufbau des Thrombus. Schichtweise haben sich kernhaltige und kernlose Zellen abgelagert. In der HE-gefärbten Übersicht sieht man, dass eine Erythrozytenmasse (rot) den Hauptbestandteil darstellt. In Fibrin verbackene Thrombozyten stellen sich rosa dar. Zum Teil scheinen die Thromben noch kanalisiert zu sein. In der 400-fachen Vergrößerung kann man einen Teil der

kernhaltigen Zellen anhand ihrer Kernmorphologie sicher als neutrophile Granulozyten identifizieren (Abb. 19).

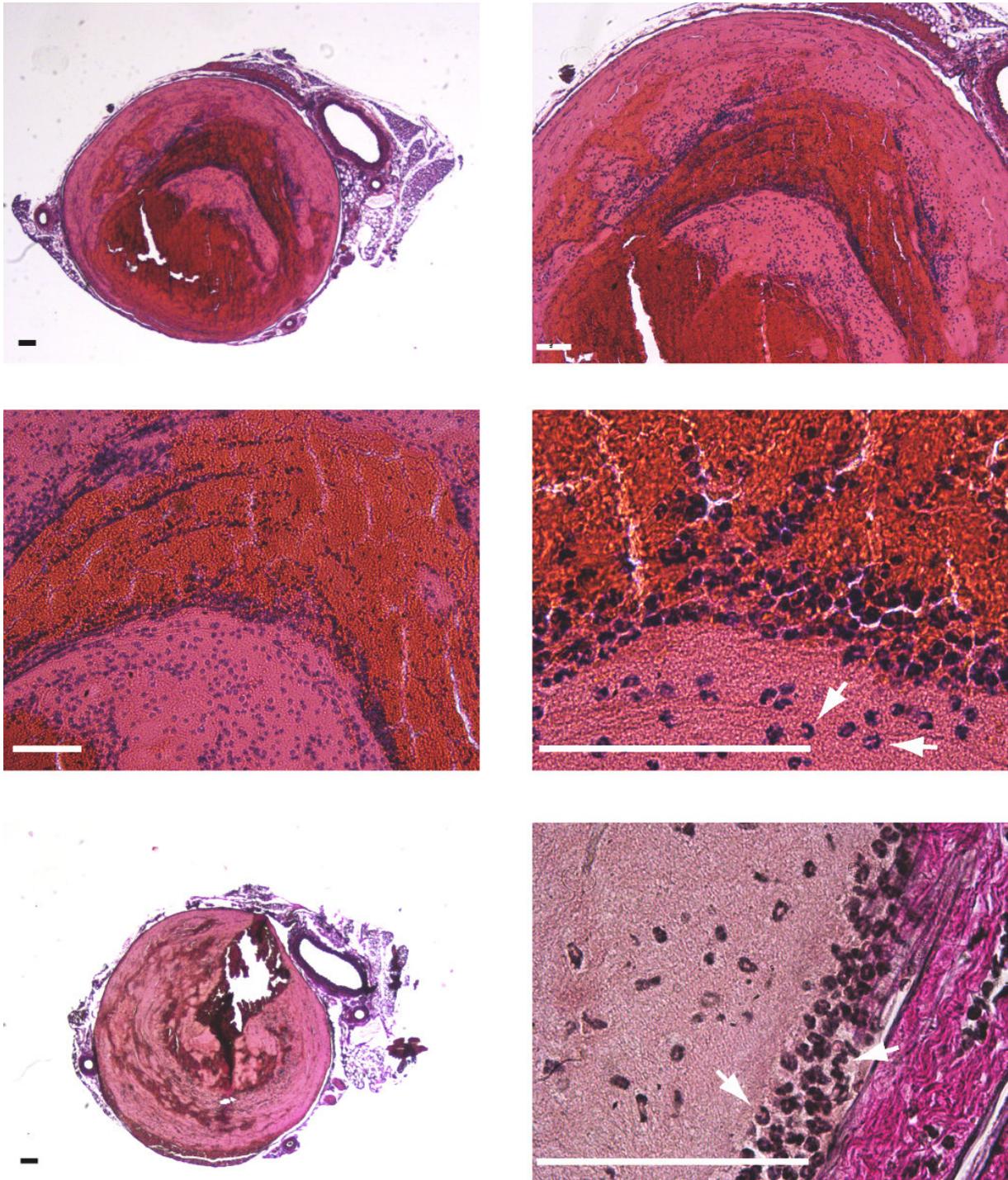


Abbildung 19: Histologie von Thrombusquerschnitten

Thrombusquerschnitt in HE (oben und mittig, Maßstab $\triangleq 100\mu\text{m}$) und van Gieson (unten, Maßstab $\triangleq 100\mu\text{m}$)

48 h nach Induktion der venösen Thrombose; Pfeile = neutrophile Granulozyten

Um die Bestandteile des Thrombus definitiv benennen zu können, wurden spezifische immunhistologische Doppelfärbungen durchgeführt. Neben der DAPI-Färbung, die kernhaltige Zellen darstellt, wurden jeweils spezifische Färbungen für bestimmte Blutbestandteile durchgeführt. Die Färbung auf CD41 (= α -Untereinheit des thrombozytären Fibrinogen-Rezeptors GPIIb) zeigt, dass Thrombozyten elementarer Bestandteil des Thrombus sind. Die CD45-Färbung definiert die kernhaltigen Zellen als Leukozyten. Die F4-80-Färbung zeigt das Vorkommen von Monozyten im Thrombusgewebe auf. Neutrophile Granulozyten machen den Hauptteil der Leukozytenpopulation aus, wie die neutrophile Elastase Färbung zeigt.

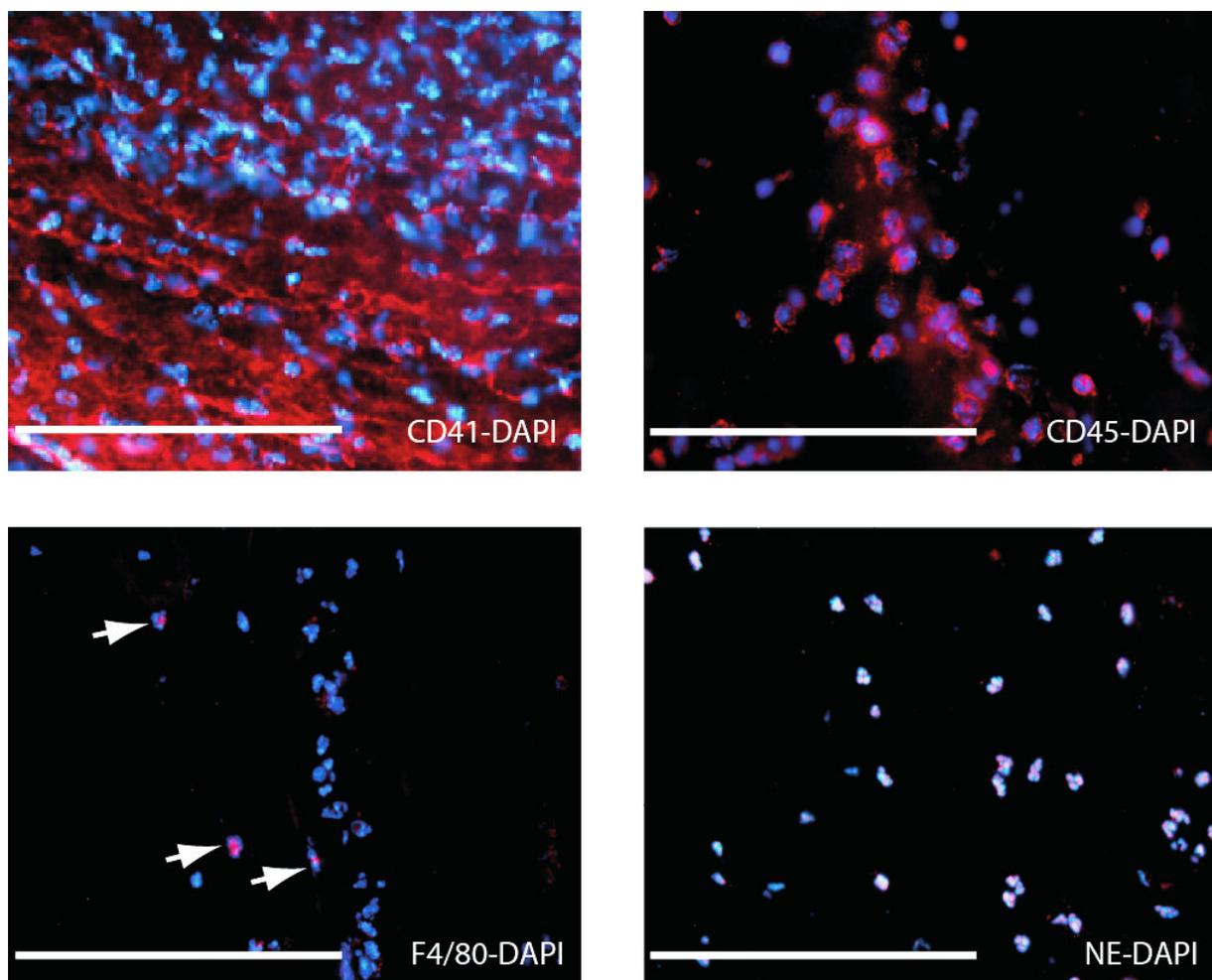


Abbildung 20: Charakterisierung der luminalen Zellen mittels Immunfluoreszenz

Maßstab \triangleq 100 μ m, DAPI = Kernfärbung (blau), CD41 = α -Untereinheit des thrombozytären Fibrinogen-Rezeptors \rightarrow Thrombozyten; CD45 = leukocyte common antigen (LCA) \rightarrow Leukozyten; F4/80-Antigen = spezifisches Transmembranprotein \rightarrow Monozyten; NE = Serinprotease neutrophile Elastase in azurophilen Granula \rightarrow neutrophile Granulozyten (jeweils rot)

Um die Verteilung von Monozyten und neutrophilen Granulozyten 48 h nach Induktion der venösen Thrombose zu quantifizieren, wurde bei fünf C57Bl6/J-Tieren eine NE-F4/80-DAPI-Dreifachfärbung durchgeführt. Neutrophile Elastase ist eine Serinprotease, die in azurophilen Granula der neutrophilen Granulozyten vorkommt. Das F4/80-Antigen ist Bestandteil der Plasmamembran von Monozyten und Makrophagen. Pro Tier wurden an jeweils zwei Objektträgern je vier Schnitte in 400-facher Vergrößerung ausgezählt. Neutrophile Granulozyten machten dabei 66,1 % (siehe Abb. 21, gelbes Rechteck), Monozyten 33,9 % (siehe Abb. 21, weiße Pfeile) der Leukozytenpopulation aus.

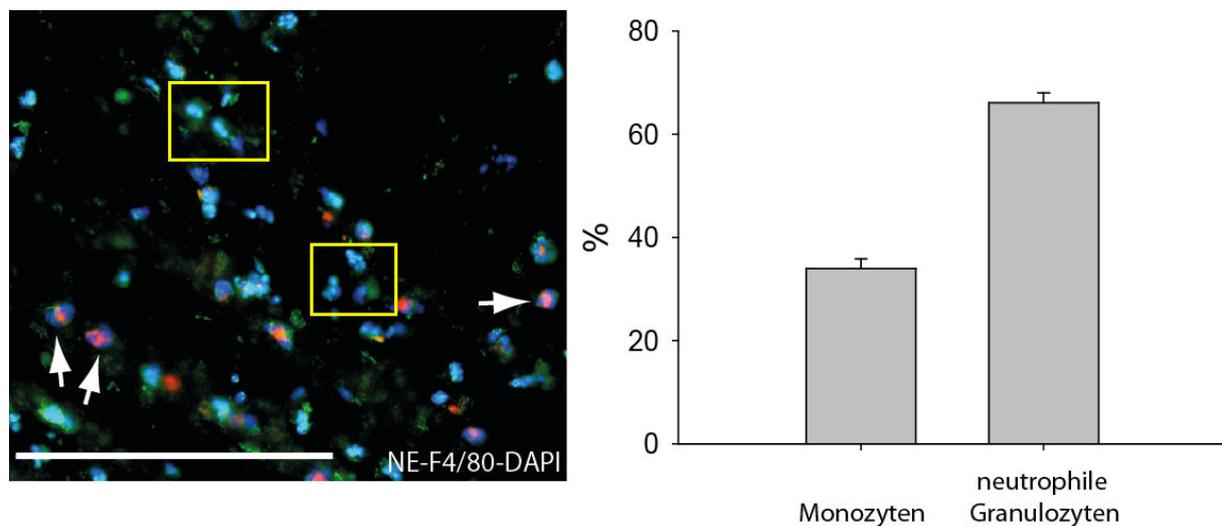


Abbildung 21: Differenzierung von Neutrophilen und Monozyten mittels Immunfluoreszenz

NE-F4/80-DAPI-Dreifachfärbung: DAPI = Kernfärbung (blau), neutrophile Granulozyten = NE-positiv (grün)

[gelbe Rechtecke] und Monozyten = F4/80-positiv (rot) [weiße Pfeile], Maßstab \triangleq 100µm; prozentualer Anteil an kernhaltigen Zellen im Thrombusgewebe 48 h nach Induktion der venösen Thrombose

3. Rolle von Leukozyten und Thrombozyten bei der Entstehung der venösen Thrombose

3.1 In der initialen Phase der Entstehung der venösen Thrombose werden mehr Leukozyten als Thrombozyten an die Endothelwand rekrutiert

In Anlehnung an das Untersuchungsregime von Köllnberger⁶² wurde die Rekrutierung von Leukozyten und Thrombozyten in der initialen Phase der Thrombusentstehung durch Anfertigung intravitalmikroskopischer Aufnahmen und anschließende Bestimmung der jeweiligen Aggregationsfläche nach 6 h erfasst.

Hierfür wurde der Fluoreszenzfarbstoff Acridin-Orange i.v. appliziert um die Leukozytenanzahl zu bestimmen. Thrombozyten wurden mittels des fluoreszenzmarkierten GPIIb/IIIa-Antikörpers dargestellt.

Nach 6 h waren von 1 mm² Endotheloberfläche 0,136 ± 0,024 mm² mit fest adhärenenten Thrombozyten bedeckt. Von Leukozyten wurden 0,692 ± 0,038 mm² bedeckt. Leukozyten bedeckten 6 h nach Induktion der Thrombose eine hochsignifikant ($p < 0,001$) größere Oberfläche des Endothels.

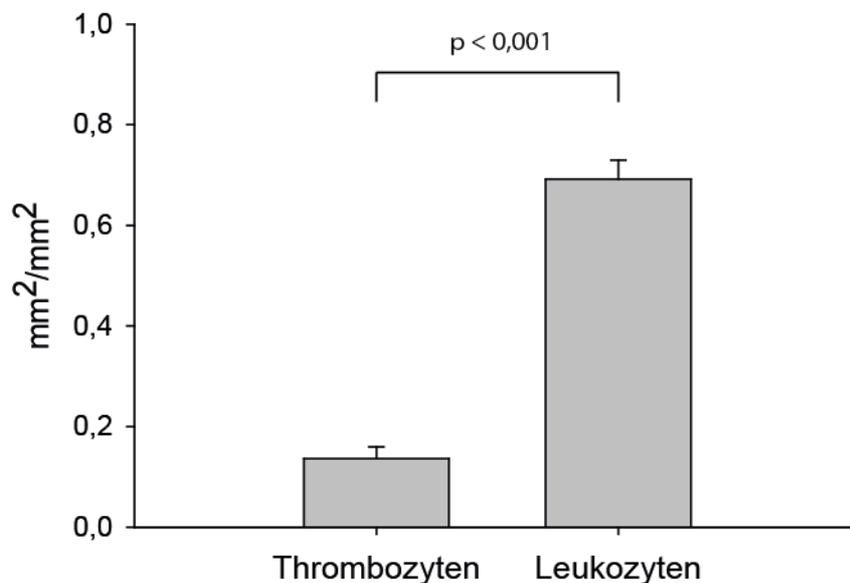


Abbildung 22: Rekrutierung von Thrombozyten und Leukozyten bei venöser Thrombose

Anteil mit Thrombozyten (n = 5) oder Leukozyten (n = 6) bedeckter Endotheloberfläche 6 h nach Induktion der venösen Thrombose

4. Analyse der Leukozyten-Subpopulationen in der initialen Phase der venösen Thrombose

4.1 Monozyten

Das Verhalten von Monozyten während der initialen Phase der venösen Thrombose wurde mittels Intravitalmikroskopie unter Verwendung von transgenen CX₃CR1-eGFP-Mäusen untersucht. Hierbei exprimieren die Monozyten GFP und können somit anhand ihrer Fluoreszenz detektiert werden. Die intravitalmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 23

zeigen die ansteigende Zahl von Monozyten über einen Zeitraum von 6 h nach Induktion der venösen Thrombose.

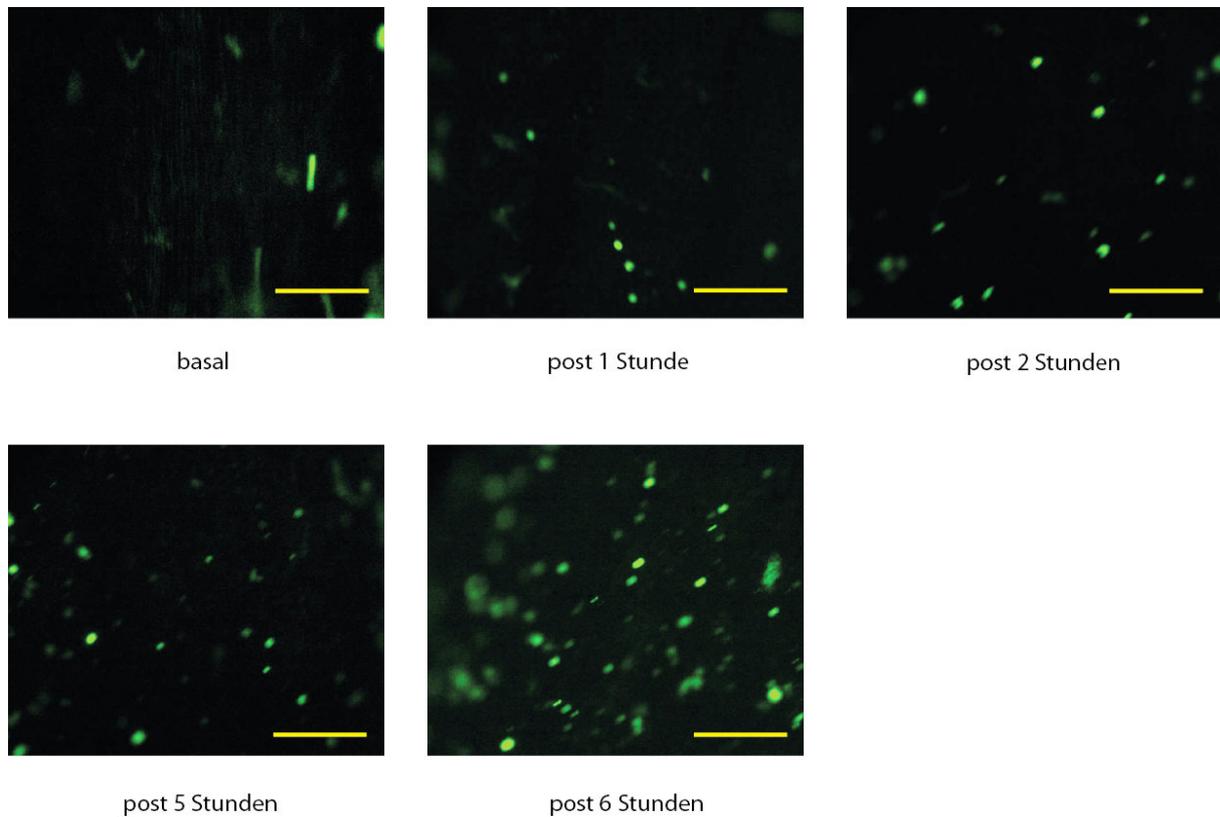


Abbildung 23: Dynamik der Monozytenrekrutierung bei venöser Thrombose

Intravitalmikroskopie: Adhäsion von Monozyten in der initialen Phase der venösen Thrombose, Maßstab \triangleq 100 μ m; basal = Zustand vor Induktion der venösen Thrombose, post 1 – 6 Stunden = repräsentative Bilder 1 – 6 h nach Induktion der venösen Thrombose

Vor Verengung der V. cava caudalis befanden sich 35 ± 7 Monozyten pro mm^2 Endotheloberfläche. Nach 1 h stieg die Anzahl auf 135 ± 34 Zellen. Nach 2 h waren es 178 ± 60 Zellen. Nach 5 h folgte ein weiterer Anstieg auf 778 ± 171 und erreichte nach 6 h 1184 ± 269 adhärenente Monozyten pro mm^2 .

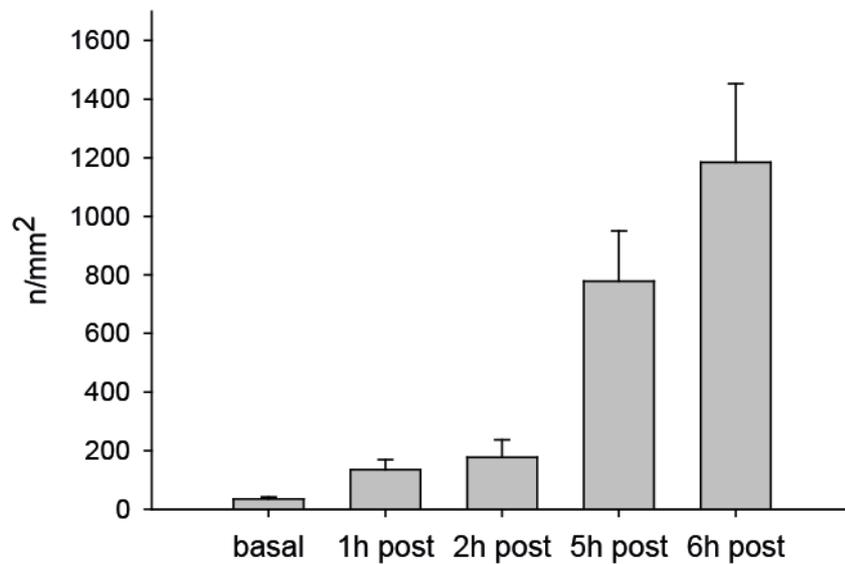
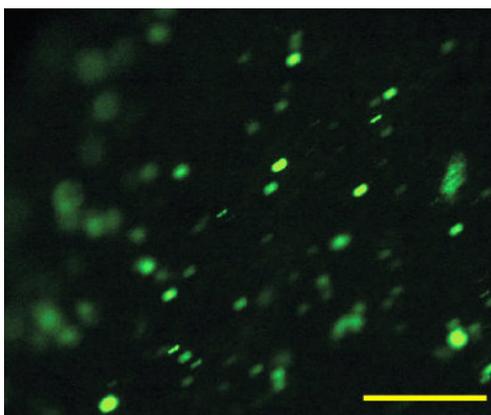
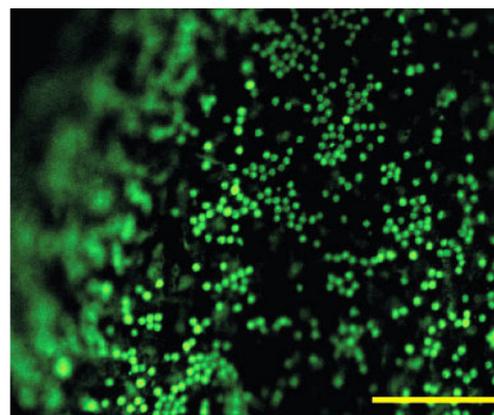


Abbildung 24: Monozytenadhäsion im Zeitverlauf vor (basal) und bis 6 h nach Induktion der venösen Thrombose, (n = 6)

Bei drei Tieren wurde nach 6 h der prozentuale Anteil der adhärenenten Monozyten an den Leukozyten durch Injektion von Acridin-Orange ermittelt. Dieser Farbstoff dient der Darstellung der Gesamtleukozytenpopulation. Hierbei waren 5108 ± 514 Leukozyten pro mm^2 adhärenent, davon handelte es sich bei 1396 ± 235 Zellen um Monozyten. Monozyten stellten somit 27 % der adhärenenten Leukozyten dar.



Monozyten post 6 Stunden



Leukozyten post 6 Stunden

Abbildung 25: Vergleich der Anzahl adhärenenten Monozyten mit Leukozyten

Intravitalmikroskopie: Adhäsion von Monozyten und Leukozyten 6 h nach Induktion der venösen Thrombose,

Maßstab $\triangleq 100\mu\text{m}$

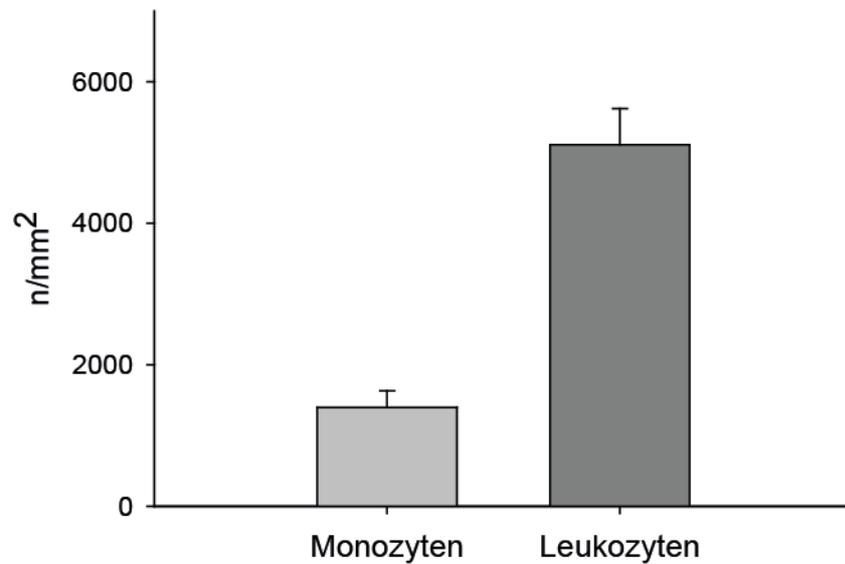


Abbildung 26: Anteil der Monozyten an den adhärenenten Leukozyten 6 h nach Induktion der venösen Thrombose, Mittelwerte aus $n = 3$ Individuen

4.2 Neutrophile Granulozyten

An transgenen LysM-eGFP-Mäusen wurde mittels Intravitalmikroskopie das Verhalten der neutrophilen Granulozyten während der initialen Phase der venösen Thrombose untersucht. Sie können aufgrund grüner Fluoreszenz erfasst werden. Abbildung 27 zeigt die massive Adhärenz von neutrophilen Granulozyten innerhalb von 6 h nach Induktion der venösen Thrombose.

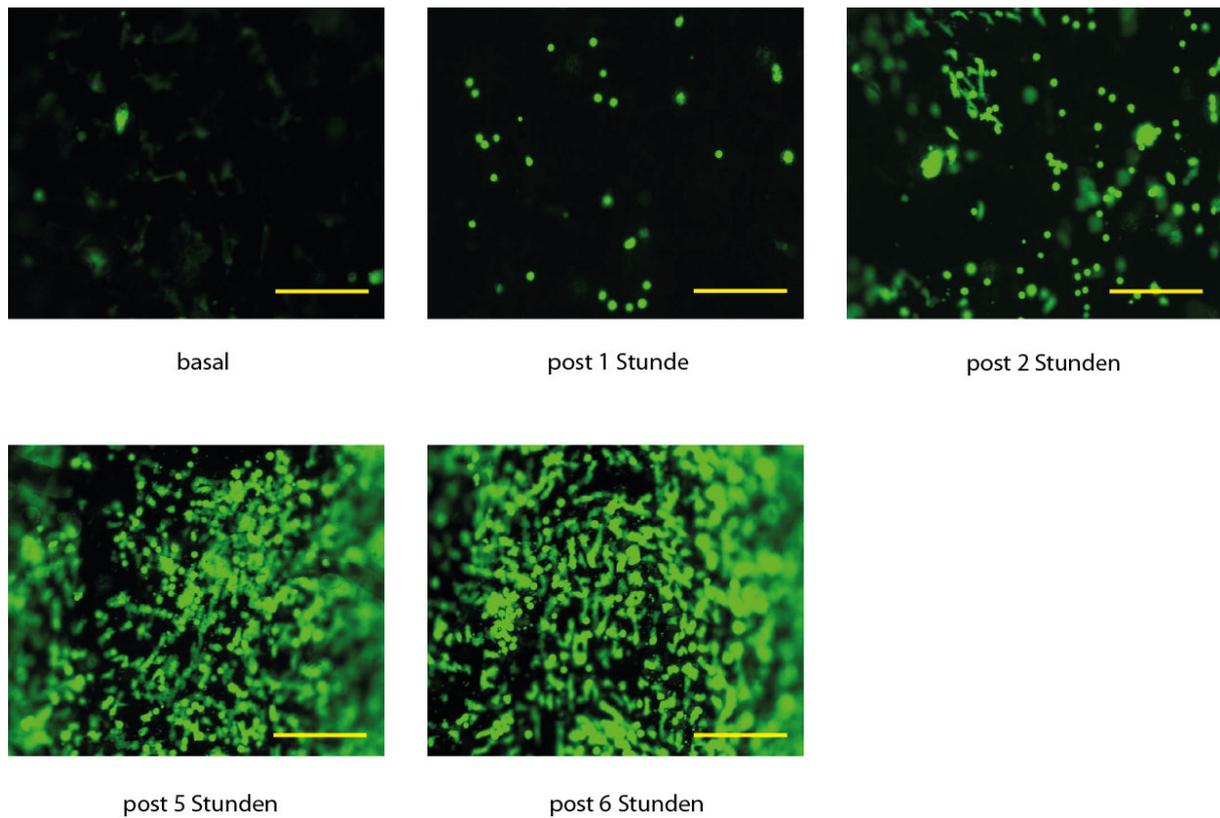


Abbildung 27: Zeitverlauf der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten *in vivo*

Intravitalmikroskopie: Adhäsion von neutrophilen Granulozyten in der initialen Phase der venösen Thrombose, Maßstab $\triangleq 100\mu\text{m}$; basal = Zustand vor Induktion der venösen Thrombose, post 1 – 6 Stunden = repräsentative Bilder 1 – 6 h nach Induktion der venösen Thrombose

Der Basalwert von adhärenenten neutrophilen Granulozyten vor Stenosierung der kaudalen Hohlvene lag bei 261 ± 103 pro mm^2 . Nach 1 h stieg die Anzahl auf 392 ± 85 , nach 2 h auf 780 ± 121 Zellen. Nach 5 h erfolgte eine weitere Erhöhung auf 4136 ± 524 und erreichte nach 6 h 4519 ± 662 adhärenente neutrophile Granulozyten pro mm^2 .

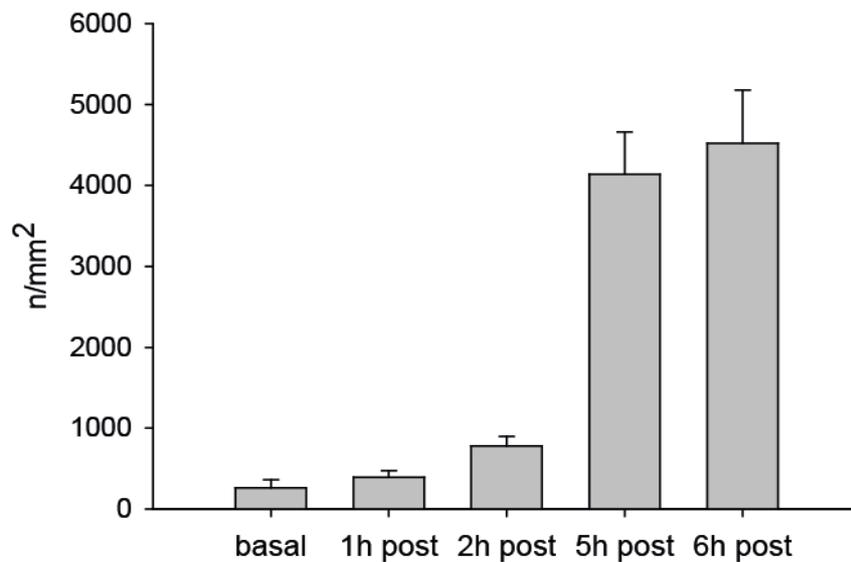
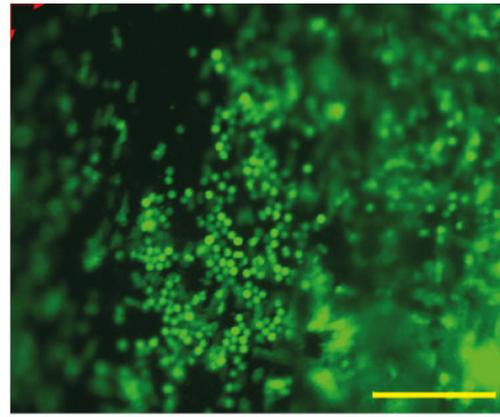
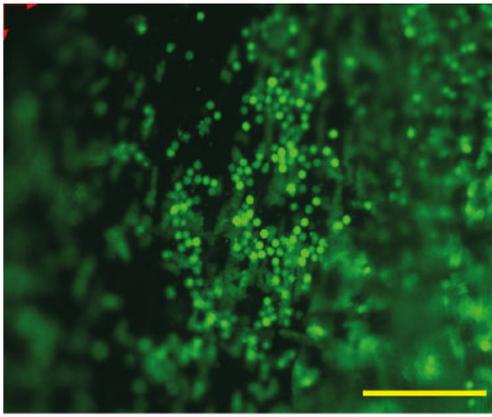


Abbildung 28: Quantifizierung der Adhäsion neutrophiler Granulozyten

Adhäsion der neutrophilen Granulozyten im Zeitverlauf vor (basal) und bis 6 h nach Induktion der venösen Thrombose, (n = 8)

Auch hier wurde nach 6 h bei drei Tieren zunächst durch IVM-Aufnahmen der Anteil der adhärennten neutrophilen Granulozyten ermittelt. Anschließend wurde durch i.v. Gabe von Acridin-Orange die Gesamtleukozytenpopulation markiert und erfasst, um den prozentualen Anteil der adhärennten neutrophilen Granulozyten an der Gesamtleukozytenzahl zu analysieren. Nach 6 h waren 7225 ± 598 Leukozyten pro mm^2 adhärennt, wovon 6042 ± 637 Zellen neutrophile Granulozyten waren. Somit machten neutrophile Granulozyten 83 % der adhärennten Leukozyten aus.



neutrophile Granulozyten post 6 Stunden

Leukozyten post 6 Stunden

Abbildung 29: Vergleich der Anzahl adhärenter neutrophiler Granulozyten mit Leukozyten

Intravitalmikroskopie: Adhäsion von neutrophilen Granulozyten und Leukozyten 6 h nach Induktion der venösen

Thrombose, Maßstab $\triangleq 100\mu\text{m}$

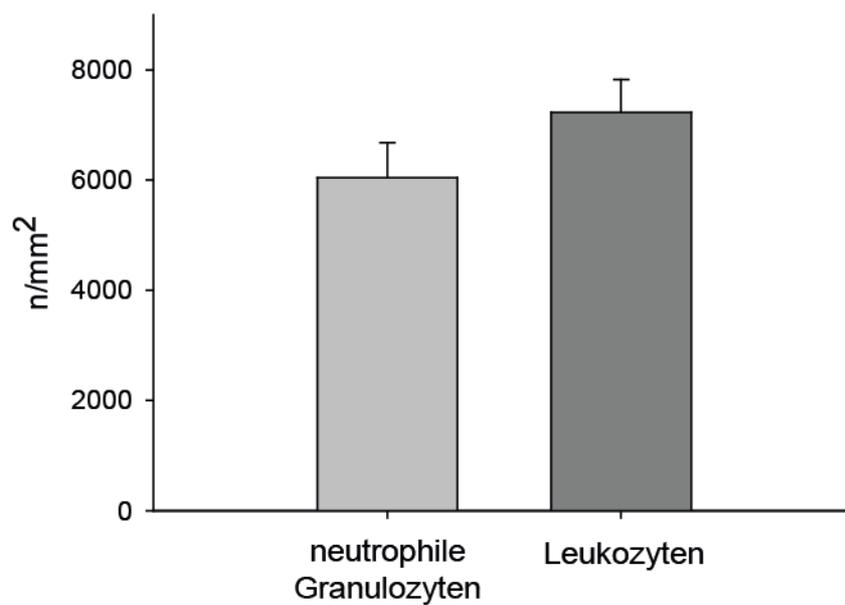


Abbildung 30: Anteil der neutrophilen Granulozyten an den adhärenenten Leukozyten 6 h nach Induktion der venösen Thrombose; Mittelwerte aus $n = 3$ Individuen

4.3 In der initialen Phase der Entstehung der venösen Thrombose werden in einem aktiv stattfindenden Prozess vermehrt neutrophile Granulozyten rekrutiert

Anhand der Aufnahmen zum Zeitpunkt 6 h nach Induktion wurde wie bei den Thrombozyten und Leukozyten (siehe 3.1) auch bei den Monozyten und neutrophilen Granulozyten die Aggregationsfläche bestimmt.

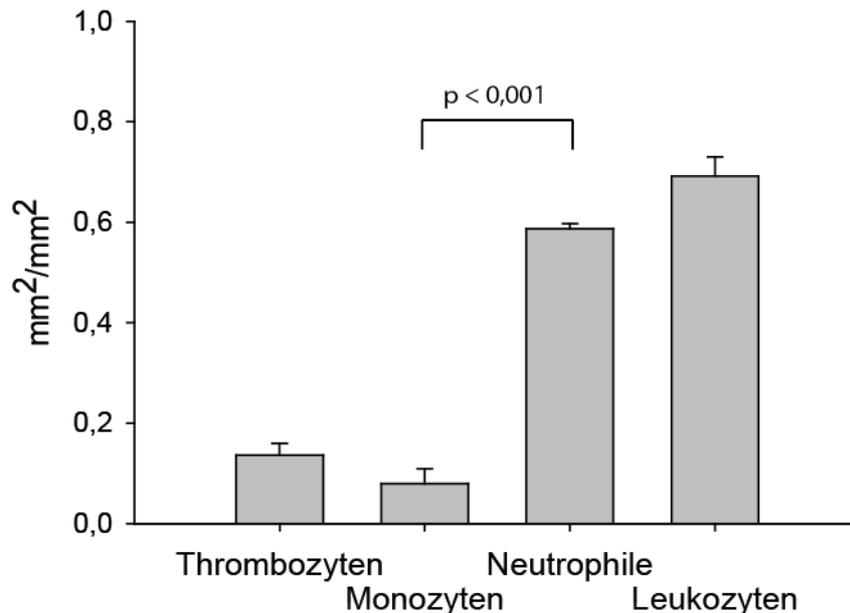


Abbildung 31: Aggregationsflächen der zellulären Thrombusbestandteile

Aggregationsflächen von Thrombozyten (n = 5), Monozyten (n=3), neutrophilen Granulozyten (n = 3) und Leukozyten (n = 6) 6 h nach Induktion der venösen Thrombose

Wie Abbildung 31 zeigt, bedeckten Monozyten 6 h nach Induktion der venösen Thrombose $0,079 \pm 0,030 \text{ mm}^2$ pro 1 mm^2 Endotheloberfläche. Von neutrophilen Granulozyten wurden $0,597 \pm 0,010 \text{ mm}^2$ bedeckt. Bei einer Leukozytenaggregationsfläche von $0,692 \pm 0,038 \text{ mm}^2$ macht das einen prozentualen Anteil von 11,4 % bei den Monozyten und 85,8 % bei den neutrophilen Granulozyten.

Die Ergebnisse von Adhäsion- und Aggregationflächenbestimmung zusammenfassend, ergibt sich hieraus, dass in der initialen Phase (6h) der Entstehung der venösen Thrombose 19,2 % der rekrutieren Leukozyten Monozyten waren; 84,4 % waren neutrophile Granulozyten.

Verglichen mit den prozentualen Anteilen nach 48 h (33,9 % Monozyten, 66,1 % neutrophile Granulozyten (siehe 2.)) zeigt dies, dass in der initialen Phase der venösen Thrombose verstärkt neutrophile Granulozyten rekrutiert werden.

Tier	Gesamtzahl Leukozyten $10^3/\mu\text{l}$	neutrophile Granulozyten $10^3/\mu\text{l}$	Monozyten $10^3/\mu\text{l}$	Lymphozyten $10^3/\mu\text{l}$
11925	11,42	1,21	0,53	9,59
11964	8,19	1,2	0,07	6,78
11967	11,34	1,47	0,17	9,7
11975	7,59	0,7	0,16	6,72
12021	7,17	0,55	0,16	6,45
Mittelwert	9,14	1,03	0,22	7,85
Standardfehler	0,83	0,15	0,07	0,66
%	100	11,2	2,4	85,8

Tabelle 12: Weißes Blutbild von C57Bl6/J-Kontrolltieren (n = 5)

Um die Zusammensetzung der weißen Blutkörperchen im Blut aufzugliedern, wurden Blutbilder von fünf C57Bl6/J-Kontrolltieren angefertigt. Mäuse haben ein lymphozytäres Blutbild, daher machen Lymphozyten mit 85,8 % den größten Anteil aus. 11,2 % sind neutrophile Granulozyten, 2,4 % sind Monozyten.

Im Hinblick auf die prozentuale Verteilung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten 6 und 48 h nach Induktion der venösen Thrombose zeigt das, dass die endotheliale Rekrutierung jener Zellen einen gezielten, aktiven Prozess darstellt.

5. Abhängigkeit der venösen Thrombose von neutrophilen Granulozyten

Um die funktionelle Rolle der zahlreich rekrutierten neutrophilen Granulozyten bei der Entstehung der venösen Thrombose zu untersuchen, wurden bei fünf C57Bl6/J-Wildtypmäusen und einem LysM-eGFP-Tier die neutrophilen Granulozyten durch Antikörpergabe depletiert. Die Depletion von neutrophilen Granulozyten über den Versuchszeitraum wurde anhand eines Blutbildes zum Zeitpunkt 48 h post Induktion bestätigt. Mit intravitalmikroskopischen Aufnahmen wurde zusätzlich die fehlende Adhäsion von neutrophilen Granulozyten während der initialen Phase der Entstehung der venösen Thrombose dokumentiert.

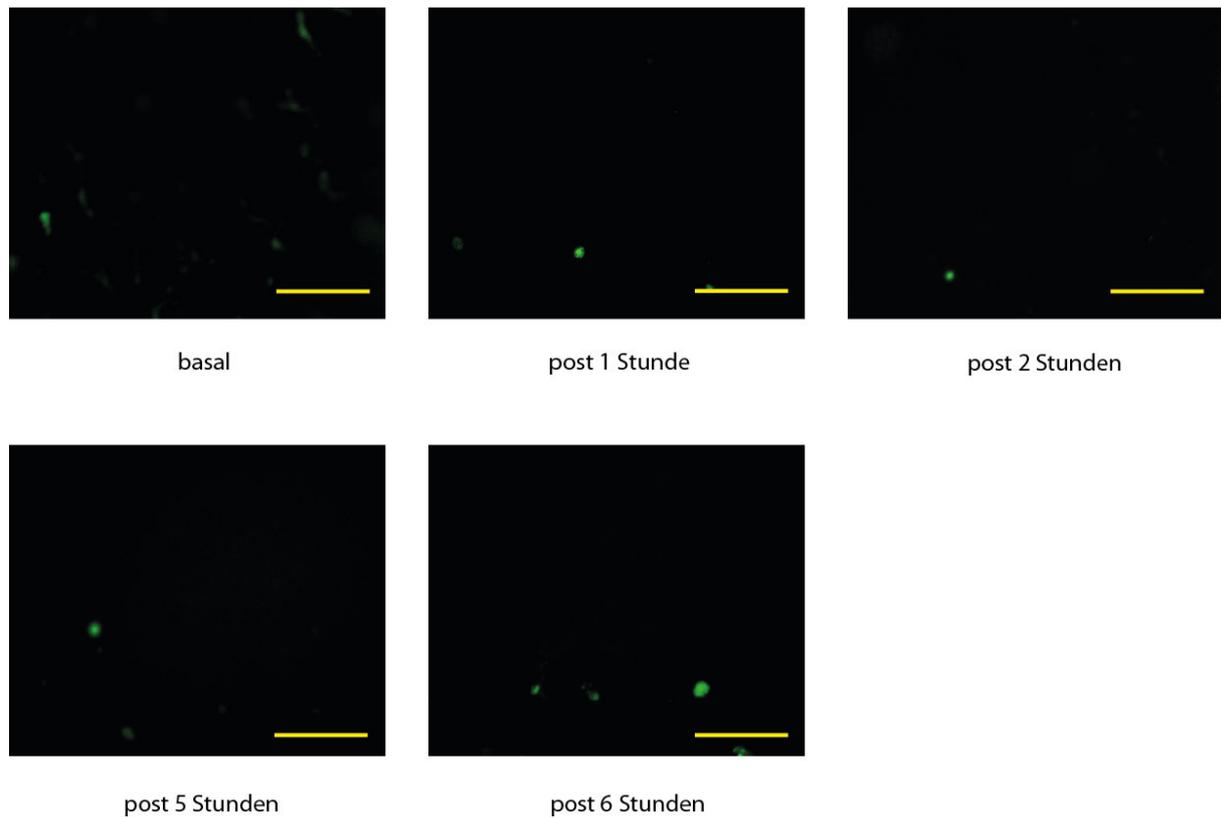


Abbildung 32: Intravitalmikroskopie: Adhäsion von neutrophilen Granulozyten in der initialen Phase der venösen Thrombose bei Neutrophilen-Depletion, Maßstab $\triangleq 100\mu\text{m}$

80,0 % der neutropenen Tiere entwickelten keine makroskopisch sichtbare venöse Thrombose. Das mittlere Thrombusgewicht betrug $1,620 \pm 1.211$ mg. Das entspricht im Vergleich mit den C57Bl6/J-Kontrolltieren einer signifikanten Reduktion um 83,4 %.

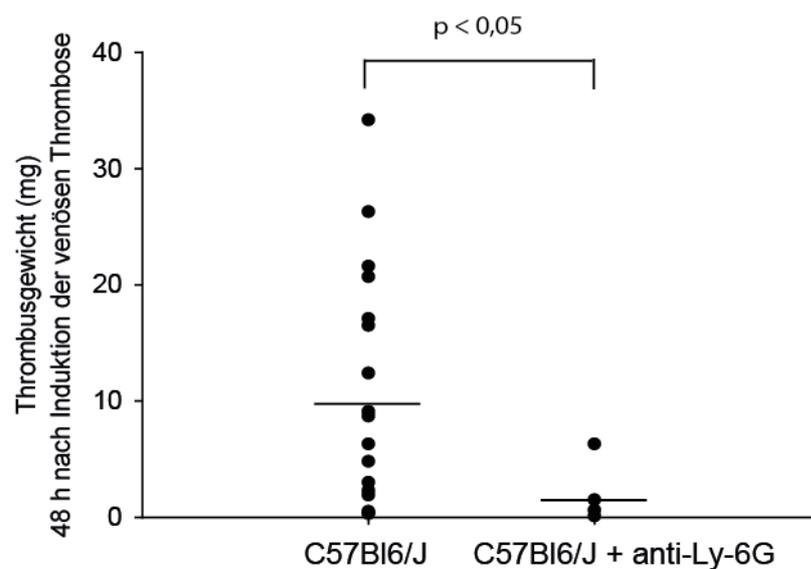


Abbildung 33: Vergleich des Thrombusgewichts von C57Bl6/J (n = 19) und C57Bl6/J neutrophile Granulozyten-Depletion (n = 5), Querbalken = Mittelwert

6. Leukozytäre Mechanismen bei der Entstehung der venösen Thrombose

6.1 Bedeutung des endothelial und thrombozytär gespeicherten P-Selektins

Um zu klären, welche Lokalisation von P-Selektin für die Entstehung der venösen Thrombose die entscheidende Rolle spielt, wurde sechs P-Selektin-Knockout-Tieren, die weder über thrombozytär (α -Granula) noch endothelial (Weibel-Palade-Körperchen) gespeichertes P-Selektin verfügen, 125×10^6 native Thrombozyten von C57Bl6/J-Wildtypspendertieren injiziert und anschließend die venöse Thrombose durch Verengung der V. cava caudalis induziert. Bei diesen Tieren war folglich durch die Spender-Thrombozyten thrombozytäres P-Selektin vorhanden. Nach 48 h wurde die V. cava caudalis reseziert und nach vorgenannter Methode (1.2) das Thrombusgewicht bestimmt. Als Kontrolltiere wurden C57Bl6/J sowie P-Selektin-Knockouts, bei denen ebenfalls die venöse Thrombose induziert wurde, herangezogen. Das mittlere Thrombusgewicht bei den P-Selektin KO + wt TZ betrug $7,833 \pm 3,654$ mg. Die mittleren Thrombusgewichte bei den Kontrolltieren betragen bei C57Bl6/J wie voran genannt $9,753 \pm 2,362$ mg und $1,250 \pm 1,597$ mg bei P-Selektin-Knockout.

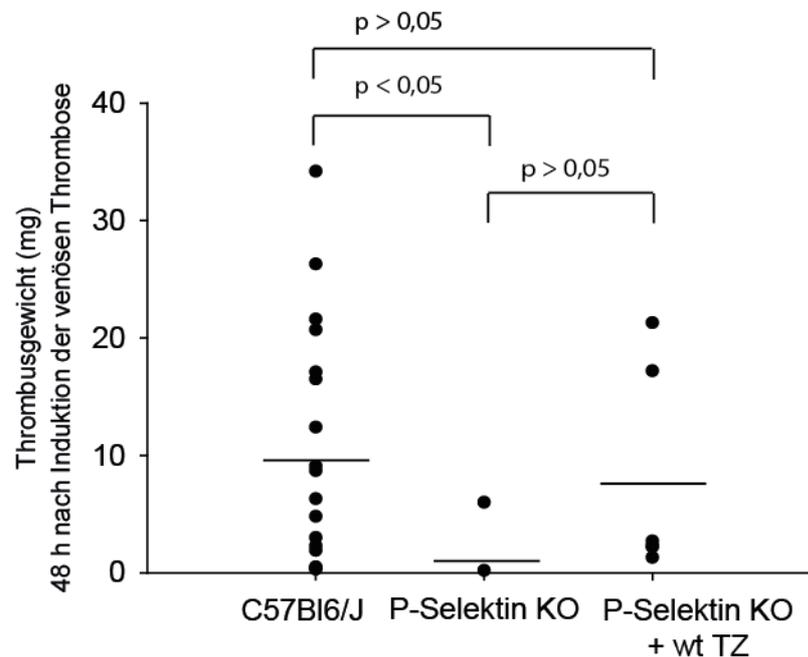


Abbildung 34: Einfluss von P-Selektion auf die venöse Thrombusbildung

Vergleich der Thrombusgewichte von C57Bl6/J (n = 19), P-Selektin-Knockout (KO) (n = 4) und P-Selektin-Knockout mit Wildtypthrombozyten (wt TZ) (n = 6), Querbalken = Mittelwert

Zwischen C57Bl6/J- und unbehandelten P-Selektin-Knockout-Kontrolltieren ist ein signifikanter Unterschied im Thrombusgewicht vorhanden. Bei den P-Selektin KO + wt TZ

Tieren gibt es aber zu keiner der Kontrollgruppen einen signifikanten Unterschied. Dieses Versuchsergebnis gibt einen Hinweis darauf, dass die endotheliale Lokalisation von P-Selektin die entscheidende Rolle bei der Entstehung der venösen Thrombose spielen könnte.

6.2 Die Rolle des von myeloiden Zellen bereitgestellten Tissue Factors bei der Entstehung der venösen Thrombose

Mit der $TF^{flox/flox} \times LysM-Cre$ -Maus kann die Rolle von TF-bereitstellenden myeloiden Zellen untersucht werden. Hierbei findet in neutrophilen Granulozyten und einem Teil der Monozyten keine TF-Expression statt.

48 h nach Induktion der venösen Thrombose war bei 58,3 % dieser Tiere keine makroskopisch sichtbare Thrombosierung vorhanden. Das mittlere Thrombusgewicht betrug $3,883 \pm 1,396$ mg. Das stellt eine 60,2 %ige Reduktion im Vergleich zu den Thromben der C57Bl6/J-Kontrollgruppe dar. Diese Reduktion erweist sich aber statistisch als nicht signifikant.

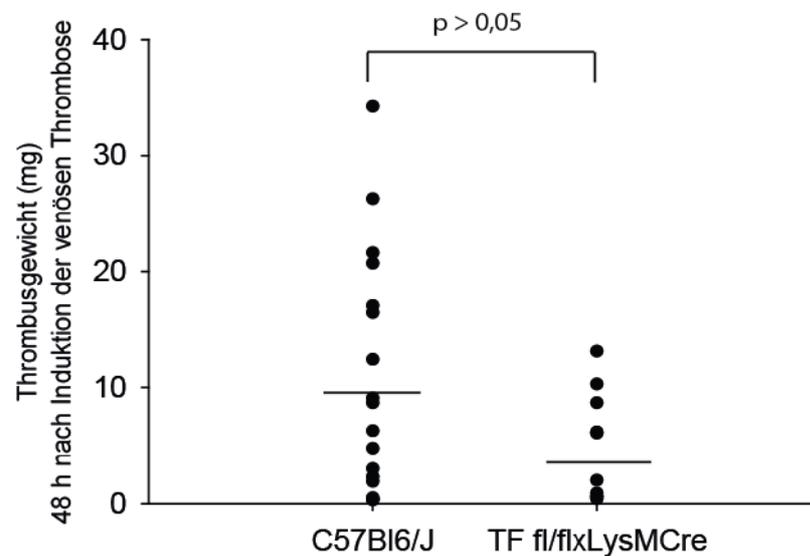


Abbildung 35: Rolle des myeloiden Tissue Factor bei venöser Thrombose

Vergleich der Thrombusgewichte von C57Bl6/J (n = 19) und $TF^{flox/flox} \times LysM-Cre$ (n = 12),

Querbalken = Mittelwert

VI. Diskussion

1. Wahl der Mauslinien

Das hier verwendete Modell für die Untersuchung der venösen Thrombose wurde für das Versuchstier Maus entwickelt, da es zahlreiche genetisch modifizierte Mauslinien gibt, die für angiologische Fragestellungen herangezogen werden können.

Als Kontrolltiere wurden C57Bl6/J-Mäuse verwendet. Sie sind der in der heutigen Wissenschaft am häufigsten verwendete Inzuchtstamm⁵⁶ und wurden als genetischer Hintergrund für zahlreiche transgene Mauslinien verwendet. So stellen sie auch den Hintergrund für alle in dieser Arbeit verwendeten transgenen Stämme dar^{11,34,40,54,55,58,92,97}. An ihnen wurden die Versuche zur Standardisierung und Evaluation des neu etablierten Mausmodells durchgeführt, sowie die Rekrutierung von Thrombozyten und Leukozyten analysiert. Das mittlere Gewicht ihrer Thromben gilt als Vergleichswert für die erhaltenen Thrombengewichte der anderen Versuchsgruppen.

Da die Hintergrundstämme C57Bl6/J, SV129 und BALB/c in ihrem hämatologischen Verhalten Unterschiede aufweisen¹¹⁸, können Ergebnisse von C57Bl6/J-Wildtypen nicht ohne weiteres auf andere Hintergrundstämme übertragen werden. Um die Ergebnisse von C57Bl6/J-Tieren abzusichern und ein weiteres Feld an möglichen transgenen Linien zu erschließen, wurde deshalb die venöse Thrombose auch an SV129S1-Wildtypen untersucht. Dabei ergaben sich sowohl hinsichtlich des Thrombusgewichts, als auch des Thrombusaufbaus keine signifikanten Unterschiede, sodass das venöse Thrombose-Modell auch bei diesem Tierstamm uneingeschränkt anwendbar ist.

Die transgenen Linien LysM-eGFP³⁴ und CX₃CR1-eGFP⁵⁸ wurden verwendet, da mit ihnen die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten während der initialen Phase der venösen Thrombose *in vivo* aufgrund der genetischen Markierung ihrer Leukozytensubpopulationen mittels Intravitalmikroskopie untersucht werden konnte. In LysM-eGFP-Mäuse sind 98 % der grünfluoreszierenden Zellen neutrophilen Granulozyten und nur 2 % Monozyten³⁴, was einen vernachlässigbaren Prozentsatz ausmacht.

P-Selektin-Knockout-Mäuse¹¹ sind nicht dazu befähigt, den Zelladhäsionsrezeptor P-Selektin zu bilden. Infolgedessen kann es auch zu keiner PSGL-1 vermittelten Interaktion zwischen Endothel und Leukozyten kommen. Dass das Fehlen von P-Selektin zu einer reduzierten Thrombusbildung führt, ist bekannt⁶². Unbekannt in diesem Zusammenhang ist jedoch die

Bedeutung der unterschiedlichen Speicherlokalisationen des P-Selektins: thrombozytär und endothelial.

TF^{flox/flox}xLysM-Cre-Tiere wurden generiert um die TF-Expression in myeloiden Zellen zu erforschen⁹⁷. 100 % der neutrophilen Granulozyten exprimieren hierbei keinen Tissue Factor. Die TF-Expression wird bei diesen Tieren auch in einem Teil der Monozyten geblockt, da LysM in manchen Monozyten in geringen Mengen exprimiert wird¹⁷, die dennoch ausreichen um das Cre-System zu aktivieren.

2. Physiologische Thrombusinduktion durch Stase am Tiermodell

Die bisher verwendeten experimentellen Modelle zur Entstehung der venösen Thrombose lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Modelle mit induziertem Endotheldefekt^{22,24,28,50,93} und Modelle mit sistierendem Blutfluss^{2,22,47,87}. Diese Modelle erlauben aber keine Rückschlüsse auf die Pathomechanismen der tiefen Beinvenenthrombose bei Patienten, da diese meist durch einen verlangsamten Blutfluss ohne Endothelschädigung ausgelöst wird, wie es z.B. bei Langstreckenflügen oder bettlägerigen Patienten der Fall ist. Die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen von humanen venösen Thromben¹⁰⁵ zeigen, dass es hierbei zu keinem offenkundigen Endothelschaden kommt. Daher werden die von der arteriellen Thromboseforschung abgewandelten Modelle mit verschiedenen induzierten Endotheldefekten der Pathophysiologie der venösen Thrombose ohne Endothelschaden nicht gerecht. Ähnlich verhält es sich bei den Modellen mit sistierendem Blutfluss. Durch den Wegfall der Muskelpumpe bei Immobilität kommt es nicht zu einer kompletten Stase des Blutflusses, wie er von diesen Modellen erzeugt wird, sondern zu einer stark verlangsamten, aber bestehenden Blutströmung¹¹⁵. Mit dem kompletten Verschluss des Blutgefäßes wird der An- und Abtransport von Zellen, Proteinen, Enzymen usw. vollständig unterbunden.

Köllnberger hat in ihrer Arbeit 2007 ein neues Modell für die Erforschung der venösen Thrombose etabliert. Dieses Modell zeichnet sich durch eine verlangsamte, aber bestehende Blutströmungsgeschwindigkeit ohne vorhandenen Endotheldefekt aus. Die Abstinenz von offenkundigen Schäden der venösen Endothelwand wurde durch elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigt⁶². Brill konnte in Kontrollversuchen zu diesem Modell zeigen, dass die venöse Thrombose durch die Flussreduktion und nicht durch die Präparation und das Setzen einer Ligatur induziert wird⁷. Durch die vorliegende Arbeit kann nun auch eine

quantitative Aussage bezüglich der Reduktion der venösen Blutströmung *in vivo* getroffen werden, die bei ca. 75 % liegt. Dies zeigt, dass schon eine starke Reduzierung des Blutflusses in Abwesenheit einer Endothelschädigung ausreicht, um die venöse Thrombose zu induzieren. Das Sistieren des Blutflusses in anderen Thrombosemodellen stellt einen unphysiologischen Stimulus dar und ist zur Auslösung der venösen Thrombusbildung nicht notwendig.

Die sehr niedrigen Werte von adhärenenten neutrophilen Granulozyten und Monozyten bei normalem venösen Fluss (Aufnahmezeitpunkt basal) zeigen, dass die chirurgische Präparation der V. cava caudalis keinen entscheidenden Einfluss auf die, nach Stenosierung und daraus resultierende Verlangsamung des Blutflusses, erfolgende Inflammation hat. Außerdem wurden Tiere, bei denen es infolge der chirurgischen Präparation zu einer Blutung aus der V. cava caudalis und einem damit verbundenen Endothelschaden kam, nicht in die Auswertung mit einbezogen.

Während der intravitalmikroskopischen Untersuchungen konnte der Bereich kranial und kaudal der einengenden Ligaturstelle untersucht werden und der weiterhin bestehende Blutfluss durch diese induzierte Engstelle beobachtet werden. Auch die vorhandene mittige Kanalisierung der Thrombenquerschnitte deutet darauf hin, dass nach 48 h noch Blutfluss vorhanden war.

Bisher wurden in diesem Modell die entstandenen venösen Thromben mit anliegender V. cava caudalis entnommen und die Quantifizierung der Thrombosierung anhand der Bestimmung des Verhältnisses von Thrombusumfang zu Gefäßumfang (Endothelwand) in histologischen Schnitten ermittelt. Um die Thrombusbildung genauer quantifizieren zu können, wurde eine Methode entwickelt, mit der das Gewicht der venösen Thromben ermittelt wurde. Die hier beschriebene Methode (siehe IV. 10.) ist standardisiert durchführbar. Unter Beachtung eines standardisierten Alters und Gewichts der untersuchten Mäuse, blieb das sog. Leergewicht (V.cava caudalis, Aorta abdominalis, Ligaturen, Filterpapier) gleich. Um das eigentliche Thrombusgewicht zu erhalten, wird das Leergewicht vom Bruttothrombusgewicht subtrahiert. Damit kann das Ausmaß der Thrombusbildung sehr genau erfasst und objektiviert werden, da die Quantifizierung in der Histologie sehr abhängig von der Wahl der Schnittebene ist. Die kaudale Ligatur verhindert, dass der Thrombus beim Bearbeiten für histologische Untersuchungen aus der V. cava caudalis dislozieren kann.

Die generierten Thromben wiesen eine charakteristische makroskopische Morphologie auf. So befand sich kranial im Bereich der Engstelle immer ein roter Thrombus, nach kaudal folgten dann weiße und rote Bereiche. Diese Morphologie ähnelt der von Thromben, welche aus Patienten mit tiefer Venenthrombose isoliert wurden¹⁰⁵.

Der histologische Längsschnitt des Thrombus spiegelte diese Morphologie wider und wies Bereiche mit deutlichen Ansammlungen von kernhaltigen Zellen auf. Die laminare Anordnung von Zellen in den histologischen Querschnitten mit der mittigen Kanalisierung wies darauf hin, dass es sich um einen aktiven Prozess handelte, der seinen Ursprung außen am Endothel hat. Am Endothel war keine Beschädigung erkennbar. Dies deckt sich mit den Befunden der Elektronenmikroskopie⁶².

Anhand der computertomographischen Untersuchung der venösen Thrombose ist es zudem gelungen, die stattfindende Thrombosierung *in vivo* mit gebräuchlichen Apparaturen der klinischen Diagnostik darzustellen. *In vivo* zeigte sich, dass sich nur Thromben kaudal der verengenden Ligatur in der V. cava caudalis gebildet hatten, was wiederum darauf hinweist, dass nicht das chirurgische Operationstrauma, sondern die Strömungsverlangsamung der entscheidende Stimulus der Thrombusbildung war.

Damit spiegelt das Modell nicht nur den Pathomechanismus der venösen Thrombose wesentlich besser wider als andere Modelle, sondern induziert auch Thromben, die hinsichtlich folgender Gesichtspunkte humanen Thromben ähneln: (1) Der protrahierte Zeitverlauf der Thrombusbildung deckt sich mit klinischen Befunden. (2) Der Thrombus kann *in vivo* mittels Computertomographie nachgewiesen werden. (3) Der makro- und mikroskopische Aufbau entspricht dem tiefer Beinvenenthrombosen bei Patienten.

3. Neutrophile Granulozyten und Monozyten tragen durch eine sterile Inflammation aktiv zur venösen Thrombose bei

Bisher wird davon ausgegangen, dass die venöse Thrombose vor allem durch Aktivierung der Gerinnungskaskade ausgelöst wird, was eine überschießende Fibrinbildung mit Okklusion des betroffenen Gefäßes zur Folge hat. Die zellulären Vorgänge in der Frühphase der venösen Thrombose und wie Blutzellen zur Fibrinbildung beitragen könnten ist aber weitgehend unbekannt. So konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass innerhalb von 6 h nach Thrombusinduktion eine massive Rekrutierung myeloider Leukozyten und, zu einem geringeren Grad, Thrombozyten stattfindet. Dies deutet auf eine aktive Rolle der Leukozyten bei der venösen Thrombusbildung hin. Weiterhin scheint die Rolle der Thrombozyten nicht der einzige entscheidende Mechanismus für die venöse Thrombose zu sein, wie dies bei der arteriellen Thrombose der Fall ist^{16,84,106}. Sowohl die Ergebnisse der

intravitalmikroskopischen Untersuchungen zur Rekrutierung von Leukozyten in der initialen Phase der Thromboseentstehung (1-6 h), als auch die histologischen Untersuchungen zum Zeitpunkt nach 48 h deuten darauf hin, dass inflammatorische Zellen eine aktive Rolle bei der venösen Thrombose spielen.

Anhand spezifischer immunhistologischer Färbungen des Thrombusgewebes 48 h nach Ligatur wurden Monozyten und neutrophile Granulozyten als vorhandene leukozytäre Subpopulationen charakterisiert. Deren Kinetik in der initialen Phase der venösen Thrombose wurde zum ersten Mal mittels Intravitalmikroskopie *in vivo* erfasst. In der frühen Phase (6 h) wurden vermehrt neutrophile Granulozyten an die Endothelwand rekrutiert. Nach 48 h erhöht sich der Anteil der Monozyten im Thrombusgewebe. Diese sog. „second wave“ von Monozyten nach initialer Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten ist charakteristisch für das Verhalten von Leukozyten während steriler Inflammation^{107,108}. Diese Dynamik der leukozytären Subpopulationen steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Wakefield, der bei einem Stase-Modell Histologien der Gefäßwand zu den Zeitpunkten 1 h, 1 d, 3 d und 6 d anfertigte¹¹². Er untersuchte dabei die Migration von Immunzellen in die Gefäßwand und stellte ebenfalls diese monozytäre „second wave“ fest.

Für die Rekrutierung von Immunzellen zu Entzündungsprozessen ist eine komplexe Abfolge aktiver Rekrutierungsprozesse notwendig (siehe Abb. 2). Ein entscheidender Schritt ist dabei die Anhaftung von Leukozyten an das aktivierte Endothel über die Interaktion von PSGL-1 mit P-Selektin⁸⁰. Das Zelladhäsionsmolekül P-Selektin trägt entscheidend zur Entstehung der venösen Thrombose bei. Das wurde von Köllnberger⁶² in Versuchen mit P-Selektin-Knockout Mäusen und von Myers⁸⁶ in Versuchen mit Wildtypmäusen, denen ein oraler P-Selektin Inhibitor verabreicht wurde, gezeigt. Dies zeigt, dass Leukozyten im venösen Thrombus nicht nur passiv abgelagert werden, sondern aktiv zu diesem inflammatorischen Prozess rekrutiert werden.

Wie erwähnt gibt es zwei Lokalisationen, in denen P-Selektin gespeichert wird: thrombozytäre α -Granula⁸⁰ und endotheliale Weibel-Palade-Körperchen^{6,82}. Hier wurde nun versucht, die beiden Herkunftsarten in ihrer Bedeutung für die venöse Thrombose zu unterscheiden. Wie in V. 3.1 gezeigt, wurden in der initialen Phase signifikant mehr Leukozyten als Thrombozyten an dem durch venöse Flussreduktion aktivierten Endothel adhären. Das legt nahe, dass die Leukozyten zum Großteil direkt an P-Selektin aus endothelialer Lokalisation binden und nicht an P-Selektin, welches von Thrombozyten stammt, die zuerst an das Endothel binden, aktiviert werden und anschließend P-Selektin auf ihrer Oberfläche präsentieren.

Deshalb wurde die Rolle von endothelialem P-Selektin genauer untersucht. Hierfür wurde P-Selektin-Knockout Mäusen Thrombozyten von Wildtypspendertieren injiziert. Somit war thrombozytäres P-Selektin vorhanden.

Dies resultierte in einem reduzierten mittleren Thrombusgewicht verglichen mit Wildtypkontrolltieren, es zeigten sich aber keine signifikanten Unterschiede. Bei der Interpretation dieser Ergebnisse ist aber zu berücksichtigen, dass vier von sechs Tieren keine makroskopisch sichtbare Thrombosierung hatten, und dass die beiden Tiere mit distinkten Thromben der gleichen Versuchsreihe (3 mal zwei Tiere) entspringen. Das erhaltene Ergebnis weist darauf hin, dass nicht das thrombozytäre, sondern das endotheliale P-Selektin von essentieller Bedeutung bei der Entstehung der venösen Thrombose ist.

Dieses Verhalten und die Tatsache, dass keinerlei Lymphozyten im Thrombusgewebe feststellbar waren, obwohl sie bei Mäusen weit über 50 % der Leukozyten im peripheren Blut ausmachen, zeigt, dass eine aktiv stattfindende Inflammation mit selektiver Rekrutierung von Leukozytensubpopulationen ein Hauptauslöser und nicht nur Folge der venösen Thrombose ist. Diese entwickelt sich vom Endothel her in Richtung des Gefäßlumens.

4. Aktivierung der Blutgerinnung durch Tissue Factor rekrutierter myeloider Zellen

Die Analyse der leukozytären Subpopulationen *in vivo* zeigte die Rekrutierung zahlreicher neutrophiler Granulozyten in der initialen Phase der Entstehung der venösen Thrombose. Um deren funktionellen Einfluss zu überprüfen, wurden sie mit Hilfe eines depletierenden Antikörpers aus der Zirkulation entfernt. Interessanterweise war bei den neutropenen Tieren in 80 % makroskopisch keine venösen Thrombose feststellbar. Daley¹⁹ berichtete 2008, dass dieser Antikörper darüber hinaus einen Teil der Monozyten, nämlich die sog. Gr-1^{int} Monozytensubpopulation depletiert. Anhand von Blutbildern wurde die Depletion von neutrophilen Granulozyten bestätigt, es war aber auch eine ca. 50 %ige Reduktion der Monozytenanzahl verglichen mit dem Kontrollblutbild unbehandelter Tiere erkennbar. Somit erweisen sich sowohl neutrophile Granulozyten, als auch Monozyten als essentiell für die Entwicklung der venösen Thrombose.

Durch die Entfernung der neutrophilen Granulozyten aus der Zirkulation fällt der von ihnen auf Monozyten ausgeübte rekrutierende Einfluss während des Entzündungsgeschehens¹⁰⁸

weg, und somit können die noch vorhandenen Monozyten ebenfalls weniger zum Inflammationsgeschehen beitragen.

Die Bereitstellung von TF, dem Starterprotein der Koagulationskaskade⁹⁸, durch myeloide Zellen ist ein wichtiger Beitrag leukozytärer Zellen zur Entstehung der venösen Thrombose.

TF spielt sowohl in arterieller als auch in venöser Thrombose eine Schlüsselrolle⁹⁰. Er ist der primäre Initiator der Koagulationskaskade und kommt sowohl im Gewebe, wie auch im Blut als sog. zirkulierender TF vor⁷⁵. Die Arbeitsgruppe um Massberg hat dessen Rolle in der venösen Thrombose untersucht. Tiere, die durch genetische Veränderung nur etwa 1 % TF exprimieren⁶¹, bilden nach Induktion der venösen Thrombose kein Fibrin und entwickeln keine Thromben. Bei dem hier verwendeten Stenose-Modell kommt es zu keiner offenkundigen Endothelverletzung, somit hat extravaskulärer TF, z.B. in der subendothelialen Matrix, keinen Kontakt zu im Blut zirkulierendem Faktor VIIa und kann den extrinsischen Weg der Gerinnungskaskade nicht starten. Es muss also zirkulierender TF, der in inaktiver Form im Blut vorliegt, von Bedeutung sein. Das wurde durch hTF-Tiere, die normale Mengen an TF exprimieren, und denen nach subletaler Bestrahlung Knochenmark von low-hTF (< 1 % TF-Expression) injiziert wurde, überprüft. Die generierten Chimären verfügten nur über extravaskulären TF und entwickelten nach induzierter venöser Flussverlangsamung keine Thromben⁶¹.

Day kam 2005 bei ihren Untersuchungen zur Rolle von intravaskulärem TF zu einem gegensätzlichen Ergebnis²¹. Bei ihren Versuchen führte die Transplantation von low-TF Knochenmark in Wildtypiere zu keiner Reduktion der Thrombusbildung. Jedoch wurde hierbei ein Modell mit kompletter venöser Stase in der V. cava caudalis verwendet, weshalb diese Ergebnisse nur bedingt übertragbar sind.

Um die spezifische TF-Bereitstellung von myeloiden Zellen zu untersuchen, wurden TF^{flox/flox}xLysM-Cre-Mäuse verwendet. Bei diesen Tieren kam es zwar zu einer Reduktion von makroskopisch erkennbarer Thrombosierung und mittlerem Thrombusgewicht, allerdings ohne statistische Signifikanz.

Das Versuchsergebnis legt zum einen nahe, dass anscheinend die weiterhin vorhandene Fähigkeit der Monozyten zur TF-Expression ausreicht, um venöse Thromben zu generieren. Zum anderen könnte es noch weitere Mechanismen geben, die bei den Versuchen zur Depletion der myeloiden Zellen ausgeschaltet, bei den TF^{flox/flox}xLysM-Cre-Mäuse aber weiterhin vorhanden waren. Neben dem oben erwähnten rekrutierenden Einfluss auf Monozyten¹⁰⁸, muss man bei neutrophilen Granulozyten an ihre Fähigkeit zur NETosis⁸ und deren schon *in vitro* gezeigten prokoagulatorischen Eigenschaften³⁸ denken.

5. Ausblick

Die bisher durchgeführten Untersuchungen beschäftigten sich mit dem extrinsischen Weg der Gerinnungskaskade. Für weiterführende Untersuchungen wäre eine mögliche Rolle des intrinsischen Weges bei der Entstehung der venösen Thrombose von Interesse.

Wie schon erwähnt, ist kürzlich eine neue Form des Zelltods, die sog. NETosis⁸ entdeckt worden. Hierzu sind ausschließlich neutrophile Granulozyten in der Lage. Die dabei ausgeschleuderten Neutrophil extracellular traps (NETs) haben, wie *in vitro* gezeigt wurde, prokoagulatorische Eigenschaften³⁸. Aktuell wird in einer weiterführenden Studie der Arbeitsgruppe um Prof. Massberg deren Rolle bei der venösen Thrombose untersucht.

VII. Zusammenfassung

Mit dieser Arbeit wurde ein neu etabliertes Mausmodell zur Entstehung der venösen Thrombose standardisiert und evaluiert. Im Vergleich mit den bis dato angewendeten Modellen, die entweder auf kompletter venöser Stase oder Gefäßwandschädigung basieren, zeichnet sich dieses Modell durch einen verlangsamten, aber beständigen venösen Blutfluss aus. Dieser wird durch eine stenosierende Ligatur der Vena cava caudalis erzeugt. Es kommt zu keiner offenkundigen Endothelschädigung.

Durch die Einführung einer Methode zur Gewichtsbestimmung der Thromben, kann die Quantifizierung der venösen Thrombusbildung exakter und objektiver erfolgen. Das Thrombusgewicht dient somit als Vergleichsparameter zwischen unterschiedlichen Versuchsgruppen.

Nach der Bestätigung der elementaren Bedeutung der Leukozyten wurde in diesem Modell zum ersten Mal die Kinetik der leukozytären Subpopulationen von Monozyten und neutrophilen Granulozyten in der initialen Phase der Thromboseentstehung mittels intravitale Videofluoreszenzmikroskopie *in vivo* erfasst. Der Mechanismus der Rekrutierung von Entzündungszellen über das Zelladhäsionsmolekül P-Selektin wurde ebenfalls untersucht. Hierbei kann der endotheliale Speicherlokalisation, im Gegensatz zur thrombozytären, eine entscheidende Bedeutung zugesprochen werden.

Die Dynamik der Leukozyten mit initialer Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und monozytärer „second wave“ bestätigt die aktive, lokal stattfindende Inflammationsreaktion. Sie ist Auslöser und nicht nur Folge der venösen Thrombose. Sie erweist sich als essentiell, da es bei Depletion von neutrophilen Granulozyten und 50 % der Monozyten zu keiner Thrombose kommt. Als ursächlich konnte die Aktivierung der Koagulation durch Bereitstellung von intravaskulärem Tissue Factor durch myeloide Zellen erschlossen werden. Weiterführende Untersuchungen könnten sich mit der Bedeutung des intrinsischen Weges der Koagulationskaskade, sowie mit der erst kürzlich entdeckten Rolle der NETosis im Thrombosegeschehen befassen. Weiterhin lassen diese Ergebnisse den Schluss zu, dass eine selektive Inhibition der Leukozytenrekrutierung eine präventive Wirkung auf die Thrombusbildung hat, was die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze ermöglichen könnte.

VIII. Summary

This dissertation standardises and evaluates a recently established mouse model of venous thrombosis induction in mice. In comparison with models used so far, which are either based on complete stasis or endothelial injury, this model features decelerated but continuous venous blood flow. This is generated by a stenosing ligation of the vena cava caudalis. There is no overt endothelial damage.

The measurement of thrombus weight allows an exact and objective quantification of venous thrombosis. Thrombus weight serves as a comparative parameter between different experimental groups.

After approval of the essential role of leukocytes, the *in vivo* kinetics of leukocyte subpopulations monocytes and neutrophils in the initial phase of venous thrombosis were analysed by intravital video fluorescence microscopy. The mechanism of recruitment of inflammatory cells through cell adhesion molecule P-Selectin has been investigated as well. In regard to this, storage in the endothelial location seems to have crucial impact compared to the location in platelets.

The initial recruitment of neutrophils followed by a second wave of monocytes proves, that venous thrombosis can be seen as an active inflammatory process. It is a trigger and not just a consequence of venous thrombosis. This is supported by the absence of venous thrombosis, when neutrophils and 50 % of monocytes were depleted. Activation of the coagulation cascade through blood borne Tissue Factor from myeloid cells could serve as an explanation for that serv.

Continuative analysis could address to the relevance of the intrinsic pathway as well as to the recently detected role of NETosis in venous thrombosis. Further, this implies that selective inhibition of leukocyte recruitment prevents venous thrombosis and might provide a new mechanism for the development of antithrombotic therapies.

IX. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CCD-Kamera	charged coupled device-Kamera
CD	Cluster of Differentiation
cm	Zentimeter
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonucleic acid
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Erdschwerebeschleunigung
g	Gramm
GFP	green fluorescent protein
GP	Glykoprotein
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
ICAM 1	intrazelluläres Adäsionsmolekül 1
i.v.	intra venös
IVC	individually ventilated cages
IVM	intravitale Videofluoreszenzmikroskopie
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
kV	Kilovolt
m	männlich
mg	Milligramm
min	Minute
mM	millimolar
mm ²	Quadratmillimeter
mm/s	Millimeter pro Sekunde
ml	Milliliter
MP	Mikropartikel

ms	Millisekunde
μ A	Mikroampere
μ m	Mikrometer
μ l	Mikroliter
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NETs	neutrophil extracellular traps
nm	Nanometer
PBS	phosphate buffered saline
PDI	Proteindisulfid-Isomerase
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PRP	platelet-rich plasma
PSGL-1	P-Selektin Glykoprotein Ligand 1
RNA	ribonucleic acid
s	Sekunde
sog.	so genannt
TF	Tissue Factor
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor
V.	Vena
VAA	vollständig antagonisierbare Anästhesie
vs.	versus
vWF	von Willebrand Faktor
w	weiblich
Wo	Woche
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

X. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau einer Vene, modifiziert nach ³⁶

Abbildung 2: Adhäsionskaskade, modifiziert nach ⁶⁷

Abbildung 3: Koagulationskaskade, modifiziert nach ²³

Abbildung 4: zur Operation vorbereitete Maus und Instrumentarium

Abbildung 5: Operationsschritte für den venösen Zugang zur V. jugularis dextra

Abbildung 6: Aufsicht auf die V. cava caudalis im Abdomen, modifiziert nach ⁹⁶

Abbildung 7: Operationsschritte zum Modell der venösen Thrombose

Abbildung 8: Strukturformel und Absorptions-/Emissionsspektrum von Rhodamin 6G

Abbildung 9: Strukturformel und Absorptions-/Emissionsspektrum von Acridin-Orange

Abbildung 10: Strahlengang im Epifluoreszenzmikroskop, modifiziert nach ⁴¹

Abbildung 11: Mikroskopierraum, modifiziert nach ⁹⁶

Abbildung 12: Entnahme der Vena cava caudalis

Abbildung 13: schematische Darstellung der Aufnahmezeitpunkte der *in vivo*

Untersuchungen

Abbildung 14: Protokoll für die späte Phase der venösen Thrombose

Abbildung 15: Flussgeschwindigkeit vor und nach Stenosierung der V. cava caudalis

Abbildung 16: Vergleich des Thrombusgewichts von C57Bl6/J und SV129S1

Abbildung 17: Computertomographische Aufnahmen mit Kontrastmittel

Abbildung 18: Makroskopie und Mikroskopie des venösen Thrombus

Abbildung 19: Histologie von Thrombusquerschnitten

Abbildung 20: Charakterisierung der luminalen Zellen mittels Immunfluoreszenz

Abbildung 21: Differenzierung von Neutrophilen und Monozyten mittels Immunfluoreszenz

Abbildung 22: Rekrutierung von Thrombozyten und Leukozyten bei venöser Thrombose

Abbildung 23: Dynamik der Monozytenrekrutierung bei venöser Thrombose

Abbildung 24: Monozytenadhäsion im Zeitverlauf vor (basal) und bis 6 h nach Induktion der venösen Thrombose

Abbildung 25: Vergleich der Anzahl adhärenter Monozyten mit Leukozyten

Abbildung 26: Anteil der Monozyten an den adhärenen Leukozyten 6 h nach Induktion der venösen Thrombose

Abbildung 27: Zeitverlauf der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten *in vivo*

Abbildung 28: Quantifizierung der Adhäsion neutrophiler Granulozyten

Abbildung 29: Vergleich der Anzahl adhärenter neutrophiler Granulozyten mit Leukozyten

Abbildung 30: Anteil der neutrophilen Granulozyten an den adhärenenten Leukozyten 6 h nach Induktion der venösen Thrombose

Abbildung 31: Aggregationsflächen der zellulären Thrombusbestandteile

Abbildung 32: Intravitalmikroskopie: Adhäsion von neutrophilen Granulozyten in der initialen Phase der venösen Thrombose bei Neutrophilen-Depletion

Abbildung 33: Vergleich des Thrombusgewichts von C57Bl6/J und C57Bl6/J neutrophile Granulozyten-Depletion

Abbildung 34: Einfluss von P-Selektion auf die venöse Thrombusbildung

Abbildung 35: Rolle des myeloiden Tissue Factor bei venöser Thrombose

XI. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Dosierungen der vollständig antagonisierbaren Anästhesie (VAA) bei der Maus, modifiziert nach ³¹

Tabelle 2: Primär- und Sekundärantikörper für Immunhistologie

Tabelle 3: Tiere für die Bestimmung der Flussgeschwindigkeit

Tabelle 4: Tiere für die Bestimmung des Thrombusgewichts

Tabelle 5: Tiere für die Bestimmung des Leergewichts

Tabelle 6: Tiere für die computertomographische Untersuchung

Tabelle 7: Tiere für die Feststellung der Verteilung der Leukozytensubpopulationen im Blut

Tabelle 8: Tiere für intravitalmikroskopische Untersuchungen

Tabelle 9: Tiere für Ermittlung der Bedeutung von P-Selektin verschiedenen Ursprungs

Tabelle 10: Tiere, an denen die Depletion der neutrophilen Granulozyten durchgeführt wurde

Tabelle 11: Tiere für die Untersuchung des von neutrophilen Granulozyten bereitgestellten
Tissue Factors

Tabelle 12: Weißes Blutbild von C57Bl6/J-Kontrolltieren

XII. Literaturverzeichnis

- 1 Ahamed J, Versteeg HH, Kerver M, Chen VM, Mueller BM, Hogg PJ, Ruf W. Disulfide isomerization switches tissue factor from coagulation to cell signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2006; 103: 13932–13937.
- 2 Angelillo-Scherrer A, Frutos P de, Aparicio C, Melis E, Savi P, Lupu F, Arnout J, Dewerchin M, Hoylaerts M, Herbert J, Collen D, Dahlbäck B, Carmeliet P. Deficiency or inhibition of Gas6 causes platelet dysfunction and protects mice against thrombosis. *Nat. Med* 2001; 7: 215–221.
- 3 Austyn JM, Gordon S. F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur. J. Immunol* 1981; 11: 805–815.
- 4 Bach RR. Initiation of coagulation by tissue factor. *CRC Crit. Rev. Biochem* 1988; 23: 339–368.
- 5 Belaouaj A, Kim KS, Shapiro SD. Degradation of outer membrane protein A in *Escherichia coli* killing by neutrophil elastase. *Science* 2000; 289: 1185–1188.
- 6 Bonfanti R, Furie BC, Furie B, Wagner DD. PADGEM (GMP140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *Blood* 1989; 73: 1109–1112.
- 7 Brill A, Fuchs TA, Chauhan AK, Yang JJ, Meyer SF de, Köllnberger M, Wakefield TW, Lämmle B, Massberg S, Wagner DD. von Willebrand factor-mediated platelet adhesion is critical for deep vein thrombosis in mouse models. *Blood* 2011; 117: 1400–1407.
- 8 Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004; 303: 1532–1535.
- 9 Broze GJ. Tissue factor pathway inhibitor and the current concept of blood coagulation. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 1995; 6 Suppl 1: S7-13.
- 10 Bucek RA, Reiter M, Quehenberger P, Minar E. C-reactive protein in the diagnosis of deep vein thrombosis. *Br. J. Haematol* 2002; 119: 385–389.
- 11 Bullard DC, Qin L, Lorenzo I, Quinlin WM, Doyle NA, Bosse R, Vestweber D, Doerschuk CM, Beaudet 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* 1995; 95: 1782–1788.
- 12 Cambien B, Wagner DD. A new role in hemostasis for the adhesion receptor P-selectin. *Trends Mol Med* 2004; 10: 179–186.
- 13 Campbell JJ, Qin S, Bacon KB, Mackay CR, Butcher EC. Biology of chemokine and classical chemoattractant receptors: differential requirements for adhesion-triggering versus chemotactic responses in lymphoid cells. *J. Cell Biol* 1996; 134: 255–266.

- 14 Celi A, Pellegrini G, Lorenzet R, Blasi A de, Ready N, Furie BC, Furie B. P-selectin induces the expression of tissue factor on monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1994; 91: 8767–8771.
- 15 Chan MY, Andreotti F, Becker RC. Hypercoagulable States in Cardiovascular Disease. *Circulation* 2008; 118: 2286–2297.
- 16 Coller BS. The role of platelets in arterial thrombosis and the rationale for blockade of platelet GPIIb/IIIa receptors as antithrombotic therapy. *Eur. Heart J* 1995; 16 Suppl L: 11–15.
- 17 Cross M, Mangelsdorf I, Wedel A, Renkawitz R. Mouse lysozyme M gene: isolation, characterization, and expression studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1988; 85: 6232–6236.
- 18 Culver D, Crawford JS, Gardiner JH, Wiley AM. Venous thrombosis after fractures of the upper end of the femur. A study of incidence and site. *J Bone Joint Surg Br* 1970; 52: 61–69.
- 19 Daley JM, Thomay AA, Connolly MD, Reichner JS, Albina JE. Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *J. Leukoc. Biol* 2008; 83: 64–70.
- 20 Darzynkiewicz Z, Robinson JP, Crissman HA (Hrsg. 1994). *Flow cytometry*. 2nd Academic Press, San Diego, 1994.
- 21 Day SM, Reeve JL, Pedersen B, Farris DM, Myers DD, Im M, Wakefield TW, Mackman N, Fay WP. Macrovascular thrombosis is driven by tissue factor derived primarily from the blood vessel wall. *Blood* 2005; 105: 192–198.
- 22 Day SM, Reeve JL, Myers DD, Fay WP. Murine thrombosis models. *Thromb. Haemost* 2004; 92: 486–494.
- 23 Deetjen P, Alzheimer C. *Physiologie*. 4., vollst. überarb Elsevier, Urban & Fischer, München 2005.
- 24 Diaz JA, Hawley AE, Alvarado CM, Berguer AM, Baker NK, Wroblewski SK, Wakefield TW, Lucchesi BR, Myers DD. Thrombogenesis with continuous blood flow in the inferior vena cava. A novel mouse model. *Thromb. Haemost* 2010; 104: 366–375.
- 25 Diehm C. Die tiefe Venenthrombose. Diagnostik und Therapie. *Dt Ärztebl* 1997: A-301-311.
- 26 eBioscience. Anti-Mouse Ly-6G (Gr-1) Purified. <http://www.ebioscience.com/media/pdf/tds/14/14-5931.pdf>, Zugriff: 20.04.2011.
- 27 Edgington TS, Mackman N, Brand K, Ruf W. The structural biology of expression and function of tissue factor. *Thromb. Haemost* 1991; 66: 67–79.
- 28 Eitzman DT, Westrick RJ, Nabel EG, Ginsburg D. Plasminogen activator inhibitor-1 and vitronectin promote vascular thrombosis in mice. *Blood* 2000; 95: 577–580.

- 29 emfret Analytics. X488.doc.
http://www.emfret.com/fileadmin/user_upload/Datasheets/X488.pdf, Zugriff: 20.04.2011.
- 30 Engelhardt W von, Breves G (Hrsg. 2005). *Physiologie der Haustiere*. 2. völlig neu bearb Enke, Stuttgart, 2005.
- 31 Erhardt W. *Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier sowie bei Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen*. Schattauer, Stuttgart, New York 2004 ;
- 32 Esmon CT. Basic mechanisms and pathogenesis of venous thrombosis. *Blood Rev* 2009; 23: 225–229.
- 33 Falati S, Liu Q, Gross P, Merrill-Skoloff G, Chou J, Vandendries E, Celi A, Croce K, Furie BC, Furie B. 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* 2003; 197: 1585–1598.
- 34 Faust N, Varas F, Kelly LM, Heck S, Graf T. Insertion of enhanced green fluorescent protein into the lysozyme gene creates mice with green fluorescent granulocytes and macrophages. *Blood* 2000; 96: 719–726.
- 35 Festing MF, Simpson EM, Davisson MT, Le Mobraaten. Revised nomenclature for strain 129 mice. *Mamm Genome* 1999; 10: 836.
- 36 Fox SI. *Human physiology*. 4 W.C. Brown, Dubuque, Iowa 1993.
- 37 Frenette PS, Johnson RC, Hynes RO, Wagner DD. Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1995; 92: 7450–7454.
- 38 Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD, Wroblewski SK, Wakefield TW, Hartwig JH, Wagner DD. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2010; 107: 15880–15885.
- 39 Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol* 2007; 176: 231–241.
- 40 Graham DB, Zinselmeyer BH, Mascarenhas F, Delgado R, Miller MJ, Swat W, Unutmaz D. ITAM Signaling by Vav Family Rho Guanine Nucleotide Exchange Factors Regulates Interstitial Transit Rates of Neutrophils In Vivo. *PLoS ONE* 2009; 4: e4652.
- 41 Grüner S. *Die Rolle der Thrombozyten- und Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in der Atherogenese*. Dissertation, München 2003.
- 42 Gupta AK, Joshi MB, Philippova M, Erne P, Hasler P, Hahn S, Resink TJ. Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death. *FEBS Lett* 2010; 584: 3193–3197.

- 43 GV-Solas. Empfehlung zur Blutentnahme bei kleinen Versuchstieren. http://www.gv-solas.de/auss/tie/tie_blutentnahme09.pdf, Zugriff: 19.04.2011.
- 44 Haemisch A. Tiergerechte Haltung von Labormäusen 2007.
- 45 Hamer JD, Malone PC, Silver IA. The PO₂ in venous valve pockets: its possible bearing on thrombogenesis. *Br J Surg* 1981; 68: 166–170.
- 46 Hees H, Sinowatz F. Histologie. Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie. 3., überarb Dt. Ärzte-Verl., Köln 2000.
- 47 Henke PK, Varga A, De S, Deatrick CB, Eliason J, Arenberg DA, Sukheepod P, Thanaporn P, Kunkel SL, Upchurch GR, Wakefield TW. Deep vein thrombosis resolution is modulated by monocyte CXCR2-mediated activity in a mouse model. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 2004; 24: 1130–1137.
- 48 Higure A, Okamoto K, Hirata K, Todoroki H, Nagafuchi Y, Takeda S, Katoh H, Itoh H, Ohsato K, Nakamura S. Macrophages and neutrophils infiltrating into the liver are responsible for tissue factor expression in a rabbit model of acute obstructive cholangitis. *Thromb. Haemost* 1996; 75: 791–795.
- 49 Ho WK. Deep vein thrombosis--risks and diagnosis. *Aust Fam Physician*; 39: 468–474.
- 50 Hollenbach S, Sinha U, Lin PH, Needham K, Frey L, Hancock T, Wong A, Wolf D. A comparative study of prothrombinase and thrombin inhibitors in a novel rabbit model of non-occlusive deep vein thrombosis. *Thromb. Haemost* 1994; 71: 357–362.
- 51 Hundelshausen P von, Weber KS, Huo Y, Proudfoot AE, Nelson PJ, Ley K, Weber C. RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium. *Circulation* 2001; 103: 1772–1777.
- 52 Invitrogen. acridine orange, 1 g.
<http://products.invitrogen.com/ivgn/product/A1301?ICID=search-product>, Zugriff: 20.04.2011.
- 53 Invitrogen. rhodamine 6g - Invitrogen Search.
<http://www.invitrogen.com/search/global/searchAction.action?query=rhodamine+6g&resultPage=1&resultsPerPage=15&autocomplete=true>, Zugriff: 19.04.2011.
- 54 Jackson Laboratory. JAX Mice Database - 002289 B6.129S7-Selp<tm1Bay>/J.
<http://jaxmice.jax.org/strain/002289.html>, Zugriff: 14.04.2011.
- 55 Jackson Laboratory. JAX Mice Database - 005582 B6.129P-Cx3cr1<tm1Litt>/J.
<http://jaxmice.jax.org/strain/005582.html>, Zugriff: 14.04.2011.
- 56 Jackson Laboratory. JAX Mice Database - 000664 C57BL/6J.
<http://jaxmice.jax.org/strain/000664.html>, Zugriff: 19.04.2011.
- 57 Jackson Laboratory. JAX Mice Database - 002448 129S1/SvImJ.
<http://jaxmice.jax.org/strain/002448.html>, Zugriff: 19.04.2011.

- 58 Jung S, Aliberti J, Graemmel P, Sunshine MJ, Kreutzberg GW, Sher A, Littman. Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 4106–4114.
- 59 Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* 1996; 88: 3259–3287.
- 60 Klyszcz T, Jünger M, Jung F, Zeintl H. Cap-Image - ein neuartiges computerunterstütztes Videobildanalysesystem für die dynamische Kapillarmikroskopie. *Biomedizinische Technik*, Berlin 1997;42:168-175.
- 61 Koellnberger M, vonBruehl M, Wagner D, Massberg S. Abstract 448: Platelets Contribute to Arterial and Venous Thrombosis in vivo. *Circulation*; 2007.
- 62 Koellnberger M. In vivo Analyse der zellulären und molekularen Mechanismen der arteriellen und venösen Thrombose in der Maus. Dissertation, München 2007.
- 63 Kuwahara M, Sugimoto M, Tsuji S, Miyata S, Yoshioka A. Cytosolic calcium changes in a process of platelet adhesion and cohesion on a von Willebrand factor-coated surface under flow conditions. *Blood* 1999; 94: 1149–1155.
- 64 Lai L, Alaverdi N, Maltais L, Morse HC. Mouse cell surface antigens: nomenclature and immunophenotyping. *J. Immunol* 1998; 160: 3861–3868.
- 65 Lang G. Histotechnik. Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik. Springer, Wien ;, New York 2006.
- 66 Lawson CA, Yan SD, Yan SF, Liao H, Zhou YS, Sobel J, Kiesel W, Stern DM, Pinsky DJ. Monocytes and tissue factor promote thrombosis in a murine model of oxygen deprivation. *J. Clin. Invest* 1997; 99: 1729–1738.
- 67 Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 678–689.
- 68 Ley K. The role of selectins in inflammation and disease. *Trends Mol Med* 2003; 9: 263–268.
- 69 Linkenheld C. Prinzip der Fluoreszenz.
<http://www.mikroskopie.de/kurse/fluoreszenz/elektron.html>, Zugriff: 20.04.2011.
- 70 López JA, Chen J. Pathophysiology of venous thrombosis. *Thromb. Res* 2009; 123 Suppl 4: S30-4.
- 71 López JA, Kearon C, Lee AYY. Deep venous thrombosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2004: 439–456.
- 72 Lowe GDO, Greer IA, Cooke TD, Deware EP, Evans MJ, Forbes CD. Risk of and prophylaxis for venous thromboembolism in hospital patients. Thromboembolic Risk Factors (THRIFT) Consensus Group. *BMJ* 1992; 305: 567–574.

- 73 Mackman N. The many faces of tissue factor. *J Thromb Haemost* 2009; 7 Suppl 1: 136–139.
- 74 Mackman N. Triggers, targets and treatments for thrombosis. *Nature* 2008; 451: 914–918.
- 75 Mackman N, Taubman M. Tissue factor: past, present, and future. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 2009; 29: 1986–1988.
- 76 Mackman N, Tilley RE, Key NS. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 2007; 27: 1687–1693.
- 77 Manly DA, Boles J, Mackman N. Role of tissue factor in venous thrombosis. *Annu. Rev. Physiol* 2011; 73: 515–525.
- 78 Massberg S, Eisenmenger S, Enders G, Krombach F, Messmer K. Quantitative analysis of small intestinal microcirculation in the mouse. *Research in Experimental Medicine* 1998; 198: 23–35.
- 79 Maugeri N, Brambilla M, Camera M, Carbone A, Tremoli E, Donati MB, Gaetano G de, Cerletti C. Human polymorphonuclear leukocytes produce and express functional tissue factor upon stimulation. *J. Thromb. Haemost* 2006; 4: 1323–1330.
- 80 McEver RP. Adhesive interactions of leukocytes, platelets, and the vessel wall during hemostasis and inflammation. *Thromb. Haemost* 2001; 86: 746–756.
- 81 McEver RP, Cummings RD. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J. Clin. Invest* 1997; 100: S97-103.
- 82 McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, Marshall-Carlson L, Bainton DF. 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* 1989; 84: 92–99.
- 83 Middleton J, Neil S, Wintle J, Clark-Lewis I, Moore H, Lam C, Auer M, Hub E, Rot A. Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells. *Cell* 1997; 91: 385–395.
- 84 Momi S, Falcinelli E, Giannini S, Ruggeri L, Cecchetti L, Corazzi T, Libert C, Gresele P. Loss of matrix metalloproteinase 2 in platelets reduces arterial thrombosis in vivo. *J. Exp. Med* 2009; 206: 2365–2379.
- 85 Mulisch M, Welsch U (Hrsg. 2009). *Romeis- Mikroskopische Technik*. Spektrum Akademischer Verlag, 2009.
- 86 Myers DD, Rectenwald JE, Bedard PW, Kaila N, Shaw GD, Schaub RG, Farris DM, Hawley AE, Wroblewski SK, Henke PK, Wakefield TW. Decreased venous thrombosis with an oral inhibitor of P selectin. *J. Vasc. Surg* 2005; 42: 329–336.
- 87 Myers DD, Hawley AE, Farris DM, Wroblewski SK, Thanaporn P, Schaub RG, Wagner DD, Kumar A, Wakefield TW. P-selectin and leukocyte microparticles are associated with venous thrombogenesis. *J. Vasc. Surg* 2003; 38: 1075–1089.

- 88 Nakamura S, Imamura T, Okamoto K. Tissue factor in neutrophils: yes. *J. Thromb. Haemost* 2004; 2: 214–217.
- 89 Østerud B. Tissue factor in neutrophils: no. *J. Thromb. Haemost* 2004; 2: 218–220.
- 90 Owens AP, Mackman N. Tissue factor and thrombosis: The clot starts here. *Thromb. Haemost* 2010; 104: 432–439.
- 91 Parry GC, Mackman N. Transcriptional regulation of tissue factor expression in human endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 1995; 15: 612–621.
- 92 Pawlinski R, Wang JG, Owens A3, Williams J, Antoniak S, Tencati M, Luther T, Rowley JW, Low EN, Weyrich AS, Mackman N. Hematopoietic and nonhematopoietic cell tissue factor activates the coagulation cascade in endotoxemic mice. *Blood* 2010; 116: 806–814.
- 93 Pierangeli SS, Harris EN. Antiphospholipid antibodies in an in vivo thrombosis model in mice. *Lupus* 1994; 3: 247–251.
- 94 Pinsky DJ, Naka Y, Liao H, Oz MC, Wagner DD, Mayadas TN, Johnson RC, Hynes RO, Heath M, Lawson CA, Stern DM. Hypoxia-induced exocytosis of endothelial cell Weibel-Palade bodies. A mechanism for rapid neutrophil recruitment after cardiac preservation. *J. Clin. Invest* 1996; 97: 493–500.
- 95 Polgar J, Matuskova J, Wagner DD. The P-selectin, tissue factor, coagulation triad. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1590–1596.
- 96 Popesko P, Rajtová V, Horák J. *A Colour Atlas Of Anatomy Of Small Laboratory Animals, Vol 2 - Rat, mouse, golden hamster.* Saunders, Philadelphia 2002.
- 97 Redecha P, Tilley R, Tencati M, Salmon JE, Kirchhofer D, Mackman N, Girardi G. Tissue factor: a link between C5a and neutrophil activation in antiphospholipid antibody induced fetal injury. *Blood* 2007; 110: 2423–2431.
- 98 Reinhardt C. New locations of intravascular tissue factor: indications. *Hamostaseologie* 2007; 27: 55–58.
- 99 Reinhardt C, Brühl M von, Manukyan D, Grahl L, Lorenz M, Altmann B, Dlugai S, Hess S, Konrad I, Orschielt L, Mackman N, Ruddock L, Massberg S, Engelmann B. Protein disulfide isomerase acts as an injury response signal that enhances fibrin generation via tissue factor activation. *J. Clin. Invest* 2008; 118: 1110–1122.
- 100 Ritis K, Doumas M, Mastellos D, Micheli A, Giaglis S, Magotti P, Rafail S, Kartalis G, Sideras P, Lambris JD. A novel C5a receptor-tissue factor cross-talk in neutrophils links innate immunity to coagulation pathways. *J. Immunol* 2006; 177: 4794–4802.
- 101 Romo GM. The Glycoprotein Ib-IX-V Complex Is a Platelet Counterreceptor for P-Selectin. *Journal of Experimental Medicine* 1999; 190: 803–814.

- 102 Roumen-Klappe EM, Janssen MCH, van Rossum J, Holewijn S, van Bokhoven MMJA, Kaasjager K, Wollersheim H, Den Heijer M. Inflammation in deep vein thrombosis and the development of post-thrombotic syndrome: a prospective study. *J. Thromb. Haemost* 2009; 7: 582–587.
- 103 Ruggeri ZM. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *J. Thromb. Haemost* 2003; 1: 1335–1342.
- 104 Scurr JH, Machin SJ, Bailey-King S, Mackie IJ, McDonald S, Smith PD. Frequency and prevention of symptomless deep-vein thrombosis in long-haul flights: a randomised trial. *Lancet* 2001; 357: 1485–1489.
- 105 Sevitt S. The structure and growth of valve-pocket thrombi in femoral veins. *J. Clin. Pathol* 1974; 27: 517–528.
- 106 Sim DS, Merrill-Skoloff G, Furie BC, Furie B, Flaumenhaft R. Initial accumulation of platelets during arterial thrombus formation in vivo is inhibited by elevation of basal cAMP levels. *Blood* 2004; 103: 2127–2134.
- 107 Soehnlein O, Zernecke A, Eriksson EE, Rothfuchs AG, Pham CT, Herwald H, Bidzhekov K, Rottenberg ME, Weber C, Lindbom L. Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes. *Blood* 2008; 112: 1461–1471.
- 108 Soehnlein O, Lindbom L, Weber C. Mechanisms underlying neutrophil-mediated monocyte recruitment. *Blood* 2009; 114: 4613–4623.
- 109 Todoroki H, Nakamura S, Higure A, Okamoto K, Takeda S, Nagata N, Itoh H, Ohsato K. Neutrophils express tissue factor in a monkey model of sepsis. *Surgery* 2000; 127: 209–216.
- 110 Waard V de, Hansen HR, Spronk HHM, Timmerman JJ, Pannekoek H, Florquin S, Reitsma PH, Cate H ten. Differential expression of tissue factor mRNA and protein expression in murine sepsis. The role of the granulocyte revisited. *Thromb. Haemost* 2006; 95: 348–353.
- 111 Wagner DD, Olmsted JB, Marder VJ. Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *J. Cell Biol* 1982; 95: 355–360.
- 112 Wakefield TW, Strieter RM, Wilke CA, Kadell AM, Wroblewski SK, Burdick MD, Schmidt R, Kunkel SL, Greenfield LJ. Venous thrombosis-associated inflammation and attenuation with neutralizing antibodies to cytokines and adhesion molecules. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 1995; 15: 258–268.
- 113 Warlow C, Ogston D, Douglas AS. Deep venous thrombosis of the legs after strokes. Part I--incidence and predisposing factors. *Br Med J* 1976; 1: 1178–1181.
- 114 White RH. The epidemiology of venous thromboembolism. *Circulation* 2003; 107: I4–8.
- 115 Wright HP, Osborn SB, Edmonds DG. Effect of postoperative bed rest and early ambulation on the rate of venous blood-flow. *Lancet* 1951; 1: 22–25.

- 116 Zhou J, May L, Liao P, Gross PL, Weitz JI. Inferior vena cava ligation rapidly induces tissue factor expression and venous thrombosis in rats. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 2009; 29: 863–869.
- 117 Zillmann A, Luther T, Müller I, Kotsch M, Spannagl M, Kauke T, Oelschlägel U, Zahler S, Engelmann B. Platelet-associated tissue factor contributes to the collagen-triggered activation of blood coagulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 2001; 281: 603–609.
- 118 Zumbach A, Marbet GA, Tsakiris DA. Influence of the genetic background on platelet function, microparticle and thrombin generation in the common laboratory mouse. *Platelets* 2001; 12: 496–502.

XIII. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. vet. Rüdiger Wanke für die Übernahme der Arbeit, deren Durchsicht und Einreichung an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Steffen Massberg bedanke ich mich für die interessante Themenstellung und die kompetente wissenschaftliche Projektbetreuung, sowie seine Anregungen und Diskussionsbereitschaft bei allen auftretenden Fragen.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. med. vet. Marie-Luise von Brühl für die hervorragende Betreuung bei meiner Arbeit, die Einarbeitung in das komplexe Modell sowie kompetente Hilfestellung, Diskussionsbereitschaft und Motivation.

Bei Herrn Dipl.-Biologe Michael Lorenz bedanke ich mich für die stete Diskussionsbereitschaft und seine Anregungen.

Vielen Dank an Herrn Konstantin Stark für die Hilfestellung bei der Anfertigung der Histologien und seine ebenfalls beständige Diskussionsbereitschaft.

Bei Frau Iina Laitinen, PhD, von der Nuklearmedizinischen Klinik am Klinikum rechts der Isar bedanke ich mich für die Ermöglichung der computertomographischen Untersuchungen.

Für die hervorragende Tierpflege bedanke ich mich bei den Tierpflegerinnen Frau Maren Bathge und Frau Nicole Blount.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglicht haben und mich stets in vollem Maße unterstützt haben.