

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von PD Dr. med. vet. Sven Reese

Angefertigt an der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik des Klinikums der
Universität München
(Direktor: Prof. Dr. Steffen Massberg)

Die Rolle des Komplementsystems bei der Entstehung der venösen Thrombose

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

Von Mag. med. vet. Isabel Teresa Fiola

aus München

München, 2014

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Sven Reese

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Hartmut Gerhards

Tag der Promotion: 08. Februar 2014

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	2
1.	Venöse Thrombose	2
1.1.	Definition	2
1.2.	Funktion und Aufbau der Vene	2
1.3.	Der venöse Thrombus	4
1.4.	Entstehung der venösen Thrombose.....	4
1.4.1.	Endothelverletzung.....	5
1.4.2.	Stase	5
1.4.3.	Hyperkoagulabilität.....	5
1.5	Pathophysiologie der venösen Thrombose.....	6
1.5.1.	Hämostase und Gerinnungskaskade.....	6
1.5.2.	Thrombozytenrekrutierung- und aktivierung.....	8
1.5.3.	Zusammenspiel von Thrombozyten und Koagulation während der Hämostase	8
1.5.4.	Leukozytenrekrutierung und Rolle des angeborenen Immunsystems.....	9
1.6.	Thromboseinduktion in Tiermodellen.....	10
1.6.1.	Eisen-Chlorid Modell.....	10
1.6.2.	Vena cava caudalis-Ligatur Modell	11
1.6.3.	Vena cava caudalis-Stenose Modell.....	11
2.	Das Komplementsystem.....	11
2.1.	Bestandteile und Aufgaben	11
2.2.	Aktivierung des Komplementsystems.....	12
2.2.1.	Der klassische Aktivierungsweg	13
2.2.1.1.	C1q	14
2.2.2.	Der alternative Aktivierungsweg	16
2.2.3.	Der Lektin Aktivierungsweg.....	17
2.2.4.	Der terminale Komplement-Komplex.....	18
2.3.	Funktionen des Komplementsystems.....	18
2.3.1.	Zelllyse	18
2.3.2.	Opsonisierung.....	18
2.3.3.	Anaphylatoxine	19

2.3.4.	Beseitigung von Immunkomplexen	19
2.3.5.	Interaktion mit dem erworbenen Immunsystem.....	19
2.4.	Regulierung des Komplementsystems	20
3.	Interaktion von Komplement- und Gerinnungssystem	21
III.	ZIELSETZUNG	23
IV.	MATERIAL UND METHODEN	25
1.	Versuchstiere	25
1.1.	Haltungsbedingungen.....	25
1.2.	Hygienemanagement.....	26
1.3.	Mäuse	26
1.3.1.	C57BL/6J-Wildtypiere	27
1.3.2.	Knock-out Tiere	27
1.3.2.1	C1q ^{-/-} Tiere	27
1.3.2.2	CR2 ^{-/-} Tiere.....	27
1.3.2.3	C3 ^{-/-} Tiere	28
1.3.2.4	C4 ^{-/-} Tiere	28
1.3.2.5	C3 ^{-/-} C4 ^{-/-} Tiere	28
2.	Operationsdurchführung	29
2.1.	Wahl und Durchführung der Narkose	29
2.2.	Narkoseantagonisierung.....	30
2.3.	Schmerzmanagement	31
2.4.	Operationsvorbereitung.....	31
2.5.	Operationstechnik für die Stenosierung der Vena cava caudalis	33
2.6.	Operationstechnik zur Entnahme der Thromben nach 48 Stunden.....	35
2.7.	Dokumentation.....	36
2.8.	Operationstechnik Jugulariskatheter	36
3.	Blutanalysen.....	38
3.1.	Blutabnahmetechniken	38
3.1.1.	Punktion der Vena facialis	38
3.1.2.	Intrakardiale Blutabnahme	39
3.2.	Großes Blutbild	39
3.3.	Partielle Thromboplastinzeit	40
3.4.	Thromboelastometrie	40

3.4.1.	EXTEM	41
3.4.2.	FIBTEM	41
4.	Intravitale Videofluoreszenzmikroskopie (IVM)	42
4.1.	Prinzip der IVM	42
4.2.	Durchführung der IVM	43
4.2.1.	Verwendete Farbstoffe	44
4.2.1.1.	Acridin-Orange.....	44
4.2.1.2.	Rhodamin B.....	44
4.2.2.	Isolation muriner Thrombozyten.....	44
4.2.3.	Bestimmung der Flussreduktion	45
4.3.	Auswertung der IVM	46
5.	Schwanzblutungszeiten.....	46
6.	Immunhistologie	47
6.1.	Präparation	47
6.2.	Färbeprotokoll	47
6.3.	Auswertung der Immunhistologie.....	49
7.	Versuchsplanung und Statistik	50
7.1.	Tierzahlen.....	50
7.2.	Versuchsgruppen.....	50
7.2.1.	Rolle des Komplementsystems bei der Entstehung der venösen Thrombose	50
7.2.2.	Leukozyten- und Thrombozytenrekrutierung	51
7.2.3.	EXTEM Werte basal	52
7.3.	Statistik.....	53
V.	ERGEBNISSE	54
1.	Einfluss des Komplementsystems auf die venöse Thrombose	54
1.1.	Thrombusgewichte	54
1.1.1.	C1q ^{-/-}	54
1.1.2.	CR2 ^{-/-}	55
1.1.3.	C3 ^{-/-} , C4 ^{-/-} und C3 ^{-/-} C4 ^{-/-}	56
2.	Einfluss des Komplementsystems auf die Blutgerinnung.....	58
2.1.	Partielle Thromboplastinzeit	58
2.2.	Schwanzblutungszeit.....	59

2.3.	Thromboelastometrie	60
3.	Einfluss des Komplementsystems auf die Blutbilder	66
3.1.	Großes Blutbild basal	66
3.2.	Großes Blutbild 48 Stunden nach Flussverlangsamung.....	68
3.3.	Thrombozyten	70
3.4.	Weißes Blutbild basal.....	71
3.5.	Weißes Blutbild 48 Stunden nach Flussverlangsamung	72
4.	Die initiale Leukozytenrektrutierung ist unabhängig von C4	74
4.1.	Leukozytenaggregation	74
4.2.	Thrombozytenaggregation	76
5.	Die Leukozytenakkumulation bei der TVT ist C4 unabhängig.....	79
5.1.	Fibrinogenfläche.....	79
5.2.	Thrombozytenfläche.....	81
5.3.	Leukozyten	83
VI.	DISKUSSION	85
1.	Wahl der Mauslinien.....	85
2.	C4-Defizienz ist protektiv gegen venöse Thrombose	85
3.	C4 hat einen geringen Einfluss auf die Blutgerinnung	86
4.	C4 ist von zentraler Bedeutung für die Leukozytenakkumulation bei venöser Thrombose	87
5.	Ausblick.....	88
VII.	ZUSAMMENFASSUNG	89
VIII.	SUMMARY	90
IX.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	91
X.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	95
XI.	TABELLENVERZEICHNIS	97
XII.	LITERATURVERZEICHNIS	99
XIII.	DANKSAGUNG	111

I. EINLEITUNG

Die tiefe Venenthrombose (TVT) und ihr Komplikation, die Lungenembolie, werden zusammen als venöse Thromboembolie (VTE) bezeichnet und sind eine der häufigsten Ursachen für Todesfälle infolge kardiovaskulärer Erkrankungen¹. Die Inzidenz für VTE steigt ab einem Alter von 45 Jahren dramatisch an und bewegt sich zwischen 300.000 und mehr als 2 Millionen pro Jahr in den USA²⁻⁴. Angesichts steigender Lebenserwartung werden Strategien zur Vorbeugung und Behandlung von VTE weltweit daher immer wichtiger⁵.

Die Thrombose ist eng verbunden mit der Hämostase. Dies ist der biologische Mechanismus, der einen starken Blutverlust nach Verletzung der Gefäßintegrität unterbindet. Auch bei der TVT kommt es zur Blutgerinnung und Plättchenaktivierung, die jedoch Konsequenzen für den Patienten hat, wenn es zur Thrombose kommt⁶. Das Komplementsystem ist mit der Blutgerinnung eng verbunden. Eine Aktivierung der prokoagulatorischen Kaskade wurde bereits im Zusammenhang mit dem Komplementsystem nachgewiesen⁷. Ziel dieser Arbeit ist die erstmalige systematische Untersuchung der Rolle des Komplementsystems und spezifischer Komplementfaktoren bei der Stase-induzierten TVT. Mit Hilfe eines neu entwickelten TVT-Modells, anhand dessen eine Flussreduktion in der Vena cava caudalis zur Thrombose führt, könnte die spezifische Rolle des Komplementsystems bei der Thromboseentstehung infolge einer Flussreduktion, ohne begleitende Endothelverletzung, untersucht werden. Damit wird beispielsweise die Situation bei immobilisierten Patienten simuliert. Das Zusammenspiel zwischen Komplementsystem und Koagulation zu verstehen hat grundlegende klinische Bedeutung⁷, auch im Hinblick auf die Entwicklung neuer Therapie- und Präventionsmöglichkeiten der Thrombose.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Venöse Thrombose

1.1. Definition

Thrombose ist die pathologische Bildung eines Blutpfropfes bzw. Gerinnsels innerhalb eines intakten Blutgefäßes. Dabei kommt es zu einem vollständigen oder teilweisen Verschluss von Arterien oder Venen durch lokale, intravasale und intravitale Blutgerinnung mit Bildung von Blutkoageln aus Thrombozytenaggregaten und Fibrin⁸. Dadurch unterscheidet sich die Thrombose von der postmortalen, intravasalen, generalisierten Bildung von Leichengerinnseln und der intravitale, aber extravasalen Blutgerinnung⁹, wie z.B. bei der physiologischen Blutgerinnung infolge einer blutenden Wunde.

1.2. Funktion und Aufbau der Vene

Das Herz-Kreislaufsystem, bestehend aus Herz, Arterien, Kapillaren und Venen, gewährleistet den Stoff- und Sauerstoffaustausch zwischen Geweben und Blut. Venen gehören zum Niederdrucksystem des Kreislaufs, dieses beginnt in den venösen Abschnitten der Kapillaren und reicht bis in den rechten Vorhof. Das System hat vielfältige Aufgaben, wie z.B. die Rückführung des Blutes zum Herzen, die Fähigkeit zirkulierendes Blut in größeren Mengen zu speichern, den Austausch von Blutgasen, Nährstoffen, Wärme und den Transport von Stoffen. Der Wandaufbau der Venen ist diesen Aufgaben entsprechend angepasst. Die Venenwand ist äußerst dehnungsfähig und übersteigt damit die Dehnungsfähigkeit der Arterien um das 200fache¹⁰. Die Gefäßwand (Abb. 1) von Venen ist in drei Hauptabschnitte unterteilt. Die innere Schicht ist die Tunica intima, die mittlere Schicht die Tunica media, ganz außen schließt sich die Tunica externa (adventitia) an. Die Tunica intima besteht aus dem Endothel, dem Stratum subendotheliale und einer dünnen Bindegewebsschicht. Sie kann auch eine Längsmuskelschicht enthalten. Die Tunica media ist im Gegensatz zu Arterien nur schwach ausgeprägt und unterteilt sich in die Membrana elastica interna, welche oft fehlt oder

nur schwach vorhanden ist, elastische Fasernetze und Membrana elastica externa. Sie besteht meist aus glatten Muskelzellen, kollagenen Fibrillen Typ I und II und elastischen Fasern. Die Tunica externa ist aus kollagenen Fibrillen und elastischen Fasern aufgebaut.

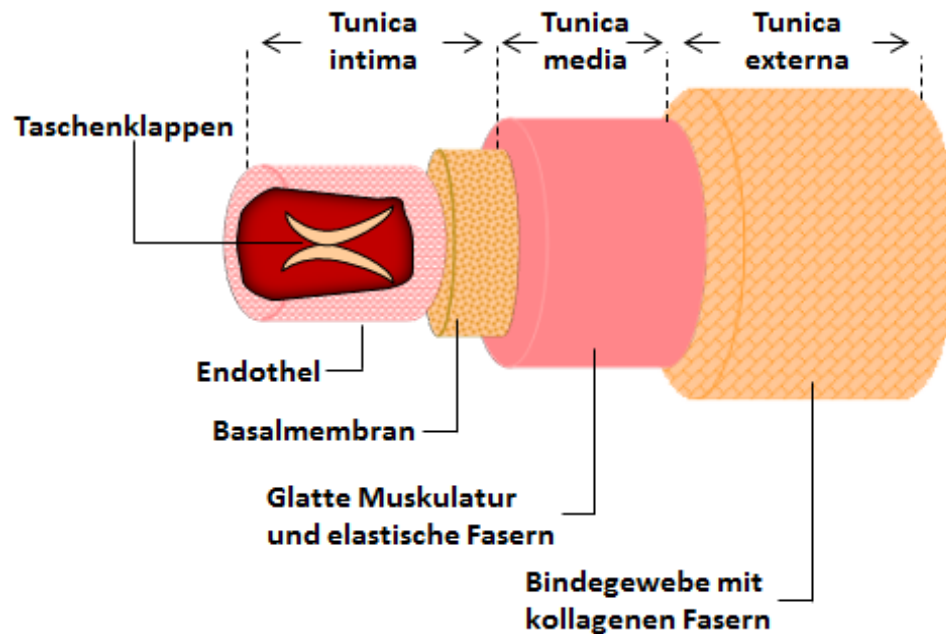


Abbildung 1: Aufbau einer Vene

Der Wandbau der Venen ist im Gegensatz zu entsprechenden Arterien dünner und stärker mit Bindegewebe durchsetzt. Die Tunica externa ist nicht klar nach außen abgegrenzt. Die großen Körpervenen, wie z.B. die Vena cava caudalis besitzen eine relativ gut ausgeprägte Tunica intima, eine schmale Tunica media, welche wenige glatte Muskelzellen, aber viel Bindegewebe enthält, und eine sehr stark ausgeprägte Tunica externa, die durch viele Bündel glatter Muskelzellen, welche in Längsrichtung verlaufen, verstärkt ist. Die mittleren Venen besitzen Taschenklappen um den Rückstrom des Blutes in die Peripherie zu verhindern. Diese werden von der Tunica intima gebildet. Im Gefäßinneren liegen sich zwei Bindegewebstaschen, von Endothel überzogen, gegenüber und geben dem bei der Ausströmungsphase der Systole entstehenden Unterdruck nach. Sie klappen zur Wand weg und lassen das Blut passieren. Mit Beginn der Diastole ist der Unterdruck nicht mehr vorhanden, dadurch klappen die Taschenklappen wieder ins Lumen zurück, das rückfließende Blut füllt die Taschen, diese verschließen das Lumen und der Blutrückfluss wird verhindert.

1.3. Der venöse Thrombus

Venöse Thromben haben eine charakteristische laminare Struktur. Sie sind reich an Fibrin und Erythrozyten und durchsetzt mit einer großen Anzahl von Leukozyten¹¹. Durch ein Modell der Stase-induzierten venösen Thrombose konnte nachgewiesen werden, dass Leukozyten schon nach sechs Stunden in großer Anzahl rekrutiert werden. Diese werden am intakten, venösen Endothel adhärent. Die Thrombozytenadhäsion beginnt schon zwei Stunden nach der Stase-Induktion und steigt mit der Zeit an. Nach sechs Stunden lagern sich die meisten Thrombozyten entweder direkt an das intakte Endothel oder an den schon adhären Leukozyten an. Thrombozyten und Leukozyten bilden Aggregate¹².

1.4. Entstehung der venösen Thrombose

Das Risiko an einer Thrombose zu erkranken ist erhöht bei Personen mit einer erblichen Veranlagung, Verletzten und frisch operierten. Ein weiterer Risikofaktor ist Immobilisierung, wie z.B. bei Langstreckenflügen oder postoperativ. Außerdem sind ältere Menschen häufiger betroffen als junge, was zum Teil durch das erhöhte Thromboserisiko bei Krebserkrankungen erklärbar ist. Auch eine Schwangerschaft begünstigt die Entstehung einer Venenthrombose¹³⁻¹⁷. Die Thrombose des tiefen Venensystems ist meistens ein akutes Ereignis, welches bei rechtzeitiger Diagnose therapiert und dessen Folgen weitgehend verhindert oder abgeschwächt werden können.

Der bekannte Berliner Pathologe Rudolf Virchow hat erstmals die zur Thrombosebildung prädisponierenden Faktoren definiert: Veränderungen an der Venenwand (Endothelverletzung), Verlangsamung der Strömungsgeschwindigkeit des Blutes (Stasis) oder Veränderungen der Blutzusammensetzung (Hyperkoagulabilität)^{18,19}. Diese drei Faktoren werden als Virchowsches Trias bezeichnet, nachfolgend wird auf jeden dieser Faktoren genauer eingegangen.

1.4.1. Endothelverletzung

Eine Beschädigung des Gefäßendothels ist ein besonders wichtiger Faktor bei der Entstehung der venösen Thrombose etwa nach Hüft- oder Knieoperationen^{20,21}. Durch die Exposition der adhäsiven subendothelialen Matrix findet eine rasche Akkumulation der Thrombozyten statt, welche hierauf aktiviert werden und den Defekt der Gefäßwand verschließen²². Zudem kommt es zur Freisetzung von Tissue Factor aus dem Gewebe, welcher den extrinsischen Gerinnungsweg aktiviert und somit die stabile Bildung eines Blutgerinnsels gewährleistet.

1.4.2. Stase

Venöse Stase stellt einen wichtigen pathologischen Faktor in der Entstehung venöser Thrombosen dar. Studien zeigten, dass die Mehrheit venöser Thromben in Regionen mit verlangsamtem Blutfluss entstehen, wie z.B. im großen Venensinus der Waden oder in Taschenklappen und Bifurcationen des Venensystems. Das wird besonders deutlich in Situationen physischer Inaktivität, wie im Fall von Bettruhe oder während Langstreckenflügen. Dabei bewirkt eine fehlende Pumptätigkeit der großen Muskeln einen verminderten Blutfluss oder sogar Stase²².

1.4.3. Hyperkoagulabilität

Das Thromboserisiko ist erhöht, wenn die hämostatische Balance zwischen pro- und antikoagulatorischen Kräften zugunsten der Koagulation verschoben ist. Wenn diese Imbalance auf einen angeborenen Defekt zurückzuführen ist und die entstandene Hyperkoagulabilität andauert, besteht ein lebenslanges Thromboserisiko²². Andererseits gibt es auch die erworbene Hyperkoagulabilität, welche etwa bei Krebserkrankungen oder Sepsis zu beobachten ist.

1.5. Pathophysiologie der venösen Thrombose

1.5.1. Hämostase und Gerinnungskaskade

Die Hämostase ist ein Prozess der ein geschlossenes Hochdruckzirkulationssystem nach einer Gefäßbeschädigung aufrechterhält. Eine Gefäßwandverletzung und der Austritt von Blut aus der Zirkulation führen rasch zu Prozessen, die zur Abdichtung der Verletzung führen. Zirkulierende Thrombozyten werden an den Ort der Verletzung rekrutiert, dort werden sie zu einer Hauptkomponente des entstehenden Thrombus. Die Blutgerinnung, aktiviert durch Tissue Factor (TF), führt zur Bildung von Thrombin und Fibrin. Diese Abläufe entstehen unter normalen Bedingungen und bei funktionierenden Regulationsmechanismen.

Wenn pathologische Prozesse die Regulationsmechanismen der Hämostase übernehmen, führt übermäßig gebildetes Thrombin zur Thrombusbildung in Arterien oder Venen²³.

Die Blutgerinnungskaskade wird lokal am Ort der Verletzung des Blutgefäßes aktiviert oder generalisiert, etwa bei disseminierter intravaskulärer Gerinnung²³. Sie setzt sich zusammen aus der intrinsischen und extrinsischen Gerinnung. Beide haben bei der Aktivierung von Faktor X eine gemeinsame Endstrecke, was die Umwandlung von Prothrombin in Thrombin zur Folge hat. Am Ende wandelt Thrombin Fibrinogen von einem löslichen Plasmaprotein in ein nichtlösliches Fibringerinnsel um²².

Während die Thrombozytenaggregation einen provisorischen Wundverschluss bildet, sichert die Blutgerinnung, dass dieser mechanisch stabil bleibt, indem der Defekt mithilfe von Fibrin abgedichtet wird. Die Fibrinbildung setzt die fortlaufende Aktivierung von Serinproteasen und ihren Kofaktoren aus dem Blut voraus. Die Fibrinbildung wird vorwiegend von einem Zell-Membran-Protein, welches als Tissue Factor bezeichnet wird, eingeleitet. Dieser wird exprimiert von Gefäßwand-Zellen, die nicht dem Blutstrom ausgesetzt sind, und in inaktiver Form auf Monozyten (Abb. 2)²⁴.

unkontrollierte oder disseminierte Gerinnung zu vermeiden muss der Gerinnungsprozess straff durch Antikoagulationsproteine reguliert werden, wie z.B. von Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI), Protein C und Antithrombin²⁵.

1.5.2. Thrombozytenrekrutierung- und aktivierung

Thrombozyten sind kleine, scheibenförmige, kernlose Zellen mit einem Durchmesser von 1-3 µm, die im Knochenmark von Megakaryozyten gebildet und freigesetzt werden^{26,27}. Jeden Tag werden Millionen von Thrombozyten produziert, diese zirkulieren im Blut und dienen als Wächter über die Intaktheit des Gefäßsystems. Wenn es zu einer Gefäßverletzung kommt, sammeln sich die Thrombozyten am Ort der Verletzung. Dies erfolgt hoch effizient, in einem mehrstufigen Prozess, durch die Interaktion von speziellen Thrombozytenoberflächenrezeptoren mit subendothelialen Matrixproteinen, eingeschlossen Kollagen und Von-Willebrand-Faktor (vWF), die in Folge einer Verletzung lokal in erheblichen Menge freigesetzt werden^{23,28-32}. Nach der Adhäsion werden die Thrombozyten aktiviert und heften sich fest an die Gefäßwand an. Adhärente Thrombozyten setzen wirksame Thrombozytenagonisten, wie z.B. ADP, aus ihren intrazellulären Granula frei. Diese führen zu einer parakrinen Thrombozytenaktivierung und zur rezeptorvermittelten Bindung von zirkulierenden Thrombozyten. Dieser Prozess wird als Thrombozytenaggregation bezeichnet. Die andauernde Adhäsion, Aktivierung und Aggregation führt zu einem schnellen Wachstum des Thrombus und kann den Verschluss eines Blutgefäßes zur Folge haben⁶.

1.5.3. Zusammenspiel von Thrombozyten und Koagulation während der Hämostase

Der Prozess der Thrombozytenakkumulation und die Blutgerinnung begünstigen sich gegenseitig während der hämostatischen Gerinnungsbildung am Ort der vaskulären Verletzung. Thrombozyten zeigen wirksame gerinnungsfördernde Funktionen, etwa durch Exposition von Phospholipiden auf der Zelloberfläche, wie z.B. Phosphatidylserine³³. Die Koagulation wiederum unterstützt die Thrombozytenaktivierung und -akkumulation, hauptsächlich durch die Protease Thrombin, welche zur Thrombozytenaktivierung über die Spaltung und Aktivierung vom Proteinase-aktivierten-Rezeptor 1 (PAR1) und PAR4 auf humanen

Thrombozyten führt³⁴. Demzufolge kommunizieren und unterstützen sich die Thrombozyten und die Gerinnungskaskade durchgehend während der Thrombusbildung⁶.

Tissue Factor, welcher den extrinsischen Weg der Gerinnung initiiert, ist ein Protein, welches in verschiedenen Geweben, wie z.B. im Gehirn, der Lunge, den Nieren und der Plazenta in hohen Mengen exprimiert wird³⁵. Es ist ein transmembranäres Glykoprotein, bestehend aus 263 Aminosäuren, mit einem Molekulargewicht von 47 kDa. Es fungiert als ein Rezeptor für FVII/VIIa im Plasma. Der TF-FVIIa-Komplex ist der direkte Initiator der Blutgerinnung in vivo³⁶. Dieser Komplex aktiviert die Gerinnungsfaktoren, FX und FIX, was in der Thrombinentstehung, Fibrinablagerung und, zusammen mit den Thrombozyten, in der Entstehung eines hämostatischen Gerinnsels resultiert³⁷.

Der Tissue Factor ist eine Hauptkomponente um die Integrität des Hochdruck-Zirkulationsystems aufrecht zu erhalten. Es hat sich gezeigt, dass dieses Protein in drei Bereichen existiert: 1. in der Adventitia und den glatten Muskelzellen der Gefäßwand; 2. induzierbar in den Zellen des endovaskulären Kompartiments, inklusive Monozyten, Granulozyten und Endothelzellen^{38,39}; 3. Ein Teil der Mikropartikel, die im Blut zirkulieren, enthalten Tissue Factor⁴⁰. Jedes dieser Tissue-Factor-Kompartimente spielt eine unterschiedliche Rolle in der Hämostase und Thrombose, abhängig von Lokalisation und Auslösemechanismus des pathologischen Ereignisses⁴¹.

1.5.4. Leukozytenrekrutierung und Rolle des angeborenen Immunsystems

An der Thrombusbildung sind nicht nur die Blutgerinnung und Thrombozyten beteiligt, sondern auch Leukozyten. Diese haben einen großen Anteil an den rekrutierten Zellen bei der Entstehung eines Thrombus nach Flussreduktion. Leukozyten lagern sich in Schichten oder Haufen an das intakte Endothel an. Durch elektronenmikroskopische und histologische Untersuchungen wurde gezeigt, dass Leukozyten bereits schon sechs Stunden nach Flussreduktion in großen Mengen rekrutiert werden. Um die Dynamik der Leukozytenrekrutierung weiter zu untersuchen, wurden Versuche mit einem intravitalem Immunfluoreszenzmikroskop und einem zwei-Photonen-Mikroskop gemacht. Dadurch wurde gezeigt, dass Leukozyten schon eine Stunde nach Flussreduktion damit beginnen, an der Gefäßwand entlang zu rollen und am Endothel adhärent zu werden. Die Anhäufung der Leukozyten nimmt mit der Zeit zu, nach fünf bis sechs Stunden ist praktisch die gesamte

Endotheloberfläche bedeckt. Dies legt nahe, dass die deutliche Leukozytenakkumulation die Entwicklung der venösen Thrombose einleitet¹².

An der Gerinnungsbildung sind auch Zellen des angeborenen Immunsystems beteiligt⁶. Monozyten und neutrophile Granulozyten werden bei venöser Thrombose beide schnell an die Gefäßwand rekrutiert und/oder während der Thrombusentstehung in das wachsende, intravasale Gerinnsel integriert. Die molekularen und zellulären Kaskaden, welche die Leukozytenakkumulation während der Gerinnungsbildung initiieren sind abhängig vom Auslöser der Thrombusentstehung^{23,42}. Bei Gefäßverletzung werden Thrombozyten als erste an den Ort der exponierten subendothelialen Matrix rekrutiert. Sind sie aktiviert, exprimieren sie Adhäsionsrezeptoren und setzen Chemokine frei, wodurch Zellen des angeborenen Immunsystems angelockt werden^{23,42,43}. Im Gegensatz dazu bleiben Endothelzellen während der Entstehung der TVT in den meisten Fällen morphologisch intakt. Bei der Stase-induzierten TVT bekommen sie durch Aktivierung eine pro-inflammatorische Oberfläche, durch die die Zellen des angeborenen Immunsystems rekrutiert werden¹². Die TVT entsteht hierbei also durch eine inflammatorische Reaktion auf die Stase.

1.6. Thromboseinduktion in Tiermodellen

Um die Entstehung der venösen Thrombose und deren Mechanismen genauer zu untersuchen werden Mausmodelle herangezogen. Es gibt verschiedene Thrombosemodelle, die auf unterschiedliche Auslöser für venöse Thrombose eingehen.

1.6.1. Eisen-Chlorid Modell

Bei diesem Modell wird die Thrombose durch die Anwendung von 10%igem FeCl₃ an der V. jugularis induziert^{44,45}. Die daraus resultierende Gefäßwandverletzung führt zur Bildung von okklusiven Thromben⁴⁶. Dieses Modell produziert zuverlässig Thromben innerhalb von Minuten nach der Verletzung. Die Größe und Geschwindigkeit der Thrombusbildung ist von der Konzentration des FeCl₃ und der Expositionszeit abhängig. Im Allgemeinen sind die resultierenden Thromben kleiner als die durch Stase erzeugten. Ein Nachteil dieses Modells ist die Produktion von transmuralen Venenwandverletzung, die nur eine Minderheit von klinischen Fällen der venösen Thrombose imitiert⁴⁷.

1.6.2. Vena cava caudalis-Ligatur Modell

Bei diesem Modell wird die Thrombose durch kompletten Stillstand des Blutflusses initiiert. Dabei kommt es allerdings zu einer schweren Verletzung der Venenwand⁴⁸⁻⁵¹. Um in der Vena cava caudalis die komplette Stase zu erzeugen wird diese kaudal der linken Nierenvene ligiert^{48-50,52}. Dieses Modell bietet reproduzierbare Thrombusgewichte, außerdem hat es sich als sehr wertvoll erwiesen bei der Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen der Venenwand und dem Thrombus während der Entwicklung einer akuten zu einer chronischen Entzündung. Nachteil dieses Modells ist der fehlende Blutfluss⁴⁷.

1.6.3 Vena cava caudalis-Stenose Modell

Dieses Modell wird verwendet, um akute und chronische venöse Thrombosen zu untersuchen^{53,54}. Es verbindet eine externe Kompression der Vene mit einer Reduktion des Blutflusses. Dadurch werden laminare Thromben zu einem frühen Zeitpunkt produziert. Außerdem wurde dieses Modell zur Erforschung der Kinetik der Thrombogenese genutzt und um die Wirksamkeit von therapeutischen Wirkstoffen zu studieren^{55,56}. Die Reduktion des Blutflusses wird durch die Ligatur der Vena cava caudalis herbeigeführt, bei der ein Platzhalter den kompletten Verschluss der Vene verhindert⁵⁷. Ein wesentlicher Nachteil dieses Modells sind die großen Unterschiede in der Größe der Thromben und die Abwesenheit von Thromben in einigen Mäusen. Dieses Modell ist allerdings am besten zur Analyse der Initiierung der venösen Thrombose geeignet⁴⁷, weshalb es in dieser Arbeit verwendet wurde.

2. Das Komplementsystem

2.1. Bestandteile und Aufgaben

In den letzten Jahren ist das Interesse am Komplementsystem als Mediator für entzündliche Prozesse im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen gewachsen⁵⁸. Das Komplementsystem ist Teil der angeborenen Immunität und erlaubt eine effektive Erkennung und Ausschaltung von Pathogenen⁵⁹.

Die ersten Beobachtungen über das Komplementsystem wurden zwischen 1884 und 1894

beschrieben. 1888 demonstrierte Nuttal, dass frisches Plasma eine bakterizide Wirkung besitzt, die durch Erhitzung auf 55° C ausgeschaltet werden kann⁶⁰. Später zeigte Bordet, dass die bakterizide Wirkung des hitzebehandelten und dadurch unwirksam gewordenen Immuserums wiederhergestellt werden kann durch Zugabe von frischem nichtimmunem Serum⁶¹. Ehrlich und Morgenroth zeigten, dass es zwei Komponenten im Blut gibt die hauptsächlich bakterizid wirken. Die erste war eine hitze-stabile Komponente, die „antiboreceptors“ (Antikörper) genannt wurde. Die zweite war eine hitze-labile Komponente, die „Komplement“ genannt wurde^{61,62}.

Das Komplementsystem enthält mehr als 30 plasma- und zellgebundene Proteine. Diese arbeiten wenn nötig zusammen, um eine Entzündung zu fördern und Eindringlinge zu schädigen, wie z.B. Mikroben oder körperfremde Zellen^{58,63,64}. Die meisten Proteine werden in der Leber synthetisiert, aber sie können auch von Endothel- und Epithelzellen, Fibroblasten sowie hauptsächlich von Makrophagen am Ort der Entzündung gebildet werden⁵⁹.

2.2. Aktivierung des Komplementsystems

Lösliche Komplementproteine zirkulieren normalerweise als Protease-Zymogene oder in inaktiver aber aktivierbarer Form im Blut. Nach der Aktivierung können die Proteasen spezifische nachgeschaltete Ziele spalten, interagieren mit anderen Proteinen, initiieren Verstärkungskaskaden oder setzen Anaphylatoxine frei. Es können nur ein Signalweg oder alle drei parallel aktiviert werden⁶⁵.

Die drei Signalwege zur Aktivierung des Komplementsystem sind (Abb. 3): der „Klassische Weg“, der die Proteine C1, C4, C2 und C3 einschließt; der „Alternative Weg“, unter der Beteiligung von C3 und den Proteinfaktoren B, D, P; und der „Lektin Signalweg“, unter der Beteiligung vom Mannose-binding Lektin (MBL und MBL-assoziierte Proteasen)⁶⁶. Alle drei Wege enden mit der Umwandlung von C3, dem wichtigsten Komplementprotein, und danach in der Aktivierung des terminalen Signalwegs und der Entstehung des Membran-Attack-Complex (MAC). Die Komplementaktivierung resultiert auch in der Ablagerung von Proteinfragmenten auf die Zelloberfläche von Zielzellen, um diese für die Phagozytose durch Makrophagen zu markieren⁶⁵.

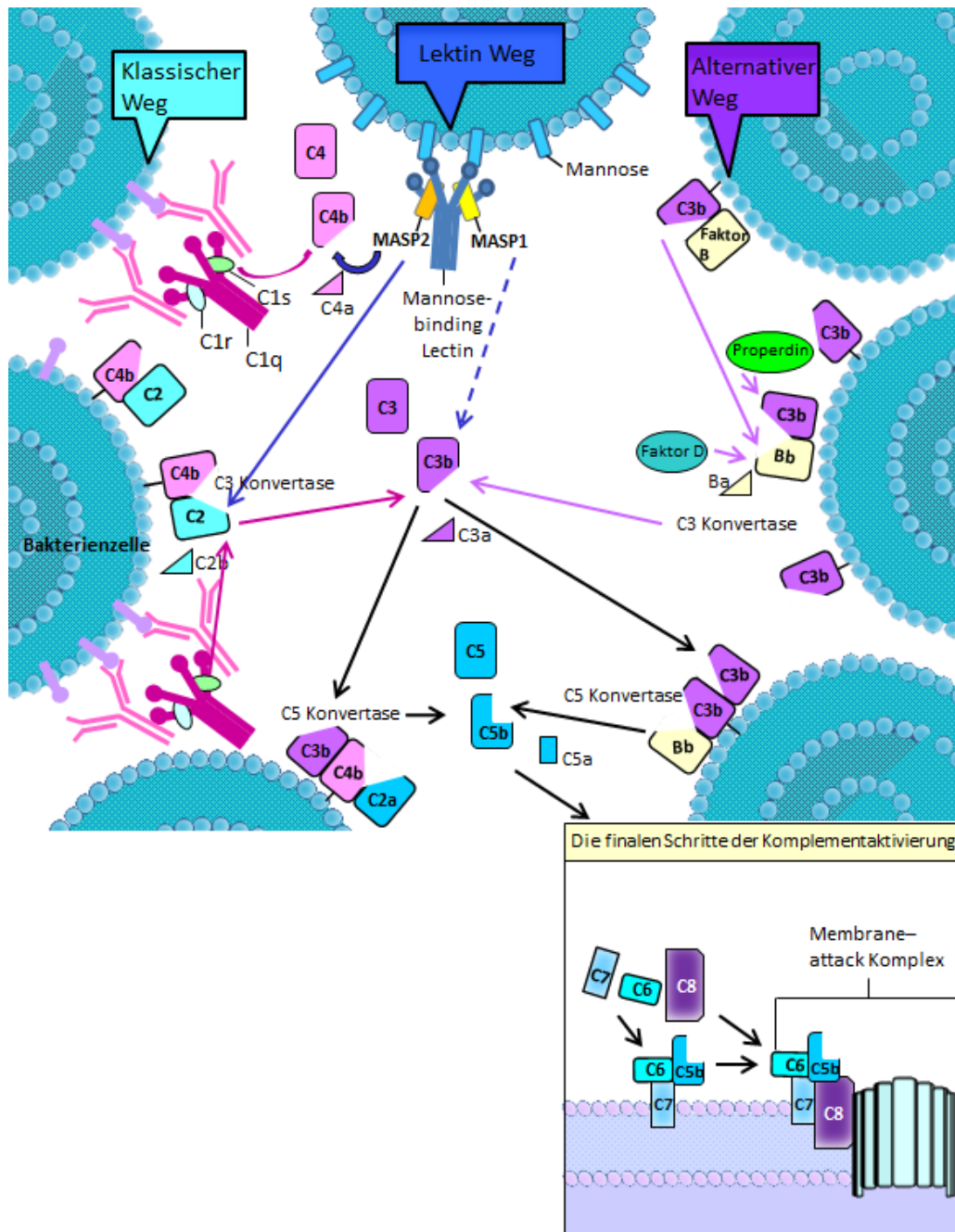


Abbildung 3: Aktivierung des Komplementsystems

2.2.1. Der Klassische Aktivierungsweg

Der Klassische Signalweg wird aktiviert über den C1-Komplex, der sich aus dem Erkennungsmolekül C1q und den beiden Serin-Protease Proenzymen C1r und C1s zusammensetzt. Der Komplex bildet sich unter der Anwesenheit von Kalzium-Ionen⁶⁷. C1q kann an antigengebundene-IgG und IgM Antikörper binden, genauso wie an eine Vielfalt von

nicht-immunglobulin Aktivatoren⁶⁸. Nachdem C1q an die Zieloberfläche gebunden hat, erfährt es eine Konformationsumwandlung, die das C1r Zymogen autoaktiviert. Anschließend spaltet und aktiviert das C1r Molekül die zwei C1s Moleküle, um die aktive C1s Serin-Protease zu bilden^{69,70}. Das aktivierte C1s spaltet C4 und C2, um die C3-Konvertase, C4b2a, zu generieren. Wenn C3 aktiviert ist, kann das Hauptfragment C3b kovalent an die Zieloberfläche binden oder an C4b im C4b2a-Komplex. Die letztere Reaktion bildet die C5-Konvertase, C4b3b2a, und den terminalen Signalweg⁶⁵.

2.2.1.1. C1q

Humanes C1q ist ein 460 kDa schweres Multimer, welches aus 6 Untereinheiten besteht (Abb. 4). Jede Untereinheit setzt sich aus drei homologen Polypeptidketten (A, B und C) zusammen. Die A, B und C Ketten haben alle eine kollagenähnliche Region am N-Terminus und einen kugelförmigen Bereich (gHA, gHB, gHC) am C-Terminus. Die A und B Ketten innerhalb der Untereinheit, sind über eine Disulfidbrücke am N-Terminus verbunden. Die C Kette hält die Untereinheit durch eine Disulfidverbindung zu einer C Kette einer anderen ABC Untereinheit zusammen. So wird eine dimere Untereinheit gebildet, an der die kollagenähnlichen Regionen der sechs Ketten diese zu einer Tripelhelix-Struktur verbinden^{71,72}.

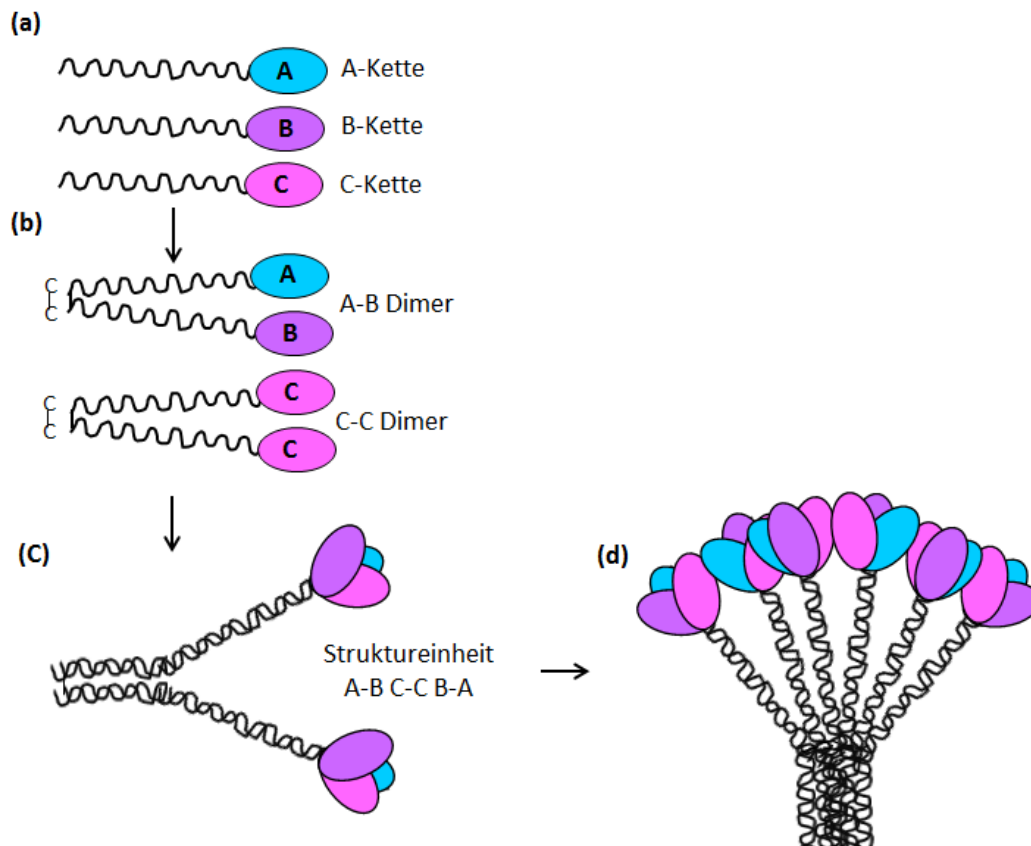


Abbildung 4: Aufbau des C1q-Moleküls

In Abbildung 4 ist der Aufbau des C1q-Moleküls zu sehen. In (a) sind die A, B und C Ketten dargestellt, mit dem N-Terminal auf der einen, dem C-Terminal auf der anderen Seite und der dazwischen befindlichen kollagenähnlichen Region. In (b) werden die durch Sulfidbrücken entstandenen A-B und C-C Dimere gezeigt. Zwei A-B und ein C-C Dimer zusammen (ABC-CBA) bilden die Tulpenstruktur (c) des C1q⁷³. (d) zeigt die heterotrimere Struktur. Die drei gC1q Module zeigen klare Unterschiede in ihren elektrostatischen Oberflächenpotentialen, was teilweise die Unterschiede in der Ligandenerkennung erklärt⁷⁴.

Die Plasmakonzentration von humanem C1q beträgt im Mittelwert 115 $\mu\text{g/ml}$ ⁷⁵. Es zirkuliert im gesamten Plasma als kalziumionen-abhängiger Komplex mit dem C1r2-C1s2 Tetramer. C1q bindet an den Aktivator über seine C-Terminus Kopfregion (gC1q). Wenn zwei oder mehr gC1q gebunden wurden, wird dadurch eine Konformationsänderung an den kollagenähnlichen Regionen induziert, was in einer Autoaktivierung von C1r resultiert. C1q bindet an geladene Gruppen und hydrophobe Regionen und hat eine breite Palette von Aktivatoren. Es bindet spezifisch an die Fc Regionen von IgG und IgM in Immunkomplexen. Die Bindung von C1q, mit mehreren Köpfen, an ein antigengebundenes pentametrices oder

hexametrisches IgM kann in der C1 Aktivierung resultieren. Es kann nur ein Kopf an ein IgG binden, darum sind zwei oder mehr antigengebundene IgG nötig für die Aktivierung. Die Bindung des C1q an ein IgG Monomer ist labil, aber die Bindung mehrerer gC1q an mehrere, nah beieinanderliegende, antigengebundene IgG hat eine hohe Affinität⁷⁶. C1q kann auch an Aktivatoren binden, die keine Immunglobuline sind, wie z.B. an Nukleinsäuren, Chromatin, zytoplasmatische Intermediärfilamente, mitochondriale Membranen, mitochondriale Proteine, Kardiolipin, ligandengebundene C-reaktive Proteine (CRP) und Amyloide^{68,77}. C1q bindet auch an viele synthetische Partikel, z.B. an Kohlenstoffnanoröhrchen und an verschiedene Polymere^{78,79}.

2.2.2. Der Alternative Aktivierungsweg

Der „Alternative Signalweg“ wird direkt aktiviert durch Kontakt mit verschiedenen Typen von komplexen Kohlehydrat-Strukturen, die an der Oberfläche von Bakterien, Hefen und vielzelligen Parasiten präsentiert werden. Auch wird dieser Signalweg durch Antikörper-Antigen-Komplexe, die IgG oder polymere IgA enthalten, und von vielen synthetischen Materialien aktiviert⁶⁸. Im „Alternativen Signalweg“ gibt es kein Hauptmolekül, wie z.B. das C1q im Klassischen Signalweg. Stattdessen wird der „Alternative Signalweg“ aktiviert durch die spontane niedrig-Level Hydrolyse von C3 im Plasma um C3(H₂O) zu bilden. Dieser Prozess tritt auf, wenn kleine nukleophile Moleküle, wie z.B. Wasser oder Ammoniak, den Thioester des unaktivierten C3 im Plasma attackieren. Das resultierende C3(H₂O) Molekül ist ähnlich in Konformation und Funktion dem C3b. Es kann einen Mg²⁺-abhängigen Komplex mit Faktor B bilden, welcher später von Faktor D gespalten wird. Dadurch wird Ba freigesetzt. Bb, eine aktive Serinprotease, bleibt an C3(H₂O) gebunden zurück. Dieser flüssig-Phase Komplex, C3(H₂O)Bb, funktioniert als C3-Konvertase des „Alternativen Signalwegs“ und spaltet C3 in C3b, welches dann kovalent und zufällig auf benachbarte Zelloberflächen angeheftet wird. Faktor B kann dann Mg²⁺-abhängig oberflächengebundenes C3b binden, um C3bB zu bilden. Das wiederum von Faktor D gespalten werden kann um die oberflächengebundene C3-Konvertase, C3bBb, des „Alternativen Signalwegs“ zu bilden. Die Konvertase kann mehr C3 spalten, um die positive Rückkopplung für C3 im „Alternativen Signalweg“ zu komplettieren. C3bBb ist homolog zur Konvertase des klassischen Aktivierungswegs, C4b2a, da C4 homolog zu C3 ist und C2 Faktor B entspricht⁶⁵.

C3bBb ist sehr instabil, das Bb spaltet sich von C3b ab mit einer Halbwertszeit von 2-3

Minuten. Properdin jedoch verlangsamt diese Spaltung des Komplexes^{80,81} und verstärkt damit die Aktivierung des Komplementsystems. Properdin bindet zuerst an oberflächengebundenes C3b und beschleunigt die Bindung des Faktor B an C3b um den C3bB-Komplex zu bilden. Faktor B kann dann durch Faktor D gespalten werden um C3bBb zu bilden, die stabilisierte C3-Konvertase⁸². Weiter Studien haben gezeigt, dass Properdin ein Initiator-molekül für den „Alternativen Aktivierungsweg“ sein könnte, in dem Properdin direkt an Oberflächen der Zielzelle binden kann und die Bindung zu C3b und danach zu Faktor B ermöglicht, um die C3-Konvertase zu bilden⁸³. Die kovalente Bindung eines weiteren C3b-Moleküls zum C3bBb-Komplex, der C3-Konvertase, führt zur Bildung des C3bBb3b-Komplexes, der C5-Konvertase des „Alternativen Aktivierungsweges“. Obwohl Properdin in seiner Struktur dem C1q nicht ähnelt, ist es multimerisch und hat funktionelle Ähnlichkeit, da es mehrere Bindungsstellen besitzt, die Pathogene und andere schädigende Einflüsse erkennen können⁶⁵.

2.2.3. Der Lektin Aktivierungsweg

Der „Lektin Signalweg“ wird initiiert durch die Bindung von Mannose-binding-lectin (MBL) an Kohlehydrat-Gruppen an der Oberfläche von Bakterienzellen⁸⁴. MBL hat eine ähnliche Struktur wie C1q, mit einem zentralen Kernstück und mehreren darum angeordneten Armen die aus einer flexiblen Tripelhelix bestehen. Jedes Ende ist mit einer Bindungsstelle versehen. Im Unterschied zur C1q Helix, enthält die Helix des MBL drei Kopien einer Einzelkette. MBL zirkuliert als eine Reihe von Multimeren die entweder zwei, vier oder sechs Arme besitzen. MBL ist ein typisches Mustererkennungsmolekül, das dazu dient die MBL-assoziierten Serin Proteasen (MASP) 1, 2 und 3 anzuheften, um so ihre Serin-Esterase-Aktivität anzuregen. MASP-2 ist die wichtigste Serinprotease bei der Aktivierung der Komplementkaskade. Sobald sie aktiviert sind, spalten und aktivieren die MASPs C4 und C2, die wiederum die C3-Konvertase, C4bC2a, bilden^{85,86}. MASP-2 ist die Enzymkomponente, welche wie C1q im „Klassischen Aktivierungsweg“, die Komponenten C4 und C2 spaltet um die C3-Konvertase zu bilden, der gemeinsame Schritt in der Aktivierung des „Lektin“ und „Klassischen Aktivierungsweges“. Alternativ kann die MASP-1 C3 direkt spalten⁸⁶⁻⁸⁸, um dadurch den „Alternativen Aktivierungsweg“ zu initiieren⁸⁷.

2.2.4. Der terminale Komplement-Komplex

Der Aufbau des C5b-9-Komplexes in einer Membran mit Lipiddoppelschicht beginnt mit der Spaltung einer Arg-Leu Bindung in die C5 α -Kette um C5a und C5b zu erzeugen. Obwohl auch eine Verbindung zwischen nativem C5 und C6 besteht, werden C5b6 Komplexe erst gebildet wenn das Fragment C5b sich mit C6 verbindet. Der C5b6 Komplex kann dann reversibel durch ionische und auch hydrophobe Einflüsse an die Membranen binden. Die folgenden Interaktionen von C7, C8 und C9 mit C5b6 und der Membran resultieren in der Bildung von heteropolymeren Transmembranporen. Diese Poren Konstruktion erfolgt über verschiedene Phasen, in denen C5b-7, C5b-8 und C5b-9 gebildet werden. Diese Komplexe zusammen werden als terminaler Komplement-Komplex bezeichnet (TCC), während C5b-9, der finale und effektivste Komplex bei der Induzierung des Zelltodes, als Membrane-Attack-Complex (MAC) bezeichnet wird⁸⁹⁻⁹².

2.3. Funktionen des Komplementsystems

2.3.1. Zellyse

Verschiedene Moleküle und Komplexe, welche aus der Aktivierung des Komplementsystems hervorgehen, entfalten die für das Komplementsystem charakteristischen Wirkungen. Die Porenbildung durch C5b-9 kann durch Wasser- und Ioneneinstrom zur Zellyse führen. Ist die Anzahl der C5b-9 Komplexe limitiert auf kernhaltigen, körpereigenen Zellen, welche geschützt sind vor der Lyse durch Regulatoren, können diese aktiviert und Signaltransduktionswege induziert werden⁹³.

2.3.2. Opsonisierung

Der Prozess, bei dem Oberflächen von Zellen mit Molekülen wie Immunglobulinen oder Komplementkomponenten markiert werden und somit für Phagozyten erkennbar gemacht werden, wird als Opsonisierung bezeichnet. C3b, das stärkste Opsonin des Körpers, bindet im Rahmen der Komplementaktivierung an die Oberfläche einer Zielzelle. Die

Komplementrezeptoren auf Phagozyten erkennen die durch C3b markierte Zelle. Es folgt die Phagozytose der opsonisierten Zellen⁹⁴.

2.3.3. Anaphylatoxine

C3a und C5a sind Anaphylatoxine, sie locken Makrophagen, Monozyten und Leukozyten an, und erhöhen über eine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen und Zytokinen in Endothelzellen die Gefäßpermeabilität⁹⁵. Durch sie werden auch die Vasodilatation und die Kontraktion glatter Muskelzellen reguliert. Über die Anaphylatoxinrezeptoren C3aR, C5aR und C5L2 (C5a receptor-like-2) auf Eosinophilen, Basophilen, Monozyten, Makrophagen, Mastzellen, dendritischen Zellen, Endothelzellen, glatten Muskelzellen, sowie aktivierten B- und T-Lymphozyten wird ihre proinflammatorische Wirkung vermittelt⁹⁶.

2.3.4. Beseitigung von Immunkomplexen

Das Komplementsystem ist auch an der Beseitigung von apoptotischen Zellen und Immunkomplexen beteiligt⁹⁶. C1q bindet an die veränderte Oberfläche von apoptotischen Zellen, entweder direkt oder indirekt über CRP oder IgM. Die veränderten Zellen weisen bestimmte Regulatoren nicht mehr auf, dadurch wird, anders als in gesunden Zellen, eine Komplementaktivierung und Opsonisierung mit C3b und C4b an ihrer Oberfläche möglich⁹⁴. Zur Phagozytose kommt es über die Interaktion mit Komplementrezeptoren auf Makrophagen. Auf apoptotischen Zellen werden aber auch noch einige Regulatoren exprimiert und limitieren mit Faktor H eine weitere Komplementaktivierung. Dadurch kommt es nicht zur C5-Konvertasenbildung und einer weiteren Komplementwirkung⁹⁶.

2.3.5. Interaktion mit dem erworbenen Immunsystem

Mittels Komplement kann die angeborene Immunabwehr die erworbene Immunabwehr gegen ein bestimmtes Antigen induzieren und stimulieren. Der Komplementrezeptor CR2, welcher

C3d, ein Abbauprodukt von C3 erkennt, wird auf B-Lymphozyten exprimiert. CR3 wirkt als Korezeptor, indem er C3d gleichzeitig mit der spezifischen Bindung zwischen Ig-Rezeptor der B-Zelle und dem Antigen bindet. Durch die Zweifachbindung der B-Zelle an das Antigen kommt es zu deren Aktivierung, zur Antikörperproduktion und somit zur Stimulation der humoralen Immunantwort. In follikulären Keimzentren kommt es auch zur komplementvermittelten Aktivierung von B-Zellen. Immunkomplexe, die durch das Komplementsystem markiert wurden, werden von dendritischen Zellen in Keimzentren erkannt und das entsprechende Antigen an B-Lymphozyten präsentiert⁹⁷.

2.4. Regulierung des Komplementsystems

Gelöste und zellgebundene Komplement-Regulatoren helfen die Angriffe des Komplementsystems zu kontrollieren. Außerdem passen sie die Intensität, die Ausbreitung und das Ende des Angriffs an die Zielzelle an⁹⁸. Zusätzlich zum C1-Esterase-Inhibitor gibt es ein Glykoprotein aus der Serpin-Familie, welches verschiedene Proteasen des „Klassischen“ und des „Lektin Wegs“ inhibiert. Es wurden noch zwei andere Modulatoren des „Lektin Wegs“ identifiziert: sMAP und MAP-1 sind nicht-proteolytische Spaltprodukte der MASP2 und MASP1/3 Gene, die offenbar mit den MASPs um die Bindung an MBL konkurrieren. Der C2-Rezeptor-Inhibitor-Trispanning bindet auch an C2 und hemmt seine Aktivierung durch C1s⁹⁹. Im „Alternativen Weg“ wird die Aktivierung hauptsächlich vom reichlich vorhandenen Faktor H und seinem Homolog, dem Faktor-H-like-Protein gesteuert. Faktor H wirkt auf die C3-Konvertase des „Alternativen Wegs“, entweder entfernt es kompetitiv Bb aus dem C3bBb-Komplex, was zu einer Zerfallbeschleunigung führt, oder es wirkt als Kofaktor für den Faktor I vermittelten Abbau von C3b. Ein anderer Flüssige-Phase-Regulator, das C4b-binding-Protein, hat ähnliche Effekte auf die Konvertasen des „Klassischen“ und „Lektin-Wegs“. Faktor H, das Faktor-H-like-Protein und das C4b-binding-Protein unterstützen die Komplementregulationen auch auf humanen Zellen. Sie erkennen spezifische Oberflächenstrukturen der Wirtszellen, dadurch kommt es zur Verhinderung von Autoimmunschädigungen⁹⁴. Die meisten humanen Zellen setzen Konvertase-Regulatoren frei, die als Zerfalls-Beschleuniger wirken, wie z.B. CR1 oder der decay-accelerating Faktor, oder als Kofaktor für Faktor I, wie CR1 oder das Membran-Kofaktor-Protein^{98,100}. Es wurden nur wenige C5-spezifische Regulatoren beschrieben. Während das Faktor-H-related-Protein 1 direkt an C5 bindet und die C5-Konvertasenaktivierung inhibiert, reguliert der

Komplementrezeptor der Immunglobulin-Superfamilie die C3b-haltigen C3- und C5-Konvertasen, obwohl die physiologischen Auswirkungen unbekannt sind. Der zellbasierte Regulator, CD59 wirkt auf den TCC durch die Verhinderung der Bildung der sublytischen und lytischen Komplexe. Zusätzlich wird der TCC kontrolliert durch lösliche Regulatoren, wie z.B. Vitronectin und Clusterin. Abschließend wandelt die Carboxypeptidas-N die Anaphylatoxine in ihre dearginierte Form um. Obwohl diese Spaltung durch die primären Rezeptoren C3aR und C5aR übermittelt wird, verschiebt sich das Signalmuster^{101,102}.

3. Interaktion von Komplement- und Gerinnungssystem

Unser schnell wachsendes Verständnis der Biologie des Komplementsystems und der Hämostase weist darauf hin, dass mehrere interessante Interaktionen zwischen den beiden Systemen bestehen. Dank neuester Studien können beide Systeme als Beteiligte bei der Entstehung von Entzündungen gesehen werden, deren Ziel es ist ein lebendes System zu stabilisieren, welches verschiedenen Störungen in seiner Hämostase ausgesetzt ist. Die Komplementkaskade wird durch die gleichen Stimuli aktiviert, die auch zu einer Entzündung führen, z.B. wenn die Gefahr einer Infektion erkannt wird, oder Gewebe beschädigt wird¹⁰³. Diese Situationen gehen im Allgemeinen auch mit einer erhöhten Neigung zur Blutgerinnung einher¹⁰⁴. Gerinnung und Komplementsystem weisen zahlreiche Ähnlichkeiten auf, auch ist eine stetig steigende Zahl von Wechselwirkung zwischen beiden Systemen bekannt. Es kommt zu einer kaskadenartigen Aktivierung von Serinproteasen bei beiden Systemen, mit teilweise gemeinsamen Aktivatoren und Inhibitoren. In-vitro-Versuche zeigten, dass Thrombin, Plasmin, FXa und FXIa sowohl C3, als auch C5 spalten können^{94,105}. In Tiermodellen mit C3-knockout Mäusen konnte gezeigt werden, dass trotz fehlendem C3 eine physiologisch aktive C5-Konvertase generiert werden kann. Außerdem konnte in humanem Plasma, nach Inkubation von C5 mit Thrombin, biologisch aktives C5a nachgewiesen werden¹⁰⁶. Über die Aktivierung von C1q kann FXIIa den „Klassischen Weg“ einleiten¹⁰⁵. Neben den bisherigen drei Wegen, könnte die direkte Aktivierung von Komplementkomponenten durch Gerinnungsfaktoren, einen zusätzlichen Aktivierungsweg des Komplementsystems darstellen¹⁰⁶.

Umgekehrt kann auch das Gerinnungssystem durch Komplementfaktoren beeinflusst werden. C5a induziert die Expression von Tissue-Factor in Leukozyten und Endothelzellen und wirkt

damit prothrombotisch⁷. Gleichzeitig stimuliert C5a die Bildung von PAI-1 in Makrophagen, Mastzellen und glatten Muskelzellen⁹⁶. C3a wiederum induziert die Thrombozytenaktivierung- und aggregation⁷. Ebenfalls werden Thrombozyten aktiviert durch die Einlagerung des C5b-9-Komplexes in Zellmembranen, ihre Granulafreisetzung wird stimuliert und es kommt zu Veränderungen der Zellmembranen mit Exposition von gerinnungsfördernden Lipiden⁷. MASP-2 ist in der Lage, Prothrombin zu aktivem Thrombin zu spalten, MASP-1 beeinflusst die Fibrinstruktur und aktiviert Prothrombin, FXIII und TAFI¹⁰⁷⁻¹⁰⁹. Auch sind Wechselwirkungen zwischen regulierenden Faktoren von Gerinnung und Komplement bekannt. Die Inaktivierung von Protein S und somit die Hemmung dieses wichtigen antikoagulatorischen Pfades löst die Bindung von Protein S an C4b-bindendes Protein aus. Faktor XII und Kallikrein werden direkt durch den C1-Inhibitor gehemmt⁹⁵. Das Ziel der direkten Interaktion zwischen und simultanen Aktivierung von Komplementsystem und Gerinnung könnte der Schutz des Körpers vor Blutverlust bei einer Verletzung sowie Schutz vor Infektionen durch Verhinderung der hämatogenen Mikrobenstreuung mittels lokaler Thrombenbildung sein^{94,105}.

III. ZIELSETZUNG

Es ist das Ziel dieser Arbeit, erste Erkenntnisse über die Rolle einzelner Komplementkomponenten bei der Entstehung der tiefen Venenthrombose zu gewinnen. Diese erfolgt insbesondere im Hinblick auf die Entwicklung neuer Therapieoptionen für die Prophylaxe und Therapie der tiefen Venenthrombose. Hierfür wurden spezielle knock-out Mauslinien verwendet, denen bestimmte Komplementkomponenten fehlen, und diese wurden mittels des Fluss-Reduktions-Modells an der Vena cava caudalis untersucht. Als Parameter für die Thrombusentstehung wurde das Thrombusgewicht ermittelt. Darüber hinaus dienten verschiedenen Blutanalysen, Schwanzblutungszeiten, IVM und immunhistologische Untersuchungen einer Analyse der koagulatorischen Eigenschaften der verschiedenen knock-out Mauslinien, sowie einer weitergehenden Beurteilung der Rolle des Komplementsystems bei der durch Stase ausgelösten TVT.

Untersuchung der Rolle von Komplementfaktoren bei der venösen Thrombose

Um den prinzipiellen Einfluss des Komplementsystems auf die Entstehung der venösen Thrombose zu analysieren, sollen im Stenosemodell vergleichend die Inzidenz der Thrombusbildung und die Gewichte der nach 48 h entstandenen Thromben untersucht werden.

Mechanismen der komplementvermittelten Zellrekrutierung bei der venösen Thrombose

Hierzu sollen Versuche mit dem IVM durchgeführt werden, um die Mechanismen der komplementvermittelten Zellrekrutierung in den ersten sechs Stunden der venösen Thrombose zu untersuchen.

Interaktion des Komplementsystems mit der Blutgerinnung bei venöser Thrombose

Um den Einfluss des Komplementsystems auf die koagulatorischen Eigenschaften des Blutes bei venöser Thrombose darzustellen, sollen verschiedene Gerinnungsanalysen und Blutbilder analysiert werden.

Einfluss des Komplementsystems auf die Thrombusmorphologie

Um Erkenntnisse über den Einfluss des Komplementsystems auf die Thrombusmorphologie, die zelluläre Zusammensetzung (Leukozyten, Thrombozyten) und über die Menge an Fibrinogen zu erhalten, sollen die 48 h nach Stenosierung der Vena cava caudalis entstandenen Thromben histologisch aufgearbeitet und fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden.

IV. MATERIAL UND METHODEN

1. Versuchstiere

Für diese Arbeit wurden Mäuse als Versuchstiere verwendet, da sich Mäuse durch kostengünstige Haltung, schnelle Generationszeiten und problemlose Aufzucht auszeichnen. Außerdem waren die nötigen Komplement-knockout-Mauslinien, für die Erforschung des Einflusses des Komplementsystems auf die Entstehung der venösen Thrombose, leicht erhältlich und gut zu züchten.

Das vorliegende Tierversuchsvorhaben wurde von der Regierung von Oberbayern gemäß §10 (AZ 55.2-1-54-2532.3-38-10) und § 7 (AZ 55.2-1-54-2532-30-13) des Deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchg. in der Fassung vom 25.05.1998) genehmigt.

1.1. Haltungsbedingungen

Die Versuchstiere stammen aus eigener Zucht und wurden in einer spezifisch pathogenfreien Haltung betreut. Dabei wurden die Tiere getrennt nach Stämmen in leicht zu reinigenden, sterilisierbaren, durchsichtigen und einzelbelüfteten Makrolonkäfigen gehalten, wobei sich bis zu fünf Mäuse einen Käfig vom Typ III erhöht (Tecniplast, Hohenpreißenberg, Deutschland) teilten. Als Einstreu für die Käfige wurden extra gewaschene und staubbefreite Holzschnitzel (ABEDD, LAV&VET Service GmbH, Wien, Österreich) in der Größe 5x5x1 cm verwendet, welche einmal wöchentlich gewechselt wurden. Als Nestbaumaterial diente Holzwolle aus entrindeter Espe (ABEDD, LAV&VET Service GmbH, Wien, Österreich). Zusätzlich waren die Käfige noch mit kleinen, dreieckigen Häuschen ausgestattet um das natürliche Verhalten der Mäuse zu unterstützen (Mouse House, Tecniplast, Hohenpreißenberg, Deutschland). Alle Tiere erhielten Wasser und Versuchstier R/M-Haltungsfutter, bestehend aus Pellets mit einem Durchmesser von 10 mm und einer Länge von 2 cm, zur freien Verfügung (Ssniff-Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland).

1.2. Hygienemanagement

Um den Gesundheitsstatus der gehaltenen Versuchstiere zu überwachen, werden vierteljährlich Sentinel-Tiere eingeschickt. Dabei handelt es sich um Mäuse des Stammes Balb/c. Diese Tiere werden als spezifiziert pathogenfrei im Alter von vier Wochen bestellt. Um die Pathogenfreiheit zu dokumentieren, wird ein Gesundheitsbericht der Mäuse mitgeschickt. Aus diesem ist ersichtlich, dass die Tiere serologisch, bakteriologisch, parasitologisch und auf Läsionen untersucht und als spezifiziert pathogenfrei beurteilt wurden. Pro Rack werden immer zwei Sentinel-Tiere dazugesetzt, falls eines verstirbt. Pro Woche bekommen die Sentinels aus jedem Käfig der zu überprüfenden Tiere eine esslöffelgroße Portion dreckiger Einstreu in ihre Käfige zugegeben. Bei der Durchführung dieser Prozedur desinfizierten die Tierpfleger die Hände und wechseln die Handschuhe nach jedem Rack, damit keine Keime verschleppt werden. Nach drei Monaten wird ein Sentinel-Tier eingeschickt und nach dem erweiterten Programm der FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations) und auf Trichomonaden untersucht. Das Gesundheitszeugnis wird der Tierhausleitung zugeschickt.

1.3. Mäuse

Da die verwendeten Stämme alle auf einem C57BL/6J Hintergrund beruhen, wurden C57BL/6J Tiere als Kontrollgruppe verwendet. Bei den einzelnen knock-out Stämmen wurden verschiedene Proteine des Komplementsystems ausgeschaltet. Dadurch lässt sich der Einfluss der einzelnen Komplementproteine auf die Entstehung der venösen Thrombose erforschen. Dies lässt Rückschlüsse zu auf ihre Wirkung, besonders im Hinblick auf die Entwicklung neuer Medikamente, um Thrombose vorzubeugen oder zu behandeln.

1.3.1. C57BL/6J-Wildtypiere

Der am häufigsten verwendete Inzuchtstamm ist der C57BL/6J Stamm. Diese Mäuse werden in einer Vielzahl von Forschungsgebieten verwendet, wie z.B. in der kardiovaskulären Biologie. C57BL/6J Tiere wurden in dieser Arbeit als native Kontrolltiere verwendet¹¹⁰.

1.3.2. Knock-out Tiere

1.3.2.1. C1q^{-/-} Tiere

Diese Tiere weisen einen Mangel des C1q Proteins, welches die erste Komponente des „Klassischen Aktivierungswegs“ ist, auf. C1q hat mehrere Aufgaben, es löst die Aktivierung von C2 aus, wodurch C3 und C4 freigesetzt werden. Außerdem spielt C1q beim Abbau von Zelltrümmern und apoptotischen Zellen eine Rolle und hat auch eine direkte opsonisierende Funktion. Menschen mit einer C1q-Defizienz sind für die Autoimmunkrankheit Systemischer Lupus Erythematodes prädisponiert. Bei Mäusen hingegen, denen das C1q Protein fehlt, lassen sich erhöhte Menge an apoptotischen Zellkörpern nachweisen, die Mäuse sind allerdings klinisch gesund¹¹¹.

1.3.2.2. CR2^{-/-} Tiere

Bei diesen Mäusen fehlt das CR2-Gen, dies führt zu einem Mangel der Komplementrezeptoren CR1 und CR2. Diese beiden Rezeptoren werden hauptsächlich auf B-Zellen und folliculären dendritischen Zellen exprimiert. Sie vermitteln Antigen-Bindung und Rückhaltung auf folliculären dendritischen Zellen, außerdem wirken sie als Korezeptoren des B-Zell-Rezeptors¹¹². Die Mäuse sind klinisch gesund.

1.3.2.3. C3^{-/-} Tiere

Bei diesen Mäusen wurde durch einen gezielten Bruch des C3-Gens, die häufigste und wichtigste Komplementkomponente, vollständig ausgeschaltet. Hierdurch kann die zentrale Komponente der drei Aktivierungswege, die C3-Konvertase, nicht mehr gebildet werden¹¹³. Die Mäuse sind klinisch gesund und züchten normal.

1.2.2.4. C4^{-/-}

Diese Mäuse weisen einen gezielten Bruch des C4-Gens auf. Dadurch fehlt die Komplement Komponente C4 vollständig, was dazu führt, dass der „Klassische Aktivierungsweg“ des Komplementsystems nicht aktiviert werden kann. C4 ist neben C3 das zweite kovalente Opsonin des Komplementsystems. Ein Fehlen von C4 beeinträchtigt außerdem die Fähigkeit der C4-Aktivierungsprodukte Antigene an follikulär dendritische Zellen zu binden, um sie für die B-Zell-Aktivierung zu binden. Damit wird die B-Zell- und Antikörperantwort gestört. Es wurde auch nachgewiesen, dass sich eine C4-Defizienz prädisponierend auf Formen der Autoimmunität (z.B. Systemischer Lupus erythematodes) auswirkt^{114,115}. Die Mäuse züchten normal und sind klinisch gesund.

1.3.2.5. C3^{-/-}C4^{-/-}

Bei diesen Mäusen weisen das C3- und das C4-Gen einen gezielten Bruch auf. Dadurch werden die Komplement Komponenten C3 und C4 gleichzeitig ausgeschaltet. C3 ist die zentrale Komponente der drei Aktivierungswege und das Fehlen von C4 verhindert die Aktivierung des Klassischen Weges. Die Mäuse sind klinisch gesund und züchten normal.

2. Operationsdurchführung

2.1. Wahl und Durchführung der Narkose

Es wurde bei den Tieren, die in dieser Arbeit verwendet wurden, explizit darauf geachtet, dass sie während und nach einem Versuch komplett analgetisch abgedeckt und somit keinem unnötigen Leid ausgesetzt waren.

Zur Einleitung der Narkose wurde eine Inhalationsnarkose mit Isofluran (Forene 100%, Abbott GmbH & co.Kg, Wiesbaden) verwendet. Dafür wurde die zu narkotisierende Maus in eine durchsichtige Röhre gesetzt, in die Isofluran zugeführt werden kann. Mit einem Isofluranverdampfer (Völker GmbH, Kaltenkirchen) wurde ein dreiprozentiges Isofluran-Sauerstoff-Gemisch in die Röhre geleitet, bis die Stellreflexe des Tieres erloschen waren (Abb. 5). Danach wurde intraperitoneal eine antagonisierbare Injektionsnarkose verabreicht. Eine Monoanästhesie mit Isofluran wirkt zwar sedierend, hypnotisch und in hohen Dosen auch unterdrückend auf die Schmerzreize, allerdings ist schnell die Toxizitätsgrenze erreicht¹¹⁶.

Da die drei Kriterien einer Allgemeinanästhesie, Bewusstlosigkeit (Hypnose), Muskeler schlaffung (Relaxation) und Aufhebung der Schmerzempfindung (Analgesie), bei therapeutischer Dosierung nicht von einem Injektionsanästhetikum allein erfüllt werden können, wurden drei verschiedene Substanzen miteinander kombiniert¹¹⁶.

Um die Analgesie zu gewährleisten wurde das Opioid Fentanyl eingesetzt. Midazolam ist ein Benzodiazepin und wurde wegen seiner relaxierenden und krampfhemmenden Wirkung verwendet. Dazu wurde Medetomidin, welches ein spezifischer α_2 -Adrenozeptoragonist ist, mit seiner sedativ-hypnotischen Wirkung kombiniert.

Es wurde eine Mischung aus 0,05 mg/kg Fentanyl (Rotexmedica, Trittau), 5,0 mg/kg Midazolam (Hameln Pharmaceuticals GmbH, Hameln) und 0,5mg/kg Medetomidin (Dorbene, Pfizer GmbH, Berlin) intraperitoneal appliziert und dadurch eine leicht steuerbare, risikoarme Narkose eingeleitet. Nach Injektion wurden die Tiere in eine dunkle Box zum Einschlafen verbracht. Das chirurgische Toleranzstadium III₂ wurde nach ca. 20 min erreicht. Zur Aufrechterhaltung der

Narkose wurde bei Bedarf subkutan nachdosiert, zusätzlich wurde die Oxygenierung des Tieres sichergestellt über eine Kopfkammer, durch die auch Isofluran eingeleitet werden kann. Über die Kopfkammer erfolgte das gleichzeitige Absaugen des Narkosegases. Die Narkosetiefe des Tieres wurde ständig durch Überprüfung des Zwischenzehenreflexes, der Atemfrequenz und des Atemtyps kontrolliert. Bei länger dauernden Versuchen, wie z.B. der sechs Stunden IVM, wurde auf jeden Fall nach 60 min nachdosiert, um die komplette Analgesie zu gewährleisten. Um einer Hypothermie des Tieres vorzubeugen wurde ein Tierbewärmungssystem (Heizplatte, DeMeTec GmbH, Langgöns) verwendet.



Abbildung 5: Röhre für die Isoflurannarkose

2.2. Narkoseantagonisierung

Die verwendete Injektionsnarkose ist vollständig antagonisierbar. Dies wurde bei den Versuchen über 48 Stunden zur Entstehung der venösen Thrombose genutzt, da die Tiere nach der Operation wieder aufwachen sollten. Dem Tier wurde nach Ende der Operation und einer Mindestdauer von 60 min nach Verabreichung der Injektionsnarkose ein Gemisch mehrerer Wirkstoffe subkutan injiziert. Es wurde eine Kombination aus Atipamezol (Antisedan, Janssen-Cilag GmbH, Neuss), Naloxon (Hameln Pharma Plus GmbH, Hameln) und Flumazenil (Insera Arzneimittel GmbH, Freiburg) verwendet. Nach ca. 10 min waren die Tiere aus der Narkose erwacht.

2.3. Schmerzmanagement

Während den unter Vollnarkose durchgeführten Operationen und auch bei der intrakardialen Blutabnahme, waren die Tiere durch Fentanyl komplett analgetisch abgedeckt. Zur Schmerzbekämpfung nach dem Erwachen aus der Narkose, wurde den Tieren subkutan 0,1 mg/kg Buprenorphin (Temgesic, Reckitt Benckiser Healthcare, Hull, UK) verabreicht. Da Buprenorphin eine Anflutungszeit von ca. 30 min besitzt, wurde immer darauf geachtet, die Injektion mindestens 30 min vor der Antagonisierung zu verabreichen. Nach 8-12 Stunden wurde die Buprenorphingabe wiederholt. Am ersten Tag nach der Operation wurde drei Mal Buprenorphin appliziert. Am zweiten Tag, also dem Entnahmetag, wurde noch zwei Mal Buprenorphin verabreicht.

2.4. Operationsvorbereitung

Nach der Narkoseeinleitung wurde damit begonnen das Tier an der zu operierenden Stelle zu enthaaren. Dies geschah zuerst mit einer Schermaschine (Ermila Magnum Handy, Wahl GmbH, Unterkirnach) und anschließend mit einer Enthaarungscreme (Veet Haarentfernungscreme, Reckitt Benckiser Deutschland GmbH, Mannheim). Zuletzt wurde die Haut mit Alkohol desinfiziert (Octeniderm Hautantiseptikum, Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt). Um die Hornhaut zu schützen wurden die Augen des Tieres mit Augencreme versehen (Bepanthen Augen und Nasensalbe, Bayer Vital GmbH, Leverkusen). Das Tier wurde in Rückenlage mittels Klebeband (3M Transpore, 3M Deutschland GmbH, Neuss) auf dem Tierbewärmungssystem mit der Schnauze in der Kopfkammer fixiert (Abb. 6).



Abbildung 6: Vorbereitung des Tieres auf die Operation

Die Operation erfolgte unter einem Stereomikroskop (Stemi-2000-C, Zeiss, Jena). Das Operationsfeld wurde durch eine Schwanenhalslampe (Schott-Kaltlichtquelle K1200, Zeiss, Jena) beleuchtet. Das Operationsbesteck bestand aus einem Mikrochirurgischem Instrumentarium (Abb. 7).



Abbildung 7: Mikrochirurgisches Operationsbesteck

2.5. Operationstechnik für die Stenosierung der Vena cava caudalis

Nach Überprüfung, ob der Zwischenzehenreflex ausgeschaltet war, wurde die Bauchhöhle in der Linea alba eröffnet. Das Darmkonvolut wurde neben die Maus auf ein zuvor vorbereitetes erhöhtes Bett aus angefeuchteter Gaze (Gazin Mullkompressen, Lohmann & Rauscher International GmbH & Co. KG, Regensburg) aus der Bauchhöhle hervor gelagert und sofort mit befeuchteter Gaze abgedeckt. Um eine bessere Übersicht der Bauchhöhle zu erlangen, wurde ein Haltefaden (7-0 Prolene, monofil, nicht resorbierbar, ETHICON Products, Norderstedt) am Peritoneum befestigt und gespannt. Nun wurde damit begonnen, die V. cava caudalis zu lokalisieren und stumpf von umliegendem Gewebe freizupräparieren. Das Hauptaugenmerk wurde darauf gelegt, direkt kaudal der Vena renalis sinistra die Vena cava caudalis zu untertunneln und in diesem Bereich von der direkt anliegenden Aorta abdominalis zu trennen, um mittels einer gebogenen Klemme einen Faden (8-0 Premilene, monofil, nicht resorbierbar, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) durchzuführen. Mit diesem Faden wurde eine doppelte Ligatur vorgelegt, darunter ein Platzhalter (Drahtstück eines humanen Herzkatheters) genau in der Mitte der Vene platziert. Durch den Platzhalter wurde ein vollständiger Verschluss der Vene verhindert und das Lumen auf ca. 30% eingeengt. Die Ligatur wurde zugezogen und mit einem einzelnen Knoten gesichert, danach wurde der Platzhalter entfernt und die Enden des Fadens gekürzt. Durch diesen Eingriff wurde die V. cava caudalis stenotisiert und der Blutfluss somit verlangsamt, was die Entstehung einer Thrombose begünstigt. Tiere, bei denen Blutungen auftraten, wurden aus den Versuchsgruppen ausgeschlossen, da nur die Flussverlangsamung ohne Endothelverletzung die TVT herbeiführen sollte. Nach Durchführung der Operation wurde das feuchtgehaltene Darmkonvolut vorsichtig in den Bauchraum zurück verlagert. Das Peritoneum und die Muskulatur wurden mit einer fortlaufenden Naht (7-0 Prolene, monofil, nicht resorbierbar, ETHICON Products, Norderstedt) und die Haut mit einer Einzelknopfnahse wieder verschlossen. Auf die Naht wurde Jodlösung aufgetupft (Abb. 8).

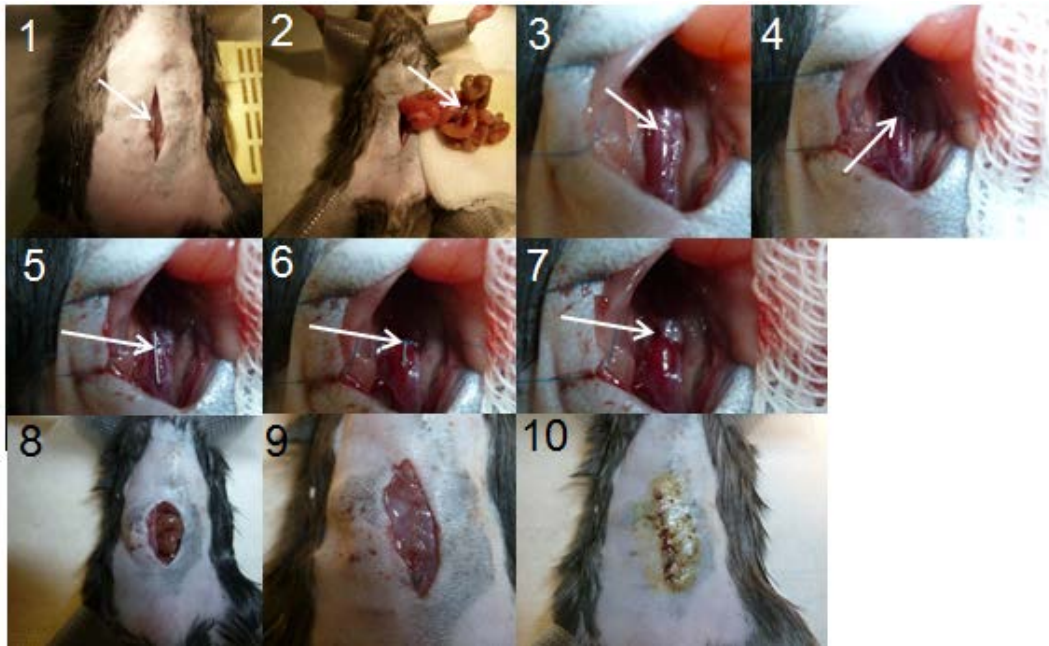


Abbildung 8: Durchführung der Stenosierung der V. cava caudalis

1: Eröffnen der Bauchhöhle in der Linea alba (Pfeil) 2: Hervorverlagern des Darmkonvoluts (Pfeil) 3: Gute Sicht auf die V. cava caudalis (Pfeil) durch Haltefäden 4: Vorlegen der doppelten Ligatur (Pfeil) 5: Platzieren des Platzhalters auf der V. cava caudalis (Pfeil) 6: Schließen der Ligatur und sichern durch einen einfachen Knoten (Pfeil) 7: Entfernen des Platzhalters und Kürzen der Fadenenden (Pfeil) 8: Zurückverlagern des Darmkonvoluts in die Bauchhöhle 9: Verschluss des Peritoneums und der Bauchmuskulatur mit einer fortlaufenden Naht 10: Verschluss der Haut mit Einzelknopfnähten und betupfen der Naht mit Jodlösung.

Die Tiere wurden nach dem Erwachen in einen Käfig verbracht, der mit Tüchern (Kimtech, Kimberley-Clark, Koblenz) ausgelegt wurde, Futter und Wasser standen ihnen zur freien Verfügung. Zur Befriedigung des Nestbautriebes erhielten die Tiere weiche Kosmetiktücher (Kleenex, Kimberly-Clark, Koblenz). Der Käfig wurde zur ständigen Beobachtung in einem Tierhaltungsschrank (Ventilated Cabinet, Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpreißenberg) untergebracht, welches klimatisiert und mit durchsichtigen roten Türen ausgestattet war, damit die Tier jederzeit überwacht werden konnten, dies aber nicht sahen und nicht gestresst wurden.

2.6. Operationstechnik zur Entnahme der Thromben nach 48 Stunden

Nach erneuter Narkoseeinleitung wie unter 2.1. beschrieben wurde die Bauchhöhle lateral der Naht eröffnet und das Darmkonvolut heraus verlagert. Jetzt war es möglich, makroskopisch zu bestimmen, ob sich ein Thrombus gebildet hat. Die V. cava caudalis wurde kranial der Ligatur eröffnet und das Blutgefäßsystem durch intrakardiale Punktion mit 5 ml isotonischer Natriumchlorid-Lösung durchgespült. Dies führt zum Tod des Tieres durch Entbluten und verhinderte, dass sich post mortem Blutgerinnsel bilden konnten. Die V. cava caudalis wurde mit dem enthaltenen Thrombus freipräpariert und von Fettgewebe und Bindegewebe befreit. Auf Höhe des Zuflusses der Venae iliacae communes wurde die V. cava caudalis mit einer weiteren Ligatur verschlossen und somit verhindert, dass der Thrombus abgeschwemmt werden konnte. Kaudal und kranial der Ligaturen wurde die V. cava caudalis abgetrennt und mit dem darin enthaltene Thrombus und der anheftenden Aorta aus der Bauchhöhle entfernt. So wurde sichergestellt, dass immer das gleiche Stück entnommen wurde. Die Vene wurde auf ein Filterpapier gelegt (Abb. 9) und damit gewogen. Auch wenn sich kein Thrombus gebildet hatte, wurde genauso verfahren.

Damit das reine Thrombusgewicht ermittelt werden konnte wurde vorab das Leergewicht der V. cava caudalis, inklusive der beiden Ligaturen und der angehefteten Aorta ermittelt. Dafür wurde bei mehreren Tieren die Operation durchgeführt aber nicht 48 Stunden gewartet, bis sich ein Thrombus gebildet hat, sondern die Vene sofort entnommen, gewogen und der Mittelwert ermittelt. Dieser Mittelwert des Leergewichts wurde vom jeweiligen Gewicht der Vene nach 48 Stunden abgezogen, um das reine Thrombusgewicht zu erhalten. Nach dem Wiegen wurde der Thrombus vom Filterpapier genommen, in Tissue Tek (Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande) eingebettet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Aufbewahrung für die immunhistologische Aufarbeitung erfolgte bei -80°C .

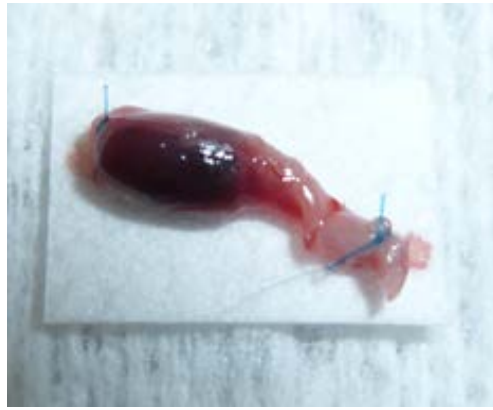


Abbildung 9: Entnommener Thrombus auf Filterpapier

2.7. Dokumentation

Die Operation selbst und auch ob ein Thrombus gebildet wurde und das entsprechende Gewicht wurden auf einem Protokoll vermerkt und anschließend noch in eine Exceltabelle eingetragen.

Auf dem Protokoll wurde die Projektbezeichnung angegeben und für jedes einzelne Tier das Datum des Eingriffs, der Stamm, das Geschlecht, die Herkunft des Tieres, das Geburtsdatum, das Gewicht, welches nach Narkoseeinleitung bestimmt wurde, die Tiernummer, das Alter des Tieres und die Menge der Injektionsnarkosen vermerkt. Außerdem wurde vermerkt ob bei der Präparation der V. cava caudalis eine Blutung aufgetreten war, diese Tiere wurden dann aus der Auswertung genommen, oder ob ein Jugulariskatheter gelegt wurde. Besondere Auffälligkeiten wurden eingetragen. Es wurde protokolliert ob ein Thrombus makroskopisch sichtbar war und sein Gewicht.

Die Tiere, die wieder aufwachten, wurden anhand eines Score Systems überwacht. Es wurden Abweichungen des Allgemeinbefindens, der Nahrungsaufnahme, der Bewegungsaktivität, des Verhaltens, des Kotabsatzes und des Harnabsatzes dokumentiert. Abbruchkriterien für den Versuch wurden genau definiert. Tiere, die aufgrund des Score Systems eine zu hohe Belastung aufwiesen, wurden frühzeitig euthanasiert und aus der Versuchsgruppe ausgeschlossen.

2.8. Operationstechnik Jugulariskatheter

Um dem Tier bei Eingriffen mit einer längeren Dauer, relativ einfach über einen

venösen Zugang Fluoreszenzfarbstoffe oder gefärbte Zellen verabreichen zu können, wurde ein Jugulariskatheter gelegt. Das schon in Narkose liegende Tier wurde vorbereitet indem die Fläche vom Kieferwinkel bis zum Sternum geschoren und mit Enthaarungscreme enthaart wurde, zum Schluss wurde mit Alkohol desinfiziert. Danach wurde die Maus mit dem Kopf in Richtung des Operateurs gelagert. Die Haut wurde rechts paramedian vom rechten Kieferwinkel bis zum Sternum eröffnet. Als nächstes wurde die rechte Glandula mandibularis lokalisiert, stumpf freipräpariert und kranial herausgeklappt. Die Glandula mandibularis wurde auf befeuchtete Gaze gelagert und damit abgedeckt. Die V. jugularis dextra wurde daraufhin lokalisiert und ein Haltefaden (Prolene 7-0, monofil, nicht resorbierbar, ETHICON Products, Norderstedt) daran befestigt, dieser diente auch dazu, den Blutfluss aus seitlichen Zuflüssen zu unterbinden. Der Haltefaden wurde unter Spannung gesetzt, so dass sich die Vene aufspannte und damit leichter zu präparieren war. Die Vene wurde, bis sie kaudal unter der Muskulatur verschwand, freipräpariert. Es wurden drei Ligaturen (Prolene 7-0, monofil, nicht resorbierbar, ETHICON Products, Norderstedt) vorgelegt, alle mit einem doppelten Knoten. Eine weiter kranial, um das Loch in der Vene zu verkleinern, die beiden anderen weiter kaudal, um den Katheter in der Vene zu befestigen und die Vene abzudichten, damit keine Luft in den Blutkreislauf gelangen kann. Der Katheter wurde vorbereitet indem der Katheterschlauch (Portex Polythene Tubing, 0,28mm ID 0,61mm OD, Smiths Medical International, Hythe, UK) mit einer Kanüle (30 G, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) versehen und auf einen Drei-Wege-Hahn (Discofix C, B.Braun, Melsungen) aufgesetzt wurde. Der Katheter wurde mit isotonischer Natriumchloridlösung gespült, bis keine Luftblasen mehr im System waren. Danach wurde der Drei-Wege-Hahn geschlossen um zu verhindern, dass sich neue Luftblasen bildeten. Der komplette Katheter wurde neben der Maus platziert. Die Spannung im Haltefaden der Vene wurde gelöst und mit einer Federschere eine kleine Inzisur in die Vene geschnitten, direkt zwischen der kranialen und den beiden kaudalen Ligaturen. Mit einer Pinzette wurde das angeschrägte Ende des Katheterschlauches in die Öffnung der V. jugularis eingeführt und sofort mit den beiden kaudalen Ligaturen fixiert. Danach wurde die entstandene Öffnung in der Vene mit der kranialen Ligatur verschlossen (Abb. 10). Die korrekte Lage des Katheters wurde kontrolliert indem der Drei-Wege-Hahn geöffnet und eine Probeinjektion mit isotonischer Natriumchloridlösung erfolgte. Der

Katheterschlauch wurde noch mittels Klebeband an der Kopfkammer fixiert, um ein Verrutschen zu verhindern. Der gesamte eröffnete Halsbereich wurde mit befeuchteter Gaze bedeckt und mit Parafilm (Laboratory Film, Bemis Company, Inc, Neenah, Wisconsin, USA) abgedeckt.

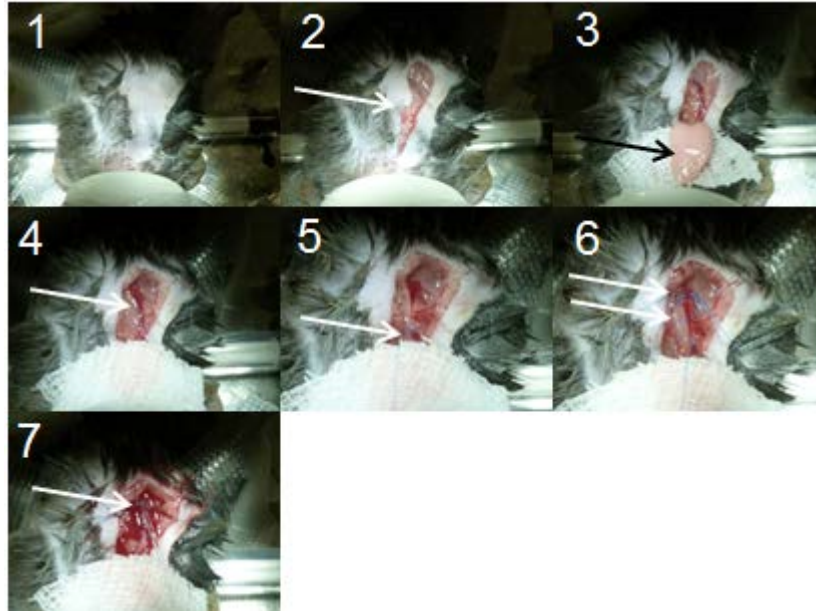


Abbildung 10: Legen eines Jugulariskatheters

1: Vorbereitete Operationsstelle 2: Eröffnen der Haut vom rechten Kieferwinkel bis zum Sternum (Pfeil) 3: Glandula Mandibularis (Pfeil) gelagert auf feuchter Gaze 4: Sicht auf die V. jugularis (Pfeil) 5: Gespannter Haltefaden (Pfeil) an der V. jugularis 6: Vorgelegte Ligaturen (Pfeil) 7: In die V. jugularis eingeführter Katheter (Pfeil)

3. Blutanalysen

3.1. Blutabnahmetechniken

3.1.1. Punktion der Vena facialis

Für diesen Eingriff wurde entweder eine schon für die Operation narkotisierte Maus verwendet, oder dem Tier 30 min vor dem Eingriff 0,1 mg/kg Buprenorphin subkutan verabreicht und danach mit Inhalationsnarkose mittels Isofluran betäubt. Für die Abnahme wurde eine sterile Lanzette (FEATHER BLOOD LANCET, pfm, Köln), ein EDTA-Röhrchen (Microvette, Sarstedt, Nümbrecht) und

Wattestäbchen benötigt. Die Maus wurde mit zwei Fingern im Nacken fest fixiert, die Gesichtshaut dadurch zurückgezogen und somit die Vena facialis gestaut. Mit der sterilen Lanzette wurde die Vene angestochen, in einem Punkt der sich in der Mitte eines Dreiecks, gebildet von Ohr, Auge und dem Kieferwinkel des Tieres, befand. Das austretende Blut wurde mit dem EDTA-Röhrchen aufgefangen. Um den Blutfluss zu stoppen wurde der Stau gelöst und die Einstichstelle mit einem Wattestäbchen komprimiert, um eine Hämatombildung zu vermeiden. Der Maus wurde pro Abnahme ca. 100 µl Blut entzogen.

3.1.2. Intrakardiale Blutabnahme

Für diese Blutabnahmetechnik wurden die Mäuse mit Isofluran und Fentanyl in Narkose versetzt. Die Maus wurde in Rückenlage fixiert und die Haut über dem Sternum eröffnet, so dass der Blick auf die Rippen frei war. Die Punktion des Herzens erfolgt links paramedian, zwischen der zweiten und dritten Rippe. Die Kanüle (26 G, BD Microlance, Becton Dickinson, Heidelberg), mit aufgesetzter Spritze in der sich 170 µl Citrat (Tri-Natriumcitrat-Lösung, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) als Gerinnungshemmer befand, wurde senkrecht eingeführt und dabei leicht aspiriert. Mit dieser Methode konnte eine Menge von ca. 1 bis 2 ml Blut gewonnen werden. Das Tier verstarb meist schon durch den massiven Blutentzug, trotzdem wurde am Ende noch ein Genickbruch durchgeführt, um den sicheren Tod herbei zu führen.

3.2. Großes Blutbild

Zur Erstellung der großen Blutbilder war eine Menge von 100 µl EDTA-Blut nötig. Hierfür wurde das Blut, welches aus der Punktion der V. facialis gewonnen wurde, verwendet. Die Blutbilder wurden vom Zentrallabor des Deutschen Herzzentrums München mit einem Sysmex-Gerät (Sysmex XS800i, Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt) erstellt. Das Blut für die basalen großen Blutbilder wurden jeweils vor der Stenosierung der V. cava caudalis und das Blut für die 48 h post Blutbilder direkt vor der Entnahme des Thrombus gewonnen.

3.3. Partielle Thromboplastinzeit

Die Messung der partiellen Thromboplastinzeit ist ein sensitives Verfahren, um einen Mangel oder einen Überschuss an Gerinnungsfaktoren, die für die Bildung eines Thrombus erforderlich sind, nachzuweisen. Speziell werden Faktor VIII und Faktor IX beachtet¹¹⁷.

Für die Analyse wurde eine Menge von ca. 1 ml mit Citrat ungerinnbar gemachten Blutes benötigt. Hierzu wurde das Blut aus der intrakardialen Blutabnahme verwendet. Die Analyse erfolgte durch das Zentrallabor des Deutschen Herzzentrums München mit dem BCS-System (BCS-System, Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn). Das Blut wurde direkt vor der Entnahme des Thrombus gewonnen.

3.4. Thromboelastometrie

Unter Thromboelastometrie versteht man ein diagnostisches Verfahren mit welchem man die Gerinnungseigenschaften von Vollblut untersuchen kann. Dabei wird die Interaktion von Gerinnungsfaktoren, Inhibitoren und Zellkomponenten gemessen, während sich ein Gerinnsel bildet und wieder lysiert wird¹¹⁸. Mit dieser Analyse können Erkenntnisse über die gesamte Kinetik der Hämostase (Gerinnungszeit, Gerinnselbildung, Gerinnselstabilität und Lysis) gewonnen werden¹¹⁹.

Für die Analyse wurde eine Menge von mindestens 600 µl mit Citrat ungerinnbar gemachten Blutes benötigt. Hierzu wurde das Blut aus der intrakardialen Blutabnahme verwendet. Die Analyse erfolgte durch das Zentrallabor des Deutschen Herzzentrums München (Rotem, Tem International GmbH, München).

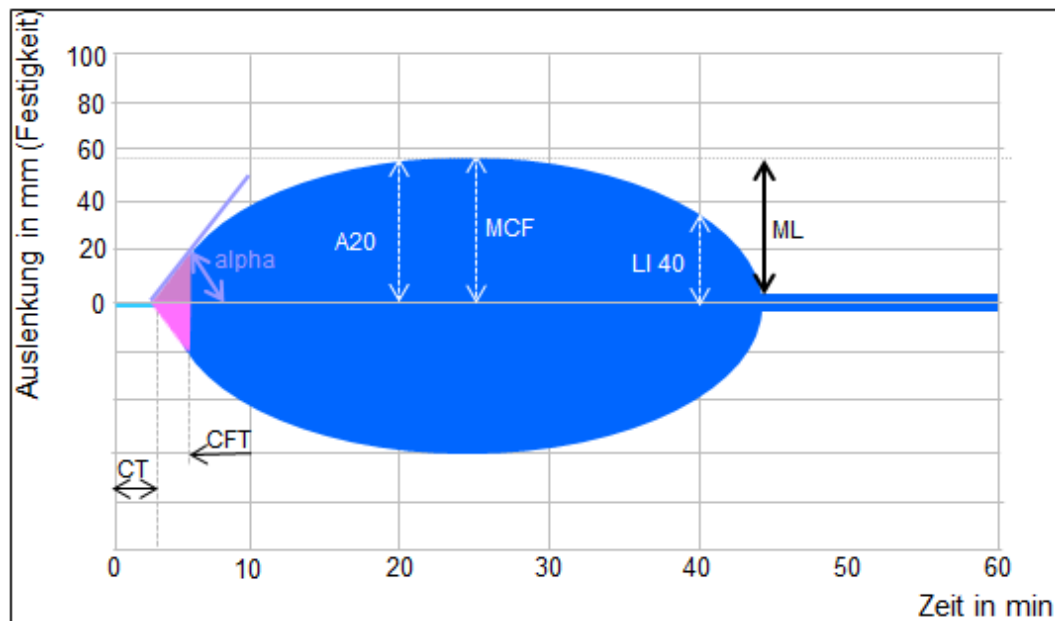


Abbildung 11: Thromboelastometrie

CT: Gerinnungszeit, CFT: Gerinnelbildungszeit, alpha: alpha-Winkel, A20: Amplitude 20 min nach CT, MCF: Maximale Gerinnselfestigkeit, LI 40: Lyseindex 40 min nach CT, ML: Maximale Lyse

3.4.1. EXTEM

Bei der EXTEM-Analyse werden über den extrinsischen Weg die Gerinnelbildung, Fibrinpolymerisation und die Fibrinolyse ermittelt. Dies erfolgt durch eine TF-Aktivierung¹²⁰.

3.4.2. FIBTEM

Bei der FIBTEM-Analyse wird der Fibrinogen-Status ohne Plättchenbeteiligung qualitativ ermittelt. Dies geschieht durch TF-Aktivierung und Zugabe eines Plättcheninhibitors (Cytochalasin, fibtem-Reagenzien, Tem International GmbH, München)¹²⁰.

4. Intravitale Videofluoreszenzmikroskopie (IVM)

Um die Reduktion der Flussgeschwindigkeit zu standardisieren, wurde der Blutfluss vor und nach Setzen der Ligatur bestimmt. Weiter wurde in sechs Stunden Versuchen die Leukozyten- und Thrombozytenrekrutierung analysiert.

4.1. Prinzip der IVM

Mit Hilfe der intravitalem Videofluoreszenzmikroskopie war es möglich, die zellulären Vorgänge in vivo während der Entstehung eines Thrombus in Echtzeit darzustellen. Dazu wurden verschiedene Zellen mit Hilfe von gut verträglichen Fluoreszenzfarbstoffen in oder ex vivo markiert.

Es wurde dafür ein Fluoreszenz-Auflicht-Mikroskop (BX51WI, Olympus, Hamburg), in Verbindung mit einem komplexen-Beleuchtungssystem MT 20 (Olympus, Hamburg) (Abb. 12) verwendet. Weiter wurde eine Xenonlampe als Lichtquelle genutzt, welche kurzwelliges Anregungslicht emittieren konnte, wodurch dann die mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Zellen in vivo sichtbar gemacht wurden. Über eine CCD-Kamera (ORCA-ER, Hamamatsu, Japan) wurde das Emissionssignal an einen Computer gesendet. Die gesamte Erfassung, Dokumentation und Auswertung erfolgte mit der Software Cell[^]R (Olympus, Hamburg).

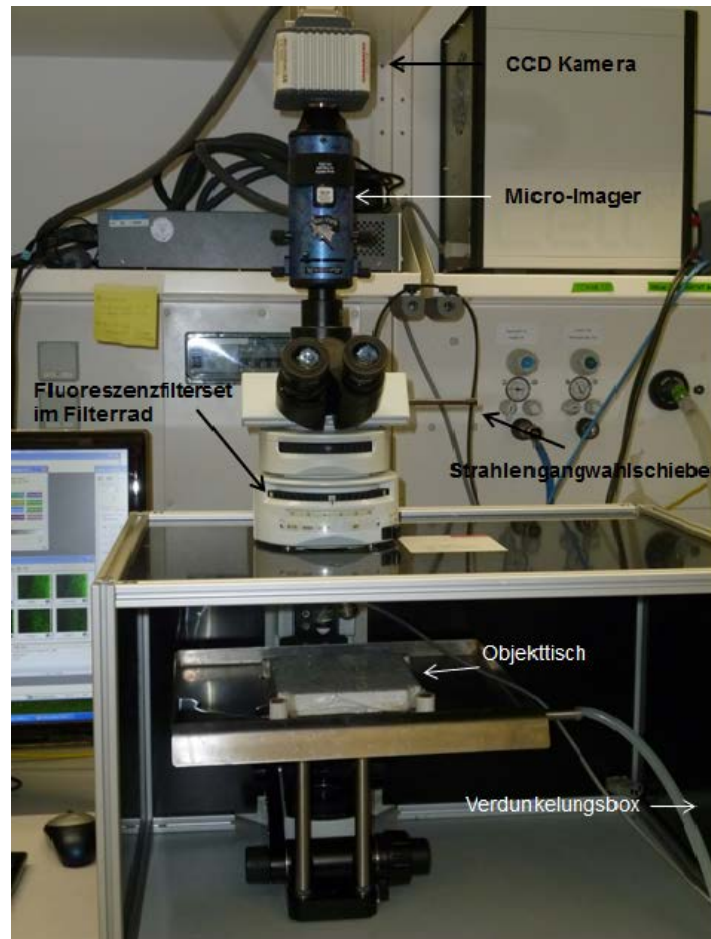


Abbildung 12: Fluoreszenz-Auflicht-Mikroskop

4.2. Durchführung der IVM

Um die zellulären Vorgänge in der initialen Phase der Entstehung eines venösen Thrombus erfassen zu können, erfolgte die intravitalmikroskopische Untersuchung bis sechs Stunden nach Setzen der Ligatur. Hierfür wurde der Abschnitt der V. cava caudalis zwischen der Ligatur und den Zuflüssen der Venae iliacae in vier Fenster unterteilt und diese aufgenommen. Es wurde ein Wasserimmersionsobjektiv (UMPland Fl 20x/0,50Na, 3,3 mm, Water dipping Lens, Olympus, Hamburg) mit einer 20-fachen Vergrößerung verwendet. Um sicherzustellen, dass sich ständig genug Wasser über der V. cava caudalis befand wurde über eine Infusionsflasche Natriumchlorid-Lösung in die Bauchhöhle getropft. Je nach Belichtungszeit entstand ein Film von ca. 10 Sekunden, welcher aus 100 Einzelaufnahmen bestand.

4.2.1. Verwendete Farbstoffe

Um den Farbstoff bzw. die gefärbten Thrombozyten intravenös verabreichen zu können wurde wie unter 2.8. beschrieben ein Jugulariskatheter gelegt.

4.2.1.1. Acridin-Orange

Um Leukozyten intravitalmikroskopisch darstellen zu können, wurde Acridin-Orange (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) verwendet. Es besitzt die Fähigkeit, sich an DNA und RNA anzulagern, indem es durch Zellmembranen diffundiert¹²¹. Sobald Acridin-Orange an DNA gebunden hat emittiert es im grünen Bereich, nach Anregung mit einer Wellenlänge von 495 nm¹²². Die Mäuse bekamen 0,05 ml dieses Farbstoffs, mit einer Konzentration von 0,05 % intravenös über den Jugulariskatheter appliziert.

4.2.1.2. Rhodamin B

Rhodamin B Isothiocyanat (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)¹²³ wurde zur ex vivo Färbung von isolierten Plättchen, in einer Konzentration von 20 µg/ml verwendet. Es kann sich in den Mitochondrien oder Zellkernen lebender Zellen anreichern. Rhodamin B emittiert im grünen Bereich, wenn es bei 514 nm angeregt wird.

4.2.2. Isolation muriner Thrombozyten

Dem Spendertier wurde wie unter 3.1.2. beschrieben mittels kardialer Punktion ca. 1,5 ml Blut abgenommen. Um möglichst physiologische Verhältnisse zu gewährleisten wurde ein Tyrode's-Puffer angesetzt. Um 100 ml Puffer herzustellen wurde jeweils 0,1 g D(+)-Glukose und bovines Serumalbumin benötigt. Dieses wurde mit Hilfe einer geeichten Waage abgewogen. Dazu wurden 90 ml Aqua dest., 1 ml HEPES (Invitrogen, Darmstadt) und 10 ml eines bereits vorbereiteten 10-fach-Tyrode's-Puffer (10,15 g NaHCO₃ (VWR International, Darmstadt), 1,95 g KCL (VWR International, Darmstadt) und 80 g NaCl (VWR International, Darmstadt) in 1000 ml Aqua dest. gelöst und steril filtriert) hinzugefügt. Der fertige Puffer wurde auf die pH-Werte 6,5 und 7,4 durch Zugabe von 2 mM HCL und NaOH eingestellt.

Um die Thrombozyten zu isolieren wurde das entnommene Blut mit Tyrode´s-Puffer pH 6,5 auf ein Volumen von 2 ml aufgefüllt und dann bei 68x g ohne Bremse für 20 Minuten (Haereus, Megafuge, Hanau) zentrifugiert. Der Überstand, welcher das plättchenreiche Plasma enthält, wurde vorsichtig mit der Pipette abgenommen und auf ein Volumen von 4 ml mit dem Tyrode´s-Puffer pH 6,5 aufgefüllt. Das Gemisch wurde dann für 10 Minuten bei 1277x g mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde abgeschüttet und das entstandene Thrombozytenpellet resuspendiert, durch Zugabe von jeweils 250 µl Tyrode´s-Puffer pH 6,5 und pH 7,4. Danach wurde mittels eines hämatologischen Analysegeräts (Sysmex XE-2100, Sysmex, Nordstedt) die Thrombozytenzahl bestimmt. Dadurch konnte die Thrombozytenzahl durch Zugabe des Tyrode´s-Puffer pH 6,5 auf eine Konzentration von 150000 Thrombozyten pro µl Flüssigkeit eingestellt werden. Zum Schluss wurden die Thrombozyten noch mit dem unter 4.2.1.2. beschriebenen Farbstoff Rhodamin B angefärbt. Dem jeweiligen Empfängertier wurde kurz vor Versuchsbeginn eine Menge von 250 µl dieser Suspension intravenös über den Jugulariskatheter verabreicht. Dadurch konnte gewährleistet werden, dass jedem Versuchstier die gleiche Flüssigkeitsmenge mit der genau gleichen Zellkonzentration verabreicht wurde. Die verwendeten, aber nicht extra gekennzeichneten Reagenzien stammen alle von Sigma-Aldrich (Taufkirchen).

4.2.3. Bestimmung der Flussreduktion

Um die Verlangsamung des Blutflusses nach Setzen der Ligatur exakt bestimmen zu können wurden im vierten Fenster, also dem kaudalsten nach der Ligatur bzw. nach Abzweigung der Vena renalis sinistra, Aufnahmen angefertigt. Die ersten noch bevor die Vene stenosierte wurde, um die physiologische Blutflussgeschwindigkeit bestimmen zu können. Danach wurde ligiert und weitere Aufnahmen im vierten Fenster mit reduzierter Blutflussgeschwindigkeit angefertigt. Um die Leukozyten sichtbar zu machen wurde der unter 4.2.1.1. beschriebene Farbstoff Acridin-Orange verwendet. Die Aufnahmen wurden mit der Software ImageJ (ImageJ 1.45s) mithilfe eines Zelltrackingverfahrens ausgewertet. Dabei wird eine Zelle über mehrere Bilder (Frame-to-Frame Methode) verfolgt und so kann die Flussgeschwindigkeit dieser Zelle ermittelt werden. Dies wurde bei jeweils sechs Zellen durchgeführt und am Ende ein

Mittelwert gebildet. Dieses Verfahren wurde für die Aufnahmen prä und post Stenose angewendet und dadurch ließ sich die Reduktion der Geschwindigkeit bzw. die Geschwindigkeit des Restflusses errechnen. Dies war nötig, um die Ligatur bzw. die Flussreduktion zu standardisieren, damit bei jedem Tier ungefähr die gleiche Geschwindigkeit des Restflusses entsteht.

4.3. Auswertung der IVM

Für die Auswertung wurden die Aufnahmen, die drei, vier, fünf und sechs Stunden post Ligatur angefertigt wurden verwendet. Pro Aufnahme wurden drei Bilder ausgewählt und diese mit Hilfe der ImageJ 1.45 Softwaren als schwarz/weiß Bilder abgespeichert. Dies geschah sowohl für die Leukozyten- als auch für die Thrombozytenaufnahmen.

Die weitere Auswertung erfolgte mit Hilfe der CapImage 8.6.3 Software. Es wurde die Fläche der aggregierten Leukozyten bzw. Thrombozyten ermittelt und diese auf eine Gesamtfläche von einem mm² hochgerechnet.

5. Schwanzblutungszeiten

Zur Bestimmung der Schwanzblutungszeit wurde dem Tier 30 min vor dem Eingriff 0,1 mg/kg Buprenorphin subkutan verabreicht. Danach wurde das Tier mittels Isoflurannarkose in Narkose gelegt und auf der Heizplatte des Tierbewärmungssystems in Rückenlage fixiert. Mit einem Skalpell wurde ein ca. 5 mm langes Stück der Schwanzspitze abgetrennt und das blutende Schwanzende auf einem Löschpapier platziert. Danach wurde sofort eine Stoppuhr zur Zeitmessung eingeschaltet. Die sich bildenden Blutropfen wurden durch das Löschpapier weggesaugt, so dass es gut möglich war, den Zeitpunkt zu bestimmen als der Blutfluss komplett stoppte. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Stoppuhr angehalten und das Schwanzende mit einem Ätzzift (Höllenstein-Ätzzift, RYMA PHARM, Körle) versorgt. Die Maus wurde zur Überwachung der Aufwachphase in einen Käfig gesetzt, dieser war mit Tüchern (Kimtech, Kimberley-Clark, Koblenz) ausgelegt um eventuelle Nachblutungen besser zu

sehen. Danach wurde die Stoppuhr abgelesen und die Zeit auf dem Protokoll vermerkt.

6. Immunhistologie

Die Thromben, die 48 Stunden nach Durchführung der Stenose der Vena cava caudalis entstanden, sollten mittels immunhistologischer Untersuchung auf ihre genaue Zusammensetzung und die beteiligten Zelltypen hin analysiert werden.

6.1. Präparation

Wie schon unter 2.6. dargestellt wurden die entnommenen Thromben in Tissue Tek (Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande) eingebettet und bei -80°C tiefgefroren. Die Einbettung erfolgte in einem aufgeschnittenen Schlauchstück, bei dem das kaudale Ende des Thrombus gekennzeichnet wurde. Das Schlauchstück mit dem eingebetteten Thrombus wurde in ein beschriftetes 1,5 ml Eppendorftube (Safe-Lock Tubes 1,5 ml, Eppendorf AG, Hamburg) verbracht und war so leichter aufzufinden zur Weiterverarbeitung.

Um die Thromben schneiden zu können, wurde der Thrombus mit Tissue Tek auf einem Stempel befestigt und dieser im Kryostat (MICROM HM 560, THERMO FISHER, SCIENTIFIC, Dreieich) so positioniert, dass vom kranialen zum kaudalen Ende Querschnitte geschnitten wurde. Die Temperatur des Gerätes war auf -25°C eingestellt, damit das Auftauen des Präparates während dem Schneiden verhindert werden konnte. Die entstandenen Schnitte, die eine Dicke von $5\ \mu\text{m}$ besaßen, wurden einzeln mit einem beschrifteten, beschichteten Objektträger (Thermo Scientific, Superfrost Plus, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig) abgenommen. Die Objektträger wurden bis zum Färben bei -20°C gelagert.

6.2. Färbeprotokoll

Für die Färbung der Objektträger wurden diese in eine lichtundurchlässige Färbekammer verbracht. Diese war mit Wasser gefüllt, um ein Austrocknen der

Schnitte zu vermeiden. Damit die aufgetragenen Lösungen sich auf den Präparaten halten und nicht einfach runtertropfen konnten, wurden diese vorab mit einem Fettstift (Dako Pen, Dako, Hamburg) umfahren.

Die verwendeten Färbungen wurden alle nach einem Standardfärbeprotokoll durchgeführt¹²⁴:

Zur Fixierung bei Raumtemperatur wurden die Präparate für drei Minuten mit 4% Formalin (Thermo Scientific, Rockford, Illinois, USA) und mit Aqua dest. behandelt. Danach wurden die Schnitte drei Mal mit PBS (Invitrogen, Damstadt) + 0,1% Tween (Tween 20, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) gewaschen. Um die unspezifischen Bindungen am Fc-Rezeptor zu blockieren, wurde ein anti-mouse CD16/32 Antikörper (affinity purified rat anti-mouse CD 16/32, Clone 93, BD Pharming, San Diego, Kalifornien, USA) in einer Verdünnung von 1:200 zusammen mit 3% BSA (Bovines Serum Albumin, PAA Laboratories, Pasching, Österreich) in PBS verwendet. Wobei bei der CD45 Färbung nur mit Fc-Block und bei der Fibrinogen-Färbung mit Fc-Block und 2% Glycin geblockt wurde. Diese Gemische wurden auf die Präparate gegeben und nach 30 Minuten abgeklopft. Danach wurde der Primärantikörper (Tab. 1) aufgetragen und bei Raumtemperatur eine Stunde inkubiert. Als Isotypkontrolle diente ein Antikörper der gleichen IgG-Klasse, der gegen ein irrelevantes Antigen gerichtet war. Nach der Inkubation mit den jeweiligen Antikörpern wurden die Präparate wieder gewaschen und danach die Sekundärantikörper aufgetragen. Hierfür wurden Antikörper aus verschiedenen Spezies, die in Alexa 488 (grün) und Alexa 594 (rot) fluoreszieren für eine Stunde auf die Präparate gegeben (Tab. 2). Zur Darstellung der Zellkerne wurde danach DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylidole, Dihydrochloride, Invitrogen, Damstadt) in einer Verdünnung von 1:3000 verwendet. Dieses musste 30 Sekunden einwirken und weist ein Emissionsmaximum von 461 nm mit blauer Fluoreszenz auf. Danach musste erneut gewaschen werden. Zum Schluss wurden ein oder zwei Tropfen Eindeckmedium (Mounting Medium, DAKO, Hamburg) auf die Objektträger aufgebracht und mit einem Deckglas abgedeckt. Dadurch konnte sich das Medium gleichmäßig über die gesamte Probe verteilen. Bis zur Auswertung wurden die Schnitte im Kühlschrank aufbewahrt.

Bei der CD41 Färbung war ein Zwischenschritt mehr notwendig, um die Permeabilität der Zellen zu erhöhen. Dafür wurden vor dem Blocken noch Triton

X-100 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) aufgetragen und nach 30 Minuten abgewaschen.

Die Präparate wurden am Mikroskop (Leica DMRB, Firma Leica, Bensheim) mit einer Digitalkamera (AcioCam, Firma Zeiss, Göttingen) abfotografiert.

Tabelle 1: Verwendete Primärantikörper

Antigen	Konzentration	verwendete Verdünnung	Primär-Antikörper	Klon	Hersteller
CD 41	0,2 mg/ml	1:25	rat	MWReg30	BD Pharming
CD 45	0,2 mg/ml	1:100	rat	30-F11	BD Pharming
Fibrinogen	6 mg/ml	1:300	rabbit	A0080	DAKO

Tabelle 2: Verwendete Sekundärantikörper

Antigen	Konzentration	verwendete Verdünnung	Sekundär-Antikörper	Hersteller
CD 41	2 mg/ml	1:200	donkey anti-rat Alexa 594	Invitrogen
CD 45	2 mg/ml	1:200	donkey anti-rat Alexa 594	Invitrogen
Fibrinogen	2 mg/ml	1:200	donkey anti-rabbit Alexa 594	Invitrogen

6.3. Auswertung der Immunhistologie

Für diese Arbeit wurden die Schnitte auf Thrombozyten (CD41), Leukozyten (CD45) und Fibrinogen gefärbt.

Die Fotos der Schnitte wurden auf Leukozyten ausgezählt. Außerdem wurden die Flächen von Fibrinogen und Thrombozyten quantifiziert. Dies erfolgte mit Hilfe der ImageJ 1.45 Software, mit deren Hilfe die Farbfotos in schwarz/weiß Bilder umgewandelt wurden. Mit der CapImage 8.6.3 Software wurde jeweils die Fibrinogen- bzw. Thrombozytenfläche ermittelt und nach Ermittlung der Gesamtfläche des Thrombusquerschnittes der prozentuale Anteil berechnet.

7. Versuchsplanung und Statistik

7.1. Tierzahlen

In den Versuch eingegangen sind insgesamt 87 Tiere. Diese Tiere waren im Alter von mindestens 10 Wochen. Vom Versuch ausgeschlossen wurden Tiere die während der Operation mindestens eine Blutung hatten oder im Verlauf des Versuches verstorben sind. Da bisher kaum Erkenntnisse zum Einfluss der zahlreichen Komponenten des Komplementsystems bei Bildung einer venösen Thrombose bestehen, erfolgte die Versuchsplanung im Sinne einer Orientierungsstudie. Das heißt die verwendeten Tierzahlen waren nicht darauf ausgelegt, in den zahlreichen Einzeluntersuchungen immer sicher signifikante Ergebnisse zu erhalten, sondern ein wesentliches Ziel war es, über die statistische Bestimmung der Effektgrößen die Faktoren zu ermitteln, welche wahrscheinlich einen besonders deutlichen/bedeutsamen Einfluss auf das Blutgerinnungssystem nehmen und damit für weiterführende hypothesenbasierende Untersuchungen speziell in Frage kommen,

7.2. Versuchsgruppen

7.2.1. Rolle des Komplementsystems bei der Entstehung der venösen Thrombose

Bei dieser Gruppe wurde bei den Wildtyp- und den knock-out Tieren vor der Operation zur Flussverlangsamung die Schwanzblutungszeit ermittelt. Sowohl basal als auch 48 Stunden nach Flussverlangsamung, wurde den Tieren Blut abgenommen um daraus Blutbilder und Gerinnungsanalysen (partielle Thromboplastinzeit, EXTEM/FIBTEM 48 nach Flussverlangsamung) zu erstellen. Nach Entnahme wurde das Thrombusgewicht bestimmt und die entstandenen Thromben immunhistologisch weiter untersucht und ausgewertet.

Tabelle 3: Versuchsgruppe für die Rolle des Komplementsystems

	Stamm	Anzahl	Alter	Gewicht
WT	C57Bl/6J	9	13-20 Wo	23,03-27,75g
Knockout	C1q ^{-/-}	8	11-13 Wo	24,99-31,89g
WT	C57Bl/6J	7	13-31 Wo	22,40-31,65g
Knockout	CR2 ^{-/-}	7	11-15 Wo	20,74-31,30g
WT	C57Bl/6J	11	15-47 Wo	21,61-31,65g
Knockout	C3 ^{-/-}	10	12-21 Wo	20,79-31,10g
Knockout	C4 ^{-/-}	9	10-23 Wo	21,96-27,60g
Knockout	C3 ^{-/-} -C4 ^{-/-}	8	13-15 Wo	22,44-31,24g

7.2.2. Leukozyten- und Thrombozytenrekrutierung

Diese Gruppe dient zur Darstellung des Einflusses des Komplementsystems auf die Leukozyten- und Thrombozytenrekrutierung nach Flussverlangsamung mittels Intravitalmikroskopie. In diese Gruppe zählen die Spendertiere für die Thrombozyten und die Empfängertiere an denen die Intravitalmikroskopie durchgeführt wurde.

Tabelle 4: Bestimmung der Leukozyten- und Thrombozytenrekrutierung

	Stamm	Anzahl	Alter	Gewicht
WT	C57Bl/6J	6	13-21 Wo	26,09-33,10g
Knockout	C4-/-	6	13-37 Wo	28,84-31,7g

7.2.3. EXTEM Werte basal

Bei dieser Gruppe wurde bei den Wildtyp- und den knock-out Tieren basal Blut abgenommen, um daraus die Gerinnungsanalyse EXTEM (basal) zu erstellen.

Tabelle 5: Bestimmung der Extem Werte basal

	Stamm	Anzahl	Alter
WT	C57Bl/6J	3	9-18 Wo
Knockout	C4-/-	3	9-29 Wo

7.3. Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Programms Sigma Plot 11.0 (Systat, Erkrath). Wobei die statistische Signifikanz für einen p-Wert $< 0,05$ angenommen wurde. Es wurden die Gewichte der Thromben durch Einzelwerte (dot plots) der verwendeten Tiere und dem Median-Wert dargestellt. Der Vergleich der Thrombusgewichte erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test. Daraufhin wurde eine Bonferroni – Holm Adjustierung mit $n=3$ durchgeführt, sodass für den kleinsten p-Wert < 0.0166 , für den mittleren p-Wert < 0.025 und den größten p-Wert < 0.05 eine statistische Signifikanz angenommen wurde. Um den Unterschied der Inzidenz der Thrombusbildung zu bestimmen wurde der Binomialtest verwendet. Hierbei wurde die Inzidenz für die Thrombusentstehung der Wildtyptiere mit der Inzidenz der $C4^{-/-}$ Tiere verglichen und die Signifikanz berechnet. Die Auswertung der Daten der Blutbilder, Gerinnungsanalysen und der Immunhistologie wurden durch Säulendiagramme dargestellt. Wobei auch hier die statistische Signifikanz für einen p-Wert $< 0,05$ angenommen wurde. Zum Vergleich der Daten wurde der t-Test verwendet. Weiter wurden die Effektgröße und der relative Unterschied für alle Parameter berechnet. Die Effektgröße wurde mit dem Programm G*Power 3.1.5¹²⁵ berechnet. Werte von 0,2 gelten als schwacher Effekt, Effekte mittlerer Stärke liegen bei Werten um 0,5 und deutlich und damit besonders bedeutsame Effekte liegen bei Werten über 0,8 vor¹²⁶. Der relative Unterschied wurde für $\geq 30\%$ als groß angenommen.

V. ERGEBNISSE

1. Einfluss des Komplementsystems auf die venöse Thrombose

1.1. Thrombusgewichte

Bei der Entnahme der Thromben wurde makroskopisch ermittelt, ob ein Thrombus vorhanden war. Dadurch konnte eine prozentuale Angabe zur Thrombusinzidenz gemacht werden. Jeder Thrombus wurde nach Entnahme gewogen, um die Thrombusgewichte der knock-out Tiere mit denen der Kontrolltiere zu vergleichen.

1.1.1. C1q^{-/-}

Die Analyse der Thrombusgewichte der C1q^{-/-} Tiere im Vergleich zu den C57Bl/6J-Kontrolltieren (Abb. 13) ergab zwar eine mittlere relative Verringerung von 37,14%, die Effektgröße war allerdings wegen der großen individuellen Variabilität der Thrombusgewichte mit 0,39 relativ niedrig. Dieser relativ geringe Effekt der Ausschaltung von C1 auf die Thrombusbildung konnte mit der verwendeten Tierzahl damit auch nicht als statistisch signifikant ($p=0,470$) nachgewiesen werden. Die Verringerung der Inzidenz der Thrombusbildung mit 6 von 9 Tieren in der Kontrollgruppe im Vergleich zu 3 von 8 Tieren in der C1q^{-/-} Gruppe (Abb. 13) war ebenfalls relativ gering und statistisch nicht signifikant ($p=0,085$) (Tab. 6).

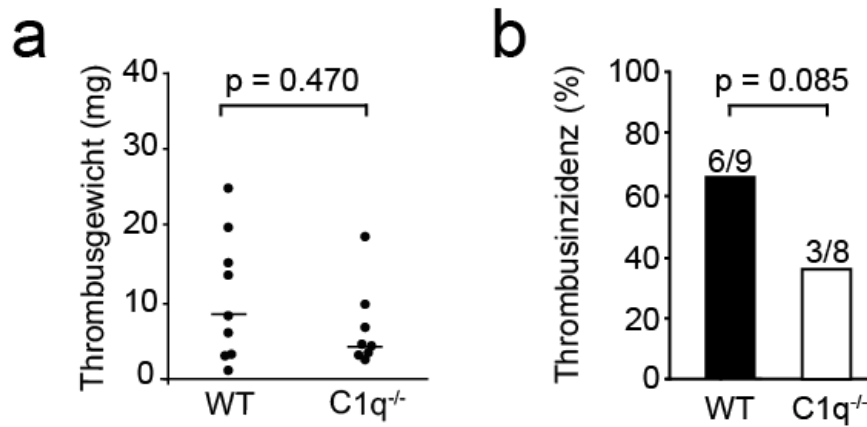


Abbildung 13: Thrombusgewicht und Thrombusinzidenz von C57Bl/6J Mäusen im Vergleich zu C1q^{-/-} Mäusen

a) Thrombusgewicht 48h nach Flussverlangsamung in Wildtypkontrollmäusen (C57Bl/6J) (n=9) und C1q^{-/-} Mäusen (n=8). Querbalken $\hat{=}$ Median-Wert.

b) Illustration der Thrombusinzidenz in Prozent in Wildtypkontrollmäusen (C57Bl/6J) und C1q^{-/-} Mäusen

Tabelle 6: Effektgröße, relativer Unterschied und Binomialtest für C1q^{-/-}

Effektgröße	0,39
rel. Unterschied	37,14%
Binomialtest Inzidenz p=	0,085

1.1.2. CR2^{-/-}

Die Analyse der Thrombusgewichte der CR2^{-/-} Tiere im Vergleich zu den C57Bl/6J-Kontrolltieren (Abb. 14) ergab zwar eine relative Verringerung von 53,10%, die Effektgröße war allerdings wegen der großen individuellen Variabilität der Thrombusgewichte mit 0,32 relativ niedrig. Dieser relativ geringe Effekt der Ausschaltung von CR2 auf die Thrombusbildung konnte mit der verwendeten Tierzahl damit auch nicht als statistisch signifikant ($p=0,281$) nachgewiesen werden. Die Verringerung der Inzidenz der Thrombusbildung mit 4 von 6 Tieren in der Kontrollgruppe im Vergleich zu 2 von 7 Tieren in der CR2^{-/-} Gruppe (Abb. 14) war ebenfalls relativ gering und statistisch nicht signifikant ($p=0,799$) (Tab. 7).

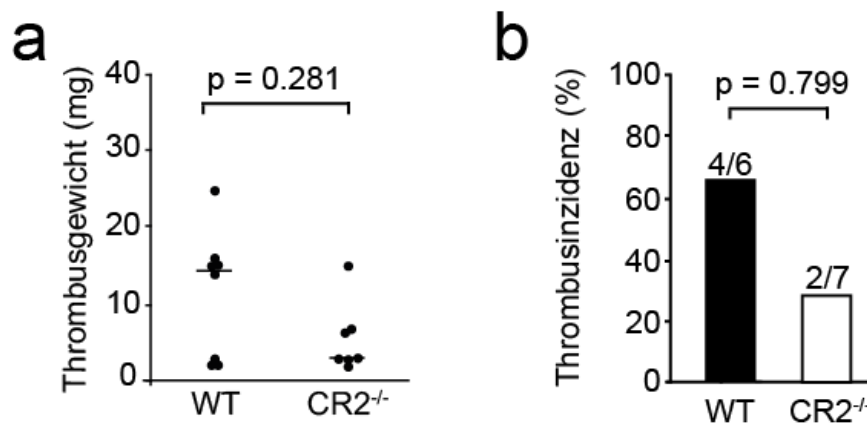


Abbildung 14: Thrombusgewicht und Thrombusinzidenz von C57Bl/6J Mäusen im Vergleich zu CR2^{-/-} Mäusen

a) Thrombusgewicht 48h nach Flussverlangsamung in Wildtypkontrollmäusen (C57Bl/6J) (n=7) und CR2^{-/-} Mäusen (n=7). Querbalken \cong Median-Wert.

b) Illustration der Thrombusinzidenz in Prozent in Wildtypkontrollmäusen (C57Bl/6J) und CR2^{-/-} Mäusen

Tabelle 7: Effektgröße, relativer Unterschied und Binomialtest für CR2^{-/-}

Effektgröße	0,32
rel. Unterschied	53,10%
Binomialtest Inzidenz p=	0,799

1.1.3. C3^{-/-}, C4^{-/-} und C3^{-/-}C4^{-/-}

Die Analyse der Thrombusgewichte der C3^{-/-}, C4^{-/-} und C3^{-/-}C4^{-/-} Tiere im Vergleich zu den C57Bl/6J-Kontrolltieren (Abb. 15) ergab für C3^{-/-} zwar eine relative Verringerung von 51,28%, die Effektgröße war allerdings wegen der großen individuellen Variabilität der Thrombusgewichte mit 0,27 relativ niedrig. Dieser relativ geringe Effekt der Ausschaltung von C3 auf die Thrombusbildung konnte mit der verwendeten Tierzahl damit auch nicht als statistisch signifikant (p=0,084) nachgewiesen werden. Die Verringerung der Inzidenz der Thrombusbildung mit 7 von 11 Tieren in der Kontrollgruppe im Vergleich zu 4 von 10 Tieren in der C3^{-/-} Gruppe (Abb. 15) war ebenfalls relativ gering und statistisch nicht signifikant (p=0,524) (Tab. 8). Bei C4^{-/-} zeigte sich eine relativ große Verringerung von 64,75%, die Effektgröße war allerdings wegen der

großen individuellen Variabilität der Thrombusgewichte mit 0,16 relativ niedrig. Dieser relativ geringe Effekt der Ausschaltung von C4 auf die Thrombusbildung konnte mit der verwendeten Tierzahl allerdings als statistisch signifikant ($p=0,012$) nachgewiesen werden. Die Verringerung der Inzidenz der Thrombusbildung mit 7 von 11 Tieren in der Kontrollgruppe im Vergleich zu 4 von 9 Tieren in der $C4^{-/-}$ Gruppe (Abb. 15) war ebenfalls relativ gering und statistisch nicht signifikant ($p=0,426$) (Tab. 8). Für $C3^{-/-}C4^{-/-}$ ergab sich zwar eine relative Verringerung von 63,46%, die Effektgröße war allerdings wegen der großen individuellen Variabilität der Thrombusgewichte mit 0,17 relativ niedrig. Dieser relativ geringe Effekt der Ausschaltung von C3C4 auf die Thrombusbildung konnte mit der verwendeten Tierzahl allerdings auch als statistisch signifikant ($p=0,018$) nachgewiesen werden. Die Verringerung der Inzidenz der Thrombusbildung mit 7 von 11 Tieren in der Kontrollgruppe im Vergleich zu 2 von 8 Tieren in der $C3^{-/-}C4^{-/-}$ Gruppe (Abb. 15) war ebenfalls relativ gering und statistisch nicht signifikant ($p=0,851$) (Tab. 8).

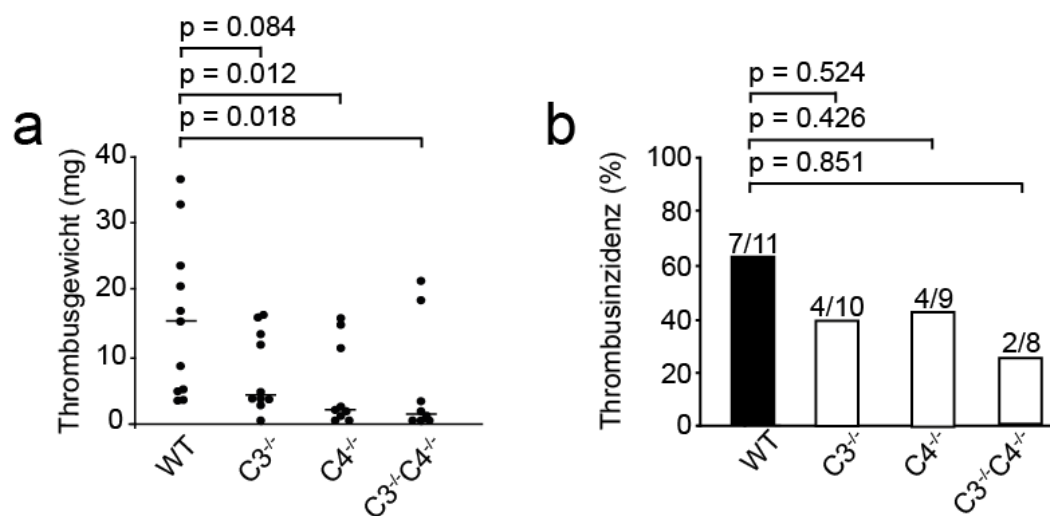


Abbildung 15: Thrombusgewicht und Thrombusinzidenz von C57Bl/6J Mäusen im Vergleich zu $C3^{-/-}$, $C4^{-/-}$ und $C3^{-/-}C4^{-/-}$ Mäusen

a) Thrombusgewicht 48h nach Flussverlangsamung in Wildtypkontrollmäusen (C57Bl/6J) ($n=11$) und $C3^{-/-}$ ($n=10$), $C4^{-/-}$ ($n=9$) und $C3^{-/-}C4^{-/-}$ ($n=8$) Mäusen. Querbalken \triangleq Median-Wert.

b) Illustration der Thrombusinzidenz in Prozent in Wildtypkontrollmäusen (C57Bl/6J), $C3^{-/-}$, $C4^{-/-}$ und $C3^{-/-}C4^{-/-}$ Mäusen.

Tabelle 8: Effektgröße, relativer Unterschied und Binomialtest für C3^{-/-}, C4^{-/-} und C3^{-/-}C4^{-/-}

	C3 ^{-/-}	C4 ^{-/-}	C3 ^{-/-} C4 ^{-/-}
Effektgröße	0,27	0,16	0,17
rel. Unterschied	51,28%	64,75%	63,46%
Binomialtest Inzidenz p=	0,524	0,426	0,851

2. Einfluss des Komplementsystems auf die Blutgerinnung

Da bei den C4^{-/-} Tieren das Thrombusgewicht am deutlichsten reduziert war wurden diese knock-out Tiere in Bezug auf ihre Gerinnungseigenschaften genauer analysiert.

2.1. Partielle Thromboplastinzeit

Um die partielle Thromboplastinzeit zu bestimmen wurde 48 Stunden nach Flussverlangsamung, wie unter IV 3.1.2. beschrieben, intrakardial Blut abgenommen.

Beim Vergleich der partiellen Thromboplastinzeit der C4^{-/-} Tiere und der C57Bl/6J-Kontrolltiere (Abb. 16) ergab sich eine große relative Verkürzung von 44,00%, die Effektgröße war mit 1,68 sehr groß (Tab. 9). Dieser relativ große Effekt der Ausschaltung von C4 auf die partielle Thromboplastinzeit konnte mit der verwendeten Tierzahl nicht als statistisch signifikant (p=0,203) nachgewiesen werden (Abb. 16).

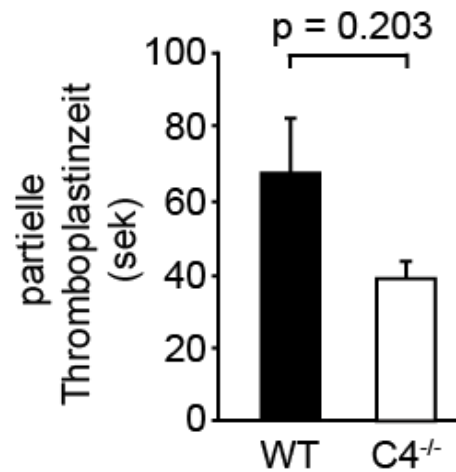


Abbildung 16: Partielle Thromboplastinzeit der C57Bl/6J Mäuse im Vergleich zu C4^{-/-} Mäusen

Partielle Thromboplastinzeit aus Blut durch intrakardiale Blutabnahme 48h nach Flussverlangsamung von Wildtypkontrollmäusen (C57Bl/6J) (n=3) und C4^{-/-} (n=2) Mäusen. Fehlerbalken $\hat{=}$ SEM.

Tabelle 9: Effektgröße und relativer Unterschied für die partielle Thromboplastinzeit

Effektgröße	1,68
rel. Unterschied	44,00%

2.2. Schwanzblutungszeit

Beim Vergleich der Schwanzblutungszeit der C4^{-/-} Tiere und der C57Bl/6J-Kontrolltiere (Abb. 17) ergab sich eine mittlere relative Verlängerung von 21,89%, hinzu kam ein mittlerer Effekt mit einer Effektgröße von 0,42 (Tab. 10). Dieser mittlere relative Effekt der Ausschaltung von C4 auf die Schwanzblutungszeit konnte mit der verwendeten Tierzahl nicht als statistisch signifikant ($p=0,529$) nachgewiesen werden (Abb. 17).

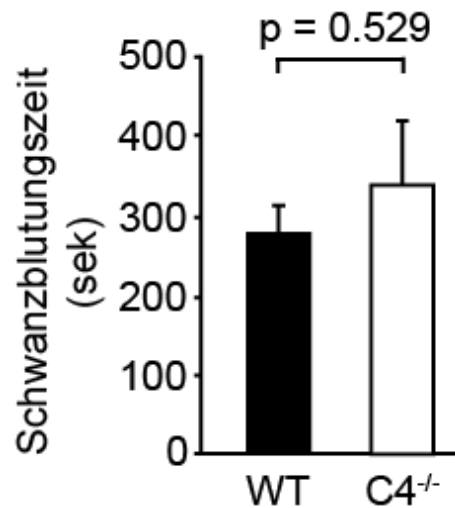


Abbildung 17: Schwanzblutungszeit der C57Bl/6J Mäuse im Vergleich zu C4^{-/-} Mäusen

Schwanzblutungszeit von Wildtypkontrollmäusen (C57Bl/6J) (n=5) und C4^{-/-} (n=5) Mäusen. Fehlerbalken $\hat{=}$ SEM.

Tabelle 10: Effektgröße und relativer Unterschied für die Schwanzblutungszeit

Effektgröße	0,42
rel. Unterschied	21,89%

2.3. Thromboelastometrie

Das Blut für die basalen EXTEM-Analysen wurde mittels intrakardialer Blutabnahme gewonnen.

Beim Vergleich der Werte der basalen EXTEM-Analyse für die C4^{-/-} Tiere und die Kontrolltiere ergibt sich für die Gerinnungszeit (CT) ein deutlicher relativer Unterschied mit 30,93%, bei einer gleichzeitig sehr hohen Effektgröße von 2,15 (Tab. 11). Mit der verwendeten Tierzahl konnte dieser sehr große Effekt auf die Verkürzung der Gerinnungszeit auch als statistisch signifikant ($p=0,009$) nachgewiesen werden (Abb. 18). Für die Verlängerung der Gerinnselformierungszeit (CFT) ergibt sich ein deutlicher relativer Unterschied von 42,57%, bei einer gleichzeitig mittleren Effektgröße von 0,55 (Tab. 11). Mit der verwendeten Tierzahl konnte dieser mittlere Effekt allerdings nicht als statistisch signifikant ($p=0,407$) nachgewiesen werden (Abb. 18). Für die maximale Gerinnselfestigkeit (MCF) ergibt sich ein geringer relativer Unterschied mit 15,83%, bei einer

gleichzeitig großen Effektgröße von 0,92 (Tab. 11). Mit der verwendeten Tierzahl konnte dieser große Effekt auf die Verminderung der maximale Gerinnselfestigkeit allerdings nicht als statistisch signifikant ($p=0,185$) nachgewiesen werden (Abb. 18). Für die Amplitude 20 min nach CT (A20) ergibt sich eine mittlerer relativer Unterschied von 27,08% und eine sehr hohe Effektgröße von 1,16 (Tab. 11). Mit der verwendeten Tierzahl konnte dieser große Effekt auf die Verkleinerung der Amplitude allerdings nicht als statistisch signifikant ($p=0,105$) nachgewiesen werden (Abb. 18).

Die anderen Werte zeigten keine deutlichen Effekte (Tab. 11), es konnten auch keine signifikanten Veränderungen nachgewiesen werden: α ($p=0.643$), LI60 ($p=0.374$), ML ($p=0.333$).

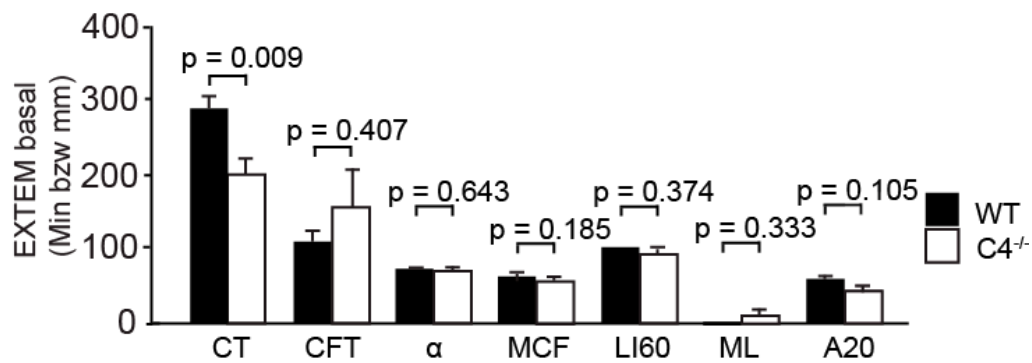


Abbildung 18: basale EXTEM-Analyse des Blutes von C57Bl/6J Mäusen im Vergleich zu C4^{-/-} Mäusen

Basale EXTEM-Analyse des Blutes von Wildtypkontrollmäusen (C57Bl/6J) ($n=3$) und C4^{-/-} ($n=3$) Mäusen. Fehlerbalken $\hat{=}$ SEM.

Tabelle 11: Effektgröße und relativer Unterschied für die basale EXTEM-Analyse

	CT	CFT	MCF	LI60	ML	A20	alpha
Effektgröße	2,15	0,55	0,92	n.b.	n.b.	1,16	0,41
rel. Unterschied	30,93%	42,57%	15,83%	8%	n.b.	27,08%	4,61%

n.b. = nicht berechenbar

Bei der basale EXTEM-Analyse mit rekombinanter TF Quelle zeigte sich im Vergleich der $C4^{-/-}$ Tiere zu den Kontrolltieren für die Gerinnungszeit (CT) ein deutlicher relativer Unterschied mit 28,91% und eine sehr hohe Effektgröße von 3,19 (Tab. 12). Mit der verwendeten Tierzahl konnte dieser große Effekt auf die Verkürzung der Gerinnungszeit auch als statistisch signifikant ($p=0,017$) nachgewiesen werden (Abb. 19). Für die Verlängerung der Gerinnelbildungszeit (CFT) ergibt sich ein deutlicher relativer Unterschied von 42,57%, bei einer gleichzeitigen mittleren Effektgröße von 0,55 (Tab. 12). Mit der verwendeten Tierzahl konnte dieser mittlere Effekt allerdings nicht als statistisch signifikant ($p=0,407$) nachgewiesen werden (Abb. 19). Für die maximale Gerinnselfestigkeit (MCF) ergibt sich ein geringer relativer Unterschied von 15,87%, bei einer großen Effektgröße von 0,89 (Tab. 12). Mit der verwendeten Tierzahl konnte dieser große Effekt auf die Verringerung der maximale Gerinnselfestigkeit allerdings nicht als statistisch signifikant ($p=0,337$) nachgewiesen werden (Abb. 19). Für die Amplitude 20 min nach CT (A20) ergibt sich ein mittlerer relativer Unterschied mit 21,63%, bei einer sehr hohe Effektgröße von 0,99 (Tab. 12). Mit der verwendeten Tierzahl konnte dieser relativ hohe Effekt auf die Verkleinerung der Amplitude allerdings nicht als statistisch signifikant ($p=0,366$) nachgewiesen werden (Abb. 19).

Die anderen Werte zeigten keine deutlichen Effekte (Tab. 12) und es konnte auch keine signifikanten Veränderungen nachgewiesen werden: α ($p=0,544$), LI60 ($p=0,423$), ML ($p=0,374$).

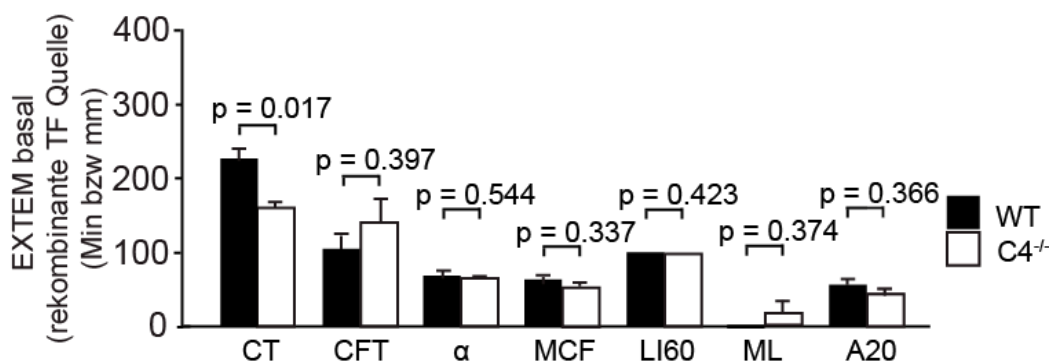


Abbildung 19: basale EXTEM-Analyse (mit rekombinanter TF Quelle) des Blutes von C57Bl/6J Mäusen im Vergleich zu $C4^{-/-}$ Mäusen

Basale EXTEM-Analyse (mit rekombinanter TF Quelle) des Blutes von Wildtypkontrollmäusen (C57Bl/6J) ($n=3$) und $C4^{-/-}$ ($n=3$) Mäusen. Fehlerbalken $\hat{=}$ SEM.

Tabelle 12: Effektgröße und relativer Unterschied für die basale EXTEM-Analyse mit rekombinanter TF Quelle

	CT	CFT	MCF	LI60	ML	A20	alpha
Effektgröße	3,19	0,77	0,89	n.b.	n.b.	0,99	0,72
rel. Unterschied	28,91%	31,48%	15,87%	0,50%	n.b.	21,63%	5,59%

n.b. = nicht berechenbar

Das Blut für die EXTEM- und FIBTEM-Analyse post 48h wurde 48 Stunden nach Flussverlangsamung durch intrakardiale Blutabnahme gewonnen.

Bei der EXTEM-Analyse 48 h nach Flussverlangsamung zeigte sich im Vergleich der C4^{-/-} Tiere zu den Kontrolltieren für die Gerinnungszeit (CT) ein hoher relativer Unterschied mit 51,50% und eine sehr große Effektgröße von 1,36 (Tab. 13). Mit der verwendeten Tierzahl konnte dieser große Effekt auf die Verlängerung der Gerinnungszeit allerdings nicht als statistisch signifikant ($p=0,175$) nachgewiesen werden (Abb. 20). Für die Verlängerung der Gerinnselfestigungszeit (CFT) ergibt sich ein großer relativer Unterschied von 88,23% und eine große Effektgröße von 1,75 (Tab. 13). Mit der verwendeten Tierzahl konnte dieser große Effekt allerdings nicht als statistisch signifikant ($p=0,099$) nachgewiesen werden (Abb. 20). Für den Alpha-Winkel (α) ergab sich ein sehr geringer relativer Unterschied von 5,04% und eine sehr große Effektgröße von 1,19 (Tab. 13). Mit der verwendeten Tierzahl konnte dieser Effekt nicht als statistisch signifikant ($p=0,080$) nachgewiesen werden (Abb. 20). Für die maximale Gerinnselfestigkeit (MCF) ergibt sich ein sehr geringer relativer Unterschied von 6,33% und eine große Effektgröße von 1,25 (Tab. 13). Mit der verwendeten Tierzahl konnte dieser große Effekt auf die Verringerung der maximale Gerinnselfestigkeit allerdings nicht als statistisch signifikant ($p=0,201$) nachgewiesen werden (Abb. 20). Für die Amplitude 10 min nach CT (A10) ergibt sich ein sehr geringer relativer Unterschied von 9,05% und eine sehr große Effektgröße von 1,3 (Tab. 13). Mit der verwendeten Tierzahl konnte dieser Effekt auf die Verkleinerung der Amplitude 10 min nach CT nicht als statistisch signifikant ($p=0,186$) nachgewiesen werden (Abb. 20). Für die Amplitude 20 min nach CT (A20) ergibt sich ein sehr geringer relativer Unterschied von 8,19% und eine sehr große Effektgröße von 1,39 (Tab. 13). Mit der verwendeten Tierzahl konnte dieser Effekt auf die Verkleinerung der Amplitude 20 min nach CT nicht

als statistisch signifikant ($p=0,147$) nachgewiesen werden (Abb. 20). Für die Amplitude 30 min nach CT (A30) ergibt sich ein sehr geringer relativer Unterschied von 6,81% und eine sehr große Effektgröße von 1,23 (Tab. 13). Mit der verwendeten Tierzahl konnte dieser Effekt auf die Verkleinerung der Amplitude 30 min nach CT nicht als statistisch signifikant ($p=0,205$) nachgewiesen werden (Abb. 20).

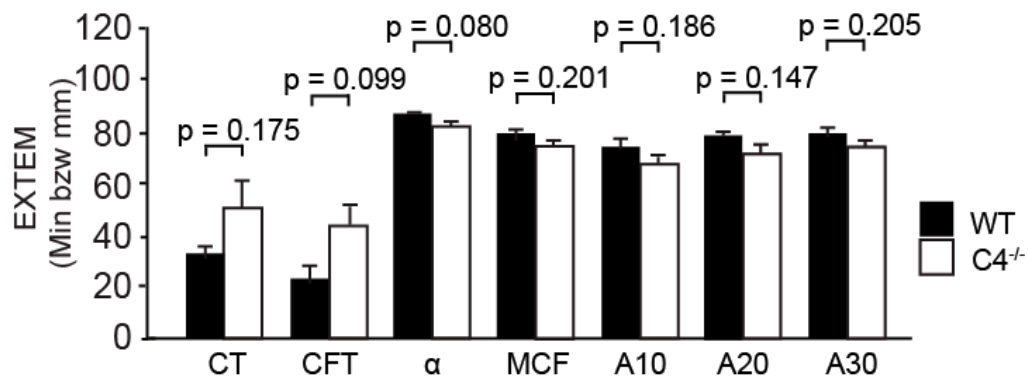


Abbildung 20: EXTEM-Analyse des Blutes von C57Bl/6J Mäusen im Vergleich zu C4^{-/-} Mäusen 48 Stunden nach Flussverlangsamung

EXTEM-Analyse des Blutes von Wildtypkontrollmäusen (C57Bl/6J) ($n=3$) und C4^{-/-} ($n=3$) Mäusen 48 Stunden nach Flussverlangsamung. Fehlerbalken \triangleq SEM.

Tabelle 13: Effektgröße und relativer Unterschied für die post 48h EXTEM-Analyse

	CT	CFT	alpha	MCF	A10	A20	A30
Effektgröße	1,36	1,75	1,91	1,25	1,3	1,39	1,23
rel. Unterschied	51,50%	88,23%	5,04%	6,33%	9,05%	8,19%	6,81%

n.b. = nicht berechenbar

Bei der FIBTEM-Analyse des Blutes der C4^{-/-} Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren ergab sich für die Gerinnselbildungszeit (CFT) ein sehr großer relativer Unterschied von 72,48% und eine sehr große Effektgröße von 1,06 (Tab. 14). Mit der verwendeten Tierzahl konnte dieser große Effekt auf die Verkürzung der Gerinnselbildungszeit allerdings nicht als statistisch signifikant ($p=0,264$) nachgewiesen werden (Abb. 21). Für die Vergrößerung des Alpha-Winkels (α) ergibt sich ein geringer relativer Unterschied von 2,36% und eine sehr große Effektgröße von 1,73 (Tab. 14). Mit der verwendeten Tierzahl konnte dieser

Effekt nicht als statistisch signifikant ($p=0,101$) nachgewiesen werden (Abb. 21). Für die maximale Gerinnselfestigkeit (MCF) ergibt sich ein geringer relativer Unterschied von 13,27% und eine mittlere Effektgröße von 0,6 (Tab. 14). Mit der verwendeten Tierzahl konnte dieser Effekt auf die Erhöhung der maximale Gerinnselfestigkeit allerdings nicht als statistisch signifikant ($p=0,504$) nachgewiesen werden (Abb. 21). Für die Amplitude 10 min nach CT (A10) ergibt sich ein mittlerer relativer Unterschied von 22,58% und eine sehr große Effektgröße von 1,24 (Tab. 14). Mit der verwendeten Tierzahl konnte dieser Effekt auf die Vergrößerung der Amplitude 10 min nach CT nicht als statistisch signifikant ($p=0,204$) nachgewiesen werden (Abb. 21). Für die Amplitude 20 min nach CT (A20) ergibt sich ein mittlerer relativer Unterschied von 21% und eine sehr große Effektgröße von 1,23 (Tab. 14). Mit der verwendeten Tierzahl konnte dieser Effekt auf die Vergrößerung der Amplitude 20 min nach CT nicht als statistisch signifikant ($p=0,206$) nachgewiesen werden (Abb. 21). Für die Amplitude 30 min nach CT (A30) ergibt sich ein mittlerer relativer Unterschied von 21,36% und eine sehr große Effektgröße von 1,27 (Tab. 14). Mit der verwendeten Tierzahl konnte dieser Effekt auf die Vergrößerung der Amplitude 30 min nach CT nicht als statistisch signifikant ($p=0,195$) nachgewiesen werden (Abb. 21).

Bei der Gerinnungszeit (CT) konnte die Effektgröße nicht berechnet werden, der relative Unterschied war mit 3,30% gering (Tab. 14). Mit der verwendeten Tierzahl konnte kein signifikante ($p=0,158$) Veränderung nachgewiesen werden (Abb. 21).

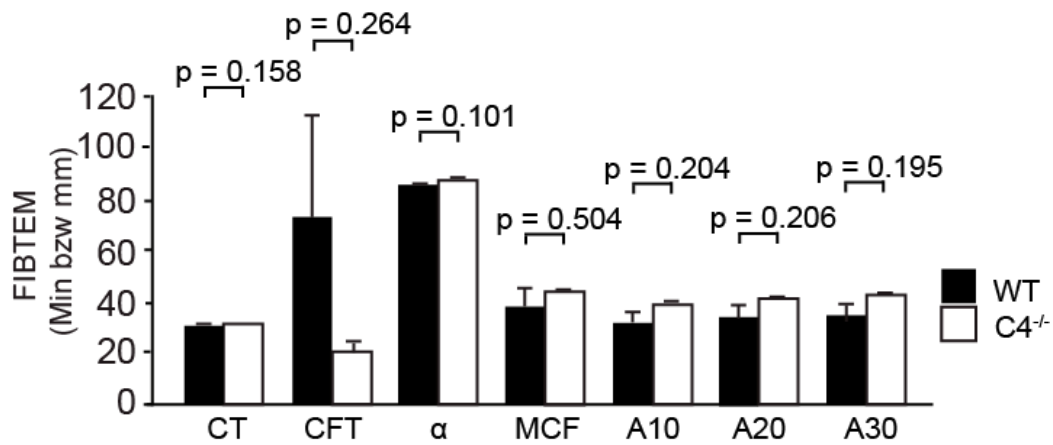


Abbildung 21: FIBTEM-Analyse des Blutes von C57Bl/6J Mäusen im Vergleich zu C4^{-/-} Mäusen 48 Stunden nach Flussverlangsamung

FIBTEM-Analyse des Blutes von Wildtypkontrollmäusen (C57Bl/6J) (n=3) und C4^{-/-} (n=3) Mäusen 48 Stunden nach Flussverlangsamung. Fehlerbalken $\hat{=}$ SEM.

Tabelle 14: Effektgröße und relativer Unterschied für die post 48h FIBTEM-Analyse

	CT	CFT	alpha	MCF	A10	A20	A30
Effektgröße	n.b.	1,06	1,73	0,6	1,24	1,23	1,27
rel. Unterschied	3,30%	72,48%	2,36%	13,27%	22,58%	21%	21,36%

n.b. = nicht berechenbar

3. Einfluss des Komplementsystems auf die Blutbilder

Um festzustellen, ob es zelluläre Unterschiede im Blut von C4^{-/-} Mäuse im Gegensatz zu den Wildtyptieren gibt und diese die unterschiedliche Thromboseneigung erklären, wurden basal und 48 Stunden nach Flussverlangsamung je ein großes und ein weißes Blutbild erstellt.

3.1. Großes Blutbild basal

Für dieses Blutbild wurden den Tieren basal vor der Operation zur Flussverlangsamung durch Punktion der V. facialis Blut abgenommen.

Bei der Analyse der basalen Blutwerte der C4^{-/-} Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren ergab sich für die Leukozyten (WBC) ein mittlerer relativer Unterschied von 17,34% und eine geringe Effektgröße von 0,31 (Tab. 15). Mit der verwendeten Tierzahl konnte dieser Effekt auf die Leukozyten nicht als statistisch signifikant ($p=0,727$) nachgewiesen werden (Abb. 22). Für die Erythrozyten (RBC) ergibt sich ein sehr geringer relativer Unterschied von 1,15% und eine geringe Effektgröße von 0,33 (Tab. 15). Mit der verwendeten Tierzahl konnte dieser Effekt nicht als statistisch signifikant ($p=0,702$) nachgewiesen werden (Abb. 22). Für das Hämoglobin (HGB) ergibt sich ein sehr geringer relativer Unterschied von 0,47% und eine geringe Effektgröße von 0,18 (Tab. 15). Mit der verwendeten Tierzahl konnte dieser Effekt auf das Hämoglobin nicht statistisch signifikant ($p=0,836$) nachgewiesen werden (Abb. 22). Für den Hämatokrit (HCT) ergibt sich ein sehr geringer relativer Unterschied von 1,34% und eine mittlere Effektgröße von 0,46 (Tab. 15). Mit der verwendeten Tierzahl konnte dieser Effekt auf den Hämatokrit nicht als statistisch signifikant ($p=0,622$) nachgewiesen werden (Abb. 22). Für das Mittlere Erythrozyteneinzelvolumen (MCV) ergibt sich ein sehr geringer relativer Unterschied von 2,49% und eine sehr große Effektgröße von 2,02 (Tab. 15). Mit der verwendeten Tierzahl konnte dieser Effekt auf das mittlere Erythrozyteneinzelvolumen nicht als statistisch signifikant ($p=0,068$) nachgewiesen werden (Abb. 22). Für das Mittlere Korpuskuläre Hämoglobin (MCH) ergibt sich ein sehr geringer relativer Unterschied von 0,69% und eine geringe Effektgröße von 0,25 (Tab. 15). Mit der verwendeten Tierzahl konnte dieser Effekt auf das Mittlere Korpuskuläre Hämoglobin nicht als statistisch signifikant ($p=0,775$) nachgewiesen werden (Abb. 22). Für die Mittlere Korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (MCHC) ergibt sich ein sehr geringer relativer Unterschied von 1,47% und eine mittlere Effektgröße von 0,65 (Tab. 15). Mit der verwendeten Tierzahl konnte dieser Effekt auf die Mittlere Korpuskuläre Hämoglobinkonzentration nicht als statistisch signifikant ($p=0,775$) nachgewiesen werden (Abb. 22).

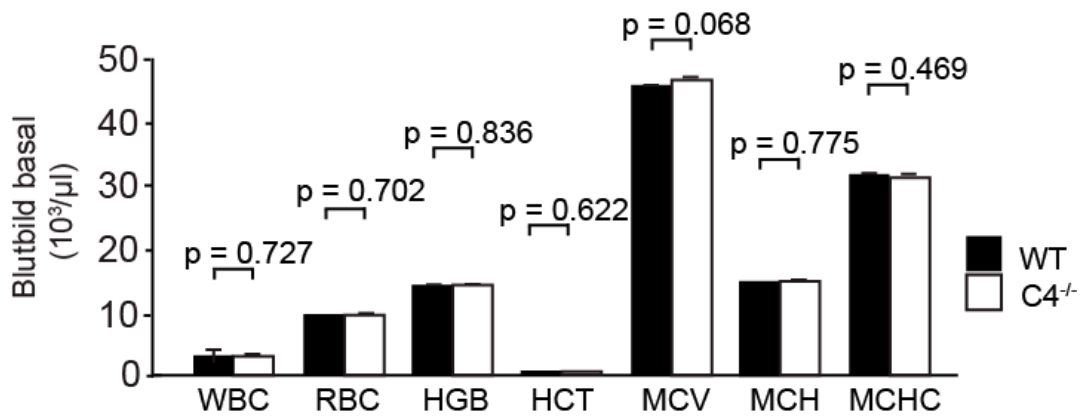


Abbildung 22: Großes Blutbild basal von C57Bl/6J Mäusen im Vergleich zu C4^{-/-} Mäusen

Großes Blutbild basal von Wildtypkontrollmäusen (C57Bl/6J) (n=3) und C4^{-/-} (n=3) Mäusen. Fehlerbalken $\hat{=}$ SEM.

Tabelle 15: Effektgröße und relativer Unterschied für basales Blutbild

	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC
Effektgröße	0,31	0,33	0,18	0,46	2,02	0,25	0,65
rel. Unterschied	17,34%	1,15%	0,47%	1,34%	2,49%	0,69%	1,47%

3.2. Großes Blutbild 48 Stunden nach Flussverlangsamung

Das Blut für diese Blutbilder wurde den Tieren 48 Stunden nach Flussverlangsamung direkt vor der Entnahme des Thrombus durch Punktion der V. facialis abgenommen.

Bei der Analyse der Blutwerte 48 Stunden nach Flussverlangsamung der C4^{-/-} Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren ergab sich für die Leukozyten (WBC) ein geringer relativer Unterschied von 12,66% und eine geringe Effektgröße von 0,25 (Tab. 16). Mit der verwendeten Tierzahl konnte dieser geringe Effekt auf die Leukozyten auch nicht als statistisch signifikant (p=0.773) nachgewiesen werden (Abb. 23). Für die Erythrozyten (RBC) ergibt sich ein sehr geringer relativer Unterschied von 2,38% und eine geringe Effektgröße von 0,16 (Tab. 16). Mit der

verwendeten Tierzahl konnte dieser Effekt nicht als statistisch signifikant ($p=0,858$) nachgewiesen werden (Abb. 23). Für das Hämoglobin (HGB) ergibt sich ein sehr geringer relativer Unterschied von 0,27% und eine sehr geringe Effektgröße von 0,02 (Tab. 16). Mit der verwendeten Tierzahl konnte dieser geringe Effekt auf das Hämoglobin nicht statistisch signifikant ($p=0,985$) nachgewiesen werden (Abb. 23). Für den Hämatokrit (HCT) ergibt sich ein sehr geringer relativer Unterschied von 1,86% und eine geringe Effektgröße von 0,12 (Tab. 16). Mit der verwendeten Tierzahl konnte dieser geringe Effekt auf den Hämatokrit nicht als statistisch signifikant ($p=0,883$) nachgewiesen werden (Abb. 23). Für das Mittlere Erythrozyteneinzelvolumen (MCV) ergibt sich ein sehr geringer relativer Unterschied von 0,56% und eine geringe Effektgröße von 0,25 (Tab. 16). Mit der verwendeten Tierzahl konnte dieser geringe Effekt auf das mittlere Erythrozyteneinzelvolumen nicht als statistisch signifikant ($p=0,771$) nachgewiesen werden (Abb. 23). Für das Mittlere Korpuskuläre Hämoglobin (MCH) ergibt sich ein sehr geringer relativer Unterschied von 2,10% und eine sehr große Effektgröße von 5,2 (Tab. 16). Mit der verwendeten Tierzahl konnte dieser Effekt auf das Mittlere Korpuskuläre Hämoglobin als statistisch signifikant ($p=0,003$) nachgewiesen werden (Abb. 23). Für die Mittlere Korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (MCHC) ergibt sich ein sehr geringer relativer Unterschied von 1,68% und eine mittlere Effektgröße von 0,75 (Tab. 16). Mit der verwendeten Tierzahl konnte dieser Effekt auf die Mittlere Korpuskuläre Hämoglobinkonzentration nicht als statistisch signifikant ($p=0,410$) nachgewiesen werden (Abb. 23).

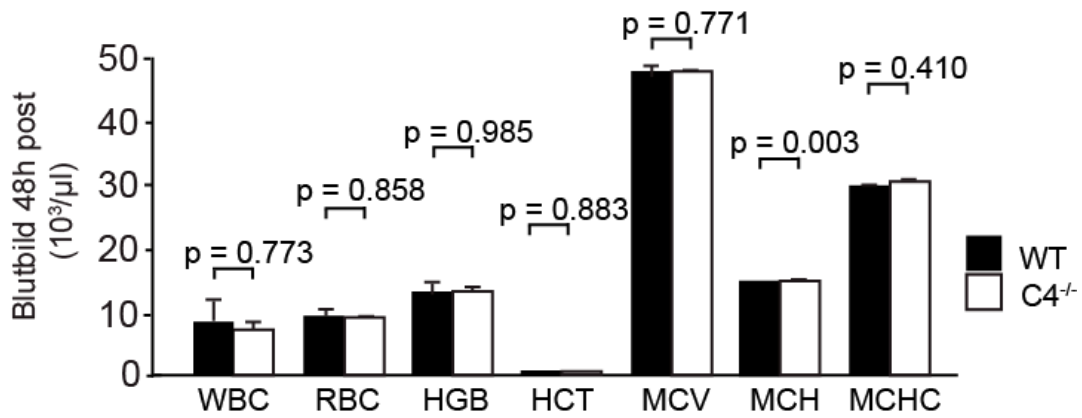


Abbildung 23: Grobes Blutbild 48 Stunden nach Flussverlangsamung von C57Bl/6J Mäusen im Vergleich zu C4^{-/-} Mäusen

Grobes Blutbild 48 Stunden nach Flussverlangsamung von Wildtypkontrollmäusen (C57Bl/6J) (n=3) und C4^{-/-} (n=3) Mäusen. Fehlerbalken \triangleq SEM.

Tabelle 16: Effektgröße und relativer Unterschied für Blutbild 48h post

	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC
Effektgröße	0,25	0,16	0,02	0,12	0,25	5,2	0,75
rel. Unterschied	12,66%	2,38%	0,27%	1,86%	0,56%	2,10%	1,68%

3.3. Thrombozyten

Bei der Analyse der basalen Thrombozyten der C4^{-/-} Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren ergab sich für die Thrombozyten eine geringe Effektgröße von 0,33 bei einem gleichzeitigen sehr geringen relativen Unterschied von 8,26% (Tab. 17). Mit der verwendeten Tierzahl konnte dieser geringe Effekt auf die Thrombozyten auch nicht als statistisch signifikant (p=0.709) nachgewiesen werden (Abb. 24).

Für die Thrombozyten 48 Stunden nach Flussverlangsamung ergibt sich ein geringer relativer Unterschied von 19,19% und eine geringe Effektgröße von 0,4 (Tab. 18). Mit der verwendeten Tierzahl konnte dieser geringe Effekt nicht als statistisch signifikant (p=0,649) nachgewiesen werden (Abb. 24).

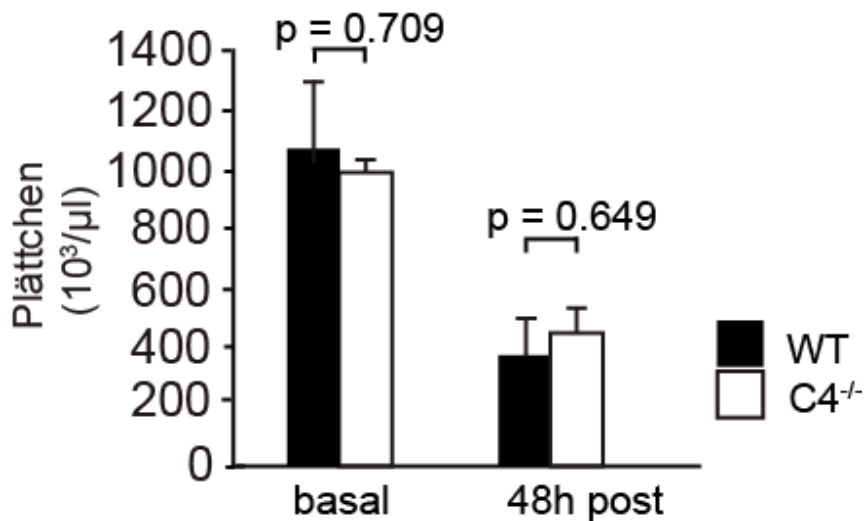


Abbildung 24: Vergleich der Menge an Blutplättchen von C57Bl/6J Mäusen und C4^{-/-} Mäusen basal und 48 Stunden nach Flussverlangsamung

Vergleich der Menge an Blutplättchen von Wildtypkontrollmäusen (C57Bl/6J) (n=3) und C4^{-/-} (n=3) Mäusen basal und 48 Stunden nach Flussverlangsamung. Fehlerbalken $\hat{=}$ SEM.

Tabelle 17: Effektgröße und relativer Unterschied für Plättchen basal

Effektgröße	0,33
rel. Unterschied	8,26%

Tabelle 18: Effektgröße und relativer Unterschied für Plättchen 48h post

Effektgröße	0,4
rel. Unterschied	19,19%

3.4. Weißes Blutbild basal

Bei der Analyse des basalen weißen Blutbildes der C4^{-/-} Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren ergab sich für die neutrophilen Granulozyten (Neut) ein geringer relativer Unterschied von 16,67% und eine geringe Effektgröße von 0,15 (Tab. 19). Mit der verwendeten Tierzahl konnte dieser geringe Effekt auf die neutrophilen Granulozyten auch nicht als statistisch signifikant ($p=0.867$) nachgewiesen werden (Abb. 25). Für die Lymphozyten (Lymph) ergab sich ein geringer relativer Unterschied von 20,51% und eine geringe Effektgröße von 0,37 (Tab. 19). Mit der verwendeten Tierzahl konnte dieser geringe Effekt auf die

Lymphozyten auch nicht als statistisch signifikant ($p=0.676$) nachgewiesen werden (Abb. 25). Für die Monozyten (Mono) ergab sich ein sehr großer relativer Unterschied von 400,00% und eine sehr große Effektgröße von 1,79 (Tab. 19). Mit der verwendeten Tierzahl konnte dieser große Effekt auf die Monozyten allerdings nicht als statistisch signifikant ($p=0.137$) nachgewiesen werden (Abb. 25).

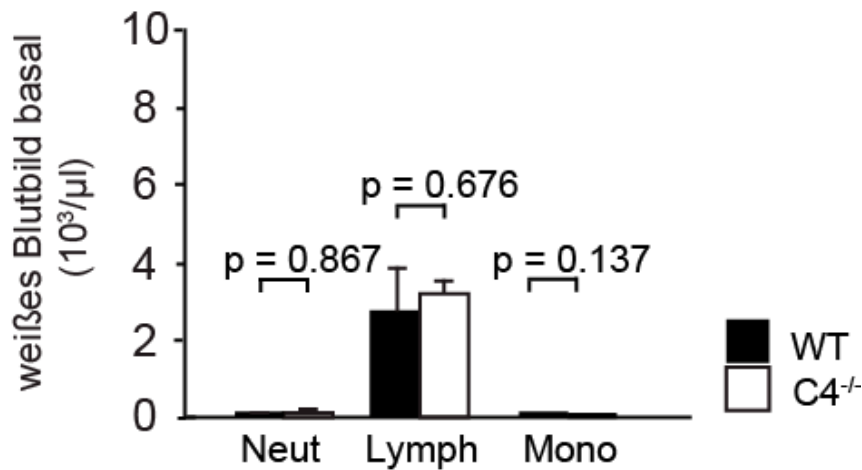


Abbildung 25: Weißes Blutbild basal von C57Bl/6J Mäusen und C4^{-/-} Mäusen

Vergleich der weißen Blutbilder basal von Wildtypkontrollmäusen (C57Bl/6J) ($n=3$) und C4^{-/-} ($n=3$). Fehlerbalken $\hat{=}$ SEM.

Tabelle 19: Effektgröße und relativer Unterschied für weißes Blutbild basal

	Neut	Lymph	Mono
Effektgröße	0,15	0,37	1,79
rel. Unterschied	16,67%	20,51%	400,00%

3.5. Weißes Blutbild 48 Stunden nach Flussverlangsamung

Bei der Analyse des weißen Blutbildes 48 Stunden nach Flussverlangsamung der C4^{-/-} Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren ergab sich für die neutrophilen Granulozyten (Neut) ein geringer relativer Unterschied von 21,40% und eine geringe Effektgröße von 0,34 (Tab. 20). Mit der verwendeten Tierzahl konnte

dieser geringe Effekt auf die neutrophilen Granulozyten auch nicht als statistisch signifikant ($p=0.694$) nachgewiesen werden (Abb. 26). Für die Lymphozyten (Lymph) ergab sich ein sehr geringer relativer Unterschied von 0,11% und eine Effektgröße von 0,00 (Tab. 20). Mit der verwendeten Tierzahl konnte dieser geringe Effekt auf die Lymphozyten auch nicht als statistisch signifikant ($p=0.999$) nachgewiesen werden (Abb. 26). Für die Monozyten (Mono) ergab sich ein mittlerer relativer Unterschied von 27,24% und eine geringe Effektgröße von 0,23 (Tab. 20). Mit der verwendeten Tierzahl konnte dieser Effekt auf die Monozyten allerdings nicht als statistisch signifikant ($p=0.793$) nachgewiesen werden (Abb. 26).

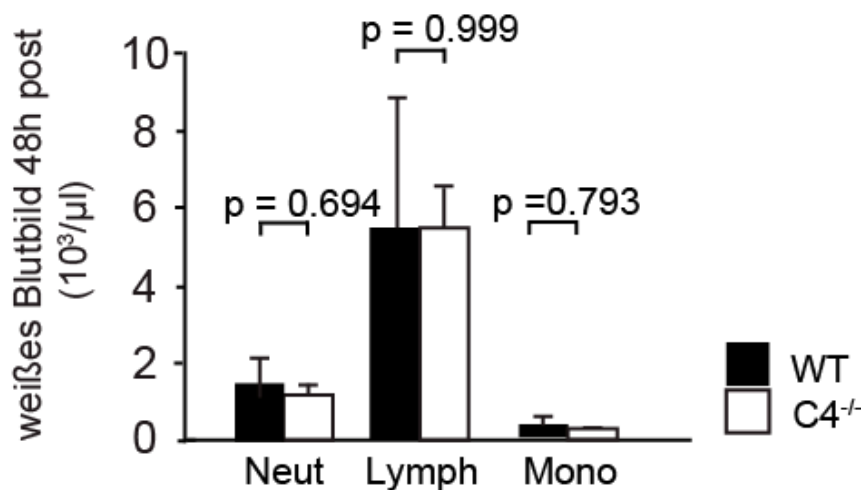


Abbildung 26: Weißes Blutbild 48 Stunden nach Flussverlangsamung von C57Bl/6J Mäusen und C4^{-/-} Mäusen

Vergleich der weißen Blutbilder 48 Stunden nach Flussverlangsamung von Wildtypkontrollmäusen (C57Bl/6J) ($n=3$) und C4^{-/-} ($n=3$). Fehlerbalken $\hat{=}$ SEM.

Tabelle 20: Effektgröße und relativer Unterschied für weißes Blutbild 48h post

	Neut	Lymph	Mono
Effektgröße	0,34	0,00	0,23
rel. Unterschied	21,40%	0,11%	27,24%

4. Die initiale Leukozytenrektrutierung ist unabhängig von C4

Um festzustellen, ob es einen Unterschied in der Leukozyten- und Thrombozytenaggregation in den ersten sechs Stunden nach Flussverlangsamung gibt wurden Aufnahmen mit dem Intravitalmikroskop angefertigt. Dabei wurde speziell auf die drei, vier, fünf und sechs Stunden nach Flussverlangsamung geachtet.

4.1. Leukozytenaggregation

Es wurde aus den IVM-Aufnahmen die μm^2 Fläche an Leukozyten pro einem mm^2 Endothelfläche ermittelt. Bei der Auswertung ergab sich zwischen den C4^{-/-} und den Kontrolltieren für die Anzahl der Leukozyten nach drei Stunden ein mittlerer relativer Unterschied von 25,17% und eine geringe Effektgröße von 0,29 (Tab. 21). Mit der verwendeten Tierzahl konnte dieser geringe Effekt auf die Verringerung der Anzahl der Leukozyten nach drei Stunden nicht als statistisch signifikant ($p=0,739$) nachgewiesen werden (Abb. 27). Für die Anzahl der Leukozyten nach vier Stunden ergab sich ein geringer relativer Unterschied von 14,65% und eine geringe Effektgröße von 0,14 (Tab. 21). Mit der verwendeten Tierzahl konnte dieser geringe Effekt auf die Erhöhung der Anzahl der Leukozyten nach vier Stunden nicht als statistisch signifikant ($p=0,871$) nachgewiesen werden (Abb. 27). Für die Anzahl der Leukozyten nach fünf Stunden ergab sich ein großer relativer Unterschied von 44,22% und eine mittlere Effektgröße von 0,63 (Tab. 21). Mit der verwendeten Tierzahl konnte dieser Effekt auf die Verringerung der Anzahl der Leukozyten nach fünf Stunden nicht als statistisch signifikant ($p=0,444$) nachgewiesen werden (Abb. 27). Für die Anzahl der Leukozyten nach sechs Stunden ergab sich ein mittlerer relativer Unterschied von 19,38% und eine geringe Effektgröße von 0,29 (Tab. 21). Mit der verwendeten Tierzahl konnte dieser Effekt auf die Verringerung der Anzahl der Leukozyten nach sechs Stunden nicht als statistisch signifikant ($p=0,724$) nachgewiesen werden (Abb. 27).

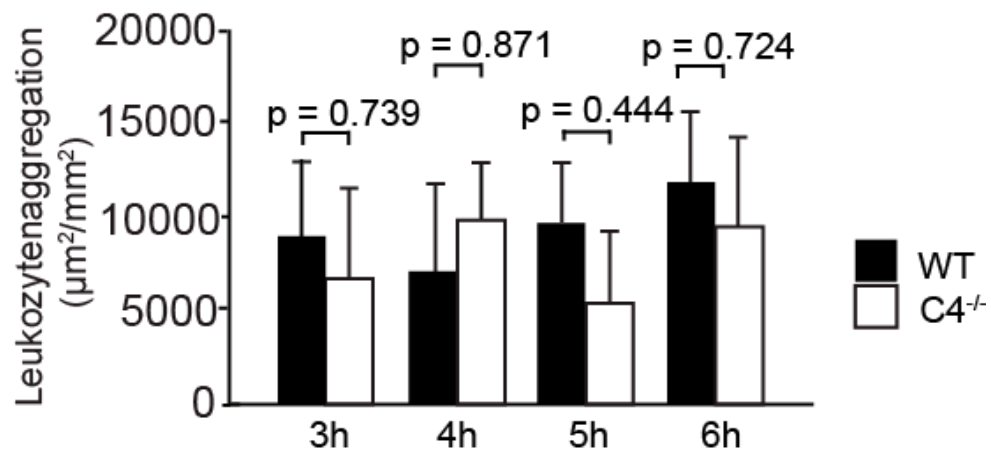


Abbildung 27: Leukozytenaggregation in μm^2 pro mm^2 von C57Bl/6J Mäusen im Vergleich zu C4^{-/-} Mäusen

Leukozytenaggregation in μm^2 pro mm^2 Endothelfläche nach drei, vier, fünf und sechs Stunden nach Flussverlangsamung, aufgenommen mit dem Intravitalmikroskop. Vergleich von Wildtypkontrollmäusen (C57Bl/6J) (3h,4h n=3; 5h, 6h n=4) und C4^{-/-} (n=3). Fehlerbalken \triangleq SEM

Tabelle 21: Effektgröße und relativer Unterschied für Leukozytenaggregation

	3h	4h	5h	6h
Effektgröße	0,29	0,14	0,63	0,29
rel. Unterschied	25,17%	14,65%	44,22%	19,38%

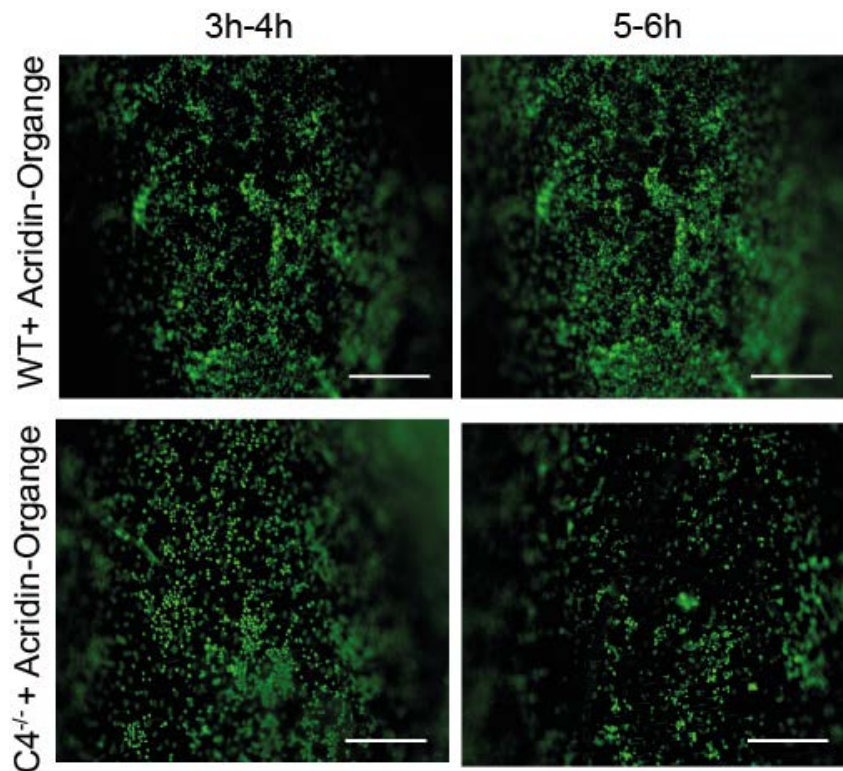


Abbildung 28: Leukozytenaggregation von C57Bl/6J Mäusen im Vergleich zu C4^{-/-} Mäusen 3-4 Stunden und 5-6 Stunden nach Flussreduktion

IVM-Aufnahmen der Leukozytenaggregation von C57Bl/6J Mäusen im Vergleich zu C4^{-/-} Mäusen 3-4 Stunden und 5-6 Stunden nach Flussreduktion. Maßstab =100 μ m

4.2. Thrombozytenaggregation

Wie bei den Leukozyten wurde auch bei den Thrombozyten aus den IVM-Aufnahmen die μ m² Fläche an Thrombozyten pro einem mm² Endothelfläche ermittelt. Bei der Auswertung ergab sich zwischen den C4^{-/-} und den Kontrolltieren für die Anzahl der Thrombozyten nach drei Stunden ein sehr großer relativer Unterschied von 147,36% und eine sehr große Effektgröße von 4,67 (Tab. 22). Mit der verwendeten Tierzahl konnte dieser große Effekt auf die Erhöhung der Anzahl der Thrombozyten nach drei Stunden auch als statistisch signifikant ($p=0,005$) nachgewiesen werden (Abb. 29). Für die Anzahl der Thrombozyten nach vier Stunden ergab sich ein sehr großer relativer Unterschied von 313,06% und eine große Effektgröße von 0,96 (Tab. 22). Mit der verwendeten Tierzahl konnte dieser große Effekt auf die Erhöhung der Anzahl der Thrombozyten nach vier Stunden allerdings nicht als statistisch signifikant

($p=0,306$) nachgewiesen werden (Abb. 29). Für die Anzahl der Thrombozyten nach fünf Stunden ergab sich ein sehr großer relativer Unterschied von 165,80 und eine mittlere Effektgröße von 0,76 (Tab. 22). Mit der verwendeten Tierzahl konnte dieser Effekt auf die Erhöhung der Anzahl der Thrombozyten nach fünf Stunden nicht als statistisch signifikant ($p=0,444$) nachgewiesen werden (Abb. 27). Für die Anzahl der Thrombozyten nach sechs Stunden ergab sich ein großer relativer Unterschied von 42,18% und eine mittlere Effektgröße von 0,50 (Tab. 22). Mit der verwendeten Tierzahl konnte dieser Effekt auf die Erhöhung der Anzahl der Thrombozyten nach sechs Stunden nicht als statistisch signifikant ($p=0,509$) nachgewiesen werden (Abb. 29).

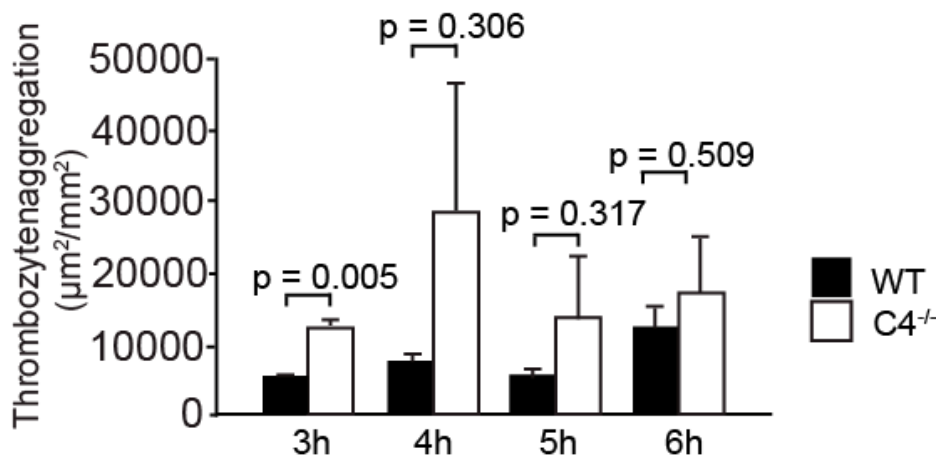


Abbildung 29: Thrombozytenaggregation in μm^2 pro mm^2 von C57Bl/6J Mäusen im Vergleich zu C4^{-/-} Mäusen

Thrombozytenaggregation in μm^2 pro mm^2 Endothelfläche nach drei, vier, fünf und sechs Stunden nach Flussverlangsamung, aufgenommen mit dem Intravitalmikroskop. Vergleich von Wildtypkontrollmäusen (C57Bl/6J) (3h,4h n=3; 5h, 6h n=4) und C4^{-/-} (n=3). Fehlerbalken $\hat{=}$ SEM

Tabelle 22: Effektgröße und relativer Unterschied für Thrombozytenaggregation

	3h	4h	5h	6h
Effektgröße	4,67	0,96	0,76	0,50
rel. Unterschied	147,36%	313,06%	165,80%	42,18%

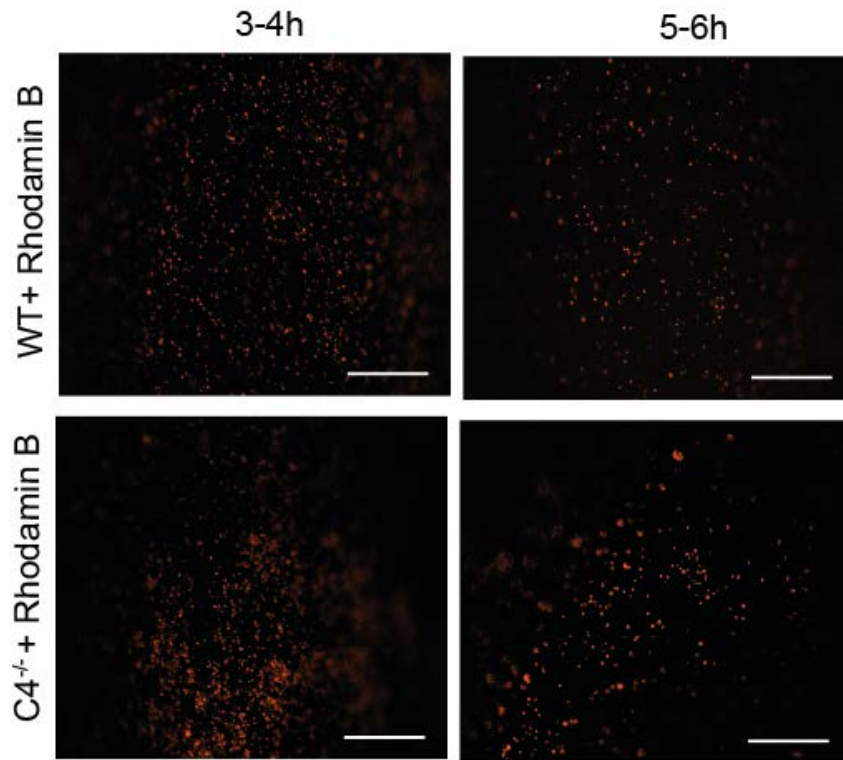


Abbildung 30: Thrombozytenaggregation von C57Bl/6J Mäusen im Vergleich zu C4^{-/-} Mäusen 3-4 Stunden und 5-6 Stunden nach Flussreduktion

IVM-Aufnahmen der Thrombozytenaggregation von C57Bl/6J Mäusen im Vergleich zu C4^{-/-} Mäusen 3-4 Stunden und 5-6 Stunden nach Flussreduktion. Maßstab = 100 μm

5. Die Leukozytenakkumulation bei der TVT ist C4 abhängig

Die 48 Stunden nach Flussverlangsamung gebildeten Thromben wurden entnommen und immunhistologisch genauer analysiert. Da sich im Thrombusgewicht der C4^{-/-} Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren ein signifikanter Unterschied gezeigt hat, wurde hier untersucht, ob auch immunhistologische Unterschiede festzustellen sind.

5.1. Fibrinogenfläche

Die entnommenen Thromben wurden geschnitten und die entstandenen Querschnitte auf fibrinogenspezifischem Marker gefärbt. Dadurch konnte der prozentuale Anteil der Fibrinogenfläche an der Gesamtfläche ermittelt werden.

Bei der Auswertung ergab sich zwischen den C4^{-/-} und den Kontrolltieren für den prozentuale Anteil der Fibrinogenfläche an der Gesamtfläche ein geringer relativer Unterschied von 8,52% und eine geringe Effektgröße von 0,18 (Tab. 23). Mit der verwendeten Tierzahl konnte dieser Effekt auf die Vergrößerung des prozentuale Anteils der Fibrinogenfläche an der Gesamtfläche nicht als statistisch signifikant ($p=0,837$) nachgewiesen werden (Abb. 31). Jedoch war das entstandene Fibrin der C4^{-/-} Thromben im Gegensatz zu den Wildtypthromben lockerer angeordnet.

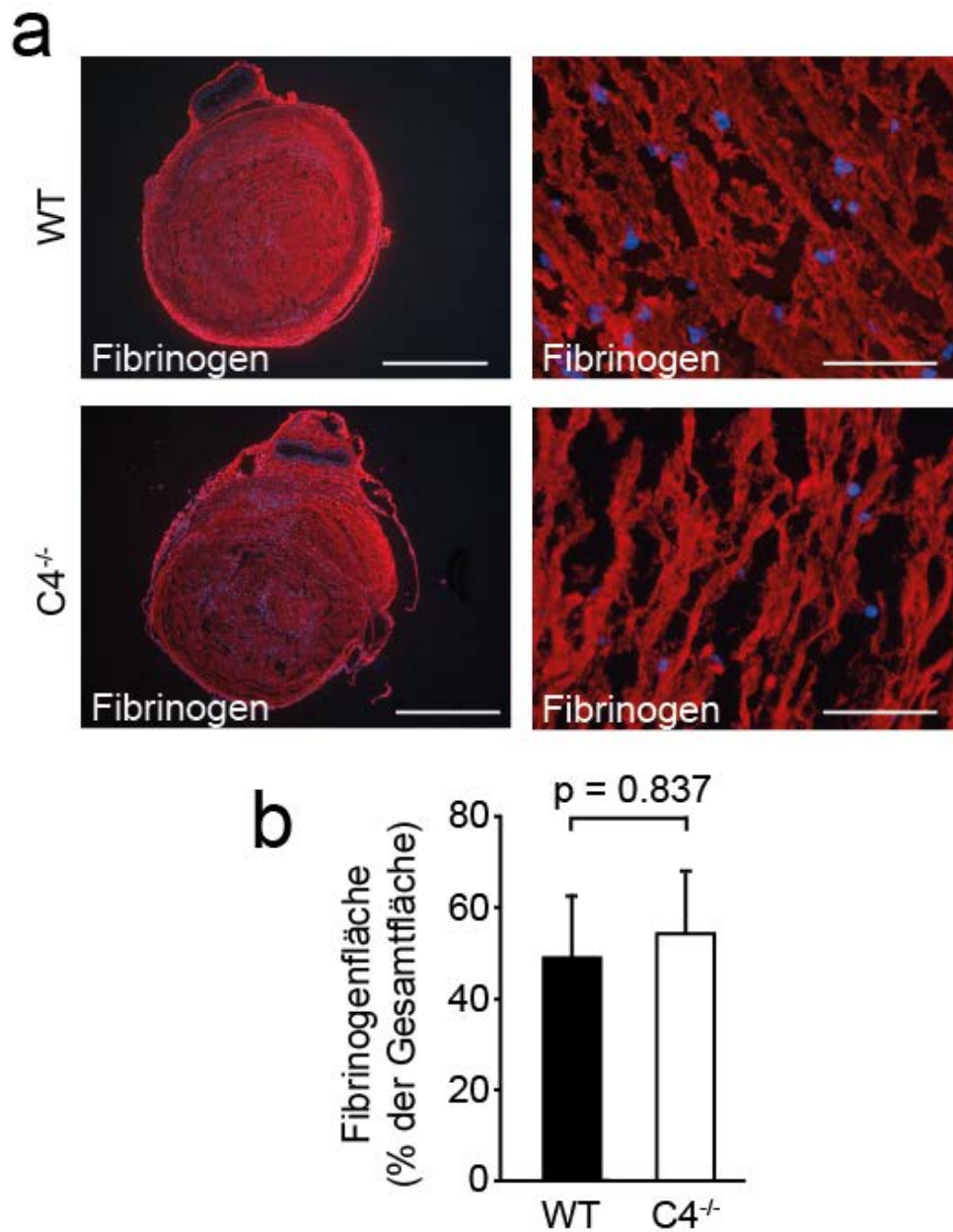


Abbildung 31: Fibrinogenfläche von C57Bl/6J Mäusen und C4^{-/-} Mäusen

a) Immunhistologische Färbung für Fibrinogen in einem WT und C4^{-/-} Thrombus. Zellkerne stellen sich durch eine DAPI Färbung blau dar. Links Übersicht eines Thrombusquerschnittes. Maßstab = 200 µm. Rechts Vergrößerung, für die Darstellung der Fibrinogenstruktur. Maßstab = 50 µm.

b) Vergleich des prozentualen Anteils der Fibrinogenfläche an der Gesamtfläche in Thrombusquerschnitten von Wildtypkontrollmäusen (C57Bl/6J) (n=3) und C4^{-/-} (n=3). Fehlerbalken ≙ SEM.

Tabelle 23: Effektgröße und relativer Unterschied für die Fibrinogenfläche

Effektgröße	0,18
rel. Unterschiede	8,52%

5.2. Thrombozytenfläche

Um den prozentuale Anteil der Plättchenfläche an der Gesamtfläche darzustellen wurden die Querschnitte der entnommenen Thromben mit CD41 gefärbt.

Bei der Auswertung ergab sich zwischen den C4^{-/-} und den Kontrolltieren für den prozentuale Anteil der Plättchenfläche an der Gesamtfläche ein großer relativer Unterschied von 35,22% und eine sehr große Effektgröße von 1,67 (Tab. 24). Mit der verwendeten Tierzahl konnte dieser große Effekt auf die Vergrößerung des prozentuale Anteils der Plättchenfläche an der Gesamtfläche nicht als statistisch signifikant ($p=0,111$) nachgewiesen werden (Abb. 32).

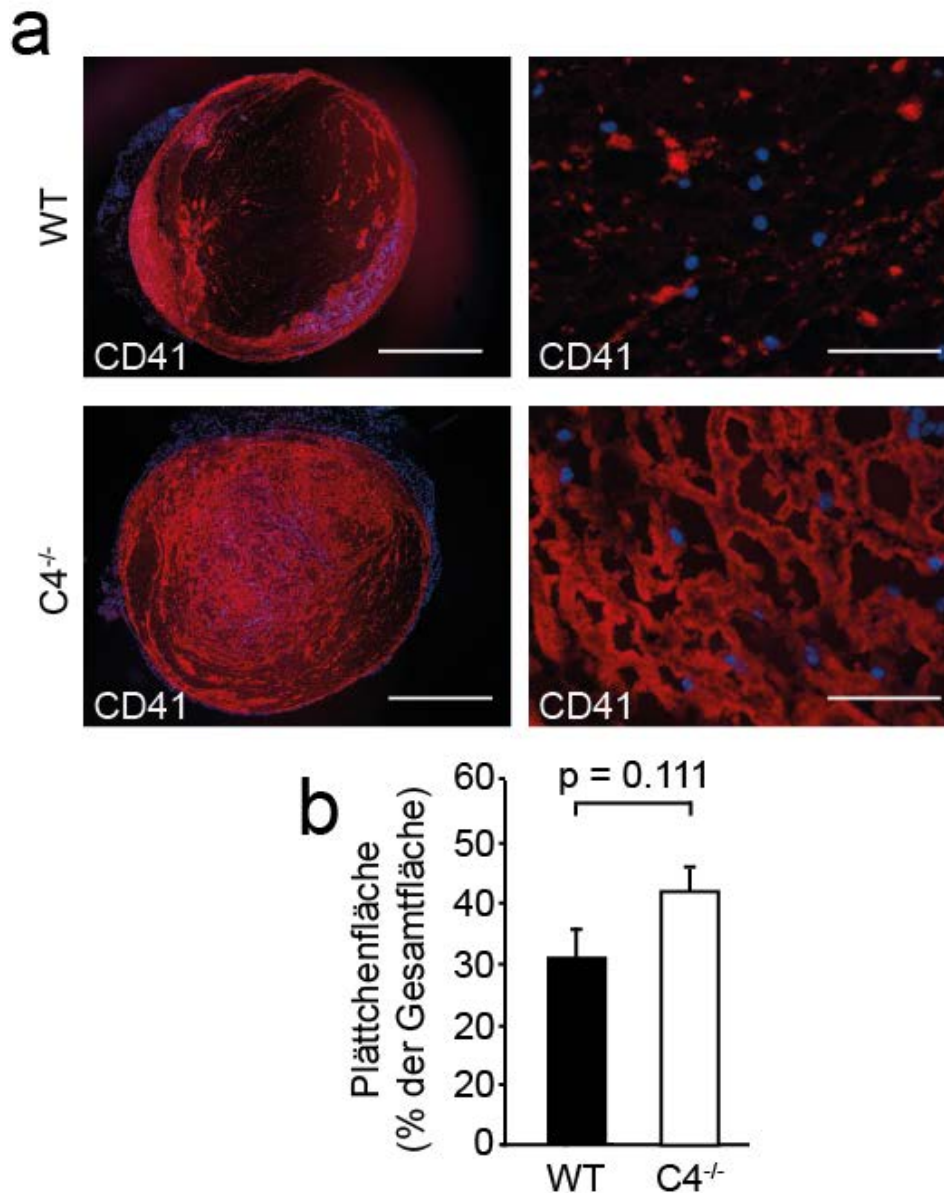


Abbildung 32: Plättchenfläche von C57Bl/6J Mäusen und C4^{-/-} Mäusen

a) Immunhistologische Färbung mit CD41 um die Blutplättchen darzustellen in einem WT und C4^{-/-} Thrombus. Zellkerne stellen sich durch eine DAPI Färbung blau dar. Links Übersicht eines Thrombusquerschnittes. Maßstab = 200 μ m. Rechts Vergrößerung, für die Darstellung der Plättchenfläche. Maßstab = 50 μ m.

b) Vergleich des prozentualen Anteils der Plättchenfläche an der Gesamtfläche in Thrombusquerschnitten von Wildtypkontrollmäusen (C57Bl/6J) (n=3) und C4^{-/-} (n=3). Fehlerbalken $\hat{=}$ SEM.

Tabelle 24: Effektgröße und relativer Unterschied für die Plättchenfläche

Effektgröße	1,67
rel. Unterschiede	35,22%

5.3. Leukozyten

Die Querschnitte der entnommenen Thromben wurden mit CD45 gefärbt, um die Leukozyten darzustellen. Diese wurden dann gezählt und deren Anzahl auf eine Fläche von einem mm² hochgerechnet.

Bei der Auswertung ergab sich zwischen den C4^{-/-} und den Kontrolltieren für die Anzahl der Leukozyten ein großer relativer Unterschied von 64,87% und eine sehr große Effektgröße von 4,290 (Tab. 25). Mit der verwendeten Tierzahl konnte dieser große Effekt auf die Verringerung der Anzahl der Leukozyten auch als statistisch signifikant (p=0,006) nachgewiesen werden (Abb. 33).

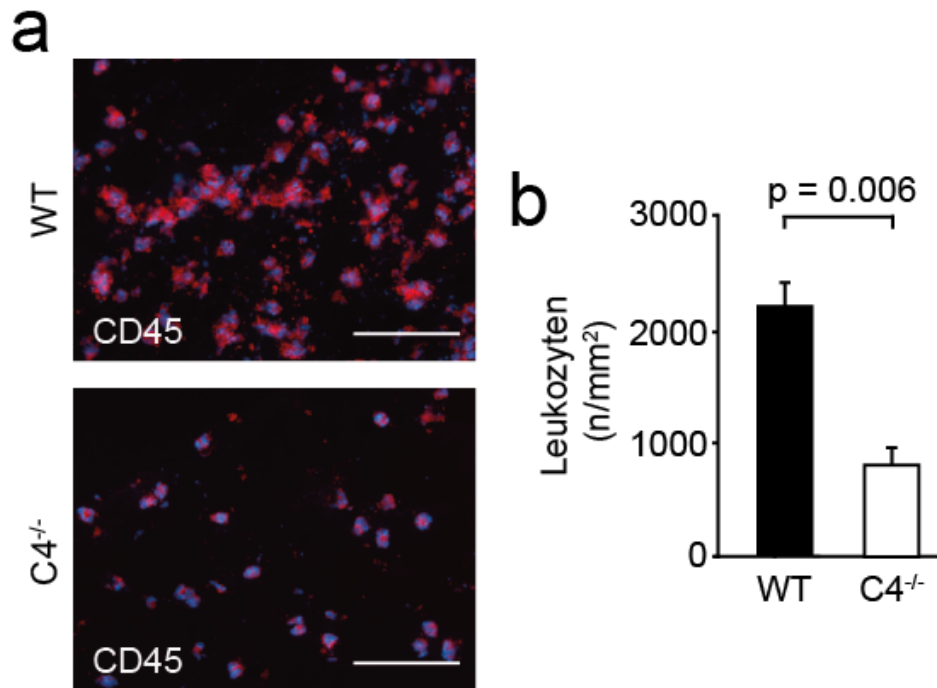


Abbildung 33: Anzahl der Leukozyten pro mm² von C57Bl/6J Mäusen und C4^{-/-} Mäusen

- a)** Immunhistologische Färbung mit CD45 um die Leukozyten darzustellen in einem WT und C4^{-/-} Thrombus. Zellkerne stellen sich durch eine DAPI Färbung blau dar. Maßstab = 50 μ m.
- b)** Vergleich der Leukozytenzahl pro mm² in Thrombusquerschnitten von Wildtypkontrollmäusen (C57Bl/6J) (n=3) und C4^{-/-} (n=3). Fehlerbalken $\hat{=}$ SEM

Tabelle 25: Effektgröße und relativer Unterschied für die Anzahl der Leukozyten

Effektgröße	4,29
rel. Unterschiede	64,87%

VI. DISKUSSION

1. Wahl der Mauslinien

Bei den Vorteilen der Maus als Versuchstier ist die relativ einfache und kostengünstige Haltung, auch in größerer Anzahl, zu nennen. Ein weiterer bedeutender Vorteil ist die schnelle Reproduktionszeit der Maus, damit ist eine schnelle und weitgehend problemlose Nachzucht sicher gestellt. Darüber hinaus ist es relativ einfach das Genom der Mäuse zu manipulieren.

Im Vorfeld dieser Arbeit wurden mehrere Komplementknockoutlinien operiert um zu analysieren beim Knockout welchen Komplementfaktors sich eine Verminderung des Thrombusgewichtes darstellt. Dies war bei der C1q^{-/-}, CR2^{-/-}, C3^{-/-}, C4^{-/-} und der C3^{-/-}C4^{-/-} Linie der Fall. Am deutlichsten war die Verminderung des Thrombusgewichtes bei den C4-Knockouttieren zu sehen, deshalb wurde diese Linie noch im Detail mittels Blutbildern, Gerinnungsanalysen, Immunhistologie und Intravitalmikroskopie untersucht, um einen genauen Überblick über den Mechanismus zu bekommen mit dem sich dieser Komplementfaktor auf die Entstehung der venösen Thrombose auswirkt. Als Kontrollstamm wurde der C57Bl/6J-Stamm verwendet. Dieser Inzuchtstamm wird am häufigsten verwendet und zeichnet sich durch eine problemlose Zucht aus, wobei eine Genotypisierung der Nachzucht nicht erforderlich ist.

2. C4-Defizienz ist protektiv gegen venöse Thrombose

Das Tiermodell zur Flussreduktion wurde in dieser Arbeitsgruppe entwickelt und weiter untersucht¹². Dieses Modell zeichnet sich durch eine weiterhin bestehende, aber um 75 % verlangsamte Flussgeschwindigkeit des Blutes aus, wobei das Endothel unversehrt bleibt. Dadurch lässt es sich mit klinischen Situationen vergleichen, die durch reine Flussreduktion ausgelöst werden. Diese manifestiert

sich z.B. bei Langstreckenflügen oder längerfristigen Immobilisation von Patienten¹²⁷. Das Thrombusgewicht wurde als Maß für die Thrombusbildung eingeführt. Dieses Modell wurde für die Kontrolltiere, sowie für die Knockoutgruppen angewendet um danach den Einfluss der verschiedenen Komplementfaktoren auf das Thrombusgewicht vergleichen zu können. Hier zeigte sich, dass die C4-Knockoutlinie und die C3/C4 Knockoutlinie eine signifikante Verminderung des Thrombusgewichtes zeigten. Bei C3^{-/-} war das Thrombusgewicht nicht signifikant vermindert, woraufhin angenommen wurde, dass bei dem Doppelknockout, das C4^{-/-} die größere Rolle spielt. Deshalb wurde die C4^{-/-} Linie weiter untersucht.

3. C4 hat einen geringen Einfluss auf die Blutgerinnung

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass es eine Interaktion zwischen Komplementsystem und Blutgerinnung gibt^{104,128-130} wobei der genaue Mechanismus noch unbekannt ist. Beim Vergleich der Schwanzblutungszeiten der C4-Knockouttiere mit den Kontrolltieren zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Allerdings gibt die Effektgrößenanalyse einen klaren Hinweis auf einen mittleren Einfluss von C4 auf die Schwanzblutungszeit. Die weitere Analyse von Einzelfaktoren zeigt auf welche Einzelfaktoren C4 Einfluss nimmt und damit insgesamt die Blutgerinnungszeit beeinflusst.

Bei der basalen EXTEM-Analyse der Thromboelastometrie zeigte sich eine signifikante Verlängerung der Gerinnungszeit. Jedoch legt die Effektgrößenanalyse nahe, dass noch einige weitere Parameter (partielle Thromboplastinzeit, Gerinnselbildungszeit bei der basalen EXTEM-Analyse mit rekombinanter TF Quelle, Gerinnungszeit und Gerinnselbildungszeit bei der EXTEM-Analyse 48 Stunden post, Gerinnselbildungszeit bei der FIBTEM-Analyse 48 Stunden post) stark beeinflusst werden und damit weiter untersucht zu werden.

Um zu überprüfen welchen Einfluss ein Knockout des Komplementfaktors C4 auf die Blutwerte hat wurden verschiedene Blutbilder, basal und 48 Stunden nach Flussverlangsamung angefertigt. Dabei zeigte sich im großen Blutbild 48 Stunden

nach Flussverlangsamung eine signifikante Veränderung beim MCH-Wert. Veränderungen dieses Wertes haben allerdings keinen Einfluss auf die durchschnittliche Hämoglobingehalt eines Erythrozyten definiert. Weiter gab es keine signifikanten Veränderungen in den Blutbildern, auch nicht bei der Thrombozyten- oder Leukozytenzahl. Daher beruht die verminderte Thrombusbildung bei C4-Knockouttieren nicht auf einer Thrombo- oder Leukopenie, welche einen großen Einfluss auf die Thrombusbildung haben¹².

4. C4 ist von zentraler Bedeutung für die Leukozytenakkumulation bei venöser Thrombose

Bei der immunhistologischen Auswertung der Thrombusquerschnitte wurde speziell auf die Fibrinogen- und die Plättchenfläche im Verhältnis zur gesamten Thrombusfläche geachtet. Beim Vergleich der C4^{-/-} Tiere mit den Kontrolltieren zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Weiter wurde die Anzahl der Leukozyten pro mm² Thrombus ermittelt. Dort zeigte sich, dass die Anzahl der Leukozyten bei den C4^{-/-} Thromben signifikant vermindert war im Gegensatz zu den Kontrolltieren. Dies könnte der Grund für das reduzierte Thrombusgewicht sein. Allerdings war die Leukozytenzahl in den Blutbildern nicht vermindert, was auf eine Beeinträchtigung der Leukozytenrekrutierung hinweist. Daher wurde die Intravitalmikroskopie durchgeführt um die frühen zellulären Vorgänge bei venöser Thrombose zu analysieren.

Um die Verminderung der Leukozytenzahl in den Thromben näher zu untersuchen, wurden intravitalmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Nach Auswertung dieser Aufnahmen zeigte sich allerdings keine signifikante Verminderung in der Leukozytenrekrutierung. Bei den Thrombozyten wiederum war eine signifikant erhöhte Rekrutierung drei Stunden nach Flussverlangsamung zu erkennen. Diese Ergebnisse geben keinen Hinweis auf die Ursache in der Reduktion des Thrombusgewichtes. Da allerdings nach 48 Stunden eine signifikant verminderte Leukozytenzahl detektierbar ist, weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass C4 nicht für die initiale Leukozytenrekrutierung, sondern für die

Akkumulation von zentraler Bedeutung ist. Um eine konkrete Aussage dazu treffen zu können, sollten allerdings noch mehr Tiere untersucht werden.

5. Ausblick

Durch diese Arbeit konnte der Einfluss des Komplementfaktors C4 auf die Entstehung der venösen Thrombose aufgezeigt werden. Allerdings konnte der Mechanismus, mit dem Komplement- und Gerinnungssystem kooperieren nicht weiter aufgeklärt werden. Es bleibt das Ziel weiterführender Untersuchungen auf Basis dieser Ergebnisse im Detail die Rolle des Komplementsystems bei der Entstehung der venösen Thrombose zu klären. Zudem muss der Einfluss von C4 auf die Thrombozytenfunktion weitergehend analysiert werden.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit untersucht die Rolle des Komplementsystems bei der Entstehung der venösen Thrombose. Bisher ist der Mechanismus mit dem das Komplementsystem in die Thrombusentstehung eingreift noch ungeklärt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein Knockout des Komplementfaktors C4 und ein Doppelknockout der Faktoren C3 und C4 zu einer Reduzierung des Thrombusgewichtes führen. Da bei einem Knockout des Faktors C4 die Reduktion des Thrombusgewichtes am deutlichsten war, wurde diese Mauslinie genauer analysiert. Auf die Blutgerinnung und die Zusammensetzung der Blutbilder konnte allerdings kein Einfluss des Komplementsystems festgestellt werden. Bei der immunhistologischen Auswertung der Thrombusquerschnitte konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der Leukozyten bei Thromben von C4-Knockouttieren signifikant reduziert war. Bei der Leukozyten- und Thrombozytenrekrutierung, die mittels Intravitalmikroskopie untersucht wurde, konnte kein signifikanter Unterschied gezeigt werden.

Allerdings gibt die Effektgrößenanalyse bei einigen Parametern Hinweise darauf, dass eine Beeinflussung durch das Komplementsystem besteht. Diese sollten weitergehend untersucht werden.

Demnach leistet diese Arbeit einen wichtigen Beitrag zum Verständnis des Einflusses von Komplementfaktor C4 auf die Entstehung der venösen Thrombose. Die Inhibition bestimmter Faktoren des Komplementsystems könnte eine zukünftige Präventionsoption der Thrombusbildung darstellen und so zu neuen therapeutischen Ansätzen in der Behandlung der tiefen Venenthrombose führen, welche nicht primär die Blutgerinnung beeinträchtigen.

VIII. SUMMARY

The role of the complement system in venous thrombosis

This dissertation examines the role of the complement system in the pathogenesis of venous thrombosis. The exact mechanism is still unknown.

It has been shown that the knockout of C4 and a double knockout of C4 and C3 lead to a reduction in the thrombus weight in a mouse model of venous thrombosis. As the reduction of the weight was most pronounced in C4 knockout mice, this mouse line was examined in more detail. An influence of the complement system on the bloodcoagulation and the composition of the blood could not be determined. The immunohistochemical analysis of the cross-sections of the thrombi showed, that the number of leukocytes in the C4-thrombi was significantly reduced. The recruitment of leukocytes and platelets, which was investigated by intravital microscopy, showed no significant difference.

However, the effect size analysis of some parameters shows that there are indications of an influence by the complement system. This should be investigated further.

In conclusion, this work makes an important contribution to the understanding of the influence of the complement factor C4 on the development of venous thrombosis. The inhibition of certain complement factors could be a future prevention of thrombus formation, and thus might lead to new approaches in the prophylaxis of deep vein thrombosis, which do not primarily impair coagulation.

IX. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AX	Amplitude X min nach CT
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosintriphosphat
AZ	Aktenzeichen
α IIb β 3	Glykoprotein auf der Thrombozytenoberfläche
B, D, P	Proteinfaktoren
bzw.	Beziehungsweise
ca.	zirka
CD59	zellbasierter Regulator
CFT	Gerinnungsbildungszeit
cm	Zentimeter
CRP	C-reaktive Proteine
C1q	Erkennungsmolekül des Komplementsystems
C1r, C1s	Serin-Protease Proenzymen
CR2	Komplementrezeptor
CT	Gerinnungszeit
C1-9	Komplementfaktoren
C5b-9-Komplex	MAC
C3aR, C5aR	Anaphylatoxinrezeptoren
C3d	Abbauprodukt von C3
C3(H ₂ O)Bb	C3-Konvertase des Alternativen Signalwegs
C4b2a	C3-Konvertase
C5L2	C5a receptor-like-2

F	Faktor
Faktor H	Bestanteil des Komplementsystems
Faktor VII	Gerinnungsfaktor
Faktor VIIa	aktivierter Gerinnungsfaktor
Faktor IX	Serinprotease
Faktor X	Serinprotease
Faktor Xa	aktivierte Serinprotease
FXIa	aktivierter Gerinnungsfaktor
FXII	Serinprotease
FXIIa	aktivierte Serinprotease
FeCl ₃	Eisen(III)-Chlorid
g	Gramm
GPIb-V-IX	Thrombozytenkomplex
HCL	Chlorwasserstoff
HCT	Hämatokrit
HGB	Hämoglobin
H ₂ O	chemische Summenformel von Wasser
ID	innerer Durchmesser
IgA	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin
IgM	Immunglobulin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IVM	Intravital Videofluoreszenzmikroskopie
kDa	Kilo Dalton

kg	Kilogramm
Lymph	Lymphozyten
µm	Mikrometer
MAC	Membran-Attack-Complex
MAP	Spaltprodukt der MASP Gene
MASP	MBL-assoziierten Serin Protease
MBL	Mannose-binding-lectin
MCH	mittlerer Hämoglobingehalt eines einzelnen Erythrozyten
MCHC	mittlere Hämoglobinkonzentration eines einzelnen Erythrozyten
MCF	maximale Gerinnselfestigkeit
MCV	mittleres Zellvolumen eines einzelnen Erythrozyten
mg	Milligramm
min	Minute
mm	Millimeter
mM	millimolar
Mono	Monozyten
n	Anzahl
NaOH	Natriumhydroxid
Neut	neutrophile Granulozyten
OD	äusserer Durchmesser
PAR	Proteinase-aktivierter-Rezeptor
PAI-1	plasminogen activator inhibitor 1
PSGL-1	P-Selektin Glykoprotein Ligand-1

RBC	Erythrozyten
s	Sekunde
s.c.	subkutan
SEM	Standardfehler
TAFI	Thrombin-aktivierbarer Fibrinolyse-Inhibitor
TCC	Terminaler Komplement Komplex
TF	Tissue Faktor
TFPI	Tissue Faktor Pathway Inhibitor
TVT	tiefe Venenthrombose
VTE	venöse Thromboembolie
vWF	von Willebrand Faktor
WT	Wildtyp
V	Vena (lat.)
VI	Glykoprotein
WBC	Leukozyten
Wo	Woche
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
α	alpha-Winkel
°C	Grad Celsius

X. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Aufbau einer Vene	3
Abbildung 2: Ablauf der Hämostase bei Verletzung eines Gefäßes.....	7
Abbildung 3: Aktivierung des Komplementsystems	13
Abbildung 4: Aufbau des C1q-Moleküls	15
Abbildung 5: Röhre für die Isoflurannarkose	30
Abbildung 6: Vorbereitung des Tieres auf die Operation.....	32
Abbildung 7: Mikrochirurgisches Operationsbesteck.....	32
Abbildung 8: Durchführung der Stenosierung der V. cava caudalis	34
Abbildung 9: Entnommener Thrombus auf Filterpapier.....	36
Abbildung 10: Legen eines Jugulariskatheters	38
Abbildung 11: Thromboelastometrie	41
Abbildung 12: Fluoreszenz-Auflicht-Mikroskop.....	43
Abbildung 13: Thrombusgewicht und Thrombusinzidenz von C57Bl/6J Mäusen im Vergleich zu C1q ^{-/-} Mäusen	55
Abbildung 14: Thrombusgewicht und Thrombusinzidenz von C57Bl/6J Mäusen im Vergleich zu CR2 ^{-/-} Mäusen.....	56
Abbildung 15: Thrombusgewicht und Thrombusinzidenz von C57Bl/6J Mäusen im Vergleich zu C3 ^{-/-} , C4 ^{-/-} und C3 ^{-/-} C4 ^{-/-} Mäusen.....	57
Abbildung 16: Partielle Thromboplastinzeit der C57Bl/6J Mäuse im Vergleich zu C4 ^{-/-} Mäusen	59
Abbildung 17: Schwanzblutungszeit der C57Bl/6J Mäuse im Vergleich zu C4 ^{-/-} Mäusen	60
Abbildung 18: basale EXTEM-Analyse des Blutes von C57Bl/6J Mäusen im Vergleich zu C4 ^{-/-} Mäusen.....	61
Abbildung 19: basale EXTEM-Analyse (mit rekombinanter TF Quelle) des Blutes von C57Bl/6J Mäusen im Vergleich zu C4 ^{-/-} Mäusen.....	62
Abbildung 20: EXTEM-Analyse des Blutes von C57Bl/6J Mäusen im Vergleich zu C4 ^{-/-} Mäusen 48 Stunden nach Flussverlangsamung.....	64
Abbildung 21: FIBTEM-Analyse des Blutes von C57Bl/6J Mäusen im Vergleich zu C4 ^{-/-} Mäusen 48 Stunden nach Flussverlangsamung.....	66
Abbildung 22: Großes Blutbild basal von C57Bl/6J Mäusen im Vergleich zu C4 ^{-/-} Mäusen	68

Abbildung 23: Großes Blutbild 48 Stunden nach Flussverlangsamung von C57Bl/6J Mäusen im Vergleich zu C4 ^{-/-} Mäusen.....	70
Abbildung 24: Vergleich der Menge an Blutplättchen von C57Bl/6J Mäusen und C4 ^{-/-} Mäusen basal und 48 Stunden nach Flussverlangsamung	71
Abbildung 25: Weißes Blutbild basal von C57Bl/6J Mäusen und C4 ^{-/-} Mäusen..	72
Abbildung 26: Weißes Blutbild 48 Stunden nach Flussverlangsamung von C57Bl/6J Mäusen und C4 ^{-/-} Mäusen	73
Abbildung 27: Leukozytenaggregation in μm^2 pro mm^2 von C57Bl/6J Mäusen im Vergleich zu C4 ^{-/-} Mäusen.....	75
Abbildung 28: Leukozytenaggregation von C57Bl/6J Mäusen im Vergleich zu C4 ^{-/-} Mäusen 3-4 Stunden und 5-6 Stunden nach Flussreduktion .	76
Abbildung 29: Thrombozytenaggregation in μm^2 pro mm^2 von C57Bl/6J Mäusen im Vergleich zu C4 ^{-/-} Mäusen	77
Abbildung 30: Thrombozytenaggregation von C57Bl/6J Mäusen im Vergleich zu C4 ^{-/-} Mäusen 3-4 Stunden und 5-6 Stunden nach Flussreduktion .	78
Abbildung 31: Fibrinogenfläche von C57Bl/6J Mäusen und C4 ^{-/-} Mäusen.....	80
Abbildung 32: Plättchenfläche von C57Bl/6J Mäusen und C4 ^{-/-} Mäusen.....	82
Abbildung 33: Anzahl der Leukozyten pro mm^2 von C57Bl/6J Mäusen und C4 ^{-/-} Mäusen	84

XI. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Verwendete Primärantikörper	49
Tabelle 2: Verwendete Sekundärantikörper	49
Tabelle 3: Versuchsgruppe für die Rolle des Komplementsystems.....	51
Tabelle 4: Bestimmung der Leukozyten- und Thrombozytenrekrutierung.....	52
Tabelle 5: Bestimmung der Extem Werte basal.....	52
Tabelle 6: Effektgröße, relativer Unterschied und Binomialtest für C1q ^{-/-}	55
Tabelle 7: Effektgröße, relativer Unterschied und Binomialtest für CR2 ^{-/-}	56
Tabelle 8: Effektgröße, relativer Unterschied und Binomialtest für C3 ^{-/-} , C4 ^{-/-} und C3 ^{-/-} C4 ^{-/-}	58
Tabelle 9: Effektgröße und relativer Unterschied für die partielle Thromboplastinzeit.....	59
Tabelle 10: Effektgröße und relativer Unterschied für die Schwanzblutungszeit	60
Tabelle 11: Effektgröße und relativer Unterschied für die basale EXTEM-Analyse	61
Tabelle 12: Effektgröße und relativer Unterschied für die basale EXTEM-Analyse mit rekombinanter TF Quelle.....	63
Tabelle 13: Effektgröße und relativer Unterschied für die post 48h EXTEM- Analyse.....	64
Tabelle 14: Effektgröße und relativer Unterschied für die post 48h FIBTEM- Analyse.....	66
Tabelle 15: Effektgröße und relativer Unterschied für basales Blutbild.....	68
Tabelle 16: Effektgröße und relativer Unterschied für Blutbild 48h post	70
Tabelle 17: Effektgröße und relativer Unterschied für Plättchen basal	71
Tabelle 18: Effektgröße und relativer Unterschied für Plättchen 48h post.....	71
Tabelle 19: Effektgröße und relativer Unterschied für weißes Blutbild basal.....	72
Tabelle 20: Effektgröße und relativer Unterschied für weißes Blutbild 48h post	73
Tabelle 21: Effektgröße und relativer Unterschied für Leukozytenaggregation ..	75
Tabelle 22: Effektgröße und relativer Unterschied für Thrombozytenaggregation	77
Tabelle 23: Effektgröße und relativer Unterschied für die Fibrinogenfläche	81
Tabelle 24: Effektgröße und relativer Unterschied für die Plättchenfläche.....	83

Tabelle 25: Effektgröße und relativer Unterschied für die Anzahl der Leukozyten	84
--	----

XII. LITERATURVERZEICHNIS

1. Roger, V.L., et al. Heart disease and stroke statistics--2011 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 123, e18-e209 (2011).
2. Cohen, A.T., et al. Venous thromboembolism (VTE) in Europe. The number of VTE events and associated morbidity and mortality. *Thrombosis and haemostasis* 98, 756-764 (2007).
3. Heit, J.A. The epidemiology of venous thromboembolism in the community. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 28, 370-372 (2008).
4. Moll, S. & Mackman, N. Venous thromboembolism: a need for more public awareness and research into mechanisms. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 28, 367-369 (2008).
5. Silverstein, M.D., et al. Trends in the incidence of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a 25-year population-based study. *Archives of internal medicine* 158, 585-593 (1998).
6. Engelmann, B. & Massberg, S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nature reviews. Immunology* 13, 34-45 (2013).
7. Markiewski, M.M., Nilsson, B., Ekdahl, K.N., Mollnes, T.E. & Lambris, J.D. Complement and coagulation: strangers or partners in crime? *Trends in immunology* 28, 184-192 (2007).
8. Pschyrembel, W. *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*. (Walter de Gruyter, Berlin, 2002).
9. Eder, H. & Fuchs, H.-W. *Lexikon der Veterinärmedizin*. 1452 (Enke im Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart, 2000).
10. Liebich, H.-G. *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere*, (Schattauer, Stuttgart, 1999).
11. Wakefield, T.W., et al. Venous thrombosis-associated inflammation and attenuation with neutralizing antibodies to cytokines and adhesion molecules. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 15, 258-268 (1995).

12. von Bruhl, M.L., et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *The Journal of experimental medicine* 209, 819-835 (2012).
13. Heit, J.A., et al. Risk factors for deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based case-control study. *Archives of internal medicine* 160, 809-815 (2000).
14. Samama, M.M. An epidemiologic study of risk factors for deep vein thrombosis in medical outpatients: the Sirius study. *Archives of internal medicine* 160, 3415-3420 (2000).
15. Rosendaal, F.R. Risk factors for venous thrombosis: prevalence, risk, and interaction. *Seminars in hematology* 34, 171-187 (1997).
16. Heit, J.A., et al. Relative impact of risk factors for deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based study. *Archives of internal medicine* 162, 1245-1248 (2002).
17. Homans, J. Thrombosis of the deep leg veins due to prolonged sitting. *The New England journal of medicine* 250, 148-149 (1954).
18. Esmon, C.T. Basic mechanisms and pathogenesis of venous thrombosis. *Blood reviews* 23, 225-229 (2009).
19. Virchow, R. *Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medizin*, (Frankfurt, 1865).
20. White, R.H., Romano, P.S., Zhou, H., Rodrigo, J. & Bargar, W. Incidence and time course of thromboembolic outcomes following total hip or knee arthroplasty. *Archives of internal medicine* 158, 1525-1531 (1998).
21. Bergqvist, D., et al. Low-molecular-weight heparin (enoxaparin) as prophylaxis against venous thromboembolism after total hip replacement. *The New England journal of medicine* 335, 696-700 (1996).
22. Kroegel, C. & Reissig, A. Principle Mechanisms Underlying Venous Thromboembolism: Epidemiology, Risk Faktors, Pathophysiology and Pathogenesis. *Respiration*, 7-30 (2003).
23. Furie, B. & Furie, B.C. Mechanisms of thrombus formation. *The New England journal of medicine* 359, 938-949 (2008).

24. Wilcox, J.N., Smith, K.M., Schwartz, S.M. & Gordon, D. Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 2839-2843 (1989).
25. Esmon, C.T. The interactions between inflammation and coagulation. *British journal of haematology* 131, 417-430 (2005).
26. Junt, T., et al. Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science* 317, 1767-1770 (2007).
27. Battinelli, E.M., Hartwig, J.H. & Italiano, J.E., Jr. Delivering new insight into the biology of megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *Current opinion in hematology* 14, 419-426 (2007).
28. Mackman, N. Triggers, targets and treatments for thrombosis. *Nature* 451, 914-918 (2008).
29. Massberg, S., et al. A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo. *The Journal of experimental medicine* 197, 41-49 (2003).
30. Gruner, S., et al. Multiple integrin-ligand interactions synergize in shear-resistant platelet adhesion at sites of arterial injury in vivo. *Blood* 102, 4021-4027 (2003).
31. Moog, S., et al. Platelet glycoprotein V binds to collagen and participates in platelet adhesion and aggregation. *Blood* 98, 1038-1046 (2001).
32. Bergmeier, W., Chauhan, A.K. & Wagner, D.D. Glycoprotein Ibalpha and von Willebrand factor in primary platelet adhesion and thrombus formation: lessons from mutant mice. *Thrombosis and haemostasis* 99, 264-270 (2008).
33. Lentz, B.R. Exposure of platelet membrane phosphatidylserine regulates blood coagulation. *Progress in lipid research* 42, 423-438 (2003).
34. Coughlin, S.R. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 3, 1800-1814 (2005).

35. Drake, T.A., Morrissey, J.H. & Edgington, T.S. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *The American journal of pathology* 134, 1087-1097 (1989).
36. Mackman, N. & Taubman, M. Tissue factor: past, present, and future. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 29, 1986-1988 (2009).
37. Kasthuri, R.S., Glover, S.L., Boles, J. & Mackman, N. Tissue factor and tissue factor pathway inhibitor as key regulators of global hemostasis: measurement of their levels in coagulation assays. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 36, 764-771 (2010).
38. Semeraro, N., et al. Direct induction of tissue factor synthesis by endotoxin in human macrophages from diverse anatomical sites. *Immunology* 50, 529-535 (1983).
39. Bevilacqua, M.P., et al. Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium: characterization and comparison with the actions of interleukin 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 4533-4537 (1986).
40. Giesen, P.L., et al. Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 2311-2315 (1999).
41. Zwicker, J.I., Trenor, C.C., 3rd, Furie, B.C. & Furie, B. Tissue factor-bearing microparticles and thrombus formation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 31, 728-733 (2011).
42. Palabrica, T., et al. Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets. *Nature* 359, 848-851 (1992).
43. Semple, J.W., Italiano, J.E., Jr. & Freedman, J. Platelets and the immune continuum. *Nature reviews. Immunology* 11, 264-274 (2011).
44. Chauhan, A.K., Kisucka, J., Lamb, C.B., Bergmeier, W. & Wagner, D.D. von Willebrand factor and factor VIII are independently required to form stable occlusive thrombi in injured veins. *Blood* 109, 2424-2429 (2007).

45. Yang, M. & Kirley, T.L. Engineered human soluble calcium-activated nucleotidase inhibits coagulation in vitro and thrombosis in vivo. *Thrombosis research* 122, 541-548 (2008).
46. Jeske, W.P., Iqbal, O., Fareed, J. & Kaiser, B. A survey of venous thrombosis models. *Methods in molecular medicine* 93, 221-237 (2004).
47. Diaz, J.A., et al. Critical review of mouse models of venous thrombosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 32, 556-562 (2012).
48. Myers, D., Jr., et al. Selectins influence thrombosis in a mouse model of experimental deep venous thrombosis. *The Journal of surgical research* 108, 212-221 (2002).
49. Myers, D.D., et al. P-selectin and leukocyte microparticles are associated with venous thrombogenesis. *Journal of vascular surgery* 38, 1075-1089 (2003).
50. Wojcik, B.M., et al. Interleukin-6: a potential target for post-thrombotic syndrome. *Annals of vascular surgery* 25, 229-239 (2011).
51. Diaz, J.A., et al. Impaired fibrinolytic system in ApoE gene-deleted mice with hyperlipidemia augments deep vein thrombosis. *Journal of vascular surgery* 55, 815-822 (2012).
52. Henke, P.K., et al. Deep vein thrombosis resolution is modulated by monocyte CXCR2-mediated activity in a mouse model. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 24, 1130-1137 (2004).
53. Humphries, J., et al. Monocyte urokinase-type plasminogen activator up-regulation reduces thrombus size in a model of venous thrombosis. *Journal of vascular surgery* 50, 1127-1134 (2009).
54. Singh, I., et al. Failure of thrombus to resolve in urokinase-type plasminogen activator gene-knockout mice: rescue by normal bone marrow-derived cells. *Circulation* 107, 869-875 (2003).
55. Singh, I., et al. Antithrombotic effects of controlled inhibition of factor VIII with a partially inhibitory human monoclonal antibody in a murine vena cava thrombosis model. *Blood* 99, 3235-3240 (2002).
56. Burnand, K.G., et al. The role of the monocyte in the generation and dissolution of arterial and venous thrombi. *Cardiovasc Surg* 6, 119-125 (1998).

57. Brill, A., et al. von Willebrand factor-mediated platelet adhesion is critical for deep vein thrombosis in mouse models. *Blood* 117, 1400-1407 (2011).
58. Walport, M.J. Complement. First of two parts. *The New England journal of medicine* 344, 1058-1066 (2001).
59. Wagner, E. & Frank, M.M. Therapeutic potential of complement modulation. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 43-56 (2010).
60. Alper, C.A. A history of complement genetics. *Experimental and clinical immunogenetics* 15, 203-212 (1998).
61. Morley, B.J. & Walport, M.J. *The Complement Facts Book*, (Academic Books, London, 2000).
62. Figueroa, J.E. & Densen, P. Infectious diseases associated with complement deficiencies. *Clinical microbiology reviews* 4, 359-395 (1991).
63. Wagner, E., Jiang, H. & Frank, M.M. *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods* (ed. Henry, J.B.) 892-913 (W.B. Saunders, Philadelphia, 2001).
64. Speth, C., Proding, W.M., Würzner, R., Stoiber, H. & Dierich, M.P. in *Fundamental Immunology* (ed. Paul, W.E.) 1047-1078 (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2008).
65. Carroll, M.V. & Sim, R.B. Complement in health and disease. *Advanced drug delivery reviews* 63, 965-975 (2011).
66. Tegla, C.A., et al. Membrane attack by complement: the assembly and biology of terminal complement complexes. *Immunologic research* 51, 45-60 (2011).
67. Arlaud, G.J., Gaboriaud, C., Thielens, N.M. & Rossi, V. Structural biology of C1. *Biochemical Society transactions* 30, 1001-1006 (2002).
68. Kang, Y.H., Tan, L.A., Carroll, M.V., Gentle, M.E. & Sim, R.B. Target pattern recognition by complement proteins of the classical and alternative pathways. *Advances in experimental medicine and biology* 653, 117-128 (2009).

69. Dodds, A.W., Sim, R.B., Porter, R.R. & Kerr, M.A. Activation of the first component of human complement (C1) by antibody-antigen aggregates. *The Biochemical journal* 175, 383-390 (1978).
70. Wallis, R., Mitchell, D.A., Schmid, R., Schwaeble, W.J. & Keeble, A.H. Paths reunited: Initiation of the classical and lectin pathways of complement activation. *Immunobiology* 215, 1-11 (2010).
71. Porter, R.R. & Reid, K.B. The biochemistry of complement. *Nature* 275, 699-704 (1978).
72. Reid, K.B. & Porter, R.R. Subunit composition and structure of subcomponent C1q of the first component of human complement. *The Biochemical journal* 155, 19-23 (1976).
73. Lu, J., Teh, C., Kishore, U. & Reid, K.B. Collectins and ficolins: sugar pattern recognition molecules of the mammalian innate immune system. *Biochimica et biophysica acta* 1572, 387-400 (2002).
74. Gaboriaud, C., et al. The crystal structure of the globular head of complement protein C1q provides a basis for its versatile recognition properties. *The Journal of biological chemistry* 278, 46974-46982 (2003).
75. Tan, L.A., Yu, B., Sim, F.C., Kishore, U. & Sim, R.B. Complement activation by phospholipids: the interplay of factor H and C1q. *Protein & cell* 1, 1033-1049 (2010).
76. Hughes-Jones, N.C. & Gardner, B. Reaction between the isolated globular sub-units of the complement component C1q and IgG-complexes. *Mol Immunol* 16, 697-701 (1979).
77. Sim, R.B. & Malhotra, R. Interactions of carbohydrates and lectins with complement. *Biochemical Society transactions* 22, 106-111 (1994).
78. Salvador-Morales, C., et al. Complement activation and protein adsorption by carbon nanotubes. *Mol Immunol* 43, 193-201 (2006).
79. Rybak-Smith, M.J., Pondman, K.M., Flahaut, E., Salvador-Morales, C. & Sim, R.B. Recognition of carbon nanotubes by the human innate immune system in *Carbone Nanotubes for Biomedical Applications* (eds. Klingeler, R. & Sim, R.B.) 183-210 (Springer Verlag Berlin, Heidelberg, 2011).

80. Farries, T.C., Lachmann, P.J. & Harrison, R.A. Analysis of the interaction between properdin and factor B, components of the alternative-pathway C3 convertase of complement. *The Biochemical journal* 253, 667-675 (1988).
81. Fearon, D.T. & Austen, K.F. Properdin: binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase. *The Journal of experimental medicine* 142, 856-863 (1975).
82. Bhakdi, S. & Trandum-Jensen, J. Complement lysis: a hole is a hole. *Immunology today* 12, 318-320; discussion 321 (1991).
83. Spitzer, D., Mitchell, L.M., Atkinson, J.P. & Hourcade, D.E. Properdin can initiate complement activation by binding specific target surfaces and providing a platform for de novo convertase assembly. *J Immunol* 179, 2600-2608 (2007).
84. Nonaka, M. & Yoshizaki, F. Primitive complement system of invertebrates. *Immunological reviews* 198, 203-215 (2004).
85. Petersen, S.V., et al. Control of the classical and the MBL pathway of complement activation. *Mol Immunol* 37, 803-811 (2000).
86. Dahl, M.R., et al. MASP-3 and its association with distinct complexes of the mannan-binding lectin complement activation pathway. *Immunity* 15, 127-135 (2001).
87. Thiel, S., et al. A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. *Nature* 386, 506-510 (1997).
88. Rossi, V., et al. Substrate specificities of recombinant mannan-binding lectin-associated serine proteases-1 and -2. *The Journal of biological chemistry* 276, 40880-40887 (2001).
89. Muller-Eberhard, H.J. Molecular organization and function of the complement system. *Annual review of biochemistry* 57, 321-347 (1988).
90. Mayer, M.M. Membrane damage by complement. *The Johns Hopkins medical journal* 148, 243-258 (1981).
91. Bhakdi, S. & Trandum-Jensen, J. Damage to mammalian cells by proteins that form transmembrane pores. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* 107, 147-223 (1987).

92. Shin, M.L., Rus, H.G. & Niculescu, F.I. Membranes attack by complement: assembly and biology of the terminal complement complexes in Biomembranes (ed. Lee, A.) 123-149 (JAI Press, Greenwich 1996).
93. Fosbrink, M., Niculescu, F. & Rus, H. The role of c5b-9 terminal complement complex in activation of the cell cycle and transcription. *Immunologic research* 31, 37-46 (2005).
94. Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K. & Lambris, J.D. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nature immunology* 11, 785-797 (2010).
95. Oksjoki, R., Kovanen, P.T., Meri, S. & Pentikainen, M.O. Function and regulation of the complement system in cardiovascular diseases. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 12, 4696-4708 (2007).
96. Speidl, W.S., Kastl, S.P., Huber, K. & Wojta, J. Complement in atherosclerosis: friend or foe? *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 9, 428-440 (2011).
97. Abbas, A.K. & Lichtman, A.H. *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System*, (Saunders, Philadelphia, 2010).
98. Zipfel, P.F. & Skerka, C. Complement regulators and inhibitory proteins. *Nature reviews. Immunology* 9, 729-740 (2009).
99. Inal, J.M., et al. Complement C2 receptor inhibitor trispanning: a novel human complement inhibitory receptor. *J Immunol* 174, 356-366 (2005).
100. Kim, D.D. & Song, W.C. Membrane complement regulatory proteins. *Clin Immunol* 118, 127-136 (2006).
101. Jalili, A., et al. Fifth complement cascade protein (C5) cleavage fragments disrupt the SDF-1/CXCR4 axis: further evidence that innate immunity orchestrates the mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells. *Experimental hematology* 38, 321-332 (2010).
102. Ratajczak, M.Z., Reza, R., Wysoczynski, M., Yan, J. & Ratajczak, J. Modulation of the SDF-1-CXCR4 axis by the third complement component (C3)--implications for trafficking of CXCR4+ stem cells. *Experimental hematology* 34, 986-995 (2006).
103. Nathan, C. Points of control in inflammation. *Nature* 420, 846-852 (2002).

104. Esmon, C.T. The impact of the inflammatory response on coagulation. *Thrombosis research* 114, 321-327 (2004).
105. Amara, U., et al. Interaction between the coagulation and complement system. *Advances in experimental medicine and biology* 632, 71-79 (2008).
106. Huber-Lang, M., et al. Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nature medicine* 12, 682-687 (2006).
107. Yongqing, T., Drentin, N., Duncan, R.C., Wijeyewickrema, L.C. & Pike, R.N. Mannose-binding lectin serine proteases and associated proteins of the lectin pathway of complement: two genes, five proteins and many functions? *Biochimica et biophysica acta* 1824, 253-262 (2012).
108. Krarup, A., Wallis, R., Presanis, J.S., Gal, P. & Sim, R.B. Simultaneous activation of complement and coagulation by MBL-associated serine protease 2. *PloS one* 2, e623 (2007).
109. Schroeder, V., Hess, K., Phoenix, F. & al., e. Complement MBL-associated serine protease-1 (MASP-1) interacts with plasma clot formation - a novel link between inflammation and thrombosis? *Mol Immunol* 48, 1675 (2011).
110. Laboratory, J. JAX Mice Database - 000664 C57BL/6J, <http://jaxmice.jax.org/strain/000664.html>, (Zugriff: 13.09.13)
111. Botto, M. C1q knock-out mice for the study of complement deficiency in autoimmune disease. *Experimental and clinical immunogenetics* 15, 231-234 (1998).
112. Ahearn, J.M., et al. Disruption of the Cr2 locus results in a reduction in B-1a cells and in an impaired B cell response to T-dependent antigen. *Immunity* 4, 251-262 (1996).
113. Wessels, M.R., et al. Studies of group B streptococcal infection in mice deficient in complement component C3 or C4 demonstrate an essential role for complement in both innate and acquired immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 11490-11494 (1995).

114. Chen, Z., Koralov, S.B. & Kelsoe, G. Complement C4 inhibits systemic autoimmunity through a mechanism independent of complement receptors CR1 and CR2. *The Journal of experimental medicine* 192, 1339-1352 (2000).
115. Fischer, M.B., et al. Regulation of the B cell response to T-dependent antigens by classical pathway complement. *J Immunol* 157, 549-556 (1996).
116. Erhardt, W. *Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier sowie bei Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen*, (Schattauer, Stuttgart, 2004).
117. Matchett, M.O. & Ingram, G.I. Partial Thromboplastin Time Test with Kaolin. Normal Range and Modifications for the Diagnosis of Haemophilia and Christmas Disease. *Journal of clinical pathology* 18, 465-471 (1965).
118. Rotem. Thromboelastometrie,
http://www.rotem.de/site/index.php?option=com_content&view=article&id=1&Itemid=7&lang=de, (Zugriff: 17.09.2013)
119. Rotem. Rotem Analyse,
http://www.rotem.de/site/index.php?option=com_content&view=article&id=2&Itemid=8&lang=de, (Zugriff: 17.09.2013)
120. Rotem. Reagents,
http://www.rotem.de/site/index.php?option=com_content&view=article&id=65&Itemid=19&lang=de, (Zugriff: 17.09.2013)
121. Sigma-Aldrich. Acridine Orange,
http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a6014?lang=de®ion=DE&cm_sp=Customer_Favorites_-_Detail_Page_-_Image-A6014%20%28Zugriff:%2030.01.2012%29, (Zugriff: 17.09.2013)
122. Technologies, L. Acridine Orange,
<http://products.invitrogen.com/ivgn/product/A1301?ICID==%3D%3D%3Dsearch-product>, (Zugriff: 17.09.2013)
123. Sigma-Aldrich. Rhodamin B Isothiocyanate,
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/283924?lang=de®ion=DE>, (Zugriff: 17.09.2013)

124. Mulisch, M. & Welsch, U. Romeis Mikroskopische Technik, (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2010).
125. Faul, F., Erdfelder, E., Buchner, A. & Lang, A.G. Statistical power analyses using G*Power 3.1: tests for correlation and regression analyses. *Behavior research methods* 41, 1149-1160 (2009).
126. Cohen, J. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*, 2nd edition, (Erlbaum, Hillsdale, New Jersey, 1988).
127. Gray, H.W. The natural history of venous thromboembolism: impact on ventilation/perfusion scan reporting. *Seminars in nuclear medicine* 32, 159-172 (2002).
128. Bhole, D. & Stahl, G.L. Molecular basis for complement component 6 (C6) deficiency in rats and mice. *Immunobiology* 209, 559-568 (2004).
129. Krem, M.M. & Di Cera, E. Evolution of enzyme cascades from embryonic development to blood coagulation. *Trends in biochemical sciences* 27, 67-74 (2002).
130. Rittirsch, D., Flierl, M.A. & Ward, P.A. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nature reviews. Immunology* 8, 776-787 (2008).

XIII. DANKSAGUNG

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Steffen Massberg für die Betreuung meiner Arbeit, sowie für seine Hilfestellungen, Anregungen und Diskussionsbereitschaft.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. med. vet. Marie-Luise von Brühl für die Übernahme der Betreuung meiner Doktorarbeit, die stetige Motivation und unermüdliche Unterstützung. Sie stand mir stets mit absoluter Hilfsbereitschaft, fachkundigen Ratschlägen und äußerstem Engagement zur Seite.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Herrn PD Dr. med. vet. Sven Reese für die Übernahme der Arbeit, deren Durchsicht und Einreichung an der tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München. Außerdem für die Hilfestellung und Unterstützung bei der Erstellung der Statistik.

Bei Herrn Dr. med. Konstantin Stark bedanke ich mich für die stetige Unterstützung, Hilfsbereitschaft, seine Ideen für dieses Projekt und die kompetente Beantwortung all meiner Fragen.

Ein großes Dankeschön geht an Frau Dr. med. vet. Sue Chandraratne für die Einarbeitung und Hilfe bei der Erstellung der histologischen Präparate und Färbungen. Für Ihre Unterstützung bei der Erstellung der Statistik. Außerdem für ihre stetige Hilfsbereitschaft, die gute Zusammenarbeit und dafür, dass sie mir mit ihrem Wissen jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Speziell danken möchte ich auch Frau Dr. med. vet. Ildiko Konrad für ihre moralische Unterstützung und die große Hilfe beim Isolieren der Thrombozyten für meine Versuche.

Weiter möchte ich Frau Dr. med. vet. Irene Schubert danken, für die Einarbeitung in die OP-Technik.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei der gesamten Arbeitsgruppe bedanken. Vielen Dank für eure Hilfsbereitschaft, die gute Arbeitsatmosphäre und die kollegiale Zusammenarbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei den TierpflegerInnen Frau Nicole Blount, Herrn Sebastian Helmer und Frau Lara Ulrich für die zuverlässige Pflege und Betreuung der Tiere und ihre stetige Hilfsbereitschaft.

Ein großer Dank geht an die MitarbeiterInnen des Zentrallabors des Deutschen Herzzentrum München, für die Analyse all meiner Blutproben.

Besonders danken möchte ich Herrn Dr. Admar Verschoor mit Arbeitsgruppe für die Überlassung der Komplement-Knockout Mäuse und seine hilfreichen Ideen, Anregungen und Ratschläge für das Projekt.

Ein Dankeschön geht auch an Herrn Avinash Khandagale aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. Bernd Engelmann, für die Analyse meiner Blutproben.

Meinen Eltern möchte ich von ganzem Herzen danken, ohne ihre stetige Unterstützung, absolute Hilfsbereitschaft und Motivation wären Studium, Diplom- und Doktorarbeit nicht möglich gewesen.