

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

Untersuchung der funktionellen Eigenschaften der retikulierten Thrombozyten im Kontext der
arteriellen Thrombose in vivo

von Andreas Claus Ehrlich
aus Buchholz in der Nordheide

München 2020

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

Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Angefertigt an der Medizinischen Klinik und Poliklinik I des Klinikums der Universität
München in Großhadern

Mentor: Prof. Dr. med. Christian Schulz

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Bernd Kaspers
Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Wanke
Priv.-Doz. Dr. Karin Weber
Univ.-Prof. Dr. Gabriela Knubben-Schweizer

Tag der Promotion: 8. Februar 2020

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Arterien	3
1.1.	Aufbau von Arterien.....	3
1.2.	Funktionsprinzip der Arterien	4
2.	Thrombozyten.....	5
2.1.	Herkunft und Anatomie der Thrombozyten	5
2.2.	Physiologische Funktion der Thrombozyten.....	6
2.2.1.	Primäre Hämostase.....	7
2.2.2.	Sekundäre Hämostase.....	8
2.2.3.	Gerinnungshemmung und Fibrinolyse	11
2.3.	Entstehung von Thrombosen.....	12
2.4.	Arterielle Thrombose in Verbindung mit Arteriosklerose	13
2.5.	Retikulierte Thrombozyten.....	17
2.5.1.	Retikulierte Thrombozyten in der Veterinärmedizin.....	21
2.5.2.	Rolle der retikulierten Thrombozyten in der arteriellen Thrombose.....	22
2.6.	Medikamentöse Behandlung und Prophylaxe der Thrombose.....	23
2.7.	Rolle der arteriellen Thrombose in der Tiermedizin	26
III.	ZIELSETZUNG	29
IV.	MATERIAL UND METHODEN.....	31
1.	Versuchstiere	31
1.1.	Mausstämme.....	31
1.2.	Tierhaltung und Zucht	32
2.	Operative Eingriffe.....	34
2.1.	Narkose.....	34
2.2.	Narkosemittel	35
2.3.	Blutentnahmetechniken	36
2.3.1.	<i>Vena facialis</i>	36
2.3.2.	Retrobulbäre Blutentnahme.....	37
2.3.3.	Herstellung Thrombozytenpuffer für die Thrombozytenisolation	38
2.3.4.	Thrombozytenisolation.....	38
2.4.	Schwanzvenenkatheter	39
2.5.	Antikörper-medierte Depletion der Thrombozyten.....	40

2.6.	Induzierung einer arteriellen Thrombose	41
2.6.1.	Vorbereitung des FeCl ₃	41
2.6.2.	Schädigung der <i>Arteria carotis communis</i>	41
2.6.3.	Herstellung Schnittpräparate für die histologische Aufarbeitung der arteriellen Thrombose.....	44
2.7.	Funktionelles Multiplate.....	45
2.7.1.	Intravenöse Applikation der Acetylsalicylsäure.....	45
2.7.2.	Multiplateversuche	45
2.8.	Arterielläre Thrombose im <i>Musculus Cremaster</i>	47
3.	Mikroskopie	49
3.1.	Fluoreszenz.....	49
3.2.	Epifluoreszenzmikroskopie	50
3.3.	Konfokalmikroskopie	50
3.4.	Spreadingversuche mit isolierten Thrombozyten	51
3.5.	Flusskammerversuche mit Kollagen und humanem Plaquematerial.....	52
3.5.1.	Aufbereitung des humanen Plaquematerials	53
4.	Durchflusszytometrie	54
4.1.	Prinzip	54
4.2.	Durchflusszytometrie von Thrombozyten	57
4.2.1.	Umsatz muriner Thrombozyten.....	58
4.2.2.	Etablierung einer Doppelfärbung zur Differenzierung zwischen jungen und alten Thrombozyten in vitro	59
4.2.3.	Etablierung einer Doppelfärbung zur Differenzierung zwischen jungen und alten Thrombozyten in vivo.....	60
4.2.4.	Färbung der Thrombozyten mit RNA-Farbstoffen.....	61
4.2.5.	Färbung der Oberflächen- und Aktivierungsmarker	63
5.	Statistische Auswertung.....	64
V.	ERGEBNISSE	65
1.	Arterielle Thrombose nach einer Antikörper-medierten Thrombozytopenie.....	65
1.1.	Kontrolle der Antikörper-medierten Thrombozytopenie	65
1.2.	Thromboseversuche der <i>Arteria carotis</i> nach Antikörper-mediierter Thrombozytopenie.....	67
2.	Umsatz muriner Thrombozyten.....	69

3.	Korrelation von jungen Thrombozyten mit retikulierten Thrombozyten	70
3.1.	Überprüfung der Korrelation mittels Durchflusszytometrie.....	71
3.2.	Überprüfung der Korrelation mittels Konfokalmikroskopie	74
4.	Oberflächen- und Aktivierungsmarker der jungen und alten Thrombozyten.....	76
5.	Überprüfung der Wirksamkeit einer ASS Behandlung mittels Multiplate ..	79
6.	Spreadingversuche mit alten und jungen Thrombozyten.....	80
6.1.	Spreadingversuche der unbehandelten Gruppe	81
6.2.	Spreadingversuche der mit ASS behandelten Gruppe.....	82
7.	Detektion von jungen und alten Thrombozyten in vivo.....	83
8.	Flusskammerversuche.....	85
8.1.	Reaktivität junger und alter Thrombozyten in Flusskammerversuchen	85
8.1.1.	Flusskammer beschichtet mit Kollagen.....	85
8.1.2.	Flusskammer beschichtet mit humanem Plaquematerial.....	87
9.	Nachweis junger und alter Thrombozyten in der arteriellen Thrombose der Arteria carotis	88
10.	Nachweis junger und alter Thrombozyten in der arteriolären Thrombose des Musculus cremaster	92
VI.	DISKUSSION	95
1.	Modell für die Untersuchung von retikulierten Thrombozyten in vivo	95
1.1.	Antikörper-mediierte Depletion der Thrombozyten.....	95
1.2.	Modell für die Untersuchung von retikulierten Thrombozyten im steady state ...	96
1.2.1.	Korrelation von jungen Thrombozyten mit retikulierten Thrombozyten	97
1.2.2.	Charakterisierung von Oberflächen- und Aktivierungsmarkern der jungen und alten Thrombozyten.....	98
2.	Funktionelle Untersuchung von jungen und alten Thrombozyten	100
2.1.	Spreadingversuche.....	100
2.2.	Flusskammerversuche	101
2.3.	Thromboseversuche mit der Arteria carotis.....	101
2.4.	Thromboseversuche mit dem Musculus cremaster	102
3.	Hyperreaktivität der jungen Thrombozyten unter ASS-Behandlung.....	103
3.1.	Validierung der intravenösen ASS-Applikation.....	103
3.2.	Klinische Relevanz der ASS	103
3.3.	Flusskammerversuche unter ASS-Behandlung	103

3.4.	Thrombose der <i>Arteria carotis</i> unter ASS-Behandlung	104
3.5.	Hypothesen für die Hyperreaktivität junger Thrombozyten unter ASS-Behandlung	104
3.5.1.	Junge inhibierte Thrombozyten dienen als Keimzentrum in einer entstehenden Thrombose	104
3.5.2.	Halbwertszeit der ASS	105
3.5.3.	Wirkungsmechanismus der ASS	106
3.5.4.	Erhöhter RNA-Gehalt der jungen Thrombozyten	107
VII.	ZUSAMMENFASSUNG.....	109
VIII.	SUMMARY.....	111
IX.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	113
X.	TABELLENVERZEICHNIS	117
XI.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	119
XII.	LITERATURVERZEICHNIS	121
XIII.	PUBLIKATIONEN IM RAHMEN DER LABORTÄTIGKEIT	141
XIV.	DANKSAGUNG	143

I. EINLEITUNG

Trotz der großen Fortschritte in Forschung und klinischer Anwendung gehören kardio-vaskuläre Krankheiten und deren Folgen weltweit zu den Erkrankungen mit der höchsten Mortalität. Da es sich um ein multifaktorielles Krankheitsbild handelt, bleiben bis heute viele Mechanismen der Entstehung und Dynamik im Verborgenen und Gegenstand aktueller Forschung (1).

Die hier vorliegende Doktorarbeit beschäftigt sich mit der Rolle von retikulierten Thrombozyten (RP = reticulated platelets) in kardiovaskulären Erkrankungen, insbesondere in der arteriellen Thrombose. Erstmals erwähnt wurden die RP 1969 von M. Ingram et. al., wodurch auch die Nomenklatur analog zu den Retikulozyten der roten Blutkörperchen geprägt wurde. Sie gelten als Subpopulation der Thrombozyten, welche kürzlich erst in den Blutfluss entlassen wurden und einen hohen Gehalt an Granula und Reste megakaryozytärer RNA aufweisen (2). Oft wird in der Forschung oder in der klinischen Chemie auch von der sogenannten „immature platelet fraction“ (IPF) gesprochen, wofür mittlerweile automatisierte Analyseverfahren zur Verfügung stehen. Diese geben aber keinen Aufschluss über die Funktion, sie dienen lediglich der Identifikation der IPF (3-5).

Bis heute sind retikulierte Thrombozyten Gegenstand der aktuellen Forschung und ein erhöhter oder erniedrigter Wert ist von klinischer Relevanz. Viele Krankheitsbilder oder zum Beispiel auch die Fähigkeit der Regeneration nach einer akuten Thrombozytopenie (mit/ohne bekannter Genese) werden anhand der IPF analysiert bzw. dienen als Prognose für den klinischen Verlauf der Erkrankung, zum Beispiel beim akuten Koronarsyndrom oder der medikamentösen Behandlung bei koronarer Herzerkrankung (6). Außerdem ist bei Patienten, die unter einem akuten Koronarsyndrom leiden, die Anzahl an retikulierten Thrombozyten deutlich erhöht (6, 7). Diese erhöhte Anzahl der RP an der Gesamtheit der Thrombozyten ist wiederum assoziiert mit dem klinischen Verlauf der vorliegenden Krankheit und besitzt eine negative Prognose (8, 9). Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass erhöhte Werte mit einem schlechteren Ansprechen auf eine Thienopyridine Behandlung mit zum Beispiel Clopidogrel (P2Y12-Antagonist) verbunden sind (10-12).

Den retikulierten Thrombozyten wird hierbei ein größeres Volumen, eine höhere Anzahl an Granula und eine erhöhte Aktivität zugeschrieben. Aktuelle Studien und eigene Vorarbeiten gehen davon aus, dass es strukturelle Unterschiede zwischen erwachsenen und retikulierten Thrombozyten gibt. Durch den hohen Gehalt an dichten Granula und megakaryozytärer RNA ist die Zahl der Kopien von Oberflächenrezeptoren (z.B. P-Selectin) gegenüber adulten Thrombozyten erhöht. Auch kommt es durch Stimulation mit ADP zu einer deutlichen Erhöhung der Expression von P-Selectin- und Fibrinogen-

Rezeptoren auf den retikulierten Thrombozyten. Ein morphologischer Unterschied am P2Y₁₂-Rezeptor selbst wird zurzeit noch diskutiert (13, 14).

Eine aktuelle Studie zeigt, dass retikulierte Thrombozyten *in vitro* zu einer überproportionalen Aggregation neigen, wodurch die hier vorliegende Fragestellung der funktionellen Untersuchung *in vivo* angeregt wurde (15).

Um die Rolle von retikulierten Thrombozyten zu untersuchen, wurde im ersten Teil dieser Arbeit eine Methode für die zuverlässigen Detektion dieser Subpopulation *in vivo* etabliert, um im zweiten Teil deren Funktion und Rolle in thromboinflammatorischen Prozessen *in vivo* zu beschreiben.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Arterien

1.1. Aufbau von Arterien

Als Arterien werden alle Gefäße bezeichnet, die vom Herzen aus weg in die Peripherie des Körpers verlaufen und diesen mit dem nötigen Blutfluss und damit verbundenen Stoffaustausch und Sauerstoff versorgen. Diesen Teil des arteriellen Kreislaufs nennt man auch den großen Körperkreislauf. Daneben gibt es noch den kleinen Lungenkreislauf, in dem sauerstoffarmes Blut zur erneuten Oxygenierung den Lungenkreislauf durchfließt (16, 17).

Wie bei allen Blutgefäßen zeichnet sich der Aufbau der Arterien durch ein dreischichtiges System aus (Abb. 1). Durch die unterschiedlichen Aufgaben und Funktionen der Gefäße kommt es zu einigen Besonderheiten beim Aufbau der Arterien. Grundsätzlich bestehen sie aber aus der Tunica intima, der Tunica media und der Tunica adventitia (externa). Allerdings ist die Gefäßwand bei Arterien deutlich dicker und das Lumen deutlich kleiner als bei Venen vergleichbaren Kalibers. Um eine Abgrenzung zwischen Gefäßlumen und Tunica intima zu erreichen, ist diese durch charakteristische Endothelzellen ausgekleidet, darunter liegt subendotheliales Bindegewebe. Anschließend folgt eine Membrana elastica interna (Bestandteil der Tunica intima), welche zusammen mit der Membrana elastica externa (Bestandteil der Tunica media) die Besonderheit von Arterien gegenüber Venen ausmacht. Zwischen diesen beiden Membranen liegt die Tunica media, welche bei Arterien besonders stark ausgebildet ist, nach Außen gefolgt von der Tunica adventitia (17-19).

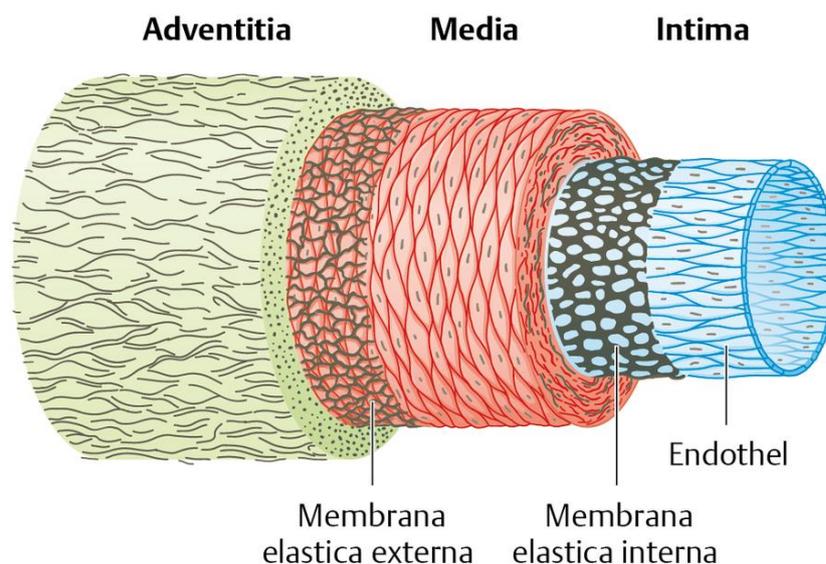


Abbildung 1: Typischer dreischichtiger Wandaufbau einer Arterie

Entnommen aus Lüllmann-Rauch, Taschenlehrbuch der Histologie, Thieme ©2012 (18)

1.2. Funktionsprinzip der Arterien

Hauptaufgabe des Kreislaufes ist es, Stoffaustausch mit den Geweben des Körpers zu betreiben. Das arterielle Blut transportiert hierbei Energieträger und Sauerstoff in die Peripherie, während das venöse Blut für den Abtransport der Stoffwechselendprodukte und CO₂ zuständig ist. Der eigentliche Stoffaustausch findet in den Endstromgebieten statt, welche durch Kapillaren und Venolen gebildet werden. Im großen Körperkreislauf, dem Hochdrucksystem (Arterien, Arteriolen, linker Ventrikel), müssen ständig hohe Drücke herrschen, um den Körper bis in die Peripherie ausreichend mit Blut zu versorgen. Im nachgeschalteten kleinen Lungenkreislauf, dem Niederdrucksystem (Kapillaren, Venen, rechter Vorhof, rechter Ventrikel, linker Vorhof und gesamter Lungenkreislauf), muss ein konstanter Blutrückstrom zum Herzen gesichert werden (17).

Um diesen Stoffaustausch zu gewährleisten, muss der vom Herzen erzeugte pulsierende Blutstrom geglättet werden. Hierbei hilft der spezielle Aufbau der Arterien. Die herznahen Arterien werden auch als elastischer Typ bezeichnet, sie besitzen also eine hohe Compliance (Dehnbarkeit der Gefäße). Durch die ausgeprägte Tunica intima und Membrana elastica interna sind sie in der Lage, während der Systole die kinetische Energie des ansteigenden Druckes durch Ausdehnung als potentielle Energie zu speichern. Somit wird ein Teil des vom Herzen ausgeworfenen Blutes innerhalb der Arterien vom elastischen Typ gespeichert. Während der Diastole nimmt der Druck innerhalb der Arterien kontinuierlich ab, wodurch die Gefäßwände in ihren Ausgangszustand zurückkehren, die potentielle Energie wieder in kinetische Energie umgewandelt wird und das in ihnen gespeicherte Blut in die Peripherie weitergeleitet wird. Insgesamt wird so die Druckdifferenz zwischen Diastole und Systole verringert. Dieses Funktionsprinzip wird auch als „Windkesselfunktion“ bezeichnet (17).

In der Peripherie überwiegen in der Tunica media schließlich die glatten Muskelzellen und es gibt deutlich weniger elastische Fasern (Elastin). Hierdurch steigt der Gefäßwiderstand stark an, da keine große Ausdehnung der Gefäße mehr möglich ist. Durch diesen großen Widerstand wird der Druck entlang der Gefäße stark gesenkt, wobei die Arteriolen den größten Anteil an diesem Druckabfall besitzen. Außerdem können Arteriolen durch Kontraktion ihrer Muskelschicht die Weite des Lumens regulieren und den damit verbundenen Strömungswiderstand, wodurch die Durchblutung der nachgeschalteten Kapillargebiete gesteuert werden kann. Je nach Bedarf kann die Durchblutung der Kapillargebiete einzelner Organe dadurch umverteilt werden (17).

2. Thrombozyten

Die wichtigste Funktion von Thrombozyten ist die Aufrechterhaltung der Hämostase, wodurch bei Verletzungen der Blutgefäße ein übermäßiger Blutverlust verhindert werden soll. Hierbei ist es unabdingbar ein exaktes Gleichgewicht einzuhalten, damit es weder zu pathologischen Blutungen (hämorrhagische Diathese), noch zu einem pathologischen Verschluss eines Gefäßes bis hin zum vollständigen Verschluss (Occlusion) des Gefäßes kommt (20).

Die Erforschung von Thrombozyten blickt auf eine lange Historie zurück. Erstmals als eigenständiger Blutbestandteil im Zusammenhang mit der Ausbildung von Thrombosen wurden Thrombozyten im Jahr 1882 von Julius Bizzozero beschrieben (21, 22).

In den 1950er und 1960er Jahren wurden weitere Fortschritte gemacht, als man erkannte, dass Thrombozyten durch Inhaltsstoffe anderer Zellen aktiviert werden können, z.B. durch ADP aus Erythrozyten (23). Ein weiterer Meilenstein in der Erforschung der Thrombozyten war die Entwicklung der Aggrometrie, wodurch die Thrombozytenfunktion in vitro mittels unterschiedlicher Stimulantien (ADP, Arachidonsäure, Kollagen etc.) untersucht werden konnte (24-27). In den 1970er Jahren wurde schließlich die Wirkung von Thromboxan A₂ auf Thrombozyten beschrieben, welches durch die Cyclooxygenase (COX) aus der Arachidonsäure synthetisiert wird. In diesem Zusammenhang wurde auch erstmalig die hemmende Wirkung von Acetylsalicylsäure (ASS, Aspirin®) auf die Cyclooxygenase beschrieben (28-31).

In den folgenden Jahren wurden viele Erkenntnisse über die physiologische und pathologische Funktion von Thrombozyten und deren pharmakologische Beeinflussung mit Bezug auf ihre klinische Relevanz gewonnen. Bis zum heutigen Tag sind Thrombozyten Gegenstand aktueller Forschung und viele Funktionen sind noch immer nicht restlos aufgeklärt.

2.1. Herkunft und Anatomie der Thrombozyten

Der Prozess der Entstehung von Thrombozyten wird auch Thrombopoese genannt und ist Teil der Hämatopoese. Aus einer pluripotenten Stammzelle entsteht hierbei eine myeloische Stammzelle, über diverse weitere Schritte entsteht der Megakaryoblast, aus dem schließlich der Megakaryozyt hervorgeht (17). Megakaryozyten sind große mehrkernige Zellen, die im Knochenmark lokalisiert sind. Durch Abschnürung des Zytoplasmas dieser Megakaryozyten werden die neu produzierten Thrombozyten zusammen mit dem Zytoplasma in den Blutkreislauf entlassen (32-35). Durch die hohen Scherkräfte in den Gefäßen, insbesondere im Bereich der Pulmonalarterien, zerfallen diese Vesikel aus Thrombozyten und Zytoplasma in bis zu 1000 einzelne Thrombozyten. Diese frisch freigesetzten Thrombozyten durchlaufen in den nächsten 24 Stunden eine Reifung, bis die endgültige kernlose, diskoide Form mit einem Durchmesser von 2-4 µm erreicht ist. Die Population der Thrombozyten ist die kleinste im zirkulierenden Blut und stellt den

geringsten Anteil am Hämatokrit (Anteil fester Blutbestandteile) (36, 37). Der wohl wichtigste regulierende Mediator der Thrombopoese ist das Thrombopoietin. Es reguliert die Anzahl, Größe und Ploidie der Megakaryozyten (6, 38, 39). Physiologische Konzentrationen der Thrombozyten im Blut liegen beim Menschen zwischen $150-400 \times 10^3/\mu\text{l}$, bei einer Maus zwischen $900-1600 \times 10^3/\mu\text{l}$, bei einem Hund zwischen $200-580 \times 10^3/\mu\text{l}$ und bei der Katze zwischen $180-500 \times 10^3/\mu\text{l}$ Blut (40-44).

Innerhalb der Thrombozyten sind mehrere Granula enthalten, welche in Tabelle 1 mit Inhaltsstoffen und deren Funktion beschrieben sind:

δ -Granula (dense granula)	ADP, ATP, Serotonin, Ca^{2+}	Aggregation, Vasokonstriktion, Produktion proinflammatorische Zytokine
α -Granula	Fibrinogen, Faktoren V/VIII, Plasminogen, Kallikrein, Albumin, PF4, Thromboglobulin, Thrombospondin, PDGF, P-Selektin	Lokale Unterstützung der Hämostase und Inflammation, Thrombozytenfunktion, Einfluss auf sekundäre Hämostase
Lysosomale Granula	Proteasen, Glykosidasen, saure Hydrolasen	Antimikrobielle Wirkung, Eliminierung von Pathogenen

Tabelle 1: Inhaltsstoffe und Funktion der thrombozytären Granula

Modifiziert nach Blair et al., Gawaz et al. und Rendu et al. (45-47)

2.2. Physiologische Funktion der Thrombozyten

Die wohl wichtigste physiologische Aufgabe der Thrombozyten ist die Aufrechterhaltung und Regulierung der Hämostase (hämostatisches Gleichgewicht). Hierbei schützen sie den Organismus vor übermäßigem Blutverlust (hämorrhagische Diathese), bewahren ihn aber gleichzeitig auch vor der übermäßigen Ausbildung von z.B. Thrombosen, welche zu einer Minderversorgung mit Blut (Ischämie) der nachgeschalteten Bereiche führen. Somit muss die Hämostase sehr präzise reguliert werden und die Gerinnungsbildung und -auflösung im Gleichgewicht stehen, um die Ausbildung von pathologischen Zuständen zu verhindern (Blutungs- oder Thromboseneigung). Voraussetzung für diese Balance ist die Integrität des Gefäßendothels (17). Innerhalb der Hämostase wird zwischen der primären und der sekundären Hämostase unterschieden.

2.2.1. Primäre Hämostase

Unter der primären Hämostase versteht man unter anderem eine lokale Vasokonstriktion, welche die erste Antwort auf eine Gefäßverletzung ist. Diese beruht auf einer Aktivierung von vasomotorischen Nerven und der glatten Gefäßmuskulatur. Neben dieser mechanisch durch die Verletzung selbst ausgelösten Vasokonstriktion, werden auch vasokonstriktorisch wirksame Substanzen ausgeschüttet (Thromboxan A₂, Serotonin, PDGF = platelet-derived-growth-factor). Durch die Vasokonstriktion wird zum einen der Blutfluss reduziert, zum anderen wird das flächenmäßige Ausmaß der Gefäßverletzung reduziert. Parallel zur Vasokonstriktion kommt es zu einer Aktivierung der Thrombozytenfunktionen. Durch die Gefäß- und daraus resultierende Endothelverletzung wird subendotheliales Kollagen an den Wundrändern freigelegt. An dieses exponierte Kollagen binden die Thrombozyten zunächst locker über ihren Kollagenrezeptor (GP I_a/II_a) (48, 49). Gleichzeitig wird durch die Endothelverletzung der von-Willebrand-Faktor aus dem Endothel und aus Thrombozyten freigesetzt, welcher ebenfalls an das Kollagen bindet. Die Thrombozyten wiederum besitzen einen von-Willebrand-Rezeptor-Komplex (GP I_b/IX/V), welcher an den vWF bindet, wodurch eine Brücke zwischen Kollagen, vWF und dem vWF-Rezeptor-Komplex der Thrombozyten gebildet wird. Gleichzeitig binden die Thrombozyten über ihren GP VI-Rezeptor direkt an Kollagen (49, 50). Von nun an hält sich durch Ausschüttung der Granula der Thrombozyten der Prozess selbstständig aufrecht (vgl. II 2.1). Aus den Granula der aktivierten Thrombozyten wird z.B. ATP, ADP, Thromboxan A₂, und Fibrinogen etc. freigesetzt, wodurch weitere Thrombozyten aktiviert werden. Besonders wichtig ist hierbei die ADP abhängige Aktivierung über den P2Y₁₂-Rezeptor (51, 52). Die Thrombozyten untereinander aggregieren durch die Bindung von Fibrinogen, vermittelt durch den Rezeptor GP II_b/III_a (reversible Aggregation). Durch weitere Mediatoren, wie u.a. Thrombospondin, Fibronectin, ADP etc. (ebenfalls in den Granula der Thrombozyten enthalten, vgl. II 2.1), kommt es schließlich zu der Ausbildung eines Thrombozytenpfropfs (weißer Abscheidungsthrombus = fibrinreich). Wichtig hierbei ist, dass es wie oben beschrieben nicht zu einer pathologischen Ausbreitung des Thrombus in den gesunden Gefäßbereich kommt. Durch Ausschüttung von Stickstoffmonoxid (NO) und Prostacyclin des gesunden Endothels in der Peripherie wird dies verhindert. Durch die hier beschriebenen Prozesse ist die primäre Hämostase nach zwei bis vier Minuten abgeschlossen und die Blutung ist zum Stillstand gekommen (Blutungszeit) (17).

2.2.2. Sekundäre Hämostase

Die sekundäre Hämostase sorgt durch ein Zusammenspiel zahlreicher Plasma-gerinnungsfaktoren und einer damit verbundenen Aktivierungskaskade für einen dauerhaften Verschluss des verletzten Gefäßes (irreversible Aggregation). Die Gerinnungsfaktoren werden in der Leber als Proenzyme synthetisiert und müssen im Verlauf der Gerinnungskaskade alle in ihre aktivierte Form überführt werden. Am Ende der sekundären Hämostase wird Fibrinogen in wasserunlösliche Fibrinpolymere gespalten, wodurch die Thrombozyten fest untereinander vernetzt werden und der Thrombus seine mechanische Festigkeit erlangt (roter Gerinnungsthrombus = erythrozytenreich). Innerhalb der sekundären Hämostase wird zwischen dem intrinsischen (endogenen) Weg, dem extrinsischen (exogenen) Weg und dem gemeinsamen Weg unterschieden (Abb. 2) (17, 53).

Der intrinsische Weg beginnt mit der sogenannten Kontaktaktivierung, wobei Kallikrein, hochmolekulares Kininogen und der Faktor XII des Gerinnungssystems mit negativ geladenen Oberflächen, in diesem Fall das durch die Gefäßverletzung freigelegte Kollagen, in Verbindung treten. Daraus folgt die Aktivierung von Faktor XI zu Faktor XIa und Faktor IX zu IXa. Faktor IXa bildet daraufhin einen Komplex mit Ca^{2+} und mithilfe des aktivierten Cofaktors XIIIa wird schließlich der Faktor X aktiviert. Ab diesem Zeitpunkt bestreiten sowohl der intrinsische als auch der extrinsische Weg den gemeinsamen Weg (17).

Der extrinsische Weg wird durch den Tissue factor induziert (TF, Gewebethromboplastin), welcher nach einer Gefäßschädigung aus Endothelzellen, Thrombozyten und Monozyten freigesetzt wird (54). Der TF aktiviert in der Folge Faktor VII (Proconvertin), der zusammen mit Ca^{2+} und Phospholipiden den Faktor-VIIa-Komplex bildet. Dieser aktiviert Faktor X zu Xa, womit der gemeinsame Weg der intrinsischen und extrinsischen Gerinnung erreicht ist (55). Darüber hinaus kann der extrinsische Weg auch weiter oben in den intrinsischen Weg eingreifen, indem der Faktor-VIIa-Komplex den Faktor IX des intrinsischen Wegs aktiviert (alternativer Weg der Gerinnung) (17).

Nach Aktivierung des Faktors X zu Xa beginnt die gemeinsame Endstrecke beider Systeme. Der aktivierte Faktor Xa bildet zusammen mit seinem Cofaktor Va, Ca^{2+} und Phospholipiden den Prothrombinase-Komplex, welcher Prothrombin in Thrombin umwandelt. Das Thrombin sorgt anschließend für die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin, wodurch die mechanisch feste Verbindung unter den aggregierten Thrombozyten hergestellt wird. Thrombin sorgt innerhalb der Gerinnungskaskade auch noch für eine positive Rückkopplung durch Aktivierung von Faktor V und VIII, wodurch die weitere Thrombinbildung positiv beeinflusst wird (48). Zusätzlich aktiviert Thrombin den Faktor XIII, wodurch eine stabile Quervernetzung von monomerem Fibrin hergestellt wird und der Thrombus weiter an Stabilität erlangt.

Als letzte wichtige Wirkung initiiert Thrombin noch die Kontraktion des Aktin-Myosin-Systems der Thrombozyten, welche zu einer Retraktion (Zusammenziehung) des Thrombus führt. Nach sechs bis neun Minuten ist schließlich auch die sekundäre Hämostase abgeschlossen (17).

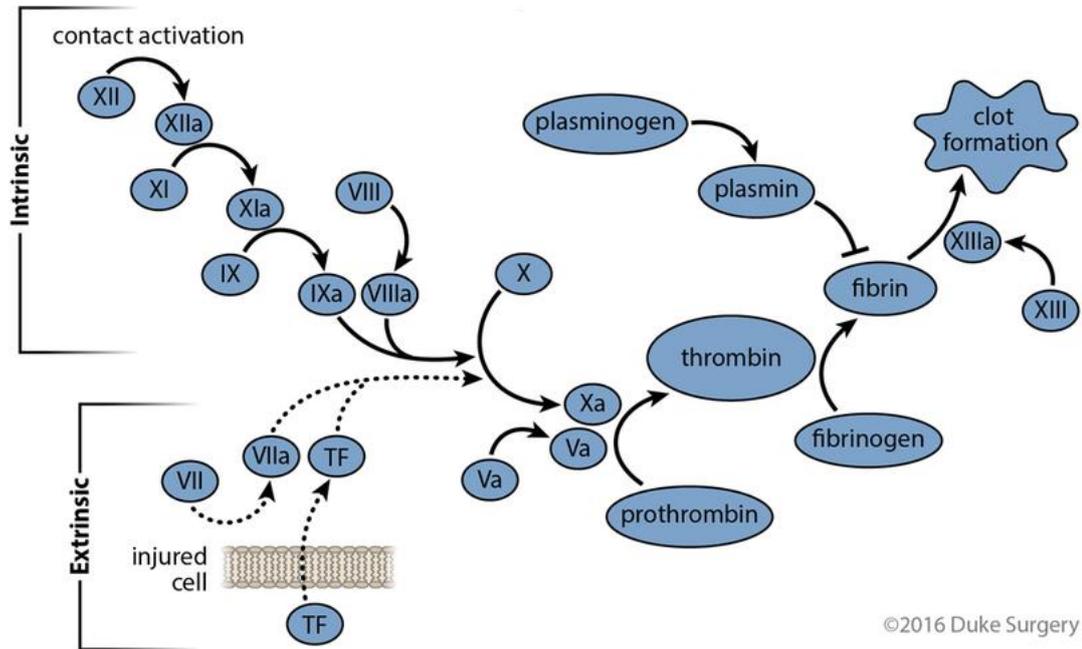


Abbildung 2: Gerinnungskaskade

Mit freundlicher Genehmigung von Manook et al. (56)

Nummer	Name	Funktion
I	Fibrinogen	Ausbildung des Fibrinnetzes
II	Prothrombin	Thrombin aktiviert Faktoren I, V, VIII und XIII
III	Tissue factor (TF)	durch Gefäßverletzung freigelegt, Cofaktor von Faktor VIIa und Beginn des extrinsischen Weges
IV	Calcium	ermöglicht die Bindung an negativ geladene Phospholipide, bei der Komplexbildung von Gerinnungsfaktoren beteiligt
V	Proaccelerin	bildet Komplex mit Faktor X
VII	Proconvertin	wird durch Kontakt mit TF aktiviert und aktiviert selbst Faktor X
VIII	Antihämophiles Globulin A	Komplexbildung mit Faktor IX
IX	Antihämophiles Globulin B	aktiviert Faktor X, Komplexbildung mit Faktor VIII
X	Stuart-Prower-Faktor	aktiviert Prothrombin, Komplexbildung mit Faktor VII
XI	Rosenthal – Faktor	aktiviert die Faktoren XII und IX
XII	Hageman – Faktor	Aktivierung des intrinsischen Weges
XIII	Fibrinstabilisierender Faktor	Stabilisierung von Fibrin durch Ausbildung Quervernetzungen

Tabelle 2: Plasmagerinnungsfaktoren

Modifiziert nach Fahlke et al. (17)

2.2.3. Gerinnungshemmung und Fibrinolyse

Damit es nicht zu einer pathologischen Thrombosierung des verletzten Gefäßes kommt, schließt sich an die primäre und sekundäre Hämostase die Gerinnungshemmung und Fibrinolyse an. Das in der Peripherie der Verletzung liegende Gefäßendothel wirkt antithrombogen, da Glykoproteine, welche im Endothel liegen, die Aktivierung von kontaktsensiblen Gerinnungsfaktoren und die lokale Aktivierung von Thrombozyten unterdrücken. Zusätzlich kann das intakte Endothel Gerinnungshemmer sezernieren, welche bereits aktivierte Gerinnungsfaktoren proteolytisch spalten und somit inaktivieren (17).

Die wichtigste Funktion in der Gerinnungshemmung übernimmt Antithrombin III, welches über Heparansulfat an der Endotheloberfläche gebunden ist. Antithrombin III hemmt verschiedene aktivierte Gerinnungsfaktoren, unter anderem Thrombin und die Faktoren IXa, Xa, XIa, XIIa. Diese Wirkung wird durch Bindung von Heparin deutlich verstärkt, welches aus basophilen Granulozyten, Mastzellen und dem Endothel sezerniert, oder iatrogen zugeführt wird. Thrombin erfährt eine weitere Hemmung durch α_2 -Makroglobulin und α_1 -Antitrypsin (17).

Durch auf der Endotheloberfläche exprimiertes Thrombomodulin wird, wie der Name schon sagt, die Funktion von Thrombin moduliert, wodurch nicht mehr Fibrinogen zu Fibrin gespalten wird, sondern Protein C in seine aktive Form Protein C_a gespalten wird. Es wird durch zusätzliche Bindung von Protein S ein Komplex gebildet, welcher die Gerinnungsfaktoren VIIIa und Va inaktiviert (17).

Wie schon kurz beschrieben, wird die Thrombozytenaktivierbarkeit durch luminale Sekretion von NO, Adenosin und Prostacyclin herabgesetzt. Gleichzeitig bildet das Endothel den Tissue factor pathway inhibitor (TFPI), welcher den Faktor-VIIa-Komplex und damit den extrinsischen Weg der Gerinnungskaskade blockiert (17).

Die Fibrinolyse soll schließlich eine übermäßige Thrombenbildung bzw. eine übermäßige Blutgerinnung verhindern. Aus dem Endothel werden v.a. Gewebeplasminogen-Aktivator (tissue plasminogen activator = tPA) und Pro-Urokinase sezerniert, letztere wird durch den Faktor XIIa in ihre aktive Form überführt. Sowohl tPA als auch die Pro-Urokinase spalten das Plasmaprotein Plasminogen zu Plasmin. Die nun aktivierte Protease Plasmin lysiert den Thrombus anschließend, indem vom Fibringerüst fibrin degradation products (FDP) abgespalten werden. Außerdem unterdrückt es durch Spaltung von Fibrinfäden die Wirkung von Thrombin und inaktiviert Gerinnungsfaktoren wie das Prothrombin (Faktor II) (17).

2.3. Entstehung von Thrombosen

Störungen der Hämostase bzw. die pathologische Ausbildung von Thrombosen sind bis heute eine der häufigsten Todesursachen weltweit. Die zugrundeliegenden Faktoren wurden erstmalig von Rudolph Virchow (Virchow's Trias) beschrieben und setzen sich aus drei verschiedenen Komponenten zusammen: Integrität des Gefäßendothels (Veränderungen bzw. Schädigung der Gefäßwand), Veränderungen der Strömungsgeschwindigkeit des Blutes (shear rate und shear stress) und Veränderung der Blutzusammensetzung (erhöhte Viskosität, übermäßig großer Anteil an prokoagulatorischen Proteinen wie Prothrombin, Fibrinogen etc.) (Abb. 3). Gewöhnlich ist die Entstehung von Thrombosen ein multifaktorielles Geschehen, setzt sich also mindestens aus zwei Faktoren der Trias zusammen (57-59). Venöse Thrombosen (z.B. tiefe Beinvenenthrombose) zeichnen sich in der Regel durch prokoagulatorische Plasmabedingungen bei gleichzeitig intaktem Endothel aus. Da in Venen im Vergleich zu Arterien ein deutlich verlangsamter Blutfluss herrscht, bis hin zur Stase hinter Venenklappen, bildet sich ein fibrinreiches Gerinnsel aus. Die arterielle Thrombose wiederum bildet sich meistens nach Verletzungen des Endothels, z.B. durch Ruptur eines atherosklerotischen Plaque, aus und ist durch einen plättchenreichen Thrombus gekennzeichnet. Parallel bzw. durch die Ruptur kommt es oft zu einer Änderung der Strömungsbedingungen und die laminare geht in eine turbulente Strömung über, wodurch die Entstehung einer Thrombose weiter gefördert wird (57). Wie bereits beschrieben, spielen sowohl bei der venösen (Veränderung Blutzusammensetzung und Strömungsgeschwindigkeit) als auch bei der arteriellen (Integrität des Gefäßendothels und Veränderung der Strömungsgeschwindigkeit) Thrombose mindestens zwei Faktoren der Trias eine Rolle, woraus ein multifaktorielles Geschehen resultiert.

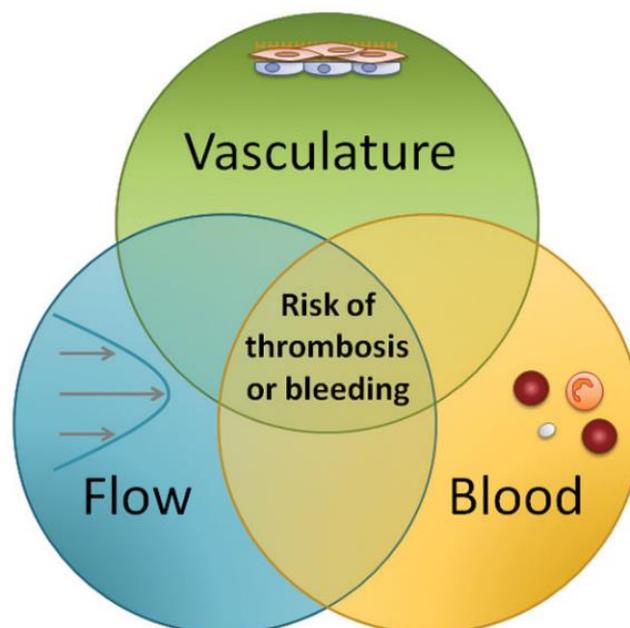


Abbildung 3: Virchow's Trias

Mit freundlicher Genehmigung von Wolberg et al. (57)

2.4. Arterielle Thrombose in Verbindung mit Arteriosklerose

Die Definition der arteriellen Thrombose ist eine pathogene, intravasale Blutgerinnung, welche zu einer unvollständigen oder vollständigen Occlusion (Verschluss) eines arteriellen Gefäßes führt (60). Die Versorgungsgebiete der betroffenen Arterien sind somit von einer Durchblutungsstörung und von Sauerstoffmangel betroffen (Minderperfusion), was zu einem Untergang des betroffenen Gewebes/der betroffenen Organe führen kann (61). Besonders häufig betroffen davon sind die Herzkranzgefäße (Herzinfarkt), die Arterien des Gehirns (Schlaganfall) und die Beinschlagadern (arterieller Verschluss / arterielle Verschlusskrankheit) (62).

Die häufigste Ursache einer arteriellen Thrombose ist das Krankheitsbild der Arteriosklerose, worunter man allgemein eine Erkrankung der arteriellen Gefäße versteht. Hierbei ist besonders die Atherosklerose zu erwähnen, welche durch Akkumulation von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, fibrinösem Gewebe und einer Verhärtung von großen und mittleren Arterien des elastischen und muskulären Typs vor allem aufgrund von Kalkablagerungen in die Intima definiert ist. Durch ihre Pathogenität ist die Atherosklerose eine der häufigsten Todesursachen der Welt (61, 63-66).

Es gibt viele prädisponierende Faktoren für die Entstehung einer Arteriosklerose, die wichtigsten sind: Hypercholesterinämie, Hyperlipidämie, Hypertonie, Tabakkonsum und Diabetes mellitus (67, 68). Folge aller Faktoren ist die initiale Einwanderung von Lipoproteinen (physiologischer Prozess) in die Arterienwand. Ist der Plasmaspiegel der Lipoproteine erhöht, dann werden diese nicht mehr aus der Intima abtransportiert und akkumulieren über die Zeit in dieser (pathologischer Prozess) (67). Eine besonders wichtige Rolle spielt hierbei das Low-density Lipoprotein (LDL), welches aus freiem Cholesterin, Cholesterinestern, Phospholipiden und Apolipoprotein B100 besteht. Seine pathologische Wirkung kann LDL entfalten, da es die mehrfach ungesättigte Fettsäure Linoleat enthält, wodurch LDL in der Lage ist Sauerstoffmoleküle aufzunehmen (69).

Die Aufnahme von Sauerstoffmolekülen führt letztendlich zu einer Oxidation von in der Intima akkumulierten LDL und ist der erste Schritt einer Entzündungsreaktion. Im Verlauf dieser Entzündungsreaktion wird das Gen NFκB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer) aktiviert, wodurch Proteine sezerniert werden, die zur Bildung von sogenannten Schaumzellen führen (68). Zunächst handelt es sich nur um eine milde Oxidation, jedoch werden mit der Zeit Monozyten in den Bereich der Entzündungsreaktion rekrutiert, die im Anschluss zu Makrophagen ausdifferenzieren. Diese Makrophagen besitzen eine deutlich größere Oxidationskapazität, wodurch die Entzündungsreaktion durch Oxidation der Lipide weiter verstärkt wird (70, 71).

Zu diesem Zeitpunkt im Krankheitsverlauf ist ein *circulus vitiosus* entstanden, die Prozesse halten sich von alleine aufrecht bzw. verstärken sich gegenseitig. Ein Produkt der Lipidoxidation ist z.B. das Lysophosphatidylcholin, welches eine chemotaktische Wirkung auf Monozyten und T-Lymphozyten besitzt. Außerdem werden durch Lysophosphatidylcholin vermehrt die Adhäsionsmoleküle VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) und ICAM-1 (interzelluläres Adhäsionsmolekül-1) auf den Endothelzellen exprimiert und der Plasmaspiegel des PDGF erhöht (72-75). Auf dem Endothel wird vermehrt P-Selektin exponiert, welches in der Lage ist, Thrombozyten, neutrophile und eosinophile Granulozyten zu binden (76). Besonders in der Initialphase der Entstehung einer Atherosklerose ist die Bindung von Thrombozyten am Endothel ein wichtiger Faktor, der den weiteren Verlauf der Atherogenese beeinflusst (65, 77). Neben P-Selektin binden die Thrombozyten auch noch über GpIb und den von-Willebrand-Faktor am Endothel, wodurch der GpIIb-IIIa Rezeptor auf der Oberfläche der Thrombozyten aktiviert wird. Die Aktivierung dieses Rezeptors führt zu einer Aggregation der Thrombozyten und einer gleichzeitigen Ausschüttung der thrombozytären Granula, wodurch Entzündungsmediatoren in die Peripherie freigesetzt werden (77). Durch die Cytokine CD40L und IL-1 werden auf der Oberfläche des Endothels vermehrt die Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1 präsentiert. Gleichzeitig kommt es zu einer vermehrten Freisetzung der Chemokine MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) und RANTES (CCL5, regulated and normal t-cell expressed and secreted) aus Monozyten, Makrophagen, Thrombozyten, glatten Muskelzellen und dem aktivierten Endothel. MCP-1 und RANTES sind für die Rekrutierung von Monozyten, Leukozyten und Granulozyten zuständig, während VCAM-1 und ICAM-1 deren Adhäsion und Transmigration in die Tunica Intima der Arterie ermöglichen (77, 78). ICAM-1 kommt nur auf Leukozyten vor, während VCAM-1 auf Leukozyten, Monozyten und Lymphozyten vorkommt (79, 80).

Durch ständiges Einwandern von Monozyten, der vermehrten Proliferation von Makrophagen und glatten Muskelzellen (induziert durch Ausschüttung des Wachstumsfaktors IL-1 aus den Makrophagen (61, 81)), sowie der Einlagerung von Lipiden im Kern, kommt es zu einem ständigen Wachstum des Plaque, bis dieser sich weit in das Lumen der betroffenen Arterie ausdehnt (82-84). Dieses ständige Wachstum des Plaque führt zu einer Unterversorgung mit Nährstoffen, wodurch eine zentrale Nekrose (nekrotischer Kern) mit Verflüssigung des Kerns entsteht (85-87).

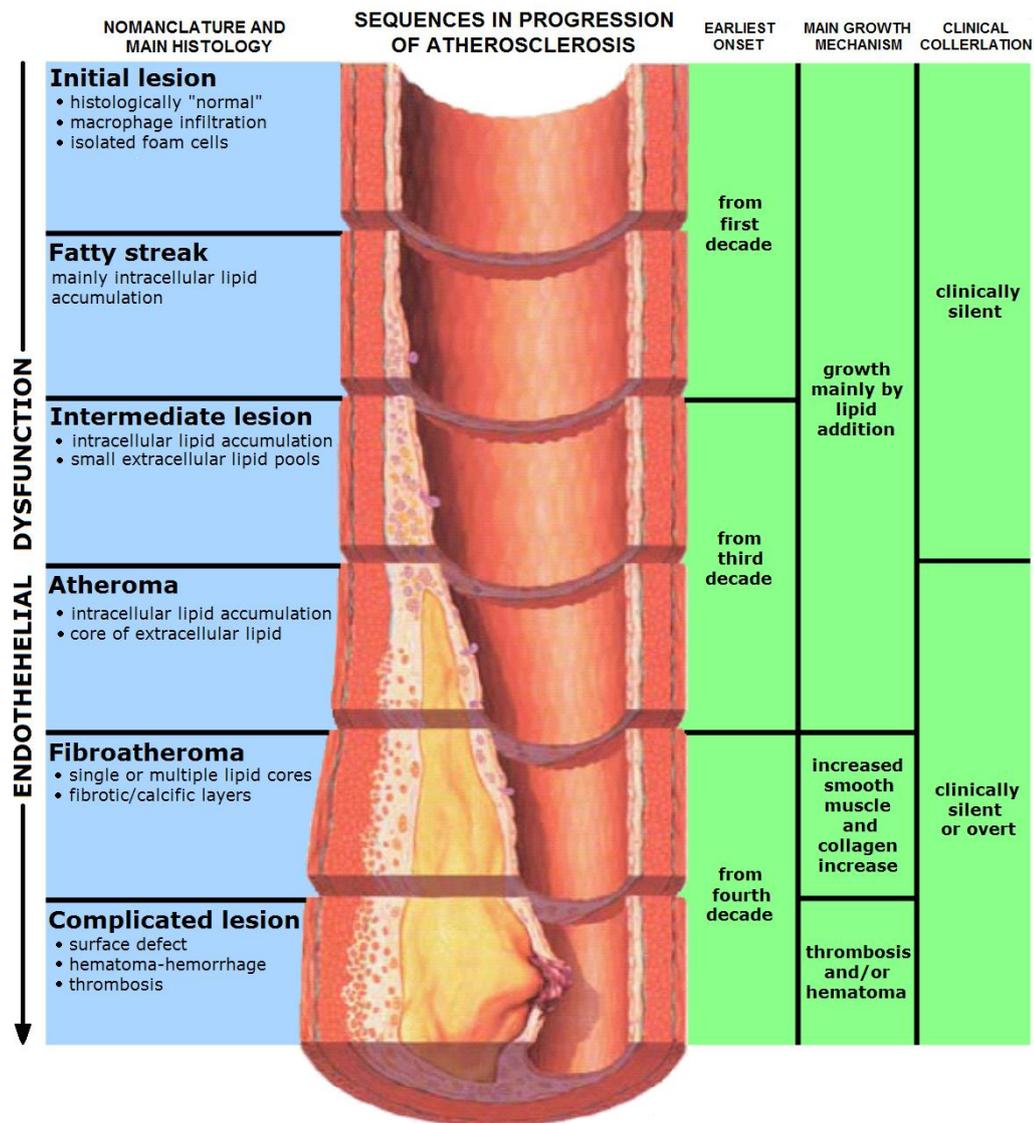


Abbildung 4: Stadieneinteilung der Entwicklung der Atherosklerose

Mit freundlicher Genehmigung von (88)

Im Verlauf des Wachstums des Plaque kommt es schließlich zu einer Kalzifizierung, wobei die zugrunde liegenden Prozesse bis heute nicht ganz aufgeklärt sind. Vermutlich sind die glatten Muskelzellen im Rahmen der Arteriosklerose in der Lage, neben fibrotischem Bindegewebe im Bereich der atherosklerotischen Läsion auch alkalische Phosphatase (ALP) zu bilden (61, 89). Die ALP bildet anschließend aus Phosphaten und Ca^{2+} Hydroxylapatit, welches im Bereich des Entzündungsprozesses abgelagert wird und zu einer Kalzifizierung des Plaque führt. Hydroxylapatit ist Grundlage der Hartschubstanz aller Wirbeltiere, z.B. im Knochen oder Zahnschmelz, wodurch auch in der Pathogenese der Arteriosklerose die Gene für die Knochensynthese stark hochreguliert werden (90, 91). Durch progressives Fortschreiten der Kalzifizierung kommt es schließlich zu einer Verhärtung der Arterienwand. Somit geht die für die Funktion der Arterien wichtige Elastizität verloren und unter den hohen Drücken, die im arteriellen System herrschen, kann es schließlich zur Ruptur der fibrösen Kappe des Plaque kommen. Wie bereits beschrieben wird TF in Monozyten und dem Endothel gespeichert und

findet sich jetzt auch vermehrt im Bereich der arteriosklerotischen Veränderungen. Zusätzlich führt das oxidierte LDL zu einer vermehrten Expression des TF (92, 93). Kommt es zu einer Ruptur des Plaque, dann kommt TF in Verbindung mit im Blut gelösten Gerinnungsfaktoren und kann so die extrinsische Gerinnungskaskade initiieren. Parallel dazu wird durch die Ruptur Kollagen freigelegt, welches über den vWF und GPVI direkt Thrombozyten binden kann und so seinen Teil zu der entstehenden Thrombose beiträgt (vgl. II 2.2.2, Abb. 2). Ein weiterer Faktor, der zur Entstehung des Thrombus beiträgt, ist die Veränderung des Blutflusses durch die räumliche Ausdehnung des Plaque in das Lumen der Arterie. Proximal des Plaque kommt es zu einer Verlangsamung des Blutflusses, während es im Bereich der Engstelle schließlich wieder zu einer Beschleunigung des Blutstroms kommt. Distal des rupturierten Plaque bzw. des Thrombus entsteht eine turbulente Strömung, wodurch der shear stress im Gefäß deutlich ansteigt und zu einer Aktivierung der Gerinnungskaskade führt (Abb. 5). Dies hat zur Folge, dass es nicht nur im Bereich der arteriosklerotischen Läsion zu einer Ausbildung eines Thrombus kommt, sondern die distalen Bereiche ebenfalls betroffen sind (57).

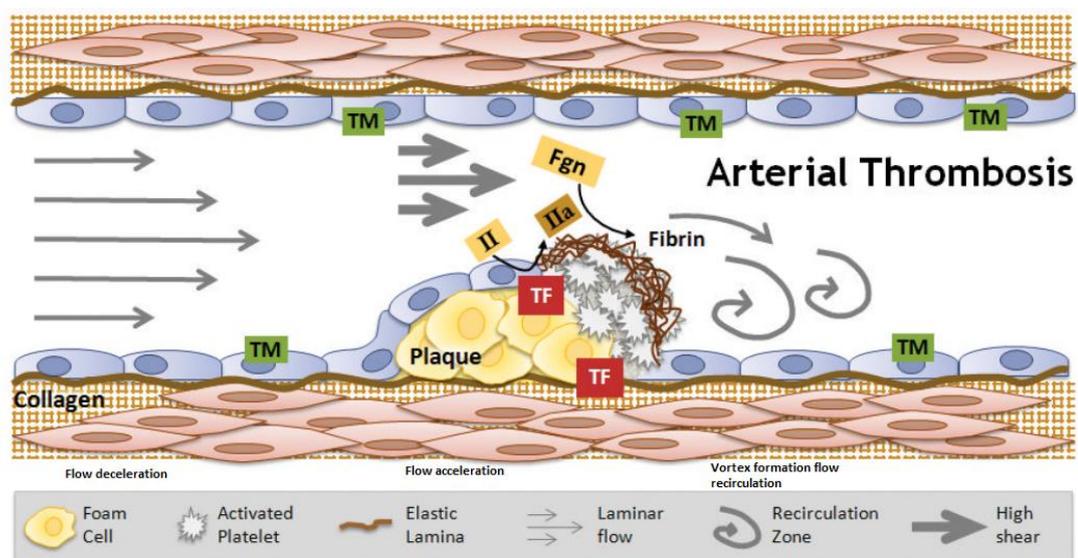


Abbildung 5: Arterielle Thrombose

Mit freundlicher Genehmigung von Wolberg et al. (57), TM=Thrombomodulin, II=Prothrombin, IIa=Thrombin, Fgn=Fibrinogen, TF=Tissue factor; TF wird vermehrt im nekrotischen Kern durch Schaumzellen gebildet und akkumuliert dort, nach Ruptur der fibrösen Kappe des Plaque wird TF in die Peripherie freigesetzt und kommt mit Gerinnungsfaktoren im zirkulierenden Blut in Kontakt

2.5. Retikulierte Thrombozyten

Als retikulierte Thrombozyten werden sehr junge Plättchen bezeichnet, die gerade frisch durch Abschnürung von den Megakaryozyten in den Blutkreislauf entlassen wurden. Sie sind das thrombopoetische Gegenstück zu den Retikulozyten (retikulierte Erythrozyten). Erstmalig erwähnt wurden sie 1969 von M. Ingram und A. Coopersmith im *British Journal of Haematology* als Folge von einem akuten Blutverlust bei Hunden.

Hierbei wurde durch wiederholte Phlebotomien ein künstlicher akuter Blutverlust simuliert, wodurch die Produktion von Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten deutlich anstieg. Gleichzeitig stieg die Anzahl von morphologisch abnormalen Zellen in allen drei Zelllinien (2). Ingram und Coopersmith entdeckten diese neue Gattung von Zellen, indem sie eine Supravitalfärbung mit New Methylene Blue (NMB) im Vollblut durchführten (Abb. 6). Hierbei zeigten sich bei einem Teil der Thrombozyten, analog zu retikulierten Erythrozyten, grobkörnige, retikuläre Strukturen, denen sie letztendlich ihre Bezeichnung verdanken. Gleichzeitig entdeckten Ingram und Coopersmith, dass die neu in den Blutkreislauf entlassenen Thrombozyten ein deutlich größeres mittleres Volumen und eine deutlich größere mittlere Dichte besaßen (2).

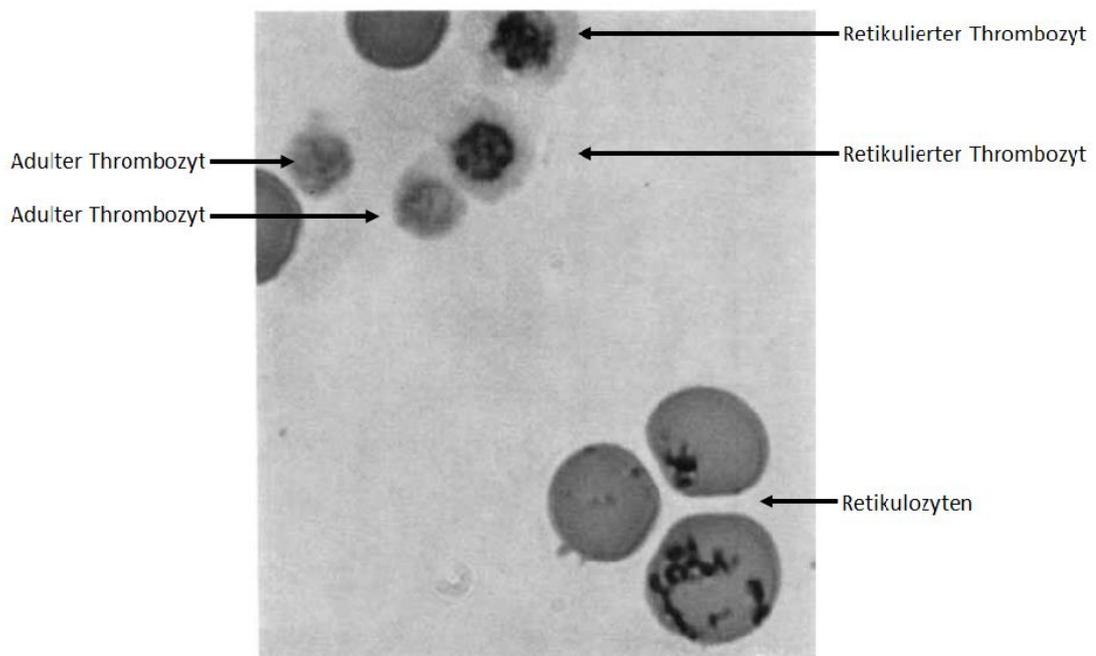


Abbildung 6: Retikulierte Thrombozyten nach akutem Blutverlust

Supravitale NMB-Färbung, mit freundlicher Genehmigung von Ingram et al. (2)

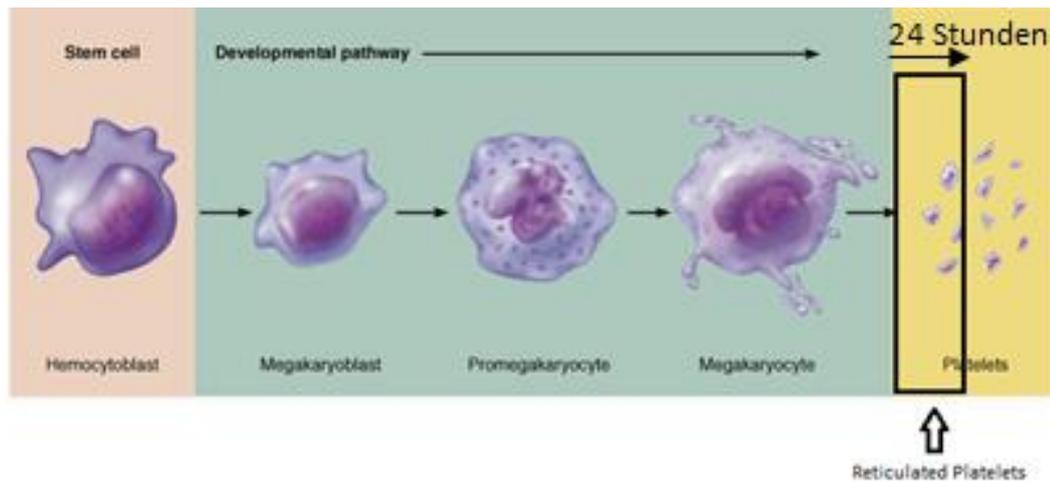
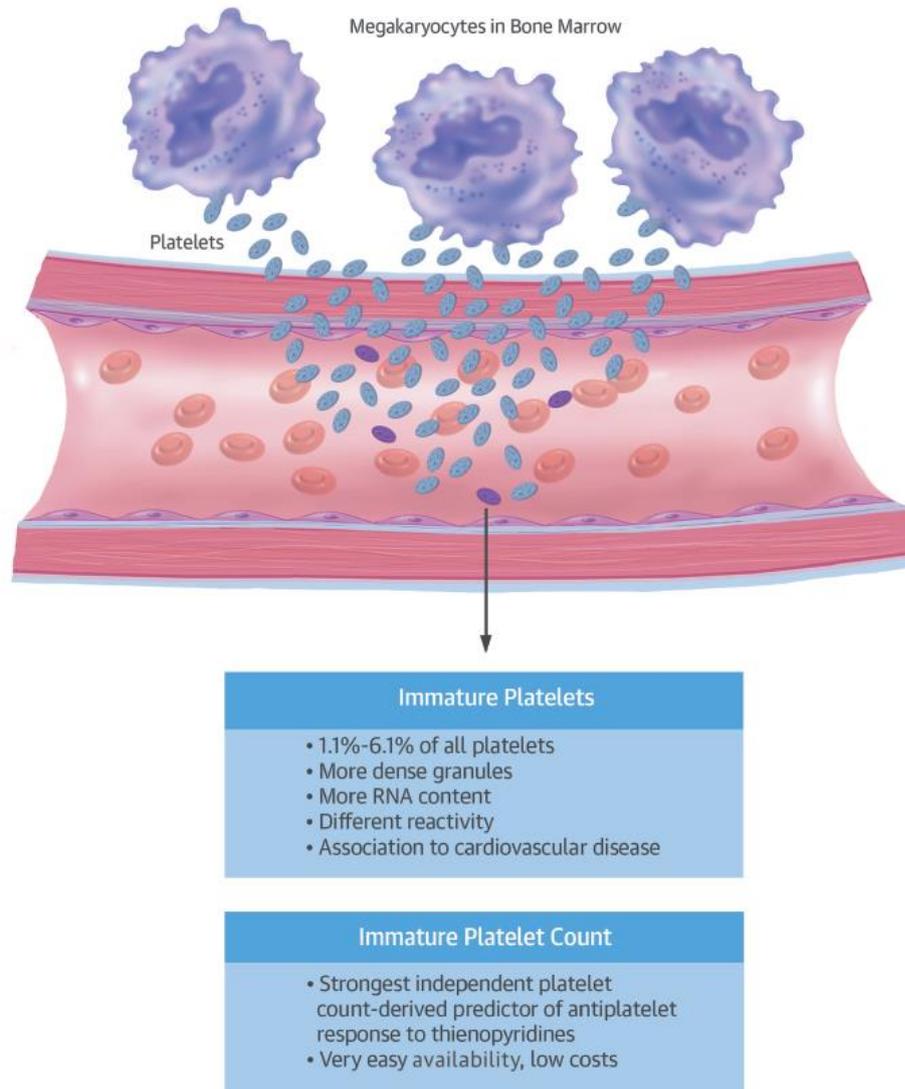


Abbildung 7: Retikulierte Thrombozyten

Modifiziert nach Benjamin Cummings, mit freundlicher Genehmigung von Benjamin Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Copyright © 2001

Ihr Anteil an der Gesamtheit der Thrombozyten wird auch als immature platelet fraction (IPF) bezeichnet. Ihre absolute Anzahl wird als immature platelet count (IPC) bezeichnet. Unter physiologischen Bedingungen beträgt der IPF beim Menschen zwischen 1-15%. Leider ist die Etablierung der Bestimmung von retikulierten Thrombozyten mittels manueller Durchflusszytometrie schwer zu standardisieren, wodurch es zu diesen relativ großen Abweichungen bezüglich der Referenzwerte kommt und jedes Labor sein eigenes Protokoll entwickeln muss (6, 94). Von adulten bzw. gereiften Thrombozyten unterscheiden sie sich durch ihr größeres mittleres Volumen (MPV = mean platelet volume), mehr dichten Granula, einer höheren Reaktivität und einem hohen Gehalt von megakaryozytärer RNA (Abb. 8) (2, 95, 96). Dass humane Thrombozyten unter bestimmten Umständen RNA enthalten, wurde sogar schon zwei Jahre vor der Entdeckung der retikulierten Thrombozyten von Boayse und Rafelson beschrieben (97-99).



Stratz, C. et al. *J Am Coll Cardiol.* 2016;68(3):286-93.

Abbildung 8: Retikulierte Thrombozyten und deren besondere Eigenschaften

Mit freundlicher Genehmigung von Stratz et al. (95)

Das Vorhandensein der verbliebenen RNA wird sich zu Nutze gemacht, um die retikulierten Thrombozyten zu identifizieren und zu analysieren. So bietet die Firma Sysmex mittlerweile vollautomatisierte Analyseverfahren, die in der klinischen Labordiagnostik täglich Anwendung finden und als Vorhersage für die Wirksamkeit von antikoagulatorischen Therapien oder der Differenzialdiagnose von Thrombozytopenien dienen. Im Gegensatz zu manuellen durchflusszytometrischen Messungen wird hier der physiologische Referenzbereich zwischen 0,8 – 6,3% gesetzt (94). Außerdem wird nicht nur zwischen adulten und retikulierten Thrombozyten unterschieden, sondern die RP werden nochmals in unreife und sehr unreife hochfluoreszente Thrombozyten in einem speziellen Messkanal unterschieden. Bei den Thrombozytopenien erhält man dadurch Auskunft darüber, ob es sich um einen erhöhten Verbrauch (Idiopathische Thrombozytopenie, TTP, AITP, DIC, Mikroangiopathien) oder einer verminderten

Produktion (Chemotherapie, Medikamentennebenwirkungen, Strahlentherapie) der Thrombozyten handelt. Allgemein gilt, dass bei einer verminderten Produktion im Knochenmark die Zahl der unreifen Thrombozyten nicht erhöht ist, bei erhöhtem Thrombozytenverbrauch ist die Zahl der RP dagegen erhöht (96).

Da die in den Thrombozyten enthaltene RNA instabil ist, wird diese innerhalb der nächsten 24 Stunden sowohl in vivo als auch in vitro größtenteils abgebaut (94, 100, 101). Die gesamte Lebensspanne humaner Thrombozyten beträgt zwischen acht bis zehn Tagen, die muriner Thrombozyten vier bis acht Tage (102, 103). Innerhalb der genannten 24 Stunden der Reifung sind die Thrombozyten noch in der Lage Proteinbiosynthese zu betreiben, was durch metabolisches Labeling und anschließenden Messungen gezeigt werden konnte. Diese Erkenntnisse werfen die Frage auf, ob die Proteinbiosynthese der Thrombozyten von biologischer Relevanz ist (102, 104). Außerdem konnte kürzlich durch Elektrophorese von aus Thrombozyten isolierter RNA gezeigt werden, dass retikulierte Thrombozyten einen deutlich höheren RNA Gehalt aufweisen als adulte Thrombozyten (retPLT 20-40 fg/PLT, adulte PLT 0,6-0,9 fg/PLT) (102). Die Hauptaufgabe der Thrombozyten ist zweifelsfrei die Hämostase, aber auch bei vaskulären Entzündungen spielen sie eine Rolle. Allerdings sind die Mechanismen und die Kinetik hinter diesen Prozessen noch weitestgehend unverstanden (102).

2.5.1. Retikulierte Thrombozyten in der Veterinärmedizin

Auch in der Veterinärmedizin spielen retikulierte Thrombozyten eine Rolle. So wird die IPF z.B. für die Beurteilung bei toxischer Myeloproliferation oder bei medikamentös induzierten Myelosuppression herangezogen. Bei Hunden dient die IPF der differentialdiagnostischen Aufarbeitung von Thrombozytopenien (Abb. 9). Bei Mäusen dient die IPF der optimierten Anfertigung von Thrombozyten-Transfusionsprotokollen, um eine immunmedierte Zerstörung dieser zu vermeiden (94, 105-108).

Table 1. Results of platelet analyses on each blood samples from affected dogs

Dog No.	Diagnosis	Breed	Age (yrs)	Sex	Platelet counts ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	RP			
						WBM $\times 10^3/\mu\text{l}$ %	PRPM $\times 10^3/\mu\text{l}$ %		
1	Hyperestrogenism with testicular tumor	Shetland Sheepdog	7	M	2	7.3	0.1	10.7	0.2
2	Babesiosis	Toy Poodle	1	M	50	22.7	11.3	21.0	10.5
3	Acute pancreatitis with DIC	Golden Retriever	9	MN	174	8.1	14.0	7.4	12.8
4	Chronic hepatitis	Wire Fox Terrier	11	FS	178	5.2	9.2	4.2	7.4
5	Gastrointestinal bleeding	Shiba	8	M	190	27.0	51.3	25.1	47.7
6	Myelofibrosis treated with prednisolone	Shih Tzu	4	FS	260	12.3	31.9	16.4	42.7
7	IMHA	Miniature Dachshund	6	M	302	26.4	79.8	24.6	74.2
8	ITP treated with prednisolon	Shetland Sheepdog	9	M	343	33.7	115.4	31.6	108.5
9	Non-regenerative hemolytic anemia	Miniature Dachshund	11	MN	699	6.3	44.1	5.3	37.2

Abbildung 9: Messung retikulierter Thrombozyten bei Hunden unter pathologischen Bedingungen

2.5.2. Rolle der retikulierten Thrombozyten in der arteriellen Thrombose

Im Krankheitsverlauf der Atherosklerose ist die mediane Überlebenszeit von Thrombozyten durch einen erhöhten Umsatz verringert, wodurch im stationären Zustand eine gesteigerte Thrombozytopoese vorliegt (11, 109-111). Gleichzeitig zeigen die retikulierten Thrombozyten, die durch die gesteigerte Thrombozytopoese vermehrt in den Blutkreislauf abgegeben werden, eine stärkere Neigung am Geschehen der arteriellen Thrombose teilzunehmen. Diese Beobachtungen sind im Einklang mit der Hypothese, dass erhöhte Werte von retikulierten Thrombozyten mit einem prothrombotischen Milieu in Verbindung gebracht werden (11, 109, 112). Zusätzlich zeigen Patienten mit koronarer Herzkrankheit (CAD = coronary artery disease) ein schlechteres Ansprechen auf eine medikamentöse Therapie und daher eine verstärkte Aggregation der Thrombozyten (11, 109, 110).

McBane et al. konnten in einer *in vitro* Studie (Flusskammerversuche mit Vollblut und arterieller shear rate) zeigen, dass, im Vergleich zu Messungen im Vollblut, der Anteil an retikulierten Thrombozyten im Anfangsstadium eines arteriellen Thrombus erhöht war (112). Dabei kann davon ausgegangen werden, dass retikulierte Thrombozyten durch ihren RNA Gehalt noch bis zu 24 Stunden nach ihrer Entlassung in den Blutkreislauf Proteinbiosynthese betreiben, wodurch es neben der Ausschüttung ihrer Granula auch zu einer *de novo* Synthese von Aktivierungsrezeptoren nach Stimulation und Rekrutierung kommt. Man spricht hier auch von einer Signal-abhängigen Translation mit Hilfe des thrombozytären Transkriptoms, induziert durch die Aktivierung der Thrombozyten (39, 112-116).

Bei einem erhöhten Wert der retikulierten Thrombozyten scheinen diese stärker auf Stimulation mit ADP, Arachidonsäure oder Kollagen zu reagieren. Außerdem zeigen sie eine erhöhte Expression des GP II-b/IIIa Rezeptors im Vergleich zu älteren Thrombozyten. Ebenfalls wird der Faktor V vermehrt exprimiert, welcher für die Bildung des Prothrombinase Komplexes benötigt wird und somit ein wichtiger Bestandteil der Gerinnungskaskade und der Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin ist (112, 117). Zusammen weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass retikulierte Thrombozyten im Vergleich zu alten Thrombozyten reaktiver sind und dass es bei einem erhöhten IPF-Wert in der Blutzirkulation wahrscheinlicher ist, dass es zu thrombotischen Ereignissen kommt.

2.6. Medikamentöse Behandlung und Prophylaxe der Thrombose

Zum heutigen Zeitpunkt stehen diverse medikamentöse Therapien zur Verfügung, mit denen thrombotische Ereignisse behandelt werden können bzw. mit denen erneute thrombotische Ereignisse verhindert werden sollen. Ebenfalls werden sie bei Patienten mit bekannten kardiovaskulären Erkrankungen prophylaktisch eingesetzt, damit es erst gar nicht zur Entstehung einer Thrombose kommt (118, 119).

Arterielle Thromben werden mit Medikamenten behandelt, die direkt auf die Thrombozyten einwirken, während venöse Thromben mit Medikamenten behandelt werden, die Proteine der Gerinnungskaskade beeinflussen (Abb. 10 und 11). Die Gefahr bei jeder Behandlung ist, dass aufgrund der geringen therapeutischen Breite (geringe Differenz zwischen der Dosis, die präventiv auf die Entstehung von Thrombosen einwirkt und der Dosis, die zu pathologischen Blutungen führt) heutiger Medikamente das prokoagulatorische Milieu vermehrt in ein antikoagulatorisches Milieu umschlägt und es im schlimmsten Fall zu Blutungen kommen kann (118).

Am gängigsten ist bei der arteriellen Thrombose eine Dual-Therapie aus NSAID's (non steroidal anti inflammatory drug, z.B. Acetylsalicylsäure) und den sogenannten P2Y₁₂-Inhibitoren (ADP-Rezeptor-Inhibitoren, z.B. Clopidogrel, Prasugrel, Ticagrelor). Zwar haben beide Wirkstoffgruppen einen anderen Wirkungsmechanismus, Ziel bei beiden ist aber die Hemmung der Thrombozytenaggregation.

ASS hemmt hierbei unspezifisch und irreversibel die beiden Enzyme Cyclooxygenase 1 und 2 (COX 1/COX 2), wobei zu ersterer eine in etwa 100fach stärkere Affinität besteht. Durch diese Hemmung kann das Substrat Arachidonsäure der Cyclooxygenasen nicht mehr zu Thromboxan A₂ umgesetzt werden, welches die Thrombozyten über den membranständigen Thromboxan-Rezeptor aktiviert. Durch die irreversible Hemmung hält dieser Effekt über die gesamte Lebensdauer der Thrombozyten an und es kommt zu einer effektiven Hemmung der Thrombozytenaggregation. ASS reduziert hierbei nicht nur signifikant das erstmalige Auftreten eines Herzinfarkts bei kardiovaskulären Erkrankungen (primäre Prävention), sondern senkt auch signifikant das Risiko eines erneuten Herzinfarkts (sekundäre Prävention) (118, 120-122).

Die P2Y₁₂-Inhibitoren entwickeln ihre Wirkung über eine Hemmung des ADP-Rezeptors der Thrombozyten (123). Durch diese Hemmung kann es anschließend nicht zu einer Aktivierung der Thrombozyten über den GP IIb/IIIa-Rezeptorkomplex kommen, es handelt sich also ebenfalls um eine Hemmung der Thrombozytenaggregation. Zu betonen ist hierbei, dass sowohl Clopidogrel als auch Prasugrel eine relativ kurze Halbwertszeit haben, während Ticagrelor eine verhältnismäßig lange Halbwertszeit im Blut aufweist. Außerdem handelt es sich bei Clopidogrel und Prasugrel um eine irreversible Hemmung, während

Ticagrelor eine reversible Hemmung bewirkt (123-126). Am häufigsten verwendet wird Clopidogrel. Typische Indikationen für eine Behandlung mit Prasugrel oder Clopidogrel sind das akute Koronarsyndrom (ACS = acute coronary syndrom) bzw. eine perkutane Koronarintervention (PCI = percutaneous coronary intervention). Neuere Medikamente wie Prasugrel und Ticagrelor sind zwar potentere P2Y₁₂-Inhibitoren und senken signifikant das Auftreten von Thrombosen im Vergleich zu Clopidogrel, erhöhen gleichzeitig aber auch das Risiko von ungewollten Blutungen (118, 127-129).

Als weitere Wirkstoffgruppe zur Behandlung der arteriellen Thrombose bleiben noch die $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptor Antagonisten (GP IIb/IIIa) zu erwähnen. Durch Inhibition dieses Rezeptors sind die Thrombozyten nicht mehr in der Lage über Bindung von Fibrinogen mit Hilfe des von-Willebrand-Faktors zu aggregieren. Gängige Medikamente dieser Wirkstoffklasse sind Abciximab und Eptifibatide, welche zur kurzzeitigen Behandlung intravenös nach einer PCI-Behandlung eingesetzt werden. Bei längerer oraler Applikation zeigt sich eine erhöhte Mortalität, weswegen diese Wirkstoffklasse im klinischen Alltag nicht sehr oft anzutreffen ist (118, 130).

Neben den bereits erwähnten Wirkstoffklassen gibt es noch die PAR-1-Inhibitoren (protease-activated receptor 1 = Thrombin Rezeptor) wie z.B. Vorapaxar (131).

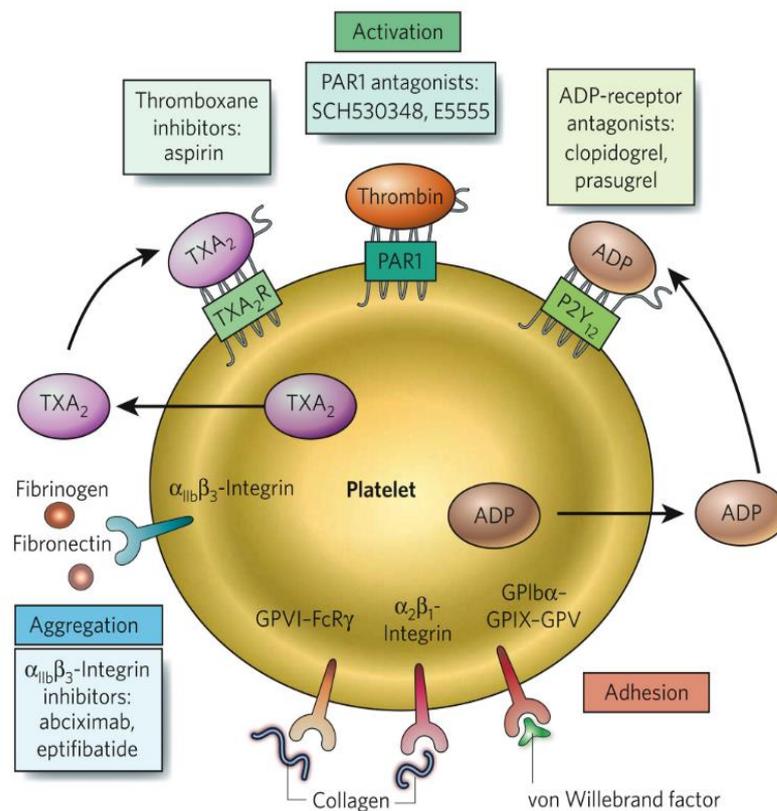


Abbildung 10: Angriffspunkte zur Behandlung der arteriellen Thrombose

Mit freundlicher Genehmigung von Mackman et al. (118)

Ein weiterer Ansatz der Behandlung akuter thrombotischer Ereignisse ist die Zersetzung von Fibrin, welches dem Thrombus seine strukturelle und mechanische Festigkeit verleiht (132). Hierzu werden Aktivatoren der Fibrinolyse genutzt, sogenannte „clot-busters“, namentlich Plasminogen-Aktivatoren (rtPA = rekombinanter Gewebeplasminogenaktivator) oder Streptokinase (von betahämolyisierenden Streptokokken synthetisiert). Je früher mit dieser Medikation begonnen wird, desto besser sind auch die Chancen auf eine erfolgreiche Behandlung. Bei einem akuten Herzinfarkt liegt das Zeitfenster bei ca. zwölf Stunden nach Auftreten der ersten Symptome, während es bei einem Schlaganfall nur ca. drei Stunden beträgt und die Behandlung zusätzlich zu lebensgefährlichen Hirnblutungen führen kann (133). Diese Medikamente sind allerdings auf Grund der flächendeckenden Verfügbarkeit der Koronarangiographie in Deutschland zunehmend in den Hintergrund gerückt.

Da in der vorliegenden Doktorarbeit ausschließlich die arterielle Thrombose behandelt wird, werden an dieser Stelle nur kurz die Wirkstoffgruppen zur Behandlung der venösen Thrombose erwähnt, welche eine antikoagulatorische Therapie darstellen. Hierbei werden Proteasen der Gerinnungskaskade direkt inhibiert, deren posttranslationale Modifikationen inhibiert oder die Aktivität von Antikoagulantien wird verstärkt. Im klinischen Alltag werden hierbei eingesetzt: Vitamin K Antagonisten (z.B. Warfarin, Hemmung der Faktoren VII, IX, X und Prothrombin), Heparin (bindet an Antithrombin und inhibiert somit Faktor Xa und Thrombin) und direkte Inhibitoren des Faktors Xa und Thrombin (z.B. Dabigatran, Rivaroxaban, Lepirudin und Desirudin) (118).

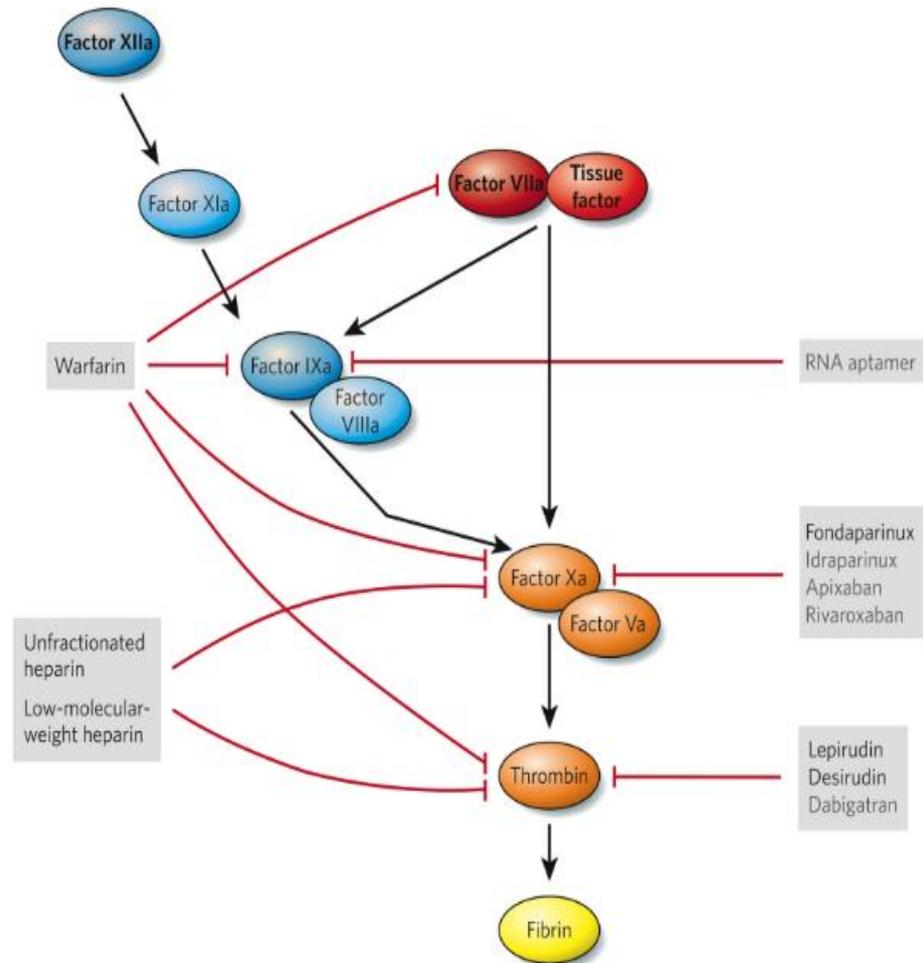


Abbildung 11: Angriffspunkte zur Behandlung der venösen Thrombose

Mit freundlicher Genehmigung von Mackman et al. (118)

2.7. Rolle der arteriellen Thrombose in der Tiermedizin

Trotz der großen Auswahl an antithrombotischen Medikamenten zur Vorbeugung und Behandlung von Thrombosen sind in der Tiermedizin wie in der Humanmedizin thromboembolische Krankheiten oft mit einem schlechten klinischen Verlauf verbunden (134).

Bei Hunden kann es zum Beispiel zu thrombotischen Ereignissen kommen, wenn parallel diverse Vorerkrankungen vorliegen. Meist ist die arterielle Thrombose bei Hunden somit eine Sekundärerkrankung und keine primäre Erkrankung. In Verbindung gebracht wird die arterielle Thrombose, bevorzugt in der Aorta und A. iliaca, mit der Protein-Losing-Nephropathie (PLN), Hyperadrenokortizismus, infektiösen Erkrankungen, intravasale disseminierte Koagulopathie und Neoplasien. All diese Vorerkrankungen resultieren in einer Hyperkoagulation und einer Hypofibrinolyse. Neoplasien können das Thromboserisiko durch die Steigerung der Thrombozytenaktivierung, Erhöhung der Thromboplastin Sekretion aus den Tumorzellen, Produktion des Faktor-X-Aktivators,

erniedrigter Fibrinolyse oder durch direkte Schädigung des Endothels durch invasives Wachstum erhöhen (135). Ebenfalls sind entzündliche Prozesse beschrieben wie Endotoxämie, Sepsis oder eine systemische Inflammation, wodurch wahrscheinlich das Gerinnungssystem aktiviert wird und antikoagulatorische Prozesse und die Fibrinolyse inhibiert werden (135, 136). Bei Katzen wird eine Aortenthrombose oft in Verbindung mit kardialen Erkrankungen gebracht, welche zu einer Herzinsuffizienz führen (z.B. HCM = hypertrophe Kardiomyopathie). Die HCM endet in einer linksventrikulären Hypertrophie und einer Myofibrose, wodurch es zu einem Linksherzversagen, systemischen arteriellen Thrombosen und plötzlichen Tod kommen kann. Ursache hierfür ist die partielle Stase des Blutflusses, wodurch die Gefäßintegrität gestört wird und es schließlich zu thrombotischen Ereignissen kommen kann. Meistens wird der initiale Thrombus in der linken Herzkammer oder im linken Herzohr gebildet, gelangt dann in den Blutkreislauf und führt durch das kleiner werdende Lumen der Gefäße in der Peripherie zu thromboembolischen Ereignissen. In vielen Fällen bleibt aber die tatsächliche Ätiologie von arteriellen Thrombosen unbekannt und bedarf weiterer Forschung (135, 137, 138).

Wie auch beim Menschen wird Übergewicht bei Hunden und Katzen zu einem immer schwerwiegenderen Problem. Grundprobleme sind auch hier übermäßige Nahrungsaufnahme und / oder ein zu geringer Energieverbrauch, wodurch eine positive Energiebilanz entsteht. Daraus können orthopädische Erkrankungen, Diabetes mellitus, kardiorespiratorische Erkrankungen, erhöhte Cholesterinwerte, Erkrankungen des Urogenitaltraktes, Neoplasien, dermatologische Erkrankungen und ein erhöhtes Anästhesierisiko resultieren. Diese Vorerkrankungen können schließlich zu kardiovaskulären Erkrankungen führen, die in thrombotischen Ereignissen enden (139).

Sowohl in Humanmedizin als auch in der Tiermedizin werden routinemäßig Medikamente eingesetzt, die zur Vorbeugung und Behandlung von thrombotischen Ereignissen dienen. Die am meisten verwendeten Medikamente in der Veterinärmedizin sind: Aspirin, Clopidogrel, Warfarin, unfraktioniertes Heparin (UFH), Dalteparin, Enoxaparin, Fondaparinux und Rivaroxaban. Eine Besonderheit hierbei ist jedoch, dass es keine allgemeinen Dosierungsempfehlungen gibt und für jeden tierischen Patienten ein neues Nutzen-Risiko-Profil erstellt werden muss. Dabei muss neben der Rasse, Alter, genetische Disposition und Gewicht auf die individuellen Eigenschaften jeder Spezies eingegangen werden. Besonders darauf zu achten ist, dass sich viele physiologische Prozesse der verschiedenen Spezies, z.B. die Verstoffwechslung von Medikamenten, stark voneinander unterscheiden (134).

III. ZIELSETZUNG

Retikulierte Thrombozyten stellen innerhalb aller Thrombozyten eine sehr junge Population dar, welche gerade erst vom Knochenmark in den Blutstrom entlassen wurde. Sie definieren sich durch einen hohen Gehalt an Granula und megakaryozytärer RNA (2, 95, 96).

Der prozentuale Anteil der retikulierten Thrombozyten ist in verschiedenen pathologischen Zuständen deutlich erhöht, z.B. bei kardiovaskulären Erkrankungen. Hierbei ist jedoch nicht bekannt, ob diese erhöhten Werte Ursache oder Folge der vorliegenden Erkrankungen sind. Auch sind die zugrundeliegenden Mechanismen bisher so gut wie nicht aufgeklärt (6, 7, 96). Diverse Studien konnten bisher zeigen, dass die retikulierten Thrombozyten im Zusammenhang mit einer erhöhten Reaktivität stehen und je höher der Anteil bei kardiovaskulären Erkrankungen ist, desto schlechter ist die Prognose für den weiteren klinischen Verlauf (8, 9). Die meisten Studien wurden unter pathologischen Bedingungen durchgeführt, das heißt, dass die Probanden bei der Probenentnahme bereits erkrankt waren. Da man, wie beschrieben, nicht weiß, ob erhöhte Werte der retikulierten Thrombozyten Ursache oder Folge der Erkrankungen sind, lassen diese Studien keine Beurteilung der physiologischen Funktion der retikulierten Thrombozyten zu (6, 7, 96).

Aus diesem Grund sollten in der vorliegenden Doktorarbeit qualitative Unterschiede zwischen jungen und adulten Thrombozyten, mit Schwerpunkt auf die arterielle Thrombose, unter physiologischen Bedingungen untersucht werden. Ein wichtiges Ziel dabei war, die Hypothese der erhöhten Reaktivität der retikulierten Thrombozyten funktionell *in vivo* nachzuweisen, da in bisherigen Studien ausschließlich *in vitro* Versuche durchgeführt wurden. Hierzu wurde zunächst *in vivo* eine zuverlässige Methode zur Detektion dieser Subpopulation etabliert. Ziel war es letztlich mittels Intravitalmikroskopie, Immunfluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie näher zu beschreiben, welche Rolle retikulierte Thrombozyten in thromboinflammatorischen Prozessen spielen.

Das langfristige Ziel hierbei ist es, neue therapeutische Ansätze zu identifizieren um retikulierte Thrombozyten gezielt zu inhibieren und dadurch den weiteren klinischen Verlauf von kardiovaskulären Erkrankungen und deren Mortalität zu verbessern.

IV. MATERIAL UND METHODEN

1. Versuchstiere

Für die hier vorliegende Doktorarbeit wurde die Maus als Versuchstier verwendet. Als Versuchstier ist die Maus besonders gut geeignet, da sie durch ihre geringe Körpergröße leicht in der Handhabung ist und in der Forschung viele transgene Linien vorhanden sind, die für die entsprechenden Fragestellungen spezifisch verwendet werden können. Ein weiterer Vorteil sind die geringe Generationszeit (10 Wochen), die hohen Wurfgrößen (3-12 Jungtiere) und die kurze Trächtigkeitsdauer (18-21 Tage). Außerdem erreichen Mäuse sehr früh ihre Geschlechtsreife (4-7 Wochen), mit 8-12 Wochen erreichen sie bereits ihre Zuchtreife. Die für die Zucht und Haltung der Mäuse benötigten Anlagen sind platzsparend und nicht sehr kostenintensiv. Die Maus ist als Versuchstier bereits bestens etabliert, im Modell der arteriellen Thrombose ist die Maus in der Forschung schon öfter beschrieben worden. Auch ist in unserem Labor z.B. die Induktion einer arteriellen Thrombose durch topische Applikation von FeCl_3 bestens etabliert (140).

Die Tierversuche wurden gemäß §8 des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt (Fassung vom 18.05.2006, zuletzt geändert durch Artikel 1 vom 17.12.2018) und von der Regierung von Oberbayern genehmigt. (Aktenzeichen: 55.2.1.54-2632-0-57-14; 55.2.1.54-2532-215-2014; 55.2.1.54-2532-94-2015)

1.1. Mausstämme

Die für die Versuche verwendeten Tiere wurden entweder unter SPF-Bedingungen (specific pathogen free) im benachbarten Zentrum für Neuropathologie und Prionenforschung gezüchtet oder bei The Jackson Laboratory, Bar Harbor, bestellt.

Für die hier behandelte Fragestellung wurden ausschließlich Tiere der C57BL/6J-Linie = Wildtyp Linie verwendet. Auch bekannt unter dem Namen „Black 6“ ist diese Inzuchtlinie, die am meisten verwendete Mauslinie in der Grundlagenforschung. Gerne wird diese Linie zur Generierung von transgenen Mäusen verwendet, sie bildet sehr selten spontane Tumore aus, eignet sich besonders gut für die Zucht und erreicht ein verhältnismäßig hohes Lebensalter. Da wir die physiologische Funktion der retikulierten Thrombozyten untersuchen wollten, fiel die Wahl auf diese Mauslinie, da keine transgenen Linien benötigt wurden.

1.2. Tierhaltung und Zucht

Spätestens eine Woche vor den geplanten Versuchen wurden die Tiere in die Tierhaltung des Walter-Brendel-Zentrums verbracht. Diese Woche diente der Gewöhnung der Tiere an die neue Umgebung und dem Abbau des durch den Transport entstandenen Stresses der Tiere. Bevor mit den Tieren ein Versuch durchgeführt wurde, sollte hiermit ausgeschlossen werden, dass Ergebnisse durch den Transportstress und den örtlichen Wechsel beeinflusst werden könnten. Dadurch sollte gewährleistet werden, dass die Gruppengrößen geringgehalten werden und möglichst wenige Versuchstiere benötigt werden. Im Walter-Brendel-Zentrum wurden die Tiere in Tierhaltungsschränke (Bioscape Uniprotect, Bioscope GmbH, Castrop-Rauxel, Germany) der hauseigenen Tierhaltung verbracht. Durch die Tierhaltungsschränke ist es möglich, die Versuchstiere in einem streng regulierten Mikroklima zu halten. Im Walter-Brendel-Zentrum wurden die Tiere bei einer Temperatur von 22 ± 1 °C und einer relativen Luftfeuchte von 55 ± 5 % bei einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden gehalten. Die Beleuchtungsstärke betrug hierbei über die gesamte Hell-Phase 50 bis 100 Lux. Gemäß den FELASA-Richtlinien (Federation of European Laboratory Animal Associations) wurden die Tiere in Polysulfon-Käfigen vom Typ M1L (Zoonlab GmbH, Castrop-Rauxel, Germany) in einer Gruppengröße von zwei bis vier Mäusen pro Käfig gehalten. Ausschließlich bei Männchen war durch ihr stark ausgeprägtes Territorialverhalten eine kurzfristige Einzelhaltung der Tiere erlaubt. Ausgestattet waren die Käfige mit einer saugstarken und staubfreien Einstreu (Abbed Nestbaumaterial B E-011, Faserbreite 3,5mm, E-012, Faserbreite 4mm + NBU E014, Faserbreite 120mm), für den Nestbau ein Häuschen aus Pappe sowie Späne als Enrichment. Wasser, welches über eine Nagetiertrinkflasche angeboten wurde, und ein Standard Diät Futter (Sniff Spezialdiäten GmbH, Soest) standen den Tieren ad libitum zur Verfügung. Der Gesundheitszustand der Tiere wurde täglich kontrolliert und bei Bedarf entsprechend eingegriffen. Ein Käfig-, Futter- und Wasserwechsel wurde einmal wöchentlich durch die Tierpfleger durchgeführt.

Wenn es für den Versuchsaufbau von Bedarf war, dann konnten die Versuchstiere im Walter-Brendel-Zentrum auch unter SPF-Bedingungen (specific pathogen free) gehalten werden. SPF bedeutet, dass die Tiere bei der Untersuchung auf bestimmte Keime negativ sind. Es ist also bekannt, welche Keime die Tiere nicht haben, der sonstige mikrobiologische Status der Tiere ist in der Regel aber nicht bekannt. Die Tiere wurden in Makrolon Käfige Typ II long (Greenline IVC SealsavePLUS, Techniplast, Buguggiate, Italy) gehalten und an ein IVC-System (individually ventilated cage) angeschlossen. Das Mikroklima wurde in der SPF-Haltung über eine Gebläseeinheit (SmartFlow, Techniplast) reguliert und auf die zuvor schon genannten Werte eingestellt.

Die Käfige waren mit einem saugfähigen und staubarmen Einstreu (Abbed Nestbaumaterial B E-011, Faserbreite 3,5mm, E-012, Faserbreite 4mm + NBU E-014, Faserbreite 120mm), einem Häuschen aus Pappe und einem Kosmetiktuch als Enrichment ausgestattet.

Um die Gefahr einer Kontamination der SPF-Haltung zu minimieren und um den Tieren eine möglichst stressarme Umgebung zu garantieren, war der Zutritt nur berechtigten und geschulten Personen erlaubt. Vor dem Zutritt zur Tierhaltung musste man zuerst eine Schleuse betreten, hier wurden die Hände desinfiziert, Schutzkleidung sowie Mundschutz, Handschuhe und Überziehschuhe angelegt. Zur weiteren Absicherung vor einer zu hohen Keimbelastung bzw. der Kontamination der Tierhaltung wurde ein Überdrucksystem installiert, wodurch das Eindringen von Fremdkörpern in die Tierhaltung so gut wie unmöglich war. Auch in dieser Tierhaltung wurden die Tiere täglich kontrolliert, einmal wöchentlich umgesetzt, erhielten frisch autoklavierte Käfige sowie frisches Futter und Wasser. Umgesetzt wurden die Tiere dabei unter einer Käfigwechselstation (Techniplast, Varese, Italy), sobald die Frontluftbarriere 30m/s betrug. Dieser Schritt diente der Absicherung gegenüber ungewollter Keimverschleppung. Die Käfige wurden im Anschluss mit 80 °C warmen Wasser gereinigt und für 20 Minuten bei 121°C und 2 bar Druck in einem Autoklav desinfiziert.

Wenn die geplanten Versuche unmittelbar bevorstanden, konnten die Tiere in einem Ventilated-Cabinet (Techniplast, Ventilated Storage Cabinet, Italy) untergebracht werden, dass sich im Tier-OP befunden hat. Dieses Cabinet diente der kurzfristigen Unterbringung der Tiere, für eine längerfristige Unterbringung mussten die Tiere in die entsprechenden Tierhaltungen verbracht werden.

Alle für die Versuche verwendeten Tiere waren zwischen 10-20 Wochen alt und wogen zwischen 20-30g Körpergewicht (KGW). Die Versuchsgruppen wurden so ausgewählt, dass es beim Alter und Gewicht zu keinen großen Abweichungen innerhalb einer Gruppe kam, ebenfalls sollte die Geschlechtsverteilung innerhalb der unterschiedlichen Gruppen ausgeglichen sein. Die Versuche wurden alle unter tiefer Anästhesie im chirurgischen Toleranzstadium durchgeführt, die während der gesamten Zeit engmaschig kontrolliert wurde. Zum Versuchsende wurden die Tiere durch eine zervikale Dislokation euthanasiert.

2. Operative Eingriffe

2.1. Narkose

In unserem Labor werden sämtliche Versuche unter einer Kombinationsanästhesie aus Inhalations- und Injektionsnarkose durchgeführt, um den Zustand der allgemeinen Anästhesie zu erreichen. Unter dem Begriff der Allgemeinanästhesie versteht man einen medikamentös induzierten Schlafzustand des Organismus, der durch Bewusstlosigkeit (Hypnose), der Skelettmuskelentspannung (Relaxation) und der Schmerzausschaltung (Analgesie) definiert ist. In diesem Zustand können chirurgische, diagnostische und therapeutische Eingriffe ohne Schmerzempfinden und Abwehrreaktionen durchgeführt werden (141).

Eingeleitet wurde jede Narkose mit einer Isofluran-Inhalationsnarkose (Isofluran CP, cp-pharma, Burgdorf). Das Prinzip besteht darin, dass das Isofluran, ein halogenierter Ether, mit Hilfe von Sauerstoff als Trägergas von der Maus eingeatmet wird. Hierzu wurde die Maus in eine Plexiglasröhre verbracht, an deren Enden jeweils ein Isofluran-Verdampfer (Datex-Ohmeda Isotec 5, UniVet Porta Fa. Groppler, Deggendorf) bzw. eine Absaugvorrichtung angeschlossen wurden. Die Absaugvorrichtung sorgt dafür, die Emission von Isofluran so gering wie möglich zu halten. Anschließend wurde die Röhre über den Verdampfer mit einem 5%igen Isofluran-Sauerstoffgemisch befüllt, wobei es zu einer raschen Anflutung im Gehirn und einer damit einhergehenden Muskelrelaxation kommt. Die Inhalationsnarkose wurde so lange durchgeführt, bis sämtliche Stellreflexe erloschen waren und sich die Atmung der Tiere leicht beschleunigte. Da Isofluran eine sehr geringe Metabolisierungsrate ($< 0,2\%$) besitzt und somit größtenteils wieder unverändert über die Lunge abgeatmet wird, wurden die Tiere im unmittelbaren Anschluss aus den Plexiglasröhren genommen und die intraperitoneale Narkose mittels einer 30G Kanüle (BD Mikrolance, Becton Dickson GmbH, Franklin Lakes, USA) und einer 1 ml Spritze (Injekt-F, B. Braun, Melsungen) appliziert (141). Während der Applikation mussten die Tiere leicht kopfüber gelagert werden, damit gewährleistet wurde, dass die Applikation intraperitoneal verläuft und nicht Darm oder Blase punktiert werden. Im Anschluss wurden die Tiere in Narkoseboxen verbracht, wodurch die Umgebungsreize minimiert wurden und eine bessere Einschlafphase garantiert wurde. Um ein Austrocknen der Cornea über die Dauer des Versuches zu verhindern, wurde bei den Mäusen eine feuchtigkeitsspendende Augensalbe (Bepanthen Augen- und Nasensalbe, Bayer, Leverkusen) aufgetragen, wobei die Applikation bei Bedarf wiederholt wurde. Bei längerer Versuchsdauer wurde den Mäusen subkutan NaCl appliziert, um eine ausreichende Versorgung mit Flüssigkeit zu gewährleisten.

Bei allen Versuchen wurde die Narkosetiefe über die gesamte Zeit und in regelmäßigen Abständen über den Zwischenzehenreflex kontrolliert. Da dieser Reflex über die gesamte Dauer des Versuchs erloschen sein sollte, ist er ein sehr gutes Indiz für die aktuelle Narkosetiefe. In der Regel wurde den Tieren alle 30 bis 45 Minuten eine halbe Dosis der

MMF-Narkose (Medetomidin, Midazolam, Fentanyl) subkutan in die Nacken- oder Kniefalte nachgegeben. Bei jeder Nachdosierung wurden Alter und Gewicht der Tiere und die aktuelle Narkosetiefe mit einbezogen.

2.2. Narkosemittel

Für die intraperitoneale Narkose wurde eine Dreifach-Narkose aus Medetomidin (Dorbene vet., zoetis Deutschland GmbH, Berlin), Midazolam (Midazolam, B. Braun, Melsungen) und Fentanyl (Fentadon, Albrecht GmbH, Aulendorf) verwendet. Durch den synergistischen Effekt der verwendeten Anästhetika erreichen wir eine balancierte Anästhesie, wodurch die Dosierung der einzelnen Medikamente möglichst geringgehalten werden kann. Hierdurch wird die Steuerbarkeit der Narkose deutlich verbessert bei gleichzeitiger Minimierung der Nebenwirkungen (141).

Medetomidin gehört zu der Gruppe der Imidazole. Seine Wirkung entfaltet sich durch Bindung an α_2 -Adrenozeptoren, wodurch die Freisetzung und Turnover Rate von Noradrenalin verringert wird. Hierdurch wird eine Sedation hervorgerufen, zusätzlich wirkt Medetomidin schmerzmindernd (analgetisch), angstlösend (anxiolytisch) und muskelrelaxierend. Appliziert wurde Medetomidin in einer Dosierung von 0,5 mg/kg. Bei Bedarf kann die Wirkung von Medetomidin durch die Applikation von 3,75 mg/kg Atipamezol (Alzane, zoetis Deutschland GmbH, Ulm) antagonisiert werden (141, 142).

Midazolam gehört zu der Gruppe der Benzodiazepine. Seine Wirkung wird über die Modulation von α_3 -GABA-Rezeptoren vermittelt, wodurch der Effekt von γ -Aminobuttersäure (GABA) im zentralen Nervensystem (ZNS) verstärkt wird. Dabei kommt es zu einer zentralen Hemmung der Nervenzellen im ZNS, wodurch eine sedative und muskelrelaxierende Wirkung erreicht wurde. Zusätzlich wirkt Midazolam angstlösend, antikonvulsiv und beruhigend. Appliziert wurde Midazolam in einer Dosierung von 5,0 mg/kg. Bei Bedarf wurde die Wirkung von Midazolam durch die Applikation von 0,72 mg/kg Flumazenil (Flumazenil, Hikma Pharma GmbH, Gräfeling) antagonisiert (141, 142).

Fentanyl gehört zu den synthetischen Opioiden und wird in der Tripelnarkose als potentes Analgetikum (Schmerzmittel) verwendet. Fentanyl bindet als Agonist an die μ -Opioidrezeptoren und wirkt dadurch stark analgetisch (schmerzlindernd) und sedierend (dämpfend). Ein entscheidender Vorteil gegenüber Morphin (Hauptalkaloid des Opiums) ist, dass Fentanyl ca. die 100fache Potenz besitzt und dadurch in wesentlich geringeren Mengen eingesetzt werden kann (141, 142). Appliziert wurde Fentanyl in einer Dosierung von 0,05 mg/kg, wozu eine 1:3 mit NaCl (Isotonische Kochsalzlösung, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany) verdünnte Vorratslösung angesetzt wurde. Bei Bedarf konnte Fentanyl mit Hilfe von Naloxon antagonisiert werden (141, 142).

Da Fentanyl eine sehr kurze Wirkdauer von 20-30 Minuten besitzt, wurde hierauf jedoch verzichtet. Im Gegenteil, je nach Versuchsplanung musste darauf geachtet werden, dass die Tiere auch im post OP Management ausreichend analgetisch versorgt wurden. Hierzu wurde den Tieren das Opiat Buprenorphin (Buprenovet, Bayer Vital GmbH, Leverkusen) in einer Dosierung von 0,1 mg/kg verabreicht. Gegenüber Morphin besteht auch hier der Vorteil, dass Buprenorphin ca. 30-mal wirksamer ist und gegenüber Fentanyl hat es eine deutlich längere Wirkdauer von acht bis zehn Stunden. Die Injektion erfolgte subkutan an den dafür geeigneten Stellen (141, 142). Zu erwähnen bleibt hier, dass es durch die Gabe von Buprenorphin bei der Maus zu einer Ischurie (Harnverhaltung) kommen kann. Die Maus muss nach Beendigung des operativen Eingriffes engmaschig überwacht werden, bei Bedarf ist eine manuelle Entleerung der Harnblase durchzuführen.

2.3. Blutentnahmetechniken

2.3.1. *Vena facialis*

Wenn für den Versuchsaufbau nur kleinere Blutvolumina bis ca. 150 µl benötigt wurden, dann war die Entnahme aus der *V. facialis* das Mittel der Wahl. Diese Blutabnahme ist technisch nicht sehr anspruchsvoll, darf mit entsprechendem zeitlichem Abstand mehrmals am selben Tier vorgenommen werden und bedarf keiner anschließenden Euthanasie der Tiere.

Sollte die Blutentnahme mit Wiedererwachen der Tiere verbunden sein, dann sollten diese vor Beginn des Versuchs ausreichend analgetisch abgedeckt werden. Hierzu erhielten die Tiere ca. 30 Minuten vor der Blutabnahme eine subkutane Injektion von Buprenorphin (vgl. IV 2.2).

Um die Blutentnahme vorzubereiten, wurden die Tiere zunächst mit Hilfe von Isofluran betäubt (vgl. IV 2.1). Nachdem die Tiere bei ausreichender Narkosetiefe aus der Plexiglasröhre entnommen wurden, wurden diese mittels Daumen und Zeigefinger in der Nackenfalte gegriffen. Diese Art der Lagerung hat den Vorteil, dass die *V. facialis* automatisch über den ausgeübten Druck angestaut wird. Jedoch ist strengstens darauf zu achten, dass der ausgeübte Druck unter keinen Umständen die Sauerstoffzufuhr der Trachea durch Kompression behindert.

Im nächsten Schritt wurde eine haarfreie Stelle in Richtung des Kieferwinkels der Maus aufgesucht, der sogenannte „Freckle-Spot“. Wenige Millimeter kaudodorsal von dieser Stelle befindet sich die Punktionsstelle für die *V. facialis*. Mit Hilfe einer Blutlanzette (Solofix, B. Braun Melsungen AG, OPM, Melsungen) wurde bei einer Einstichtiefe von ca. vier bis fünf Millimetern die Vene punktiert. Die Blutstropfen wurden dabei mit einer EDTA-Küvette (Microvette 100 K3E, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) oder einem Eppendorf Safe-Lock Tube (Eppendorf Tubes®, Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH,

Wesseling), welches zuvor mit einem Antikoagulant (Citrat, Heparin o.ä.) befüllt wurde, aufgefangen. Um die entstandene Blutung möglichst schnell zu stoppen und der Entstehung von Hämatomen entgegenzuwirken, wurde der Stau gelöst und die Punktionsstelle so lange komprimiert, bis es zum Sistieren der Blutung kam. Da für diesen Versuch eine reine Inhalationsnarkose (niedrige Metabolisierungsrate, vgl. IV 2.1.) verwendet wurde, konnten die Mäuse zum Aufwachen wieder in ihren Käfig verbracht werden, wobei sie während der gesamten Aufwachphase weiterhin überwacht wurden.

2.3.2. Retrobulbäre Blutentnahme

Wenn für den Versuchsaufbau eine größere Menge Blut benötigt wurde, dann war die retrobulbäre Blutentnahme das Mittel der Wahl. Insgesamt kann mit dieser Methode bei adulten Tieren ± 1 ml Blut entnommen werden. Ein besonderer Vorteil dieser Technik ist, dass es zu fast keiner Voraktivierung der Thrombozyten kommt, was bei anderen Entnahmetechniken teilweise zu einer nicht unerheblichen Fehlerquelle werden kann. Besonders bei der hier vorliegenden Fragestellung (Aktivierung und Funktion von Thrombozyten) ist dies ein wichtiger Aspekt. Hauptsächlich beruht dieser Vorteil darauf, dass während der gesamten Blutentnahme das Blut über passive bzw. Kapillarkräfte entnommen wird, eine Aspiration oder sonstige mechanische Kräfte werden nicht ausgeübt.

Bei der retrobulbären Blutentnahme handelt sich um einen finalen Versuch, die Tiere werden im Anschluss durch eine zervikale Dislokation euthanasiert. Allgemein wäre es erlaubt, wiederholte Blutentnahmen an einem Auge im Abstand von mindestens 2 Wochen durchzuführen. Wie bereits beschrieben, werden die Tiere zuerst mit einer Inhalationsnarkose mittels Isofluran und einer anschließenden Injektionsnarkose mittels MMF in den Zustand einer tiefen Anästhesie versetzt (vgl. IV 2.1. und 2.2.). Nach Prüfung und Ausbleiben der Reflexe kann mit der eigentlichen Blutentnahme begonnen werden.

Wie bei der Blutentnahme aus der *V. facialis* werden auch hier die Tiere mit Hilfe eines Nackengriffs gelagert, wodurch es zu einer Anstauung aller Gefäße im Kopfbereich kommt. Im Anschluss wird eine Kapillare unter moderatem Druck mit einer leichten Dreh- und Kippbewegung über den rostralen Augenwinkel in Richtung des kontralateralen Kieferwinkels in den Venenplexus hinter den Bulbus der Maus getrieben. Je nach Versuchsplanung wurde die Kapillare zuvor mit einem entsprechenden Antikoagulant behandelt. Wurde Heparin (Heparin- Natrium- 25000 I.E., ratiopharm GmbH, Ulm) eingesetzt, war es ausreichend, die Kapillare mit einem Volumen von 10 μ l mit diesem zu spülen. Damit wurde eine finale Blut-Heparin-Verdünnung von 1:100 erreicht (bei 1 ml Gesamtvolumen). Wurde Citrat verwendet, dann wurde sowohl die Kapillare mit 10 μ l Citrat gespült, als auch weitere 90 μ l in ein bereitstehendes Eppendorf Safe-Lock-Tube vorgelegt, um eine finale Blut-Citrat-Verdünnung von 1:10 zu erreichen (bei 1 ml

Gesamtvolumen). Nach Beendigung der Blutentnahme wurde die Maus umgehend euthanasiert. Das gewonnene Blut wurde ohne weitere Zwischenlagerung direkt den entsprechenden Versuchen zugeführt.

2.3.3. Herstellung Thrombozytenpuffer für die Thrombozytenisolation

Für den allgemeinen Umgang mit Vollblut oder der Isolation von Thrombozyten musste zunächst eine Pufferlösung angesetzt werden, die sogenannte Thyrode's-HEPES-Pufferlösung. Diese Lösung ist isotonisch und besitzt einen physiologischen pH-Wert, wodurch die Blutzellen möglichst wenig in ihrer Funktion beeinträchtigt werden und es zu keiner relevanten Thrombozytenaktivierung kommt (143).

Für die Herstellung des Puffers waren folgende Schritte notwendig: Zunächst wurden 10 ml eines 10-fach-Tyrode's-Puffer vorbereitet, welcher aus 10,15g NaHCO₃ (VWR International, Darmstadt), 1,95g KCl (VWR International, Darmstadt) und 80g NaCl (VWR International, Darmstadt) bestand. Im Anschluss wurden 0,1g D(+)-Glukose, bovines Serumalbumin und 1 ml HEPES (Invitrogen, Darmstadt) mit 90 ml Aqua dest. vermischt. Beide Lösungen wurden nun mit 1000 ml Aqua dest. vermischt und steril filtriert. Im letzten Schritt wurde die fertige Lösung durch Zugabe von 2mM HCl und NaOH auf einen pH-Wert von 6,5 bzw. 7,4 eingestellt.

2.3.4. Thrombozytenisolation

Je nach Versuchsaufbau war es teilweise notwendig, Thrombozyten zu isolieren und von anderen Blutbestandteilen zu trennen. Hierzu wurde das antikoagulierte Vollblut in eine Zentrifuge gegeben (Eppendorf Zentrifuge 5804, Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling, Germany) und bei 150G für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand, das sogenannte platelet rich plasma (PRP), wurde in ein neues Eppendorf Safe-Lock-Tube überführt. Um in den nächsten Schritten eine Aktivierung der Thrombozyten zu verhindern, wurde PGI₂-alpha (Prostacyclin I2, Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg) in einer Konzentration von 10µg/ml hinzugegeben. PGI₂alpha wirkt als funktioneller Gegenspieler von Thromboxan und hemmt so die Thrombozytenaggregation.

In einem zweiten Zentrifugationsschritt wurde das PRP bei 380G für insgesamt 30 Minuten zentrifugiert. Hierbei entstand ein Pellet aus Thrombozyten auf dem Boden des Eppendorf Safe-Lock-Tubes. Der Überstand wurde komplett verworfen, das Pellet aus Thrombozyten wurde in 1000 µl Thyrode's-HEPES-Puffer resuspendiert.

In einem dritten Zentrifugationsschritt wurden die resuspendierten Thrombozyten erneut bei 380 G für 20 Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und die Thrombozyten in 500 µl Tyrode's-HEPES-Puffer resuspendiert.

In der entstandenen Thrombozytenlösung wurde die Thrombozytenzahl mit Hilfe eines hämatologischen Analysegeräts (ABX Micros ES60 Hämatologie Analysegerät, Horiba ABX, Montpellier, Frankreich) bestimmt. Im Anschluss wurde die Lösung so mit Tyrode´s-HEPES-Puffer verdünnt, dass eine finale Thrombozytenkonzentration von 5×10^4 Thrombozyten/ μl erreicht wurde.

2.4. Schwanzvenenkatheter

Standardmäßig wurde den Mäusen vor Versuchsbeginn ein Schwanzvenenkatheter in eine der beiden lateral verlaufenden Venen (*Venae coccygeae laterales*) gelegt. Über diesen Schwanzvenenkatheter konnten die benötigten fluoreszierenden Antikörper oder Medikamente appliziert werden. Gleichzeitig konnte über den Katheter bei längerer Versuchsdauer für eine ausreichende Flüssigkeitssubstitution gesorgt werden, indem in regelmäßigen Abständen steriles NaCl intravenös injiziert wurde.

Der Schwanzvenenkatheter musste zunächst selber hergestellt werden. Hierzu schneidet man ein ca. 7cm langes Stück von einem Polyethylenschlauch (Fine Bore Polyethene Tubing, 0,28mm ID, 0,61mm OD, Smiths Medical International Ltd., Hythe, UK) ab. Anschließend werden zwei 30G Kanülen (BD Microlance3, Becton Dickinson and Company Limited, Drogheda, Louth, Irland) benötigt. Bei einer der beiden Kanülen wird mit Hilfe einer Klemme und einer schnellen Knick-Bewegung die Kanüle vom dazugehörigen Konus abgetrennt. Diese abgebrochene Kanüle wird in ein Ende des Schwanzvenenkatheters eingeführt. In das andere Ende wird anschließend die verbliebene intakte Kanüle eingeführt. Um die Durchgängigkeit und die Dichtigkeit des Katheters zu überprüfen, wurde eine 1 ml Spritze (BD Discardit™, Becton Dickinson S.A., Fraga, Huesca, Spanien) gefüllt mit 0,9%-NaCl-Lösung aufgesetzt und der Katheter ausreichend gespült. Die Befüllung des Katheters vor der Verwendung am Versuchstier hatte noch eine weitere wichtige Funktion. Hiermit sollte sichergestellt werden, dass das gesamte System aus Spritze und Katheter frei von Luftblasen war. Sollten sich noch Luftblasen innerhalb des Systems befinden und werden diese intravenös appliziert, dann kommt es umgehend zu einer Luftembolie und das Versuchstier verstirbt.

Fertig vorbereitet und gespült wurde der Schwanzvenenkatheter dann mit Hilfe eines Nadelhalters vorsichtig in eine der beiden lateral gelegenen Venen gelegt. Da dieser Schritt meist ohne Narkose durchgeführt wurde, wurde die Maus mit Hilfe einer Fixierungsvorrichtung (Tailvein Restrainer for Mice, TV-150 STD, Braintree Scientific, USA) immobilisiert, wobei der Schwanz außerhalb der Fixierungsvorrichtung verblieb. Dieser wurde zwischen Mittel- und Zeigefinger an der Schwanzbasis ergriffen, durch leichten Druck der beiden Finger wurden die beiden Venen gestaut. Sollten sich im weiteren Verlauf die Gefäße nicht gut anstauen lassen oder nicht klar durch die Haut

abzeichnen, dann war es oft von großer Hilfe, für wenige Minuten einen mit warmem Wasser gefüllten Handschuh auf den Schwanz zu legen. Die Venen dilatierten dadurch weitaus stärker, die anschließende Punktion wurde vereinfacht. Mit Hilfe eines Nadelhalters wurde der Katheter dann in die Schwanzvene eingebracht, wobei möglichst weit distal begonnen wurde.

Je nach Verwendungszweck wurde der Schwanzvenenkatheter nach Injektion der Antikörper oder Medikamente wieder entfernt, oder er verblieb über die gesamte Versuchsdauer innerhalb der Vene. War dies der Fall, dann wurde der Katheter hierfür mit einem sehr schnell aushärtenden Gewebekleber (Histoacryl, B. Braun Surgical SA, Rubi, Spanien) fixiert, um ein Verrutschen des Katheters bei z.B. Lageveränderungen des Tieres zu verhindern. Nach Fixierung musste der Katheter erneut auf seinen korrekten Sitz, Durchgängigkeit und Dichtigkeit überprüft werden.

Wenn es bei Applikationen über den Schwanzvenenkatheter nötig war, die dabei verwendeten Spritzen auszutauschen, dann musste auch hier höchste Sorgfalt walten, damit keinerlei Luftblasen im System eingeschlossen wurden. Nach Entfernung der Spritze vom Katheter sollte vor der Verbindung mit einer neuen Spritze der Konus des Katheters komplett mit NaCl gefüllt werden, wodurch die Gefahr eines Lufteinschlusses bis auf ein geringes Restrisiko minimiert wurde.

2.5. Antikörper-medierte Depletion der Thrombozyten

Um die Fragestellung der Reaktivität junger bzw. retikulierter Thrombozyten näher zu untersuchen, wurde als erster Ansatz die gezielte Depletion von Thrombozyten verwendet. Hierzu wurde ein Antikörper (Emfret R300, Emfret Analytics, GmbH & Co. KG, Würzburg, Germany) verwendet.

R300 ist ein monoklonaler Antikörper, der sich gegen das murine GPIIb α (CD42b) richtet. GPIIb α ist Teil des Glykoprotein Ib-IX-V (Von-Willebrand-Faktor) Rezeptor-Komplexes auf der Oberfläche von Thrombozyten. Durch die Bindung wurden die Thrombozyten als fremd erkannt und dies führte zu einer irreversiblen Fc-unabhängigen Depletion der Thrombozyten (144-146).

Zunächst wurde wie bereits beschrieben den Mäusen ein Schwanzvenenkatheter gelegt (vgl. IV 2.4). Über diesen Katheter wurde der Maus der R300 Antikörper in einer Konzentration von 1 μ g/g Körpergewicht appliziert. Dieser lag in einer Konzentration von 0,5mg/ml vor, einer Maus von 25g KGW wurden somit 50 μ l des Antikörpers vermischt mit 150 μ l sterilem PBS appliziert. Innerhalb der ersten 60 Minuten wurden dadurch bis zu 95% der Thrombozyten depletiert. Gleichzeitig wurde eine Kontrollgruppe vorbereitet, die statt des R300 Antikörpers eine Isotyp-Kontrolle (Emfret C301, Emfret Analytics, GmbH

& Co. KG, Würzburg, Germany) injiziert bekommen hatte, welcher zu keiner Depletion der Thrombozyten führte. Nach der Injektion des Antikörpers bzw. der Isotyp-Kontrolle wurde zu den Zeitpunkten 4, 24, 48 und 72 Stunden bei allen Mäusen Blut über die *V. facialis* abgenommen (siehe IV 2.3.1). Mit diesen Proben wurde mittels eines Blutanalysegerätes (ABX Micros ES60 Hämatologie Analysegerät, Horiba ABX, Montpellier, Frankreich) die Thrombozytenkonzentration in beiden Gruppen bestimmt, um den Erfolg und die Spezifität der Depletion zu überprüfen.

2.6. Induzierung einer arteriellen Thrombose

2.6.1. Vorbereitung des FeCl₃

Für die topische Applikation von Eisen-III-Chlorid (FeCl₃, wasserfreies Pulver, > 99,99% Reinheit, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) und die damit einhergehende Induzierung einer arteriellen Thrombose in der *A. carotis communis*, musste zunächst das FeCl₃ angemischt werden. Das in Pulverform vorliegende FeCl₃ wurde hierzu in einer Verdünnung von 1:10 mit destilliertem Wasser angemischt, um eine Endkonzentration von 10% zu erreichen. Für eine Stammlösung wurden 5 g FeCl₃ und 45 ml destilliertes Wasser verwendet und für 1 Minute mit einem Vortex gut vermischt. Da in der Regel nicht das gesamte FeCl₃ gelöst wurde, wurde die 10%ige Lösung filtriert (Whatman-Filter, GE Healthcare, Life Science, Pittsburgh, USA), um eine homogene Lösung zu erhalten. Anschließend wurde die gebrauchsfertige FeCl₃ Lösung zu je 1 ml in Eppendorf Safe-Lock-Tubes aliquotiert und bei -20°C eingefroren. Da die Gefahr bestand, dass die FeCl₃-Lösung durch Oxidation an Wirkung verliert, wurde für jede Versuchsreihe ein neues Aliquot verwendet.

2.6.2. Schädigung der Arteria carotis communis

Das allgemeine Prinzip der Schädigung mit FeCl₃ beruht auf eine oxidative Schädigung durch ROS (reactive oxygen species) des Endothels und ist ein oft benutztes Modell in der Forschung für die Untersuchung einer Thrombose unter aseptischen Bedingungen. In neuen Studien wurde gezeigt, dass die ROS durch Oxidation von Hämoglobin, welches durch Hämolyse freigesetzt wurde, gebildet werden (147, 148). Durch diese Schädigung verliert das Endothel seinen Schutz gegenüber einer Interaktion mit zirkulierenden Thrombozyten und es werden Komponenten des Gerinnungssystems freigelegt (Verlust der Gefäßintegrität). Diese Art der Schädigung kann an einer Vielzahl von Gefäßen vorgenommen werden (149). Außerdem konnten wir in einer vorausgegangenen Studie in histologischen Untersuchungen zeigen, dass sich humane und murine Thromben in ihrer strukturellen Zusammensetzung stark ähneln (140).

Um eine Schädigung mittels FeCl_3 der *Arteria carotis communis* zu induzieren, wurde die Maus zunächst in tiefe Narkose gelegt und auf dem Rücken mit dem Kopf Richtung Operateur auf einer Wärmeplatte (ThermoLux-Wärmematte, Fa. Dehner, Rain (Lech)) unter einem Stereomikroskop (Stemi-2000-C, Zeiss, Jena, Germany) gelagert. Nach Entfernung der Haare durch Rasur und Enthaarungscreme (Asid-Med, AsidBonz GmbH, Herrenberg, Germany) und Desinfektion des OP-Feldes im Halsbereich, wurde paramedian ein Hautschnitt von ca. 2 cm Länge vom Kieferwinkel Richtung Sternum gesetzt. Durch stumpfe Präparation der ventral liegenden Fettschichten, einer Verlagerung der Speicheldrüse (*Glandula submandibularis*) nach lateral, einer Durchtrennung des *Musculus omohyoideus*, welcher quer über die Arterie verläuft, wurde in der Tiefe die *Arteria carotis communis* sichtbar. Da parallel zu der Arterie der *Nervus vagus* verläuft, musste dieser im weiteren Verlauf durch stumpfe Präparation vorsichtig von der Arterie getrennt werden. Im nächsten Schritt wurde ein kleines grünes Plastikstück (3 x 10 mm, eigene Herstellung) kaudal der *Bifurcatio carotidis* so unter der Arterie platziert, dass der Nerv unterhalb des Plastikstücks zum Liegen kam, die Arterie oberhalb. Dies diente dazu, dass die Arterie ein kleines Stück weit aus dem Operationsfeld herausgehoben wurde, wodurch die Sicht erheblich verbessert und bei der FeCl_3 Applikation kein umliegendes Gewebe geschädigt wurde. In den späteren Intravitalmikroskopie-Versuchen zeigte sich weiterhin, dass das umliegende Gewebe eine relativ starke Autofluoreszenz entwickelt, welche ebenfalls durch das Plastikstück eliminiert wurde.

Für die Applikation des FeCl_3 wurde zunächst ein Filterpapier (Whatman Filter, GE Healthcare, Life Sciences, Pittsburgh, PA, USA) auf eine Größe von 1 x 1 mm zurechtgeschnitten. Dieses Filterpapier wurde dann mit 2 μl einer 10%igen FeCl_3 -Lösung getränkt, bis es vollkommen mit der Lösung gesättigt war. Anschließend wurde das Filterpapier auf das vorgelegte Plastikstück gelegt und vorsichtig mit einer Pinzette von lateral seitlich an der Arterie platziert. Hierbei war darauf zu achten, dass die Arterie vorher bei Bedarf noch ausreichend getrocknet wurde. Sollte sich viel Flüssigkeit um die Arterie herum befinden, bestünde ansonsten die Gefahr das 10%ige FeCl_3 zu verdünnen, die Arterie nicht mehr in einem klar begrenzten Areal bzw. das umliegende Gewebe durch ein Verlaufen der Lösung zu schädigen, wodurch die Versuchsergebnisse negativ beeinflusst würden (Abb. 12).

Die Dauer der Schädigung betrug in unserem Versuchsaufbau drei Minuten, danach wurde das Filterpapier mit dem FeCl_3 entfernt und die Arterie dreimal mit sterilem PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) von außen gespült, um die Schädigung endgültig zu stoppen. Im Anschluss wurde die Maus unter das Intravitalmikroskop (Mikroskop: Leica DM 6 FS, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany; Kamera: Andor Zyla sCMOS, Oxford Instruments, Abingdon, UK; Solid-State

Lichtquelle: Spectra X light engine®, Lumencor, Beaverton, OR, USA) verbracht und es wurden über 60 Minuten im Abstand von 0,5 Sekunden Bilder der sich bildenden Thrombose angefertigt (vgl. IV 3.2.). Während der gesamten Aufnahmezeit war darauf zu achten, dass die Arterie mithilfe von PBS ausreichend feucht gehalten wurde. Die entscheidenden Messgrößen waren hierbei die Dauer bis zum ersten vollständigen Verschluss der Arterie (Occlusion) und die sich anschließende Zeitspanne, bis der Thrombus sich wieder auflöste und die Arterie erneut durchgängig wurde (Reperfusion = Dauer der ersten Occlusion). Zusätzlich wurde darauf geachtet, ob es nach der Reperfusion zu erneuten Verschlüssen der Arterie kam (150-152). Kam es zu keiner Occlusion, dann wurden die Ergebnisse mit $t = 60$ Minuten gewertet (unvollständiger Verschluss), da erfahrungsgemäß nach dieser Zeitspanne kein vollständiger Verschluss der *A. carotis* mehr zu erwarten war. Die entstandenen Bilder wurden mit der LASX Software (Leica Application Suite X, Version 3.3.3.16958, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) oder ImageJ (Open Source) analysiert.

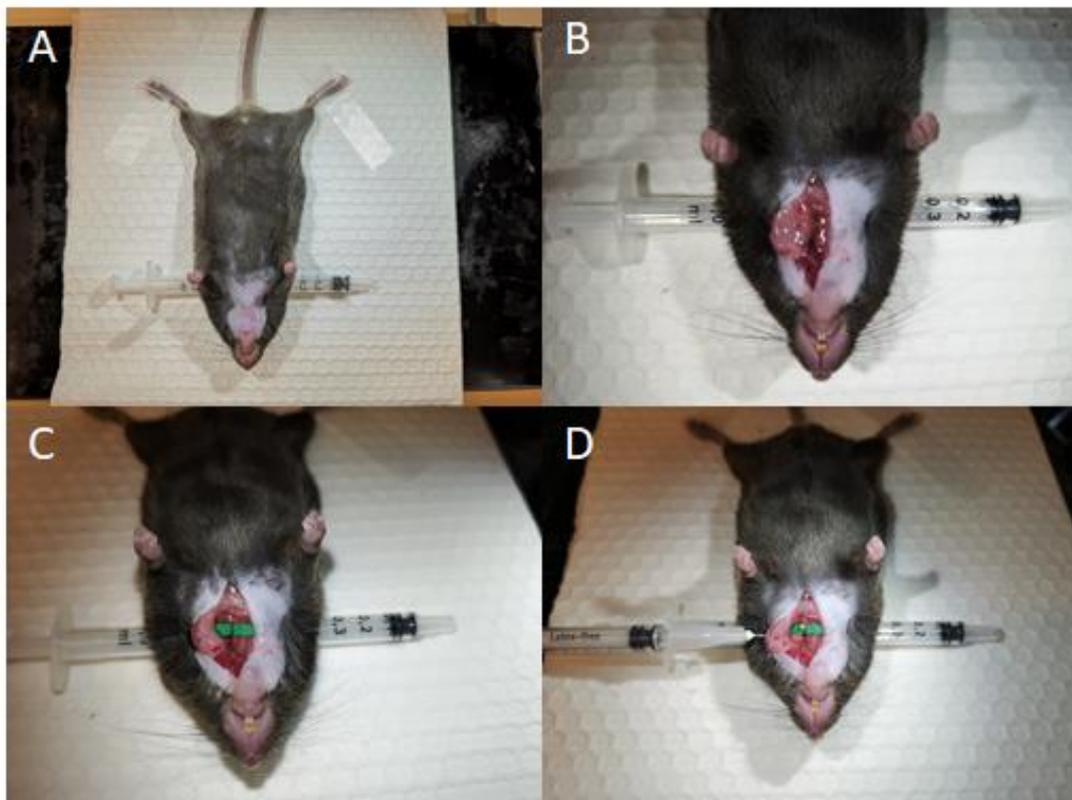


Abbildung 12: Darstellung der OP-Technik für die arterielle Thrombose der *A. carotis*

A: Lagerung der Maus mit anschließender Enthaarung, Reinigung und Desinfektion des OP-Feldes;
B: Paramedianer Hautschnitt und laterale Verlagerung der Speicheldrüse; C: Trennung der *A. carotis* und des *N. vagus* mit Plastikstück; D: Schädigung der *A. carotis* mittels Filterpapier und FeCl_3

2.6.3. Herstellung Schnittpräparate für die histologische Aufarbeitung der arteriellen Thrombose

Je nach Fragestellung wurden im Anschluss an die Schädigung mittels FeCl_3 die arteriellen Thromben für eine histologische Untersuchung mit einem Konfokalmikroskop entnommen, anstatt sie mit einem Intravitalmikroskop zu analysieren. Um einen möglichst frisch entstandenen Thrombus mit adhärennten Thrombozyten aus der Initialphase zu erhalten, wurde die Zeit bis zum ersten vollständigen Verschluss (Occlusion) abgewartet und direkt danach der Thrombus entnommen. Hierzu wurde jeweils cranial und caudal der Thrombose eine Ligatur angesetzt, um eine möglichst unkomplizierte Entnahme zu gewährleisten. Zusätzlich dienten die Ligaturen während der Entnahme dazu, dass die Thromben durch die leichte mechanische Manipulation nicht abgespült wurden und in den entnommenen Carotiden verblieben.

Histologisch untersucht wurden zwei verschiedene Versuchsgruppen, wobei die erste als Kontrollgruppe lediglich steriles PBS und die zweite Gruppe eine Stunde vor Versuchsbeginn Aspirin intravenös über einen Schwanzvenenkatheter appliziert bekommen hatte (vgl. IV 2.7.1.). Hiermit sollte untersucht werden, ob es Unterschiede in der Dynamik und der histologischen Zusammensetzung der Thromben beider Gruppen gibt. Zusätzlich wurden mit unserer Doppelfärbung sämtliche Thrombozyten markiert, wodurch wir zwischen jungen und alten Thrombozyten unterscheiden konnten. Für eine detaillierte Erklärung des Färbeprotokolls siehe IV 4.2.3.

Der Thrombus wurde in toto mitsamt der *A. carotis* und den beiden Ligaturen entnommen. Zuerst wurde ein Schnitt an der cranialen Ligatur vorgenommen, damit eine möglichst geringe Blutung entstand und die Probe nicht unnötig damit kontaminiert wurde. Anschließend wurde die *A. carotis* durch einen Schnitt an der kaudalen Ligatur durchtrennt und die Arterie samt Thrombus mit Hilfe der Haltezügel der Ligatur entnommen. Um etwaiges Blut oder anhaftendes Gewebe zu entfernen, wurde die *A. carotis* dreimal von außen mit sterilem PBS mithilfe einer 5 ml Spritze (B. Braun, Melsungen) gesäubert. Im Anschluss wurden die Thromben durch ein Einbettmedium (Tissue-tek, Sakura Finetek Europe) in Kryoeinbettformen (Tissue-tek Cryomold 10 x 10 x 5 mm, Sakura Fintek Europe) eingebettet und bis zur weiteren Verwendung bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren.

Die histologischen Schnitte wurden mit einer Dicke von $5\text{ }\mu\text{m}$ an einem Kryotom (CryoStar NX70, Thermo Fisher Scientific) bei einer Innenraumtemperatur von $-18\text{ }^\circ\text{C}$ und einer Klingentemperatur von $-25\text{ }^\circ\text{C}$ erstellt. Die Präparate sollten möglichst dünn geschnitten werden, damit annähernd eine Monoschicht an Thrombozyten entsteht. Insgesamt wurden aus verschiedenen Teilen der Thromben Schnitte generiert, um eine möglichst große Randomisierung bei den histologischen Proben zu erhalten. Direkt nach dem Schneiden

wurden die Schnitte auf einen Objektträger (Menzel Gläser Superfrost Plus, Gerhard Menzel, Braunschweig) übertragen. Die Schnitte wurden mit einem Fettstift (Liquid Blocker, Science Service, Japan) umrandet und für 15 Minuten mit einer 1%igen PFA-Lösung (Formaldehyde Solution, Methanol-free, Thermo Scientific, Rockford, USA) fixiert. Im Anschluss wurden sie dreimal mit PBS in Glasküvetten für 5 Minuten gewaschen, um die PFA-Lösung zu entfernen. Eine weitere Aufarbeitung war nicht nötig, da die Mäuse in vivo alle benötigten Antikörper, wie oben bereits beschrieben, appliziert bekommen hatten (vgl. IV 4.2.3.). Im letzten Schritt wurden die Schnitte mit einem Eindeck-Medium (Dako Fluorescence Mounting Medium, Dako North America Inc., USA) und einem Deckglas (Menzel Gläser, Thermo Scientific) bedeckt. Mit Hilfe eines Konfokalmikroskops wurde bei jeder Probe die Oberfläche des dort vorhandenen Thrombus vermessen, im Anschluss daran wurde der prozentuale Flächenanteil der jungen Thrombozyten innerhalb dieses Thrombus ermittelt. Von Interesse war hierbei die Beteiligung junger Thrombozyten an der Gesamtheit des Thrombus in einer unbehandelten Gruppe im Vergleich zu einer mit Aspirin behandelten Gruppe von Mäusen (vgl. IV 2.7.1 und 3.3.).

In der Regel wurden die Aufnahmen direkt nach Herstellung der Proben angefertigt. War dies nicht möglich, so konnten die Schnitte über mehrere Wochen ohne Qualitätsverlust bei +4°C in Aufbewahrungsboxen in einem Kühlschrank gelagert werden.

2.7. Funktionelles Multiplate

2.7.1. Intravenöse Applikation der Acetylsalicylsäure

Zunächst wurde eine Injektionslösung Aspirin verdünnt in sterilem PBS angemischt und den Mäusen mit einer Konzentration von 2 µg pro g KGW gelöst in 150 µl PBS über einen Schwanzvenenkatheter i.v. appliziert (vgl. IV 2.4). Da Aspirin als Prodrug appliziert wird und erst in seinen wirksamen Metaboliten umgesetzt werden muss, wurden die Tiere für die nächste Stunde in ein Ventilated Cabinet verbracht. Die Applikation von Acetylsalicylsäure wurde bei den Spreadingversuchen, den Flusskammerversuchen und den Versuchen der arteriellen Thrombose in der *A. carotis* verwendet.

2.7.2. Multiplateversuche

Um die Wirksamkeit der Applikation von Aspirin in unseren Versuchsaufbauten zu testen und eine wirksame Dosierung zu etablieren, wurde ein Thrombozytenfunktionstest durchgeführt. Hierbei wurde ein Multiplate® Gerät der Firma Roche verwendet. Das Testverfahren beruht auf einer Impedanzaggregometrie, wobei in einer Messzelle zwei unabhängige Sensorpaare in die Blutprobe eingetaucht werden. Die beiden unabhängigen

Sensorpaare dienen zugleich als integrierte Qualitätskontrolle. Kommt es zu einer Aktivierung der Thrombozyten, dann lagern diese sich an die silberbeschichteten Sensordrähte an und ändern den elektrischen Widerstand (Impedanz) zwischen den beiden Drähten eines Sensorpaares. Die Änderungen im Widerstand werden elektronisch erfasst und durch ein Diagramm sichtbar gemacht, wobei die Stärke der Aggregation durch die „area under the curve“ (AUC) angegeben wird. Insgesamt können mit dem Multiplate® Gerät verschiedene Aktivierungswege getestet werden (z.B. ADP, TRAP, Kollagen, Arachidonsäure, ADP + PGE1, Ristocetin) (153, 154).

Nach der einstündigen Inkubationszeit von ASS wurde mittels einer retrobulbären Blutentnahme ca. 1 ml Blut verdünnt mit 100 µl Citrat abgenommen und die Tiere wurden im Anschluss durch eine zervikale Dislokation euthanasiert (Vgl. IV 2.3.2.). Zeitgleich wurde einer zweiten Maus, welche anstelle von Aspirin lediglich 150 µl steriles PBS bekommen hat, ebenfalls Blut abgenommen, welches im weiteren Verlauf des Versuchsaufbaus als unbehandelte positiv Kontrolle diente.

Um eine Thrombozytopenie oder eine Thrombozytose auszuschließen, wodurch die Messergebnisse des Multiplate Testes verfälscht werden könnten, wurde bei sämtlichen Proben der Thrombozytenwert mit Hilfe eines Blutanalysegeräts auf seinen physiologischen Referenzwert überprüft.

Da die Blutproben durch Citrat antikoaguliert wurden, mussten sie vor dem eigentlichen Test rekalkifiziert werden. 300 µl Vollblut wurden hierzu mit 300 µl einer selbst angemischten Rekalkifizierungslösung (0,9% NaCl + 3mM CaCl₂) vermischt und anschließend in ein Multiplate-Testgefäß überführt, wo sie für die nächsten 6 Minuten inkubierten. Die Multiplate-Testgefäße besitzen einen integrierten Magnet-Rührer, durch den die Proben über die gesamte Testdauer weiterhin vermischt wurden.

Im nächsten Schritt wurden die rekalkifizierten Blutproben durch Zugabe von ADP oder Arachidonsäure stimuliert. ADP diente als positiv Kontrolle, da ADP unabhängig von einer durch Aspirin inhibierten Cyclooxygenase-1/2 die Thrombozyten aktivieren kann. Die Arachidonsäure diente dem Nachweis der Wirksamkeit von Aspirin, da diese durch die inhibierte Cyclooxygenase-1/2 nicht weiter zu Thromboxan-A₂ umgesetzt werden konnte und folglich zu keiner Aktivierung der Thrombozyten führen konnte. ADP wurde in einer Endkonzentration von 40µM, Arachidonsäure in einer Endkonzentration von 0,1mM verwendet. Nach Zugabe der stimulierenden Substanzen wurde für die nächsten 6 Minuten die daraus resultierende Aggregation der Thrombozyten gemessen (gemessen in AUC, siehe oben).

2.8. Arteriöläre Thrombose im *Musculus Cremaster*

Neben der Makrozirkulation sollte auch die Mikrozirkulation in Bezug auf die Thrombose und der Beteiligung von jungen und alten Thrombozyten an dieser untersucht werden. Hierzu wurden sämtliche Thrombozyten mit unserer Doppelfärbung markiert (vgl. IV 4.2.3). Anschließend wurden die Mäuse auf eine speziell angefertigte Plexiglas-Platte zusammen mit einer Heizmatte verbracht. Die Plexiglas-Platte besaß eine kreisrunde Vorrichtung, auf der der *M. cremaster* nach Freilegung aufgespannt werden konnte und so einer intravitalmikroskopischen Analyse zugänglich gemacht wurde.

Nach Lagerung der Maus wurde distal das Skrotum eröffnet. Mit einer gebogenen Pinzette wurde der *M. cremaster* ergriffen und mit einer zweiten Pinzette vorsichtig vom umliegenden Gewebe befreit. Unter leichtem Zug wurde so der *Cremaster* Stück für Stück frei präpariert, bis er schließlich vollkommen aus dem Skrotum hervorverlagert werden konnte. Im nächsten Schritt wurde der *Cremaster* mit einer sehr feinen Schere in der Medianen auf der ventralen Seite aufgeschnitten. Nun konnte der Muskel aufgespannt werden und ringförmig mit kleinen Nadeln auf der kreisrunden Vorrichtung fixiert werden, der Hoden wurde nach lateral aus dem Sichtfeld verlagert. Während der ganzen Prozedur war stets darauf zu achten, den *M. cremaster* mit ausreichend sterilem PBS feucht zu halten. Außerdem durften nur minimale Zugkräfte ausgeübt werden, da es ansonsten zu einer Vasokonstriktion der Gefäße mit anschließender Stase des Blutflusses kam, wodurch die Versuchsergebnisse negativ beeinflusst wurden (Abb. 13).

Zusammen mit der Plexiglas-Platte wurde die Maus unter das Intravitalmikroskop (vgl. IV 3.2) verbracht und mit einer 20x Vergrößerung analysiert. Für eine Optimierung der Bilderqualität wurden sämtliche Aufnahmen mit einer Superfusion (PBS) durchgeführt. Nachdem eine erste Orientierung vorgenommen wurde und der *M. cremaster* auf einen guten und beständigen Blutfluss kontrolliert wurde, wurden bestimmte arteriöläre Areale für 1 Minute mit 1% FeCl₃ geschädigt, wodurch analog zu der *A. carotis* Thromben innerhalb der Gefäße entstanden.

Die intravitalmikroskopischen Aufnahmen dienten lediglich der Kontrolle des Blutflusses und der erfolgreichen Induzierung einer arteriölären Thrombose. Nach Versuchsende wurden die *Mm. cremasteres* entnommen und mit einem Konfokalmikroskop untersucht, wodurch es möglich war auch einzelne Zellen innerhalb der Thrombosen zu analysieren (vgl. IV 3.3). Die *Mm. cremasteres* wurden in vivo mit 1% PFA fixiert und anschließend entnommen. Nach der Entnahme wurden sie auf Objektträgern mit Dako mounting medium und Deckgläsern fixiert. Eine weitere Vorbereitung der Proben war nicht notwendig, da bereits alle benötigten Antikörper in vivo appliziert wurden. Nach Fixierung konnten die Proben bei +4°C für mehrere Wochen ohne Qualitätsverlust gelagert werden.

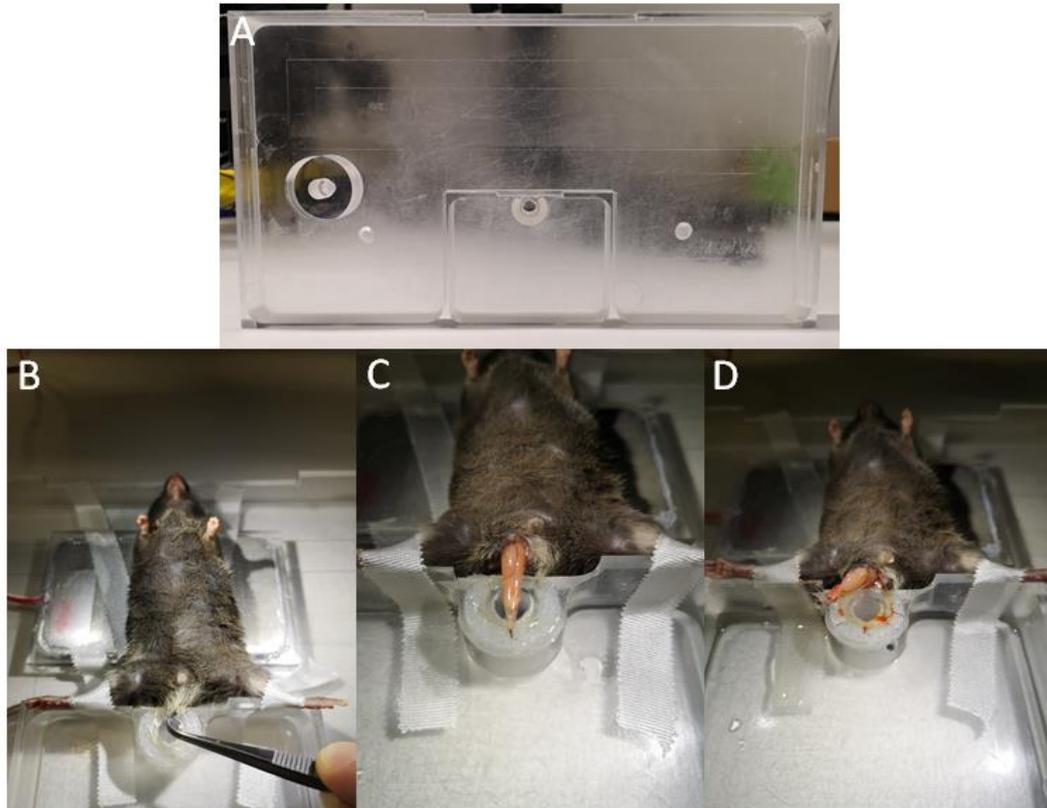


Abbildung 13: Darstellung der OP-Technik für die *M. cremaster* Präparation mit anschließender FeCl_3 Schädigung

A: Plexiglas-Platte mit kreisrunder Vorrichtung zur Fixierung des *M. cremaster*; B: Distale Eröffnung des Skrotums; C: Vorverlagerung des *M. cremaster* aus Skrotum heraus; D: Sternförmige Fixierung mit kleinen Nadeln nach Eröffnung des Muskels in der Medianen.

3. Mikroskopie

Wegen ihrer geringen Größe und der daraus resultierenden leichten Handhabung ist die Maus als Versuchstier besonders gut für intravitalmikroskopische Aufnahmen geeignet. Hierbei ist es möglich, einzelne Zellen in ihrer physiologischen Umgebung sichtbar zu machen und näher zu untersuchen. Dank transgener Mauslinien, bei denen in bestimmten Zellen Fluoreszenzproteine eingezüchtet wurden, oder der Applikation von Fluoreszenz Antikörpern, sowohl in vivo als auch in vitro, können verschiedene zelluläre Bestandteile und Strukturen markiert werden und über die verschiedenen Mikroskopietechniken sichtbar gemacht werden. Die gesamte hier genutzte Mikroskopie beruht auf dem physikalischen Phänomen der Fluoreszenz.

3.1. Fluoreszenz

Unter Fluoreszenz versteht man die spontane Emission von Licht bestimmter Stoffe, die zuvor eine energetische Anregung erfahren haben. Licht wird hierbei bei einer definierten Wellenlänge absorbiert und bei einer definierten Wellenlänge emittiert. Diese Emission entsteht, wenn ein fluoreszierendes Molekül von Photonen beschossen wird und hierbei ein Elektron ein Photon absorbiert. Durch diese Absorption gelangt das Elektron von einem energiearmen Grundzustand auf einen energiereicheren angeregten Zustand und es wechselt seine Position innerhalb eines Atoms auf die nächst höher gelegene Schale in der Elektronenhülle. Das höhere Energieniveau kann das Elektron nur über wenige Nanosekunden aufrechterhalten. Danach fällt es wieder auf die nächst tiefer gelegene Schale der Elektronenhülle zurück und dabei wird das zuvor absorbierte Photon als Strahlung freigesetzt (155, 156). Da in diesem Schritt Energie verloren gegangen ist, besitzt das emittierte Licht des Photons weniger Energie und ist langwelliger als das ursprünglich zur Anregung verwendete Licht. Es entsteht eine Differenz zwischen Anregungs- und Emissionsmaximum, welche man auch als Stoke-Shift bezeichnet (157, 158).

Das große Potential der Fluoreszenz erkannte Oskar Heimstädt und entwickelte Anfang des 19. Jahrhunderts das erste Fluoreszenzmikroskop. Mit diesem Mikroskop war es möglich, die Autofluoreszenz von anorganischen und organischen Proben zu untersuchen (159). Der nächste Meilenstein in der Mikroskopie wurde durch die Entwicklung eines Epifluoreszenz-Mikroskops von Ellinger und Hirt knapp 20 Jahre später gelegt (160). In der Zwischenzeit sind viele verschiedene Mikroskopietechniken etabliert worden, die sich das Prinzip der Fluoreszenz zu Nutze machen. Für die hier untersuchten Fragestellungen wurde die Epifluoreszenzmikroskopie und die Konfokalmikroskopie verwendet.

3.2. Epifluoreszenzmikroskopie

Für die in der Arbeit vorkommenden Versuche wurde ein Epifluoreszenzmikroskop der Firma Leica (Leica DM6 FS, Wetzlar, Germany) verwendet. Als Lichtquelle diente ein solid state Illuminator (Lumencor, Spectra X light engine, Lumencor Inc., Beaverton, OR, USA) mit verschiedenen Wellenlängen, die den jeweiligen Antikörpern angepasst wurden. Die Aufnahmen wurden mit einem 5x-fach Objektiv mit einer numerischen Apertur (NA) von 0,12 angefertigt und anschließend digital von einer Kamera (Andor Zyla sCMOS, Oxford Instruments, Abingdon, UK) abgespeichert.

Das Prinzip des Epifluoreszenzmikroskops beruht darauf, dass von der Lichtquelle aus das Licht über einen Anregungsfilter und einen Strahlteiler von oben durch das Objektiv auf das Objekt geleitet wird. Im Objekt selbst entsteht durch diese Anregung die Fluoreszenz in zuvor markierten Zellen oder Strukturen, welche eine längere Wellenlänge als das zur Anregung verwendete Licht besitzt. Das durch das Objektiv gebündelte Licht trifft erneut auf den Strahlteiler, welcher nur dieses langwelligere Emissionslicht durchlässt. Da dennoch ein Teil des Anregungslichtes reflektiert wird und nicht vom Strahlteiler komplett eliminiert werden kann, wird der verbliebene Rest des Anregungslichtes von einem Sperrfilter eliminiert, bevor es auf dem Detektor beziehungsweise dem Okular landet (155, 158). Die mit dem Epifluoreszenzmikroskop aufgenommenen Bilder und Videos wurden mit der Leica Software (Leica Application Suite X, Version 3.0.1.15878, Wetzlar, Germany) oder ImageJ (Open Source) ausgewertet.

3.3. Konfokalmikroskopie

Der große Vorteil bei der Konfokalmikroskopie besteht darin, dass fast ausschließlich Fluoreszenz aus der Fokusebene detektiert wird und die Fluoreszenz außerhalb der Fokusebene herausgefiltert werden kann. Hierzu werden zwei Lochblenden verwendet, die erste direkt hinter der Lichtquelle, die zweite vor dem Detektor, die dafür Sorge tragen, dass nur die Fokusebene des Objektes scharf dargestellt wird. Signale, die außerhalb der Fokusebene liegen, werden ausgeblendet.

Es können verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe verwendet werden, die durch Laser verschiedener Wellenlänge angeregt werden, welche durch einen Scannerspiegel über die einzelnen Abschnitte des Objektes geführt werden. Das zu betrachtende Objekt wird also nicht in seiner Gesamtheit beleuchtet, sondern der Laser wird Stück für Stück über das Objekt gerastert. Mit Hilfe eines lichtempfindlichen Sensors wird ein digitales Bild aus den vielen Einzelbildern hinter der konfokalen Lochblende generiert.

Die hier untersuchten Aufnahmen wurden mit einem Zeiss Konfokalmikroskop (Zeiss LSM 880 mit Airyscan, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) angefertigt. Verwendet

wurden die histologischen Proben der arteriellen Thrombose, der Thrombose im *M. cremaster* und die in der Flusskammer generierten Proben (vgl. IV 2.6.3, 2.8 und 3.5). Die Aufnahmen wurden mit der Software Zen (Zen blue edition, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany) und ImageJ (Open Source) ausgewertet. Das verwendete Konfokalmikroskop war zusätzlich mit einem Airyscan ausgestattet, wodurch eine höhere Sensitivität, eine verbesserte Auflösung und eine höhere Aufnahme-geschwindigkeit entstehen. Um die Auflösung des Bildes deutlich zu erhöhen, gleichzeitig aber noch eine gute Licht-Effizienz zu erreichen, wird neben der Lochblende vor dem Detektor noch ein konzentrisch angeordneter hexagonaler Flächendetektor eingesetzt. Hierbei bleibt die Lochblende geöffnet, wodurch auch Emissionslicht außerhalb der Fokusebene die Lochblende passieren kann. Dieses Licht wird zum hexagonalen Flächendetektor geleitet, welcher aus 32 einzelnen Detektorelementen besteht. Jedes einzelne dieser Elemente stellt eine eigene Lochblende dar und die Einzelsignale der Detektorelemente werden anschließend zu einem Bild mit höherer Auflösung und besserem Signal-Rausch-Abstand verrechnet (161-163).

3.4. Spreadingversuche mit isolierten Thrombozyten

Um die Spreadingversuche durchzuführen, wurden zunächst Thrombozyten aus dem Vollblut der Maus isoliert. Für die Durchführung der Blutentnahme und der Isolation der Thrombozyten siehe Kapitel IV 2.3.2-2.3.4. Die Spreadingversuche dienen einer Überprüfung der Plättchenfunktion, da diese sich nach Aktivierung ausbreiten (= spreading). Bei den hier durchgeführten Spreadingversuchen wurde sowohl eine unbehandelte Gruppe, als auch eine mit ASS behandelte Gruppe untersucht (für die Applikation ASS siehe Kapitel IV 2.7.1.). Die isolierten murinen Thrombozyten wurden im Anschluss auf mit Fibrinogen beschichtete μ -slides (Ibidi, Martinsried, Germany) verbracht, wo sie sich nach Stimulation mit Thrombin (0,5 U/ml) oder Kollagen (10 μ g/ml) für die nächste Stunde ausbreiten (= spreading) konnten. Zusätzlich wurde eine unstimulierte Probe angefertigt. Nicht aggregierte und adhärenente Thrombozyten wurden durch vorsichtige Spülung mit sterilem PBS entfernt, während die aggregierten Thrombozyten mit einer 1%igen PFA Lösung fixiert wurden. Im Anschluss folgte ein Permeabilisierungsschritt mit 0,1% Triton und die F-Aktin Filamente der aktivierten Plättchen wurden mit einem AlexaFluor 488 Phalloidin Farbstoff (Invitrogen, ThermoFisher) angefärbt. Da auch hier vor Versuchsbeginn eine Doppelfärbung der Thrombozyten in vivo angewendet wurde, konnte man zwischen jungen und alten Thrombozyten unterscheiden (siehe Kapitel 4.2.3). Im Anschluss wurden mikroskopische Aufnahmen der Proben mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200M, Zeiss Mikroskope, Jena, Germany) angefertigt und die beiden Populationen wurden auf Unterschiede in ihrer Größe und damit Aktivierbarkeit untersucht. Bei jedem Versuchstier wurden insgesamt jeweils 50 junge und alte Thrombozyten auf ihre Oberfläche vermessen und daraus wurden die Mittelwerte bestimmt.

3.5. Flusskammerversuche mit Kollagen und humanem Plaquematerial

Bei den Flusskammerversuchen wurden ebenfalls zwei verschiedene Ansätze verfolgt. Zum einen wurde unbehandeltes Vollblut der Mäuse verwendet, zum anderen wurde den Mäusen vor Versuchsbeginn ASS intravenös über einen Schwanzvenenkatheter appliziert (vgl. IV 2.7.1.). Außerdem wurde für die Beschichtung der Flusskammer sowohl Kollagen (Kollagenreagens HORM®, 1mg/ml, Takeda Austria GmbH, Linz, Austria) als auch humanes Plaquematerial verwendet. Das humane Plaquematerial wurde hierbei verwendet, um die pathologischen Vorgänge eines rupturierten atherosklerotischen Plaque *in vitro* zu simulieren. Um zwischen jungen und alten Thrombozyten zu unterscheiden, wurde auch hier die Doppelfärbung der Thrombozyten angewendet (vgl. 4.2.3).

Nachdem die Maus fertig für den Versuch vorbereitet war, wurde 30 Minuten vor der retrobulbären Blutabnahme die Flusskammer (ibiTreat, 15µl-Slide VI^{0,1}, Cat. # 80666, IbiDi, Gräfeling, Germany) vorbereitet, indem diese im ersten Versuchsansatz mit Kollagen beschichtet wurde. Das Kollagen lag in einer Konzentration von 1mg/ml vor und wurde für den Versuch 1:10 mit sterilem PBS verdünnt, um eine finale Konzentration von 100µg/ml zu erreichen. Im Anschluss wurden alle Flusskammern mit ca. 50 µl der Kollagenlösung gespült. Für die nächsten 30 Minuten wurde die Flusskammer bei Raumtemperatur gelagert, damit es zu einer ausreichenden Bindung des Kollagens kam.

Im zweiten Versuchsansatz wurde 30 Minuten vor der Blutabnahme die Flusskammer mit humanem Plaquematerial beschichtet, welches Patienten bei einer Herzkatheter Untersuchung entnommen wurde. Nach der Entnahme wurde das Material mehrerer Patienten homogenisiert und in 20 µl Aliquots bei -80°C eingefroren. Kurz vor der Beschichtung wurde es bei Raumtemperatur aufgetaut und mit 400 µl sterilem PBS (1:20) verdünnt. Mit diesem verdünnten Plaquematerial wurden schließlich alle Flusskammern gespült und für die nächsten 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach Ablauf der 30-minütigen Inkubationszeit wurden bei beiden Versuchsansätzen alle Flusskammern mit 200 µl sterilem PBS gespült, um überflüssiges Kollagen und Plaquematerial auszuspülen. Hierbei war strengstens darauf zu achten, dass es zu keinen Lufteinschlüssen innerhalb der Flusskammern kommt, da diese das Experiment negativ beeinflussen würden.

Das für den Versuch benötigte Vollblut wurde schließlich in allen Versuchsansätzen mittels retrobulbärer Blutentnahme gewonnen und durch Zugabe von Heparin antikoaguliert (vgl. IV 2.3.2). Für die Perfusion der Flusskammern wurde ein Perfusor (HARVARD Apparatus, Pump 11 Elite, Cat.# 70-4500) benutzt, wobei die Flussrate so eingestellt wurde, dass eine arterielle Durchblutung simuliert wurde, sprich shear rate und shear stress die gleichen Werte wie im arteriellen System besaßen. Im vorliegenden Versuch bedeutete dies, dass

die Flusskammern mit einer Flussrate von 5,61ml/h für insgesamt 3 Minuten mit den jeweiligen Blutproben perfundiert wurden.

Nach Abschluss der dreiminütigen Perfusion wurden die Flusskammern für fünf Minuten mit sterilem PBS perfundiert, damit überschüssiges Blut ausgewaschen wurde und nur die Thrombozyten in den Flusskammern verblieben, die entweder an Kollagen oder dem humanen Plaquematerial adhärirt waren. Zur Fixierung der gebundenen Thrombozyten wurden die Flusskammern zusätzlich eine Minute lang mit 1% Paraformaldehyd (PFA) perfundiert. Sowohl die Perfusion mit PBS als auch die Perfusion mit PFA wurde mit der gleichen Flussrate vorgenommen, um keine adhärenen Thrombozyten auszuspülen. Um die im Anschluss folgenden Aufnahmen mittels eines Konfokalmikroskops zu optimieren, wurden die Flusskammern im letzten Schritt mit Dako Mounting Medium (Dako fluorescence mounting medium, Cat.# S3023) gefüllt und mit einer aus Paraffin-Wachs und Polyolefin bestehenden Verschlussfolie (Parafilm „M“ laboratory film, Bemis flexible packaging) luftdicht verschlossen. Fertig nachbereitet konnten die Flusskammern über mehrere Wochen bei +4°C im Kühlschrank ohne Qualitätsverlust aufbewahrt werden.

3.5.1. Aufbereitung des humanen Plaquematerials

Um das humane Plaquematerial nach Entnahme bei einer Herzkatheter Untersuchung für die Flusskammerversuche vorzubereiten, wurde zunächst ein Dialyse-Puffer hergestellt. Dieser bestand aus 4,38g NaCl gelöst in 500 ml destilliertem Wasser und 1 ml 0,5M EDTA. Nach guter Durchmischung des Puffers wurde dieser steril filtriert.

Das Plaquematerial wurde für die Aufarbeitung in einer Petrischale auf Eis aufbewahrt. Bei einer ersten optischen Kontrolle wurden überflüssige Teile des Plaquematerials entfernt und das verbliebene Material wurde gewogen. Im Anschluss wurden die einzelnen Teile in möglichst kleine Stücke zerschnitten und mit 1 ml kaltem Dialysepuffer pro 100mg gewogenem Gewebe vermischt. Im nächsten Schritt wurde das Plaquematerial, bei Bedarf unter weiterer Zugabe von kaltem Dialysepuffer, durch mechanische Kräfte fast restlos zerkleinert. Die so aufgearbeitete Probe wurde zu je 40 µl aliquotiert und bis zu seiner weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Die Entnahme und Verwendung des Plaquematerials wurde vom Ethikkomitee der Ludwig-Maximilian-Universität München (LMU) und von der Technischen Universität München (TUM) genehmigt. Ein schriftliches Einverständnis wurde vor Verwendung von allen Probanden eingeholt und sämtliche Versuche wurden im Einklang mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt.

4. Durchflusszytometrie

4.1. Prinzip

Das Prinzip der Durchflusszytometrie (FACS® = fluorescence activated cell sorting) beruht ebenfalls auf dem physikalischen Phänomen der Fluoreszenz, ist somit vereinfacht gesagt ein weiterentwickeltes und automatisiertes Fluoreszenzmikroskop (vgl. IV 3.1 und 3.2) (164). Hierbei sind die Vorteile gegenüber einem herkömmlichen Fluoreszenzmikroskop die sehr schnelle Messung hoher Zellzahlen (> 20000 Ereignisse/s; 2×10^7 Zellen/ml bei $60 \mu\text{l}/\text{min}$) und die parallele Messung von bis zu 12 verschiedenen Fluoreszenzen (165). Der Begriff FACS, mittlerweile ein Synonym für die Durchflusszytometrie, ist ein eingetragenes Warenzeichen des Geräteherstellers Becton Dickinson, Heidelberg. Um sich das Phänomen der Fluoreszenz zu Nutze zu machen, werden auch hier verschieden markierte Antikörper genutzt, die durch eine Antigen-Antikörperreaktion und nachfolgender Anregung entsprechende Fluoreszenzen emittieren. Es können sowohl direkte Antikörper (mit Fluorochrom-konjugierte, monoklonale Antikörper) oder indirekte Antikörper (ein unkonjugierter Erstantikörper und ein an diesen bindenden konjugierter Zweitantikörper) benutzt werden.

Die mit Antikörper behandelte zu untersuchende Probe wird hierzu so aufgearbeitet, dass am Ende eine homogene Zellsuspension entsteht. Die einzelnen Zellen müssen eine Größe innerhalb von $0,2$ bis $150 \mu\text{m}$ besitzen. Diese Zellsuspension wird über eine Kapillare vom Durchflusszytometer angesaugt und gelangt schließlich in eine Messküvette, wo jede einzelne Zelle nacheinander durch die im Laserlicht enthaltenen Photonen angeregt wird (Abb. 14). Wie bei der Fluoreszenz üblich wird zum einen Streulicht emittiert, zum anderen Fluoreszenzlicht. Hierbei ist es wichtig, dass beide Signale getrennt voneinander detektiert werden, worauf das eigentliche Funktionsprinzip eines Durchflusszytometers beruht. Im Gegensatz zu den beschriebenen Mikroskopietechniken wird beim Durchflusszytometer das Streulicht nicht herausgefiltert, da es Aufschluss über die Größe und die Komplexität der Zelle gibt. Je dichter und komplexer eine Zelle, wie zum Beispiel Granulozyten mit ihrer rauen Oberfläche und vielen Vesikel, desto mehr Licht wird gestreut, im Vergleich zu weniger dichten und nicht so komplex aufgebauten Zellen wie den Lymphozyten. Diese beiden Parameter werden über das Vorwärtstreulicht (FSC = Forward Scatter) und das Seitwärtstreulicht (SSC = Sideward Scatter) gemessen. FSC steht dabei für die Beugung des Lichts im flachen Winkel, welche mit dem Volumen der Zelle korreliert. SSC steht für die Beugung des Lichts im rechten Winkel und korreliert mit der Granularität der Zelle, Struktur des Zellkerns und der Anzahl an Vesikeln (165, 166).

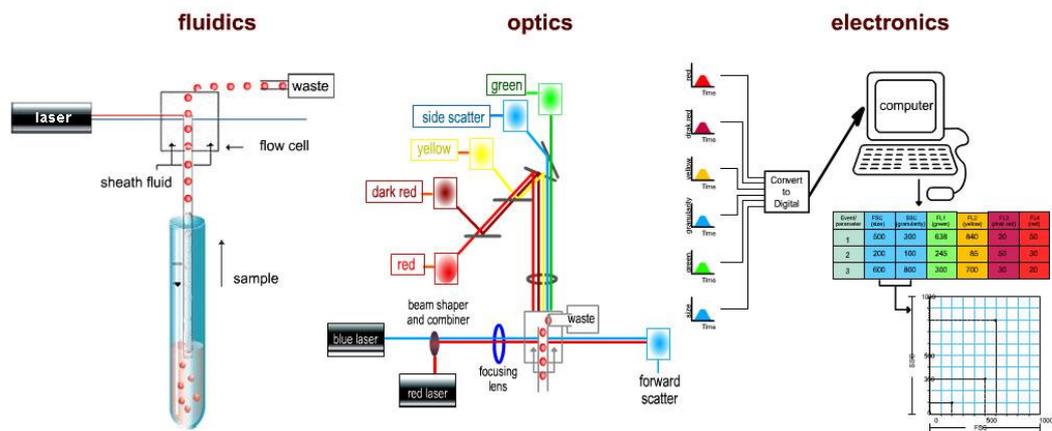


Abbildung 14: Die drei Hauptbestandteile eines Durchflusszytometers

Flüssigkeitssystem, Optisches System und elektronisches System (aus: Einführung in die Durchflusszytometrie: Trainingsvorbereitung, BD Bioscience, Heidelberg) (166)

In der Regel wird der FSC auf der x-Achse aufgetragen und der SSC auf der y-Achse, wodurch auch in ungefärbten Proben anhand der morphologischen Merkmale gut differenzierbare Populationen zu erkennen sind (Abb. 15).

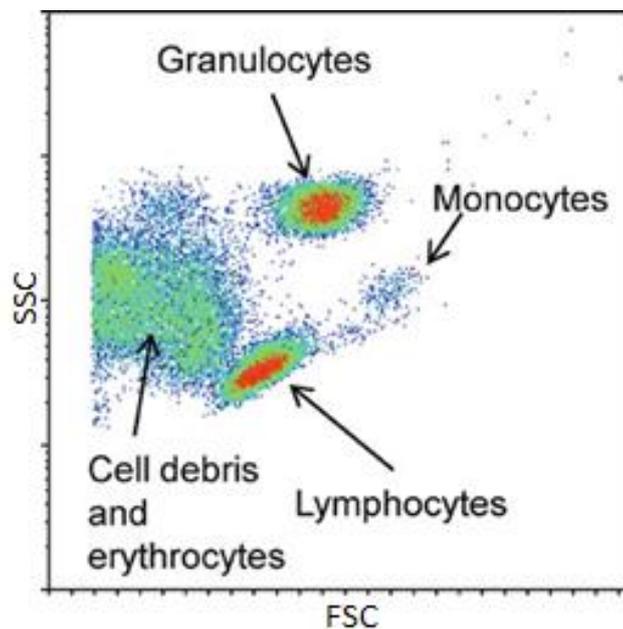


Abbildung 15: Charakterisierung von Blutzellen anhand ihrer morphologischen Merkmale

Mit freundlicher Genehmigung von Ethier et al. (167)

Um diese morphologischen Populationen weiter zu differenzieren, werden verschiedene fluoreszierende Antikörper verwendet, die spezifisch an Oberflächenantigene, Rezeptoren etc. binden. In dieser Doktorarbeit wurden zum Beispiel häufig Antikörper verwendet, die sich gegen den von Willebrand-Faktor-Komplex (GpIb-IX-V-Rezeptor-Komplex) oder Proteine der CD-Klassifizierung (z.B. CD41) richten. Durch Anregung mit Hilfe eines Lasers werden Elektronen der Fluoreszenzfarbstoffe auf ein höheres Energieniveau gehoben, sobald sie auf ihr niedrigeres Energieniveau zurückkehren, emittieren sie ihre spezifische Fluoreszenz über freigesetzte Photonen (vgl. IV 3.1.). Die Anzahl der emittierten Photonen korreliert hierbei mit der Anzahl der gebundenen Antikörper, es kann somit eine quantitative Aussage über die Menge von Oberflächenantigenen, Rezeptoren etc. getroffen werden.

Im Rahmen eines Versuches lassen sich hierbei viele verschiedene Antikörper verwenden, die durch Laser verschiedener Wellenlänge angeregt werden (Abb. 16). Das dabei emittierte Licht wird durch Filter geleitet bevor es auf einen Photodetektor trifft und in ein digitales Bild umgewandelt wird. Solange sich die Antikörper in der von ihnen emittierten Wellenlänge unterscheiden, kann man simultan viele verschiedene Information innerhalb eines Versuches erhalten (Abb. 17).

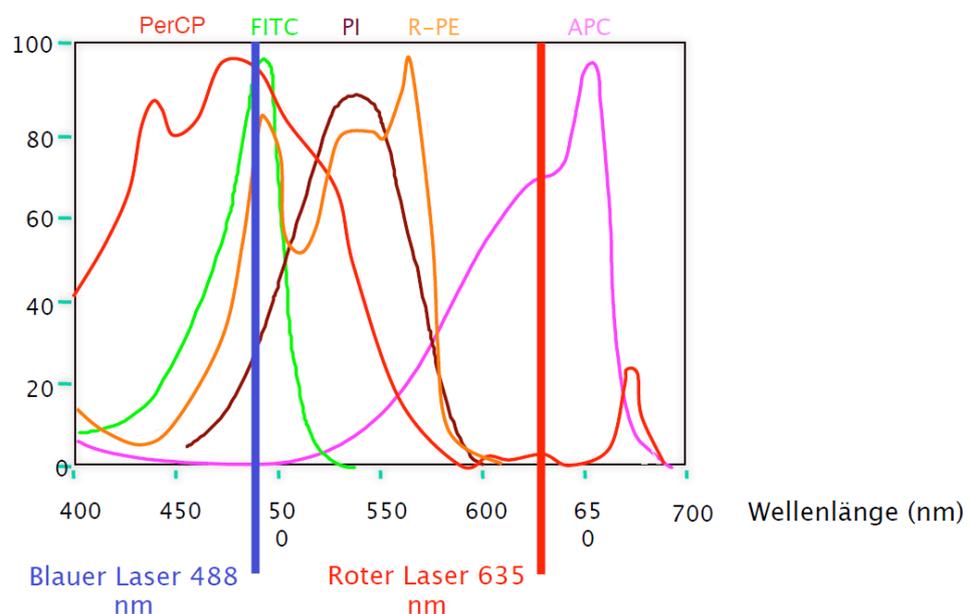


Abbildung 16: Absorptionsspektren gebräuchlicher Fluorochrome

Aus: Grundlagen der Durchflusszytometrie, BD Deutschland, Heidelberg (165)

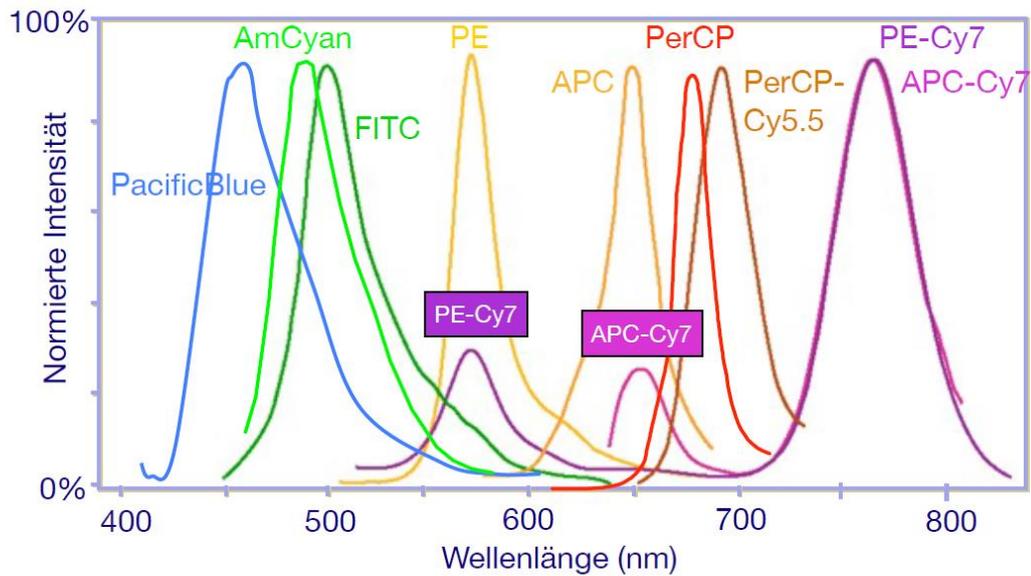


Abbildung 17: Emissionsspektren gebräuchlicher Fluorochrome

Aus: Grundlagen der Durchflusszytometrie, BD Deutschland, Heidelberg (165)

Die so erhaltenen digitalen Bilder können auf verschiedene Art und Weise angezeigt werden, die häufigsten Darstellungen sind der sogenannte Scatter Plot oder ein Histogramm. Der Scatter Plot zeigt die einzeln gemessenen Zellen an, wodurch sich unterschiedliche Populationen differenzieren lassen, das Histogramm zeigt die Häufigkeit der einzelnen Messsignale an. Für die vorliegenden Versuche wurde ein BD LSRFortessa (BD Bioscience) verwendet. Ausgewertet wurden die erhobenen Daten mit der Software FlowJo 10.3.

4.2. Durchflusszytometrie von Thrombozyten

Gegenüber vielen anderen Analysemethoden bringt die Analyse von Form, Größe und Funktion etc. der Thrombozyten mittels Durchflusszytometrie mehrere entscheidende Vorteile mit sich. Zu Beginn der Durchflusszytometrie wurden nur isolierte Thrombozyten bzw. plättchenreiches Plasma (PRP) untersucht, wobei es jedoch zu einer artifiziellen Aktivierung der Thrombozyten durch die mechanische Verarbeitung der Proben kommen kann, zum Beispiel durch Zentrifugation (168, 169). Durch die Etablierung der Verarbeitung bzw. der Analyse von Vollblut Proben in der Durchflusszytometrie wurde dieses Problem umgangen, da deutlich weniger mechanische Manipulation der Proben nötig war (170). Hierdurch war es letztendlich möglich, die Aktivierungsstadien von Thrombozyten durch aktivierungsabhängige Antikörper zu bestimmen bzw. die Menge aktivierender Oberflächenmarker und Proteine der Thrombozyten vor und nach Aktivierung durch exogene Agonisten (z.B. Kollagen, ADP, Arachidonsäure) quantitativ zu bestimmen.

Thrombozyten sind sehr sensitiv für Änderungen im physiologischen Gefäßniveau, wodurch sie auf geringste Änderung in diesem entsprechend reagieren. Da es sich bei der Durchflusszytometrie um eine rein photoelektrische Analyse der Thrombozyten ohne eine mechanische Manipulation handelt, kann eine Funktionsänderung dieser größtenteils vermieden werden (171). Des Weiteren erkennt man schon innerhalb der morphologischen Darstellung einer Probe im FSC und SSC aktivierte Thrombozyten, da diese sich in ihrer Größe und Granularität von nicht aktivierten Thrombozyten unterscheiden. Durch entsprechende Gating-Strategien können diese aktivierten Thrombozyten ausgeschlossen werden, bevor die nicht aktivierte Population genauer analysiert wird.

Ein weiterer Vorteil der Durchflusszytometrie besteht darin, dass oftmals Zellen oder Zellfragmente morphologische Ähnlichkeiten zu den Thrombozyten aufweisen und dadurch mit diesen verwechselt werden können (Fragmente von Erythrozyten oder Thrombozyten selbst, Fragmente von Leukozyten etc.). Diese Zellen und Fragmente werden beim morphologischen Gating zwar noch zu den Thrombozyten gezählt, im nächsten Schritt können diese aber verlässlich als falsch negativ eliminiert werden. Da die Thrombozyten zuvor einen spezifischen Antikörper gebunden haben (z.B. GpIb, Emfret X488/649), können diese eindeutig als Thrombozyten identifiziert werden, während alle falsch positiven Zellen oder Zellfragmente eliminiert werden (172-174).

4.2.1. Umsatz muriner Thrombozyten

Zunächst haben wir mittels Durchflusszytometrie die Überlebenszeit der murinen Thrombozyten ermittelt, wodurch sich Rückschlüsse auf die de novo Synthese von Thrombozyten ziehen lassen.

Den Mäusen wurde hierzu zum Zeitpunkt $t = 0$ der thrombozytenspezifische Emfret GpIb X649-APC Antikörper über die Schwanzvene appliziert. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurde erstmalig über die Vena facialis ca. 10 μ l Vollblut in Citrat abgenommen, gefolgt von weiteren Blutentnahmen alle 24 Stunden. Für jede Untersuchung wurden 5 μ l Vollblut in vitro mit 1 μ l eines CD61-FITC Antikörpers und 45 μ l sterilem PBS für 10 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurde das Vollblut mit 1 ml FACS Lysing solution für 15 Minuten inkubiert und mit einem Durchflusszytometer untersucht.

4.2.2. Etablierung einer Doppelfärbung zur Differenzierung zwischen jungen und alten Thrombozyten in vitro

Um zwischen alten Thrombozyten (> 24 Stunden) und jungen Thrombozyten (< 24 Stunden) zu unterscheiden, musste zuerst eine spezifische Färbung etabliert werden. In mehreren Vorversuchen wurde Mäusen ein Antikörper (Emfret X649, DyLight-649, Emfret Analytics GmbH & Co. KG, Eibelstadt, Germany) über einen Schwanzvenenkatheter gespritzt, der spezifisch an der GpIb β -Untereinheit des GPIb-V-IX-Komplexes (Von-Willebrand-Faktor-Rezeptor) bindet und sämtliche Thrombozyten bei spezifischer Anregung fluoreszieren lässt. Dies erfolgte in einer Konzentration von 0,05 $\mu\text{g/g}$ Körpergewicht, oder entsprechend 0,5 $\mu\text{l/g}$ Körpergewicht des Antikörpers. Der verwendete Antikörper verändert in vivo weder die Thrombozytenadhäsion noch die Aggregation (175, 176). Nach 24 Stunden wurde den Mäusen Blut über die *Vena facialis* entnommen und dieses einer FACS-Analyse unterzogen. Dazu wurde in vitro 1 μl eines CD41-PacificBlue Antikörpers (PacificBlue anti-mouse CD41, BioLegend Inc., San Diego, CA, USA) zusammen mit 5 μl Vollblut für 15 Minuten in einem Eppendorf Safe-Lock-Tube bei Raumtemperatur in absoluter Dunkelheit inkubiert. Zusätzlich wurden 45 μl steriles PBS (Dulbecco's Phosphate buffered saline, Sigma-Aldrich®, Steinheim, Germany) hinzugegeben, um einem Austrocknen der Probe vorzubeugen. Um die Probe vor der Analyse aufzureinigen, wurde nach der Inkubation eine Lyse durchgeführt, wobei durch Osmose sämtliche Erythrozyten zum Platzen gebracht wurden. Hierzu wurde eine hypotone Lösung aus vollentsalztem Wasser und einem Lyse-Konzentrat (BD FACS Lysing Solution, Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) in einer Verdünnung von 1:10 angesetzt. 1 ml dieser Lösung wurde anschließend zu den 50 μl der Probe pipettiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die nun fertig vorbereitete Probe wurde einer FACS Analyse unterzogen.

Durch diese Art der Färbung konnte man innerhalb der Thrombozytenpopulation zwischen alten und jungen Thrombozyten unterscheiden. Zum Zeitpunkt $t = -24$ Stunden binden alle zu diesem Zeitpunkt in der Blutzirkulation vorhandenen Thrombozyten den GpIb X649 Antikörper. Innerhalb der nächsten 24 Stunden kommt es zu einer Erneuerung eines Teils der Thrombozytenpopulation aufgrund ihrer relativ kurzen Überlebenszeit ($\pm 25\%$ neue Thrombozyten innerhalb von 24 Stunden). Der in vitro hinzugegebene Antikörper CD41-PacificBlue bindet jetzt an alle Thrombozyten, die in der Vollblut Probe vorhanden sind. Die in den letzten 24 Stunden gebildeten Thrombozyten tragen hierbei nur den CD41-PacificBlue Antikörper, während alle Thrombozyten, die älter als 24 Stunden sind, beide Antikörper gebunden haben (GpIb X649 und CD61-PacificBlue). Durch entsprechendes Gating mit Hilfe des Durchflusszytometers konnte im Anschluss die Thrombozytenpopulation zwischen alt (> 24 Stunden) und jung (< 24 Stunden) aufgetrennt werden.

Die Zeit zwischen der Applikation der beiden Antikörper konnte beliebig gewählt werden, die Zeitspanne von 24 Stunden galt lediglich der Etablierung der Versuche. In späteren Versuchen, wie z.B. der arteriellen Thrombose oder auch der Flusskammer, wurde bewusst eine Zeitspanne von 12 Stunden gewählt, um eine möglichst junge Population von Thrombozyten zu identifizieren. Da diesen im Zusammenhang mit ihrem RNA Gehalt eine erhöhte Reaktivität zugeschrieben wird und die RNA erst nach 24 Stunden größtenteils abgebaut wird, ist davon auszugehen, dass in einer 12 Stunden alten Population ein sehr hoher Anteil an retikulierten Thrombozyten vorliegt.

4.2.3. Etablierung einer Doppelfärbung zur Differenzierung zwischen jungen und alten Thrombozyten in vivo

Wie auch in Kapitel IV 4.2.2 beschrieben, wurde hier das Prinzip der Doppelfärbung innerhalb eines definierten Zeitraums genutzt (pulse labeling). Der Unterschied zwischen beiden Versuchsaufbauten bestand darin, dass zuerst der GpIb X649 24 oder 12 Stunden vor Versuchsbeginn intravenös appliziert wurde und als zweiter Antikörper ebenfalls in vivo und intravenös der GpIb X488 (Emfret X488, DyLight-488, Emfret Analytics GmbH & Co. KG, Eibelstadt, Germany) 10 Minuten vor Versuchsbeginn gegeben wurde. Wie der X649 Antikörper bindet auch der X488 an die GpIb β -Untereinheit des GPIb-V-IX (Von-Willebrand-Faktor-Rezeptor) Komplexes, strahlt seine Fluoreszenz allerdings im FITC-Spektrum aus, der X649 im APC-Spektrum. Die Dosierung der beiden Antikörper erfolgte mit der gleichen Berechnung (0,05 μ g/g KGW; 0,5 μ l/g KGW).

Nach der Blutentnahme (*V. facialis* oder retrobulbär) wurde 5 μ l Vollblut mit 45 μ l sterilem PBS aufgefüllt. Da bereits beide Antikörper in vivo appliziert wurden, bedurfte es keiner weiteren Inkubationszeit. Es wurde direkt 1 ml FACS Lysing solution hinzugegeben und die Probe wurde für die nächsten 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen aufbewahrt. Im Anschluss konnte die fertige Probe mit unserem Durchflusszytometer analysiert werden. Genau wie bei der in vitro Methode konnte man durch entsprechendes Gating zwischen einer jungen und einer alten Population von Thrombozyten unterscheiden. Die alten Thrombozyten (> 24 bzw. > 12 Stunden) waren hierbei für beide injizierten Antikörper positiv, während die jungen Thrombozyten (< 24 bzw. < 12 Stunden) lediglich für den zuletzt injizierten GpIb X488 Antikörper positiv waren. Vorteil dieser Methode war, dass es zu einer minimalen Manipulation und damit Voraktivierung der Thrombozyten kam. Im Gegensatz zu der in vitro Methode bedurfte es außer der Lyse keiner weiteren Zwischenschritte mehr, bevor die Probe analysiert werden konnte, wodurch die mechanische Manipulation minimiert wurde. Außerdem ist für beide GpIb Antikörper beschrieben, dass sie keinen Einfluss auf die Funktion der Thrombozyten haben (103).

4.2.4. Färbung der Thrombozyten mit RNA-Farbstoffen

Für die Färbung der RNA der Thrombozyten standen insgesamt 3 verschiedene Farbstoffe zur Verfügung: Thiazol Orange (TO, BD Retic-Count, Becton Dickinson and Company, BD Biosciences, San Jose, CA, USA), Syto13 (Syto13 molecular probes, life technologies, Thermo Fisher, Inchinnan Business Park, Paisley, UK) und RNaselect (Syto RNaselect Green Fluorescent Cell Stain, Molecular Probes, Invitrogen detection technologies, Inchinnan Business Park, Paisley, UK).

Thiazol Orange (TO) ist zellpermeabel und bindet sowohl bei RNA, als auch bei DNA in einem Verhältnis von 1:2 an einem Basenpaar. Durch die Bindung kommt es zu einer Konformationsänderung, wodurch ein planarer fluoreszierender Komplex gebildet wird, welcher Licht bei einer Wellenlänge von 475nm absorbiert und bei 500nm emittiert (177). TO ist zwar einer der am längsten verwendeten und am besten etabliertesten Farbstoffe zur Detektion von RP, besitzt aber den Nachteil, dass er teilweise unspezifische Bindungen mit anderen Zellkomponenten eingeht. So wird z.B. ADP angefärbt, welches sich in den dichten Granula befindet oder auch mitochondriale DNA. Diese unspezifische Färbung ist besonders zeit- und konzentrationsabhängig, auch die Temperatur während der Inkubation spielt eine entscheidende Rolle. Aus diesem Grund muss jedes Labor sein eigenes spezifisches Protokoll entwickeln, welches präzise eingehalten werden muss, da ansonsten der prozentuale Anteil der RP in der anschließenden Messung fälschlicherweise zu hoch ausfallen kann (101, 178).

Syto13 ist ebenfalls ein zellpermeabler Nukleinsäure Farbstoff und besitzt sowohl zu RNA, als auch zu DNA die gleiche Bindungsaffinität. Nach Bindung wird das Licht bei einer Wellenlänge von 491nm absorbiert und bei 514nm emittiert. Im Vergleich zu TO ist Syto 13 deutlich spezifischer bei seiner Bindung an RNA/DNA. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Färbung mit Syto13 im Vergleich deutlich stabiler ist, deshalb auch bei längeren Inkubationszeiten die Intensität der Fluoreszenz gleichbleibt. Bei TO hingegen nimmt die Fluoreszenz über die Dauer der Inkubationszeit zu und führt durch unspezifische Färbung zu falsch-positiven Ergebnissen. Bei Versuchsansätzen, die lange Zeit in Anspruch nehmen, wie z.B. dem Cell-Sorting, ist Syto13 daher TO überlegen (179).

Auch RNaselect ist zellpermeabel, im Gegensatz zu den beiden anderen Farbstoffen bindet es jedoch selektiv an RNA. Nach Bindung an die RNA wird Licht bei einer Wellenlänge von 490nm absorbiert und bei 530nm emittiert. Alle drei Farbstoffe können durch ihre identischen Absorptions- und Emissionsspektren mit einem Fluoreszinz-Filter-Set untersucht werden (180).

Wie in IV 4.2.2 beschrieben, wurde den Mäusen 12 Stunden vor Versuchsbeginn der GpIb X649 Antikörper intravenös appliziert. Nach retrobulbärer Blutentnahme wurden 5 μ l Vollblut mit 1 μ l CD41-PacificBlue in 45 μ l sterilem PBS für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Im Anschluss wurden, wie in Tabelle 3 aufgeführt, die verschiedenen RNA-Farbstoffe hinzugegeben und ebenfalls für 15 Minuten inkubiert.

TO	Syto 13	RNAselect
<ul style="list-style-type: none"> • Zugabe von 50 μl TO (BD Retic-Count, Thiazol Orange 0,01 mg/ml) • Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur • Zugabe von 1 ml 1% PFA-Lösung, weitere Inkubation über 15 Minuten 	<ul style="list-style-type: none"> • Zugabe von 50 μl Syto13 (100nM) • Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur • Zugabe von 1 ml 1% PFA-Lösung, weitere Inkubation über 15 Minuten 	<ul style="list-style-type: none"> • Zugabe von 50 μl RNAselect (5μM) • Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur • Zugabe von 1 ml 1% PFA-Lösung, weitere Inkubation über 15 Minuten

Tabelle 3: Farbstoffe für die Anfärbung der megakaryozytären RNA

Für die Absicherung der Versuchsergebnisse wurde für sämtliche Proben eine Negativkontrolle mit analysiert, bei der anstatt der RNA-Farbstoffe 50 μ l steriles PBS zu den Vollblut Proben hinzugegeben wurde. Die nun fertigen Proben konnten mittels Durchflusszytometrie untersucht werden. Zunächst wurde die Thrombozytenpopulation zwischen jungen und alten Thrombozyten aufgetrennt. Im Anschluss konnten beide Populationen auf RNA positive Zellen und somit RP untersucht werden.

Zusätzlich wurden selbige Proben mit unserem Konfokalmikroskop analysiert (vgl. IV 3.3.). Hierbei sollte untersucht werden, ob es auch optisch möglich ist einen erhöhten RNA Gehalt innerhalb der jungen Thrombozytenpopulation nachzuweisen. Es wurde eine ausreichende Menge der Proben auf einen Objektträger ausgestrichen und für 5 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden die Proben mit Dako Mounting Medium und einem Deckglas abgedeckt. Eine weitere Vorbereitung der Proben war nicht nötig, da bereits sämtliche Färb- und Fixierungsschritte für die Durchflusszytometrie durchgeführt wurden. Zur Absicherung der Ergebnisse wurden ebenfalls negativ Kontrollen ohne RNA-Farbstoffe analysiert. Insgesamt wurden bei jeder Probe 10 alte und 10 junge Thrombozyten identifiziert, welche nach Anfertigung der Bilder mit Hilfe der Software ImageJ auf ihre mittlere Fluoreszenzintensität für die applizierten RNA-Farbstoffe überprüft wurden.

4.2.5. Färbung der Oberflächen- und Aktivierungsmarker

Im Rahmen der hier vorliegenden Doktorarbeit wurden diverse Oberflächen- und Aktivierungsmarker untersucht, um die Verteilung dieser auf alten und jungen Thrombozyten miteinander zu vergleichen. Wie auch bei den anderen Versuchen, wurde den Mäusen 12 Stunden vor Versuchsbeginn der GpIb X649 Antikörper über die Schwanzvene injiziert, um alle Thrombozyten zu markieren (vgl. IV 4.2.2.). 12 Stunden nach der Injektion des Erstantikörpers wurde mittels einer retrobulbären Blutentnahme ca. 1 ml Blut gewonnen, welches durch Citrat antikoaguliert wurde. Um zwischen den alten Thrombozyten und den jungen Thrombozyten zu unterscheiden, wurde im nächsten Schritt in vitro ein Zweitantikörper hinzugegeben, der sich gegen das Integrin α -IIb (= CD41) richtet (CD41 Pacific Blue, IgG1 κ , Rat anti-mouse, BioLegend, Cat.# 133932). Hierzu wurden 5 μ l Vollblut mit 45 μ l sterilem PBS in einem Eppendorf Gefäß vermischt und 1 μ l des CD41 Antikörpers wurde hinzugegeben. Die untersuchten Oberflächenmarker sind in folgender Tabelle 4 aufgeführt.

Antikörper	Klon	Hersteller	Verwendete Menge
CD41/CD61-PE	JON/A	Emfret Analytics	1 μ l auf 5 μ l Vollblut
CD62P-FITC	RB40.34	BD Bioscience	1 μ l auf 5 μ l Vollblut
GPVI-PE	#784808	R&D Systems	1 μ l auf 5 μ l Vollblut
CD61-PE	2C9.G2 (HM β 3-1) BD	BD Pharmingen	1 μ l auf 5 μ l Vollblut
GPIX-FITC	Xia.B4	Emfret Analytics	1 μ l auf 5 μ l Vollblut

Tabelle 4: Antikörper für die Untersuchung der Oberflächen- und Aktivierungsmarker der Thrombozyten

Für sämtliche Antikörperkombinationen wurden Isotyp-Kontrollen durchgeführt, um die Spezifität der einzelnen Färbungen zu kontrollieren. Nach einer Inkubationszeit der Farbstoffe von insgesamt 15 Minuten bei Raumtemperatur in absoluter Dunkelheit wurde 1 ml FACS-Lysing-Solution hinzugegeben, eine weitere Inkubationszeit von 15 Minuten folgte. Die nun fertig vorbereiteten Proben konnten mittels Durchflusszytometrie analysiert werden.

5. Statistische Auswertung

Die hier vorliegenden Versuche in Hinblick auf die funktionelle Untersuchung von retikulierten Thrombozyten im Kontext der arteriellen Thrombose *in vivo* wurden als Orientierungsstudie konzipiert. Da *in vivo* bisher noch keine Untersuchungen bekannt sind, ging es hauptsächlich darum, neue Hinweise auf eine unterschiedliche Funktion von retikulierten Thrombozyten zu erlangen, auch wenn teilweise in den einzelnen Gruppen keine statistische Signifikanz erreicht wurde. Um dem Tierschutz gerecht zu werden, wurden die Gruppengrößen möglichst geringgehalten, um einen unnötigen Verbrauch an Mäusen zu vermeiden.

Sämtliche Graphen wurden mit der Software GraphPad Prism 5 angefertigt und mit Microsoft Power Point bearbeitet. Alle statistischen Analysen wurden mit der Hilfe von Sigma Plot und Sigma Stat Version 13.0 durchgeführt. Vor den Testungen auf Signifikanz wurden alle Daten mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung überprüft. Bei normalverteilten Werten wurde der Vergleich zweier Gruppen mit dem Student's t-test durchgeführt. Lag bei zwei Gruppen keine Normalverteilung vor, dann wurde der Mann-Whitney-Rank Sum Test angewandt. Alle hier präsentierten Daten geben das Mittel +/- SEM (standard error of mean) an. Bei einem p -Wert von $p < 0,05$ wurde eine statistische Signifikanz der Testergebnisse angenommen.

V. ERGEBNISSE

1. Arterielle Thrombose nach einer Antikörper-medierten Thrombozytopenie

Weil für RP in der Literatur ein größeres Volumen, ein höherer Gehalt an Granula und eine vermehrte Reaktivität beschrieben wird, wurde dieser Versuchsaufbau gewählt, um zu überprüfen, ob die depletierten Tiere eine deutliche Thromboseneigung aufweisen (6, 13, 14). In vitro konnten Armstrong et al. bereits nachweisen, dass retikulierte Thrombozyten überproportional an der Bildung von Aggregaten beteiligt sind (15). Durch die Antikörper-medierte Thrombozytopenie wird eine massive Thrombopoese ausgelöst, wodurch der prozentuale Anteil der retikulierten Thrombozyten (IPF) an der Gesamtheit der Thrombozyten deutlich ansteigt (Abb. 18 B) (6, 13, 14). Unsere Hypothese hierbei war, dass es durch den erhöhten IPF-Wert auch in vivo zu Unterschieden in der arteriellen Thrombose bezüglich der Verschlusszeiten zwischen Kontroll-Mäusen und depletierten Mäusen kommt.

1.1. Kontrolle der Antikörper-medierten Thrombozytopenie

Mit Hilfe einer automatisierten Thrombozytenmessung (ABX Micros ES60 Hämatologie Analysegerät, Horiba ABX, Montpellier, Frankreich) wurde der Erfolg der Antikörper-vermittelten Depletion und mit einer Isotyp-Kontrolle die Spezifität der Depletion überprüft. Innerhalb von 4 Stunden kam es zu einem signifikanten Abfall der Thrombozyten ($p < 0,001$, $n = 5$, Abb. 18) der depletierten Gruppe im Vergleich zu der Kontroll-Gruppe. Im Abstand von 24 Stunden wurde den Mäusen Blut über die *Vena facialis* abgenommen und der aktuelle Thrombozytenwert mit einem Blutanalysegerät überprüft. So konnten wir nachweisen, dass nach 72 Stunden wieder ein annähernd physiologischer Thrombozytenwert erreicht war und es keinen signifikanten Unterschied mehr zwischen der depletierten und der Kontrollgruppe gab ($p = \text{n.s.}$, $n = 5$, Abb. 18). Außerdem haben Morowski et al. in einer ihrer Publikationen beschrieben, dass es ab einem Thrombozytenwert von $>300 \times 10^3$ Thrombozyten/ μl zu keinem signifikanten Unterschied bei den Verschlusszeiten in der arteriellen Thrombose der *A. carotis* kommt, bei unseren Versuchen wurde ein Wert von $<500 \times 10^3$ Thrombozyten/ μl nie unterschritten (181). Daher wurde dieser Zeitpunkt ($t = 72$ Stunden nach Depletion) gewählt, um eine FeCl_3 induzierte Thrombose bei den Mäusen auszulösen und mittels Intravitalmikroskopie zu analysieren (vgl. IV 2.5., 2.6.2. und 3.2.).

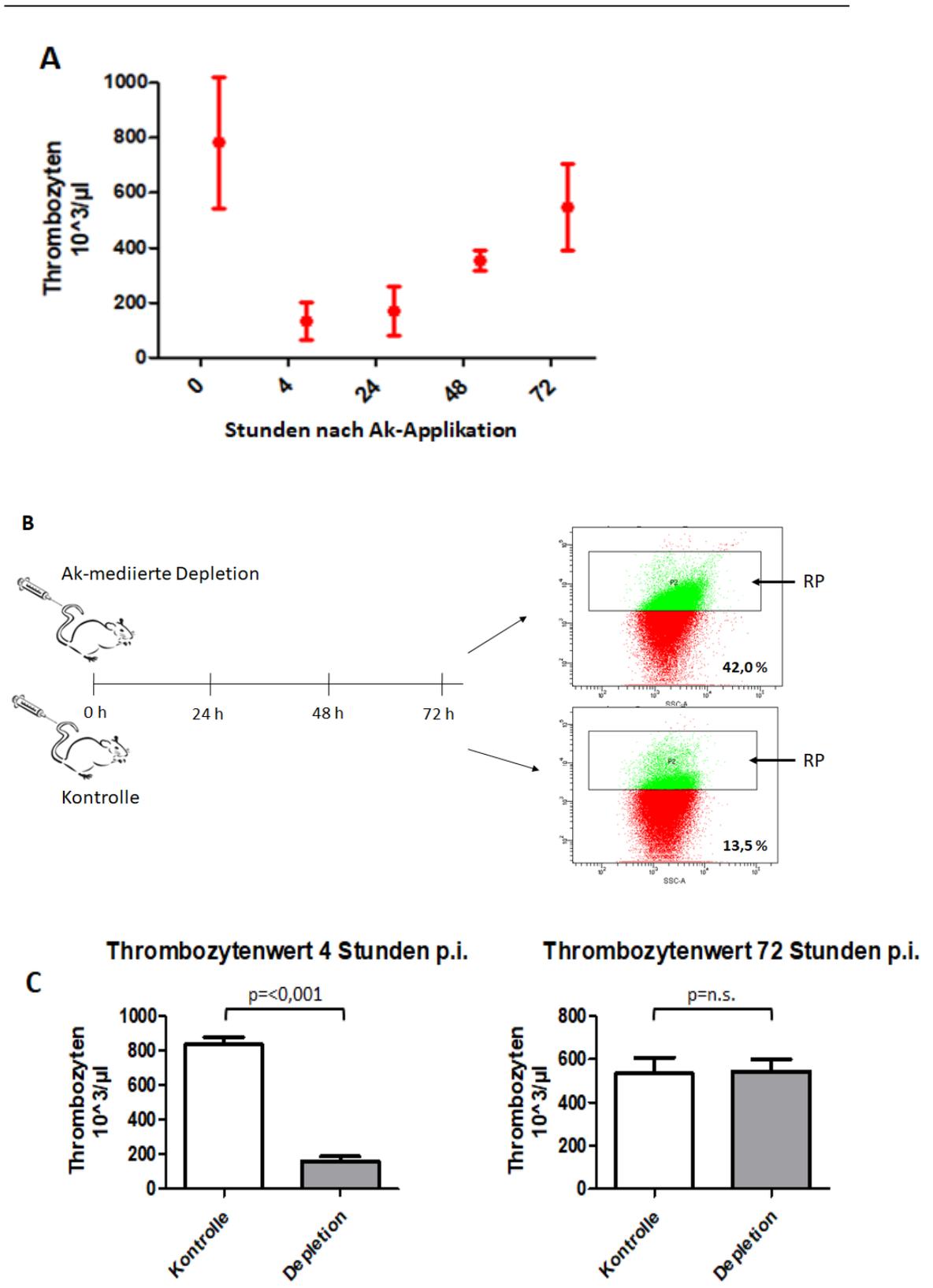


Abbildung 18: Antikörper-medierte Thrombozytopenie

A: Thrombozytenwerte nach Antikörper-mediierter Thrombozytopenie, gemessen über 72 Stunden;
 B: Repräsentatives Beispiel der RP-Werte in einer depletierten Gruppe und einer Kontroll-Gruppe 72 Stunden nach Injektion der Antikörper;
 C: Vergleich der Thrombozytenwerte 4 und 72 Stunden nach Injektion der Antikörper.

1.2. Thromboseversuche der *Arteria carotis* nach Antikörper-mediierter Thrombozytopenie

In der Depletions-Gruppe wurden insgesamt $n = 9$ Tiere, in der Kontroll-Gruppe $n = 7$ Tiere verwendet und mittels FeCl_3 eine Thrombose in der *A. carotis* induziert. Für die Versuchsdurchführung und die erhobenen Messgrößen siehe Kapitel IV 2.6.2. In der Depletions-Gruppe kam es bei 3 Mäusen zu einem vollständigen Verschluss (Occlusion) der *A. carotis*, während sich bei 6 Tieren kein vollständiger Verschluss entwickelte (43 ± 24). In der Kontrollgruppe kam es ebenfalls bei 3 Mäusen zu einer vollständigen Occlusion, bei 4 Mäusen zu einem unvollständigen Verschluss (39 ± 26). Bei der anschließenden statistischen Auswertung hat sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen in der Ausbildung einer arteriellen Thrombose ergeben ($p = \text{n.s.}$, $n = 7 - 9$, Abb. 19).

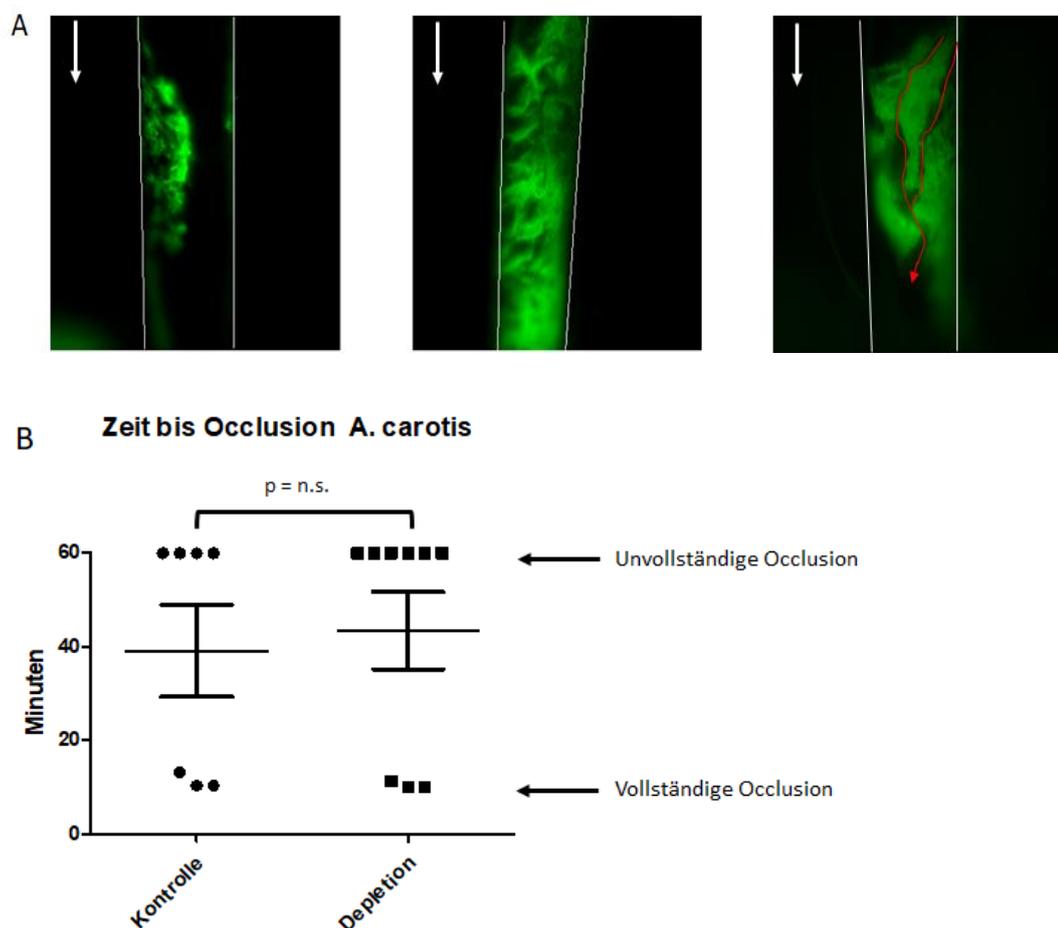


Abbildung 19: Thrombose der *A. carotis* nach Antikörper-mediierter Thrombozytopenie

A: Repräsentative Bilder einer Thrombose in der *A. carotis*, Links: unvollständiger Verschluss, Mitte: vollständiger Verschluss der Arterie, gut zu sehen ist, wie es durch die Stase zu einer Verjüngung der Arterie in Richtung Blutfluss kommt, Rechts: beginnende Rekanalisierung der Arterie; Weiße Linien = Wand der Arterie; Weiße Pfeile = Richtung des Blutflusses, rote Pfeile = Verlauf der Rekanalisierung innerhalb des Thrombus; B: Zeit bis zum ersten vollständigen Verschluss der *A. carotis*.

In der Regel kommt es in diesem Versuchsaufbau auch bei einem kompletten Verschluss der Arterie im weiteren Versuchsverlauf zu einer Rekanalisierung des Gefäßes, welche oftmals von einer erneuten Occlusion gefolgt wird. Erhobene Messgrößen waren hierbei die Dauer der ersten vollständigen Occlusion bis zum Beginn einer Rekanalisierung und das erneute Auftreten von vollständigen Verschlüssen nach der Rekanalisierung. Sowohl bei der Dauer (Depletion = $0,75 \pm 1,19$; Kontrolle = $0,24 \pm 0,48$; $p = \text{n.s.}$, $n = 7 - 9$), als auch bei der Anzahl wiederkehrender Verschlüsse (Depletion = $0,67 \pm 1,12$; Kontrolle = $0,71 \pm 0,95$; $p = \text{n.s.}$, $n = 7 - 9$) gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen der depletierten und der Kontrollgruppe (Abb. 20).

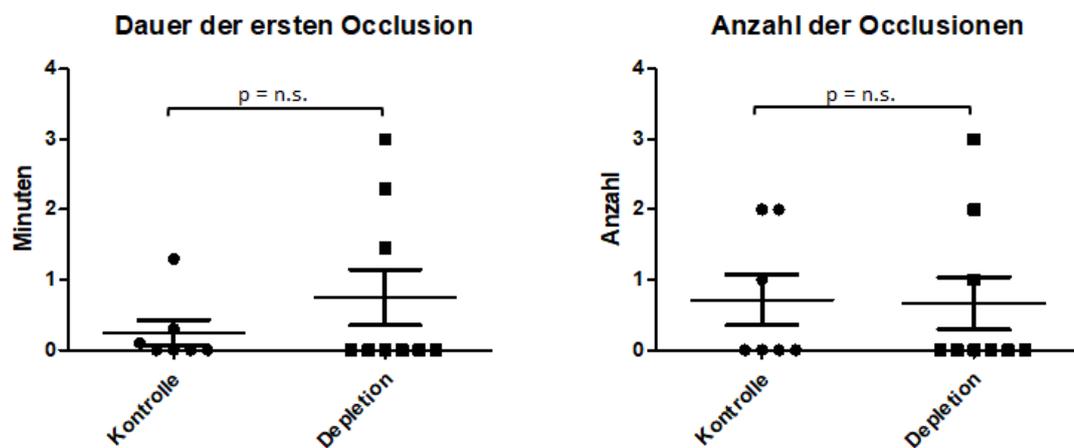


Abbildung 20: Dauer der ersten Occlusion und Anzahl wiederkehrender Verschlüsse in der depletierten und in der Kontroll-Gruppe

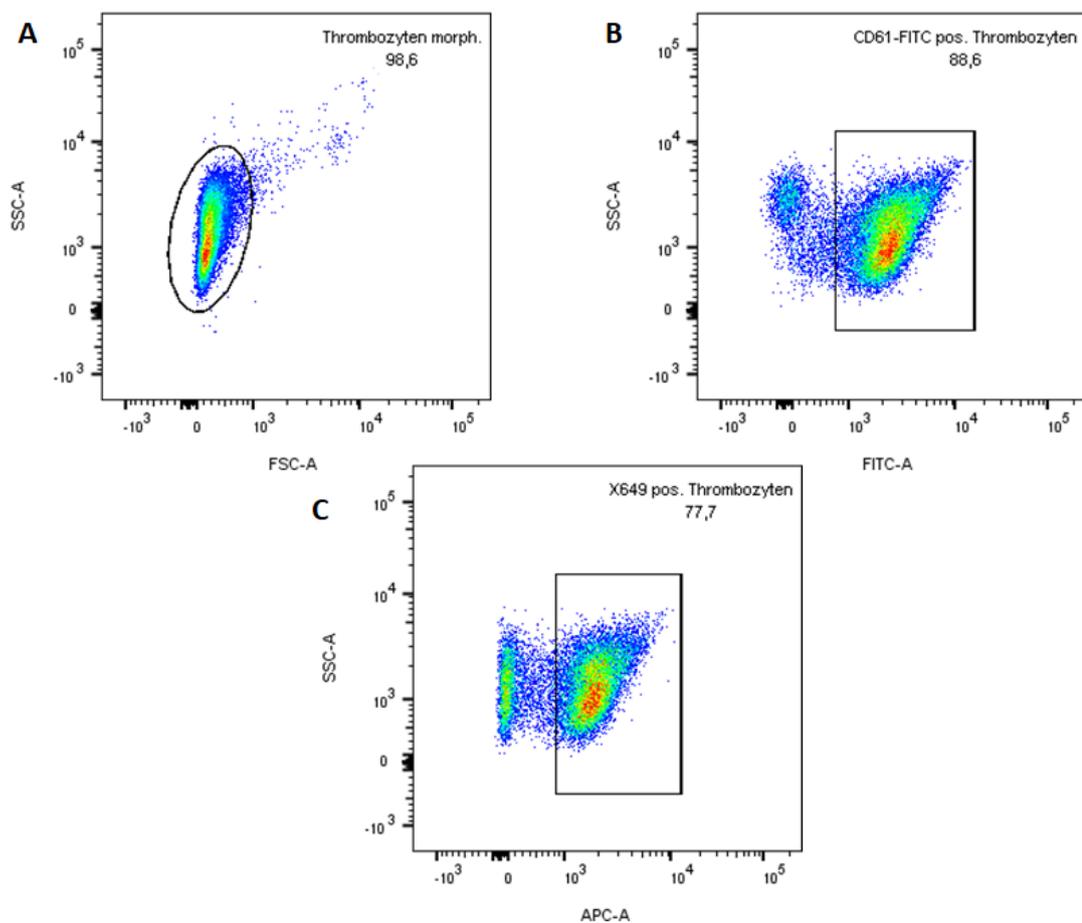
Auf Grund der hier festgestellten Ergebnisse haben wir entschieden, dass das Modell der Antikörper-medierten Thrombozytopenie mit anschließender Thrombose der *A. carotis* nicht für die Untersuchung unserer Hypothese geeignet war, da es bei keiner der erhobenen Messgrößen einen signifikanten Unterschied der beiden Gruppen gab. Da es durch die Depletion zu einer sterilen Inflammation kommt, kann keine Untersuchung der RP unter steady-state-Bedingungen gewährleistet werden. Außerdem konnten zeitgleich zu unseren Untersuchungen Gupta et al. nachweisen, dass es durch eine Antikörper-medierte Thrombozytopenie zu einer unvollständigen Reifung des GPVI-Rezeptors und einer damit einhergehenden Verlangsamung der Signaltransduktion nach Aktivierung der Thrombozyten kommt (182). Aus diesen Gründen haben wir uns für alternative Ansätze für die Untersuchung von RP entschieden, welche im Folgenden beschrieben werden.

2. Umsatz muriner Thrombozyten

Zunächst haben wir mittels Durchflusszytometrie die Überlebenszeit von murinen Thrombozyten ermittelt, wodurch sich Rückschlüsse auf die de novo Synthese von Thrombozyten ziehen lassen.

Für die Versuchsvorbereitungen und Anwendung der Antikörper siehe Kapitel IV 4.2.1.

Bei $t = 0$ waren annähernd 100% ($92,45 \pm 0,35$, $n = 5$) der Thrombozyten positiv für den GpIb X649 Antikörper, was für eine erfolgreiche Applikation spricht und einer nahezu vollständigen Sättigung der Thrombozyten mit dem Antikörper. Nach 96 Stunden waren annähernd 0% der Thrombozyten noch positiv ($4,44 \pm 1,17$, $n = 5$) für den GpIb X649 Antikörper, was darauf schließen lässt, dass nach 96 Stunden fast sämtliche Thrombozyten erneuert wurden. Murine Thrombozyten besitzen somit eine mediane Überlebenszeit von ca. 4 Tagen, was einem Umsatz von ungefähr 25% pro Tag entspricht (Abb. 21).



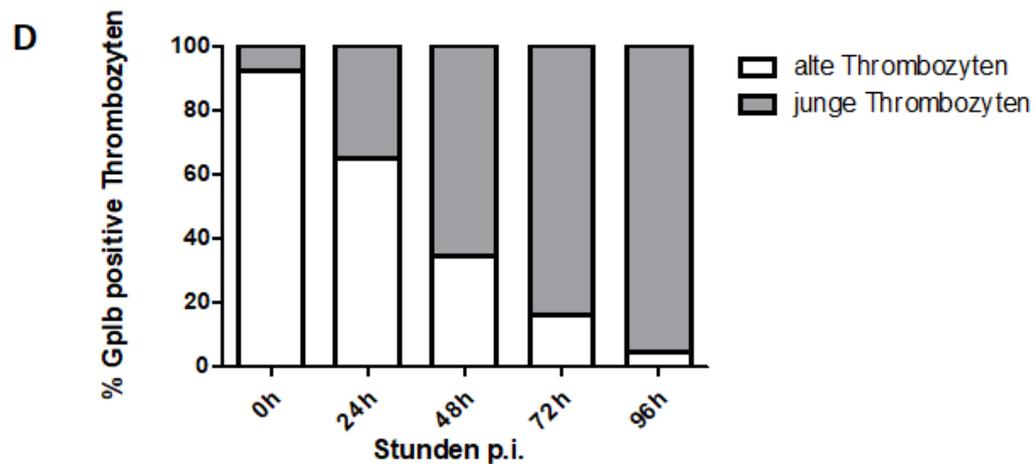


Abbildung 21: Umsatz muriner Thrombozyten innerhalb von 24 Stunden

A, B und C: Repräsentativer FACS-Plot für die Detektion von neu gebildeten Thrombozyten, A: Anhand des Forward- und Sideward-Scatter wurde die Population der Thrombozyten morphologisch eingegrenzt, B: Die morphologische Population wurde auf den *in vitro* hinzugegebenen CD61-FITC Antikörper überprüft, welcher alle Thrombozyten markiert, wodurch die morphologische Population aufgereinigt werden kann. Andere Zellen oder Zelltrümmer werden hierbei aussortiert, C: Überprüfung auf den initial *in vivo* applizierten GpIb X649 Antikörper innerhalb der gesamten Thrombozytenpopulation; 24 Stunden nach Applikation sind noch 77,7% der Thrombozyten positiv für diesen, daraus ergibt sich eine *de novo* Synthese der Thrombozyten von 22,3% innerhalb von 24 Stunden; D: Umsatz muriner Thrombozyten gemessen über einen Zeitraum von 96 Stunden.

3. Korrelation von jungen Thrombozyten mit retikulierten Thrombozyten

Um die Hypothese zu bestätigen, dass die Population der jungen Thrombozyten reich an retikulierten Thrombozyten ist, wurden weitere Versuchsreihen durchgeführt, indem zusätzlich mit RNA-Farbstoffen gearbeitet wurde. Somit konnten wir feststellen, inwieweit die junge Population auch mit den retikulierten Thrombozyten korreliert, da diese innerhalb der ersten 24 Stunden noch einen hohen Gehalt an RNA besitzen, an welche die Farbstoffe binden können (Abb. 22). Das Prinzip der hier angewendeten Doppelfärbung ist in Kapitel IV 4.2.2 beschrieben, die RNA-Farbstoffe sind in Kapitel IV 4.2.4 beschrieben.

3.1. Überprüfung der Korrelation mittels Durchflusszytometrie

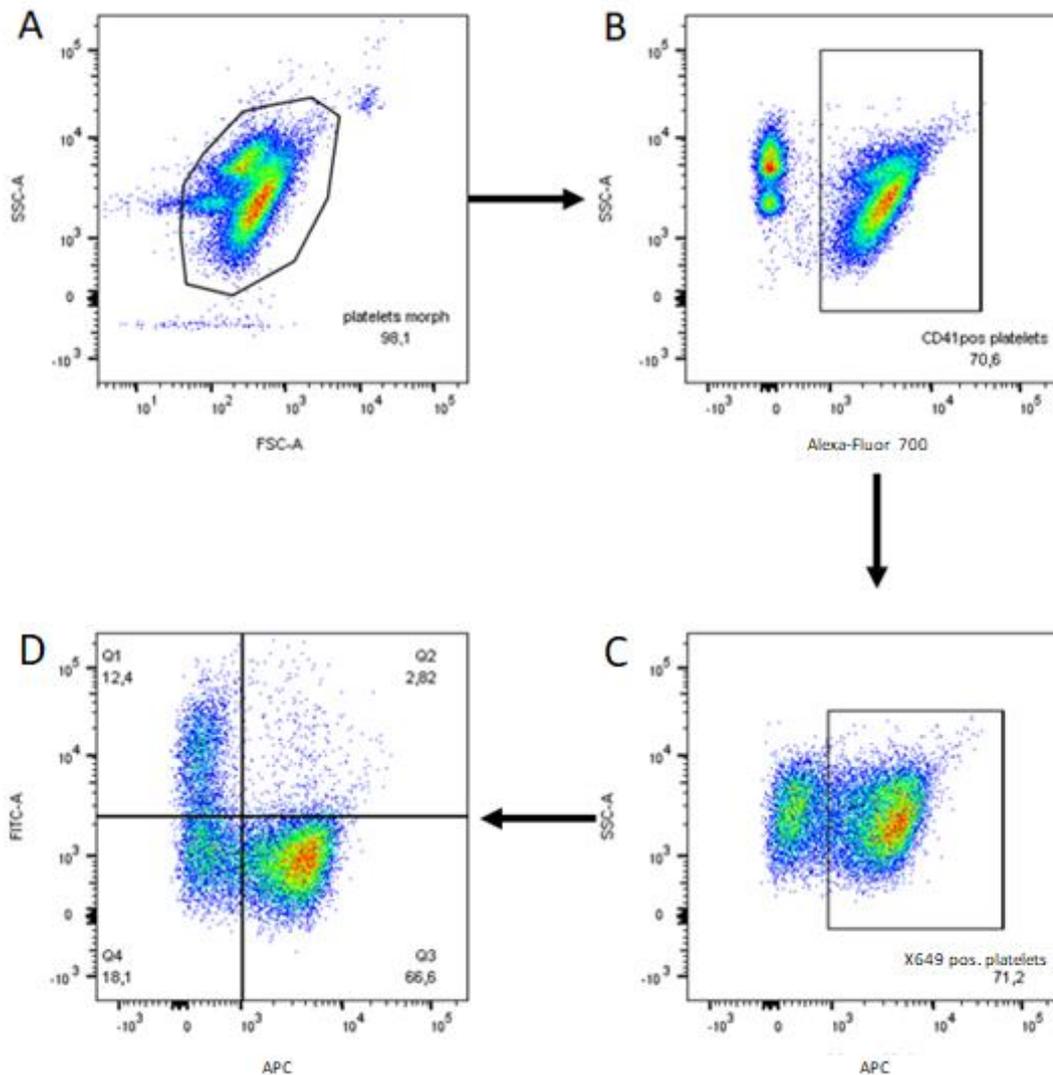


Abbildung 22: Repräsentativer FACS-Plot der Korrelation zwischen jungen und alten Thrombozyten und deren RNA-Gehalt

A: Morphologisches Gating der Thrombozyten mittels Forward- und Sidewardscatter; B: Identifikation aller Thrombozyten durch den in vitro hinzugegebenen CD41 PacificBlue Antikörper; C: Identifikation der GpIb X649 positiven Population, die älter als 24 Stunden ist, die für diesen Antikörper negative Population ist jünger als 24 Stunden; D: Auftragung der beiden Populationen gegen den verwendeten RNA-Farbstoff; Q2 und Q3 = Population der Thrombozyten älter als 24 Stunden; Q1 und Q4 = Population der Thrombozyten jünger als 24 Stunden; auf der y-Achse werden die für den verwendeten RNA-Farbstoff positiven Zellen aufgetragen, wobei man eine deutliche Population RNA-positiver Zellen innerhalb der Thrombozyten jünger als 24 Stunden erkennt (Q1), während es innerhalb der Population älter als 24 Stunden kaum positive Zellen gibt (Q2).

Als Negativ-Kontrollen wurden zusätzlich Proben angefertigt, in denen keine RNA-Farbstoffe verwendet wurden. Im Anschluss wurden sämtliche Proben mit der Analysesoftware FlowJo auf ihre durchschnittlichen RNA-Fluoreszenz-Intensitäten (MFI = Mean fluorescence intensity) der verschiedenen Farbstoffe innerhalb der beiden Populationen überprüft. Die statistische Auswertung der MFI-Werte zeigte eine signifikant stärkere RNA-Fluoreszenz innerhalb der Population der jungen Thrombozyten. Für die Färbungen mit TO ergab sich hierbei ein p - Wert $< 0,001$ (MFI junge Thrombozyten $2,5 \pm 0,5$; $n = 7$), mit RNaselect $p < 0,001$ (MFI junge Thrombozyten $1,8 \pm 0,2$; $n = 5$) und für die Syto13 Färbungen ein p - Wert = $0,002$ (MFI junge Thrombozyten $2,8 \pm 1,0$; $n = 6$). Durch die hier gewonnenen Ergebnisse lässt sich darauf schließen, dass es einen signifikanten Zusammenhang zwischen jungen Thrombozyten und deren RNA-Gehalt (korreliert mit der MFI) gibt, wodurch sie zu den retikulierten Thrombozyten gezählt werden können (Abb. 23).

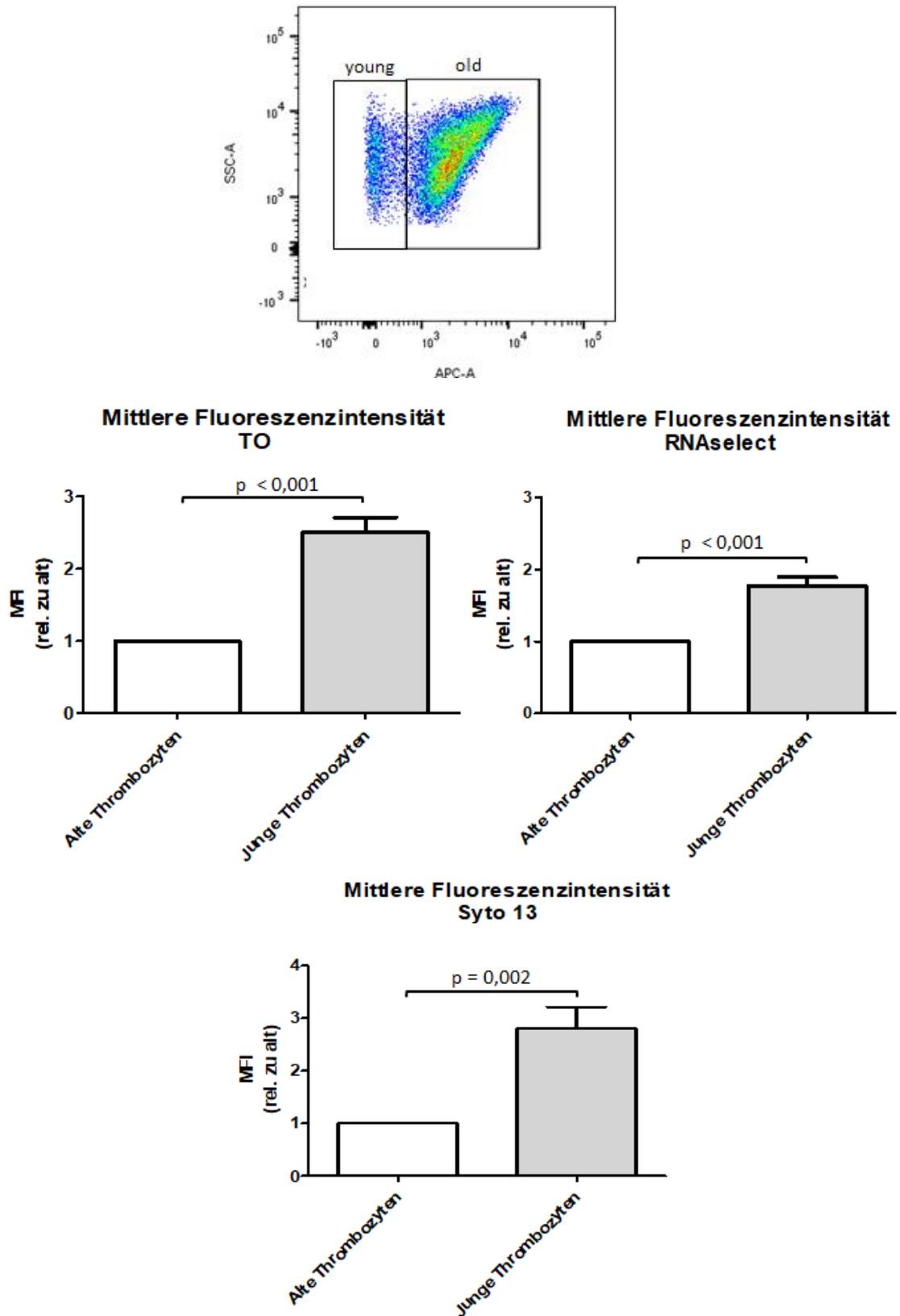


Abbildung 23: Graphische Darstellung der RNA-Fluoreszenzintensitäten innerhalb der jungen und der alten Population

Angegeben in MFI = Mean fluorescence intensity.

3.2. Überprüfung der Korrelation mittels Konfokalmikroskopie

Neben durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden selbige Proben mit einem Konfokalmikroskop analysiert. Hierbei sollte ebenfalls untersucht werden, ob der RNA-Gehalt der retikulierten Thrombozyten mit dem Alter korreliert und man diesen Unterschied optisch darstellen und analysieren kann. Für die Vorbereitungen und Durchführung des Versuchs siehe Kapitel IV 4.2.4. Anhand der angefertigten Bilder war zu erkennen, dass die jungen Thrombozyten im Vergleich zu den alten einen deutlich erhöhten RNA-Gehalt aufwiesen. Es wurden insgesamt die Proben von $n = 4$ Mäusen verwendet. Nach Anfertigung der Bilder mit Hilfe des Konfokalmikroskops wurden diese mit der Software ImageJ analysiert. Im Vergleich zu der Population der alten Thrombozyten, wies die junge Population eine signifikant erhöhte MFI auf (MFI alte Thrombozyten 661 ± 54 , MFI junge Thrombozyten 1426 ± 237 , $p = 0,02$, $n = 4$). Somit lässt sich neben den durchflusszytometrischen Untersuchungen auch mittels Konfokalmikroskopie eine signifikante Korrelation zwischen der jungen Population und deren Fluoreszenzintensität aufgrund eines erhöhten RNA-Gehalts nachweisen (Abb. 24).

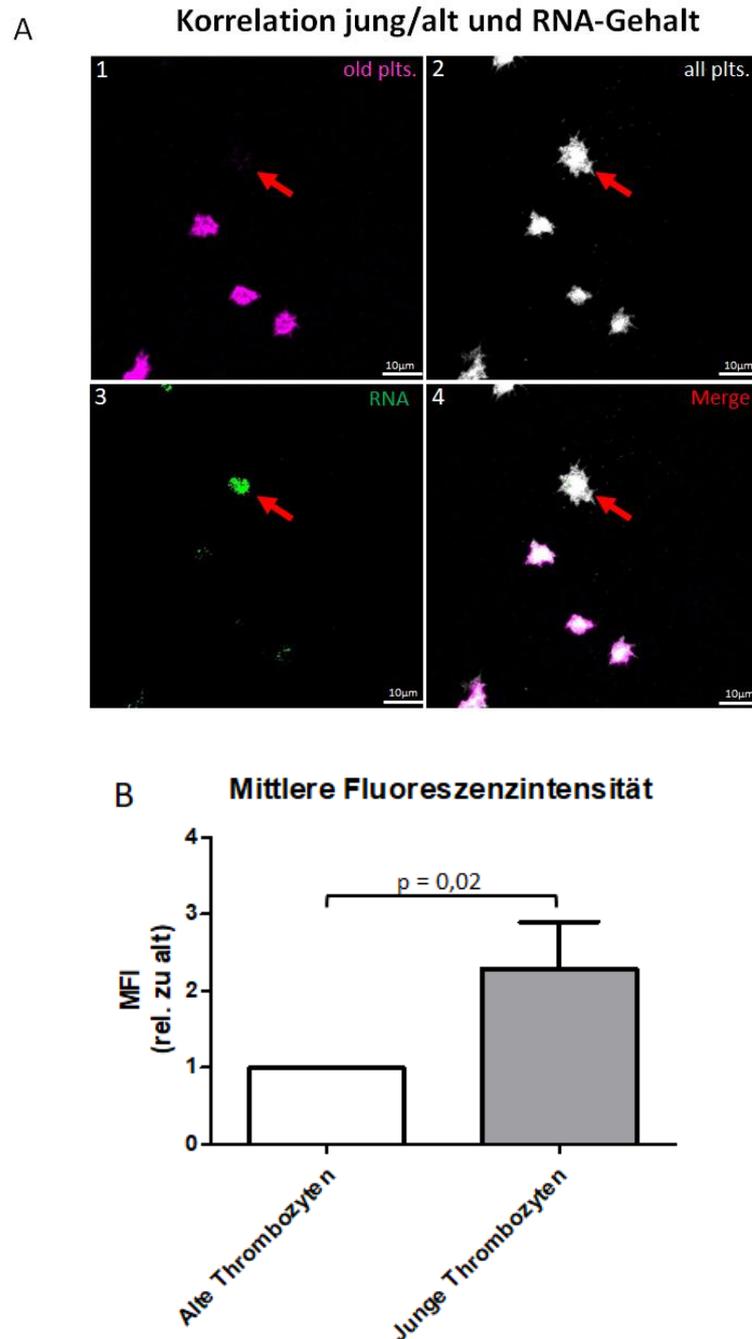


Abbildung 24: Ermittlung der Korrelation junger Thrombozyten und deren RNA-Gehalt mittels Konfokalmikroskopie

A: Repräsentatives Beispiel einer Doppelfärbung der Thrombozyten in Kombination mit einer RNA-Färbung (RNaselect 2,5µM); 1: Darstellung der Thrombozyten positiv für den GpIb X649 Antikörper (12 Stunden vor Versuchsbeginn appliziert); 2: Darstellung der Thrombozyten positiv für den CD41-PB Antikörper (in vitro hinzugefügt; Thrombozyten, die nur für diesen Antikörper positiv sind, wurden in den letzten 12 Stunden neu gebildet); 3: Anfärbung der RNA innerhalb der Thrombozyten; 4: Der Pfeil zeigt auf einen Thrombozyten, welcher nur für den CD41-PB Antikörper positiv ist und somit jünger als 12 Stunden ist, gleichzeitig ist dieser auch deutlich positiv für die Anfärbung mit RNaselect, was für einen hohen RNA-Gehalt spricht; B: MFI der alten und jungen Thrombozyten

4. Oberflächen- und Aktivierungsmarker der jungen und alten Thrombozyten

Als Parameter für die Reaktivität der jungen Thrombozyten, wurden in diesem Versuchsaufbau diverse Oberflächen- und Aktivierungsmarker auf deren quantitative Unterschiede zwischen der alten und jungen Population untersucht. Für die Versuchsvorbereitungen und Durchführung siehe Kapitel IV 4.2.2 und 4.2.5. Um eine spezifische Anfärbung der Oberflächen- und Aktivierungsmarker zu garantieren, wurden für sämtliche Proben Isotyp-Kontrollen durchgeführt (Abb. 25).

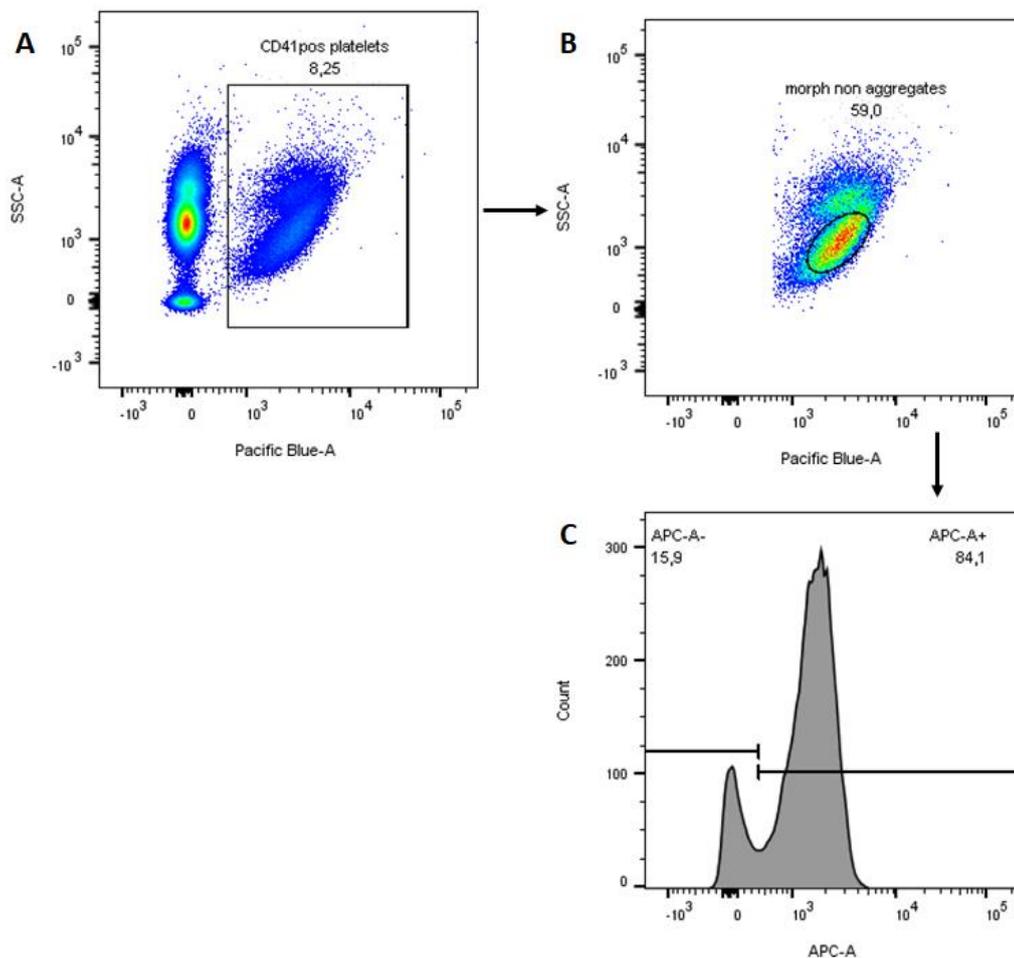


Abbildung 25: Repräsentative Gating-Strategie zur quantitativen Messung von Oberflächen- und Aktivierungsmarkern

Selbige Strategie wurde bei allen Antikörper-Kombinationen angewendet; A: Mit Hilfe eines Durchflusszytometers wurden zuerst alle Thrombozyten über den CD41-PacificBlue Antikörper identifiziert, welcher in vitro hinzugegeben wurde; B: Im Anschluss wurden morphologisch abnormale Thrombozyten ausgeschlossen, da bei diesen eventuell eine Voraktivierung vorliegen könnte, wodurch die Versuchsergebnisse verfälscht werden; C: Die so definierte Gruppe wurde über den vor 12 Stunden i.v. applizierten GpIb X649 Antikörper zwischen jungen und alten Thrombozyten aufgeteilt. Im Anschluss wurden die MFI-Werte der gebundenen Oberflächen- und Aktivierungsmarker in beiden Populationen gemessen und miteinander verglichen.

Überprüft wurden in diesem Versuchsaufbau die Oberflächen- und Aktivierungsmarker CD61, CD62p (P-Selektin), GPIX, GPVI und JONA/A. Da die MFI mit der Anzahl der vorhandenen Marker und der daran gebundenen Antikörper korreliert, lässt sich eine quantitative Aussage über die Verteilung dieser treffen. Sämtliche hier untersuchten Oberflächen- und Aktivierungsmarker waren in der Gruppe der jungen Thrombozyten häufiger vorhanden. Ein signifikanter Unterschied hat sich für die Marker CD62p (MFI alt 93 ± 70 , MFI jung 126 ± 58 , $p = 0,006$, $n = 5$), GPIX (MFI alt 781 ± 532 , MFI jung 839 ± 572 , $p = 0,04$, $n = 5$) und GPVI (MFI alt 2936 ± 846 , MFI jung 3255 ± 1072 , $p = 0,03$, $n = 5$) ergeben. Ebenfalls deutlich häufiger vorhanden war der CD61-Rezeptor, eine statistische Signifikanz wurde knapp verfehlt (MFI alt 3927 ± 874 , MFI jung 4304 ± 1040 , $p = 0,07$, $n = 5$). Lediglich der Rezeptor JON/A lag sowohl bei den alten als auch bei den jungen Thrombozyten in etwa der gleichen Menge vor (MFI alt 265 ± 72 , MFI jung 266 ± 69 , $p = \text{n.s.}$, $n = 5$). Das junge Thrombozyten quantitativ mehr Marker besitzen, unterstützt die Hypothese, dass diese im Fall eines Thrombosegeschehens leichter und schneller zu aktivieren sind und vermehrt an diesem beteiligt sind (Abb. 26).

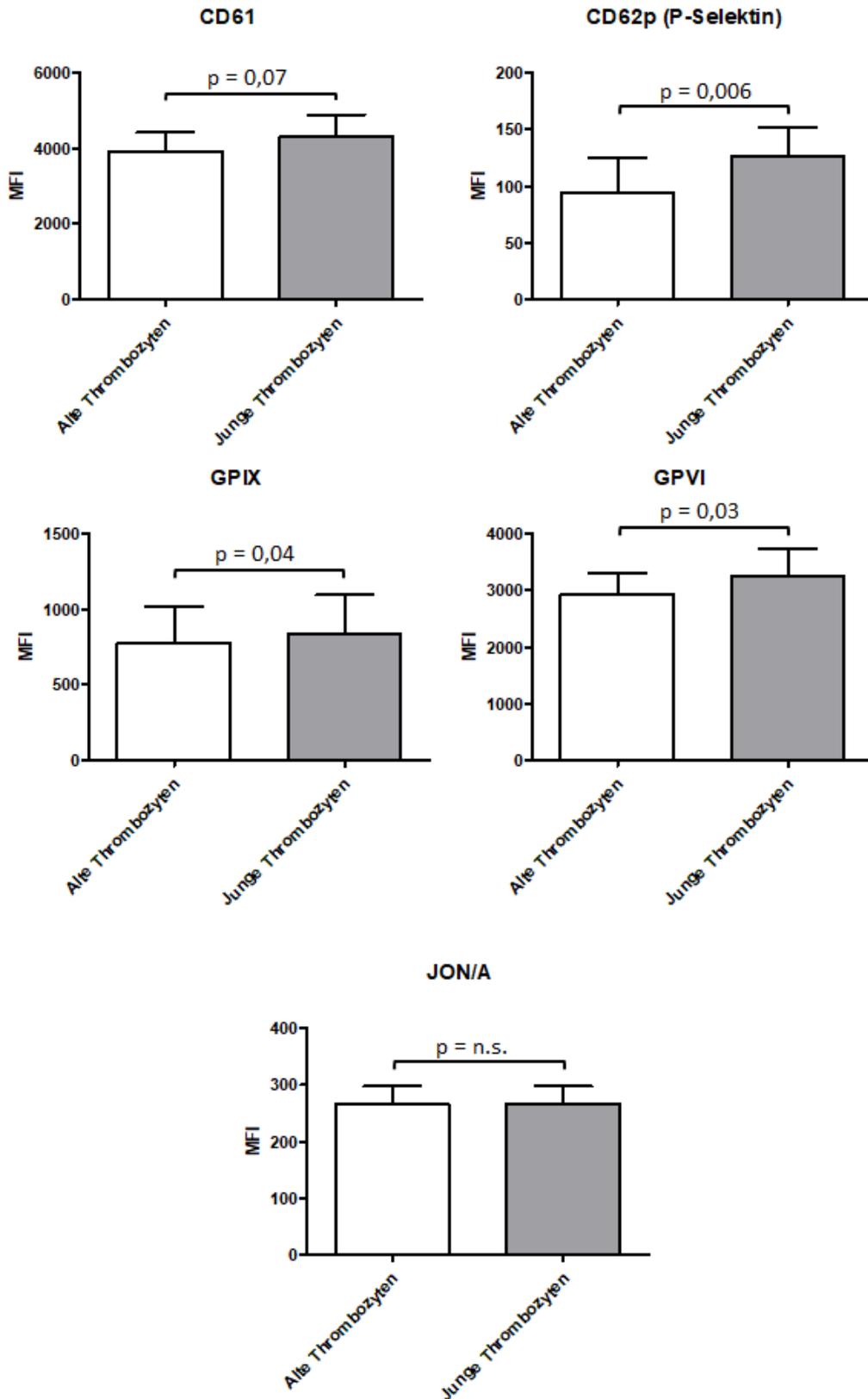


Abbildung 26: Messung der MFI der Oberflächen- und Aktivierungsmarker in der alten und jungen Population der Thrombozyten

5. Überprüfung der Wirksamkeit einer ASS Behandlung mittels Multiplate

Um die Wirksamkeit der in den folgenden Versuchen verwendeten Acetylsalicylsäure-Behandlung zu überprüfen, wurden mit Mäusen Multiplateversuche durchgeführt. Der ersten Versuchsgruppe wurde hierbei eine Stunde vor Versuchsbeginn Aspirin intravenös appliziert, während eine zweite Versuchsgruppe lediglich steriles PBS verabreicht bekommen hat. Für das Prinzip und die Durchführung der Versuche siehe Kapitel IV 2.7, 2.7.1 und 2.7.2. Vor den Multiplateversuchen wurden bei sämtlichen Mäusen mit unserem Blutanalysegerät die Thrombozytenwerte ermittelt, welche bei allen Tieren im physiologischen Referenzbereich lagen ($540-720 \times 10^3$ Thrombozyten/ μl).

In der unbehandelten Versuchsgruppe, die mit Arachidonsäure stimuliert wurde, war eine deutliche Aktivierung zu erkennen. In der mit Acetylsalicylsäure behandelten Gruppe hingegen kam es zu keinerlei Aktivierung der Thrombozyten, was für eine wirkungsvolle und vollständige Hemmung der Cyclooxygenase spricht.

Als positiv Kontrolle wurden selbige Proben anstelle von Arachidonsäure mit ADP stimuliert. Da Acetylsalicylsäure lediglich die Cyclooxygenase und damit die Umsetzung von Arachidonsäure hemmt, sollte die Behandlung keinerlei Auswirkungen auf die Aktivierbarkeit mit ADP haben. Bei den unbehandelten Mäusen war erneut eine deutliche Aktivierung erkennbar. Auch in der mit ASS behandelten Gruppe kam es diesmal zu einer deutlichen Aktivierung der Thrombozyten, was für eine physiologische Plättchenfunktion spricht (Abb. 27).

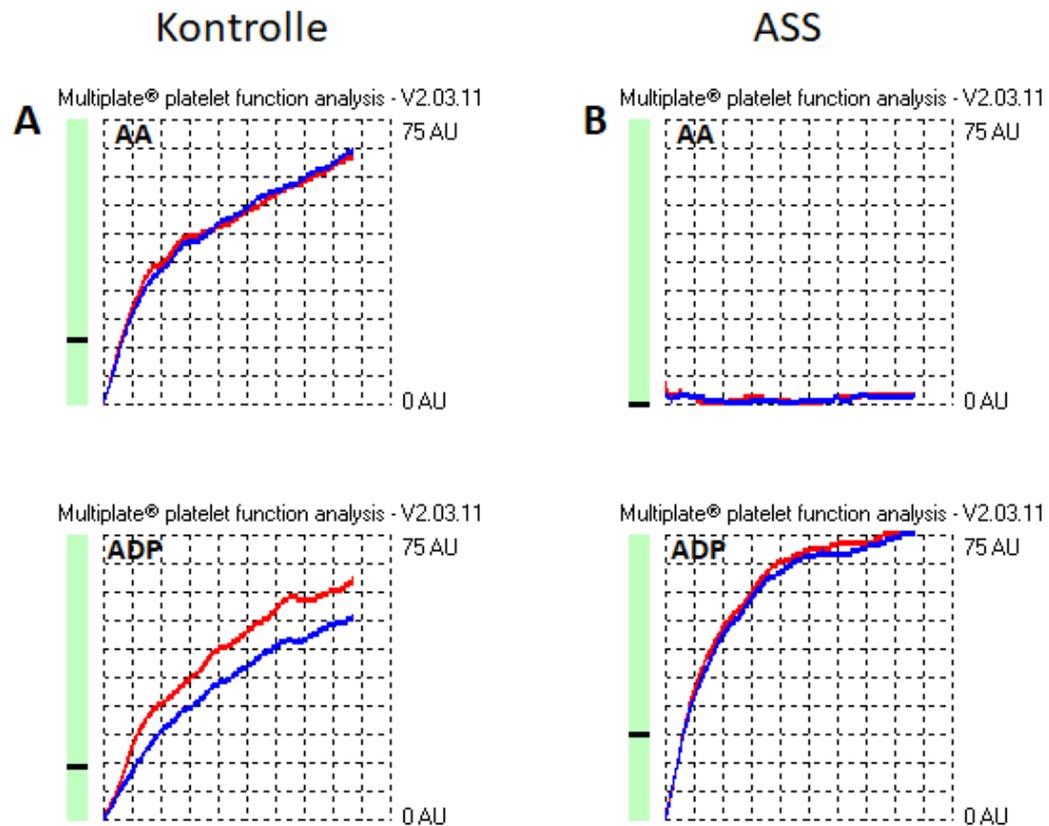


Abbildung 27: Repräsentatives Beispiel eines Multiplateversuchs

A: Unbehandelte Gruppe, Stimulation mit 0,1mM Arachidonsäure (oben) und mit 40 μ M ADP (unten); B: mit ASS behandelte Gruppe, Stimulation mit 0,1mM Arachidonsäure (oben) und mit 40 μ M ADP (unten)

Für die Multiplateversuche bleibt festzuhalten, dass die gewählte Dosierung der intravenös verabreichten Acetylsalicylsäure-Behandlung zu einer vollständigen Hemmung der Thrombozyten in diesem Versuchsaufbau bezüglich einer Stimulation mit Arachidonsäure geführt hat. Die Stimulation mit ADP belegt die spezifische Hemmung der COX-1 durch Aspirin, da die Thrombozyten grundsätzlich zur Aggregation befähigt waren.

6. Spreadingversuche mit alten und jungen Thrombozyten

Mit Hilfe der Spreadingversuche sollten die Thrombozyten innerhalb der jungen und alten Population auf deren Plättchenfunktion überprüft werden. Kommt es zu einem erfolgreichen Aktivierungsprozess der Thrombozyten, breiten sich diese im Anschluss aus (=“spreading“) und ihre Oberfläche vergrößert sich. Für die Versuchsvorbereitungen und Durchführung siehe Kapitel IV 3.4 und. Die Proben wurden im Anschluss fixiert und sämtliche Aufnahmen wurden mit einem Epifluoreszenzmikroskop angefertigt (Abb. 28).

Thrombozyten Spreading

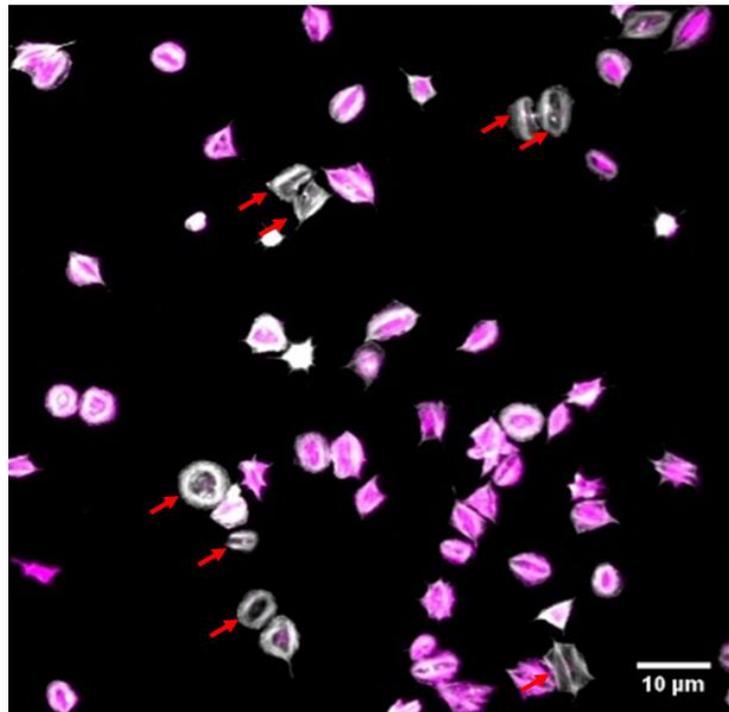


Abbildung 28: Repräsentatives Beispiel der Spreadingversuche mit Thrombozyten

Stimulation erfolgte mit 0,5 U/ml Thrombin; roten Pfeile: Thrombozyten, die nur für den zuletzt injizierten GpIb X488 Antikörper positiv waren und somit in den letzten 12 Stunden neu gebildet wurden.

6.1. Spreadingversuche der unbehandelten Gruppe

In allen drei Gruppen wurde deutlich, dass die jungen Thrombozyten im Mittel eine größere Oberfläche besaßen (unstimuliert Oberfläche alt $16,0 \pm 0,8$, Oberfläche jung $16,4 \pm 0,8$, $p = \text{n.s.}$, $n = 4$; Thrombin Oberfläche alt $23,2 \pm 0,4$, Oberfläche jung $25,2 \pm 1,5$, $p = 0,029$, $n = 4$; Kollagen Oberfläche alt $19,6 \pm 1,2$, Oberfläche jung $20,5 \pm 1,4$, $p = \text{n.s.}$, $n = 4$). Besonders deutlich wurde dies bei der mit Thrombin stimulierten Gruppe, wobei es zu einem statistisch signifikanten Unterschied der Oberflächen von jungen und alten Thrombozyten kam ($p = 0,029$; $n = 4$). Dieses Ergebnis spricht dafür, dass sich junge Thrombozyten im Vergleich zu alten Thrombozyten übermäßig mit Thrombin stimulieren lassen. Außerdem besitzen beide stimulierten Gruppen im Mittel eine größere Oberfläche der Thrombozyten im Vergleich zu der unstimulierten Gruppe, was eine erfolgreiche Aktivierung und damit normale Plättchenfunktion belegt (Abb. 29).

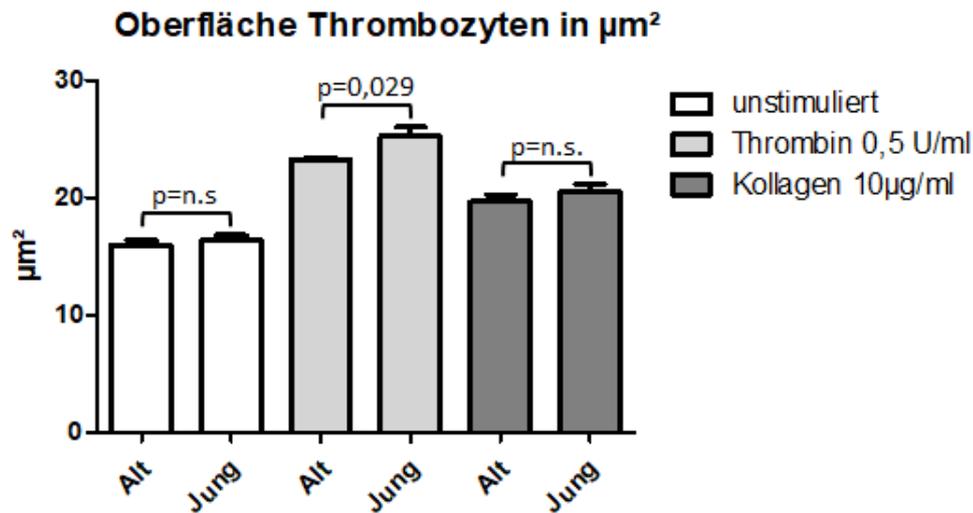


Abbildung 29: Messung der Oberfläche von jungen und alten Thrombozyten in μm^2 in einer unbehandelten Gruppe

6.2. Spreadingversuche der mit ASS behandelten Gruppe

Zusätzlich wurden diese Versuche bei weiteren Mäusen durchgeführt, welchen eine Stunde vor Versuchsbeginn Aspirin intravenös appliziert wurde. Auch in dieser Versuchsgruppe ließen sich die Ergebnisse reproduzieren und die jungen Thrombozyten zeigten im Mittel eine größere Oberfläche.

In der mit ASS behandelten Gruppe kam es ebenfalls von den unstimulierten zu den stimulierten Proben zu einem deutlichen Anstieg der Oberfläche (unstimuliert Oberfläche alt $13,7 \pm 0,9$, Oberfläche jung $13,9 \pm 0,6$, $p = \text{n.s.}$, $n = 4$; Thrombin Oberfläche alt $22,2 \pm 1,2$, Oberfläche jung $25,4 \pm 1,8$, $p = 0,027$, $n = 4$; Kollagen Oberfläche alt $17,3 \pm 1,8$, Oberfläche jung $18,3 \pm 2,7$, $p = \text{n.s.}$, $n = 4$). Diese Zunahme spricht dafür, dass die Thrombozyten erfolgreich aktiviert wurden und sich ausgebreitet haben. Wie auch in der unbehandelten Gruppe war hierbei die Stimulation mit 0,5 U/ml Thrombin am wirksamsten und die einzige Probe, bei der es einen signifikanten Unterschied ($p = 0,027$) der Oberfläche zwischen alten und jungen Thrombozyten gegeben hat ($p = 0,027$; $n = 4$), was für eine übermäßige Aktivierung der RP durch Thrombin spricht (Abb. 30).

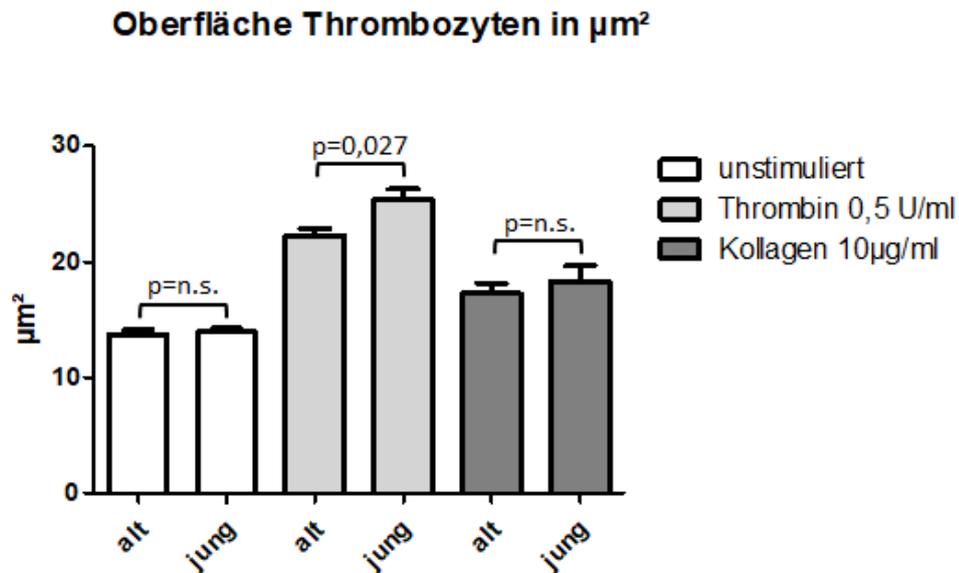


Abbildung 30: Messung der Oberfläche von jungen und alten Thrombozyten in μm^2 in einer mit ASS behandelten Gruppe

7. Detektion von jungen und alten Thrombozyten in vivo

Da die Applikation von RNA-Farbstoffen aufgrund der zu geringen Fluoreszenzintensität in vivo nicht geeignet ist, haben wir eine sehr gut reproduzierbare Methode für die Detektion von jungen und alten Thrombozyten etabliert. Die Intention dahinter war, dass innerhalb einer jungen Population Thrombozyten ein großer Teil zu den retikulierten Thrombozyten gehört, da deren RNA erst nach 24 Stunden größtenteils abgebaut ist. Mit den zuvor durchgeführten Versuchen (Korrelation junger Thrombozyten mit deren RNA-Gehalt) konnten wir diese Hypothese bereits bestätigen. Für das Prinzip der Doppelfärbung, um in vivo zwischen jungen und alten Thrombozyten zu differenzieren, siehe Kapitel 4.2.3. Im Anschluss wurden die Proben mit einem Durchflusszytometer untersucht. Überprüft wurde hierbei die prozentuale Verteilung von jungen und alten Thrombozyten 12 Stunden nach Applikation des Erstantikörpers. Im Mittel betrug der Anteil alter Thrombozyten nach 12 Stunden $84,93 \pm 2,62 \%$ ($n = 10$), der Anteil junger Thrombozyten $15,07 \pm 2,62 \%$ ($n = 10$) (Abb. 31).

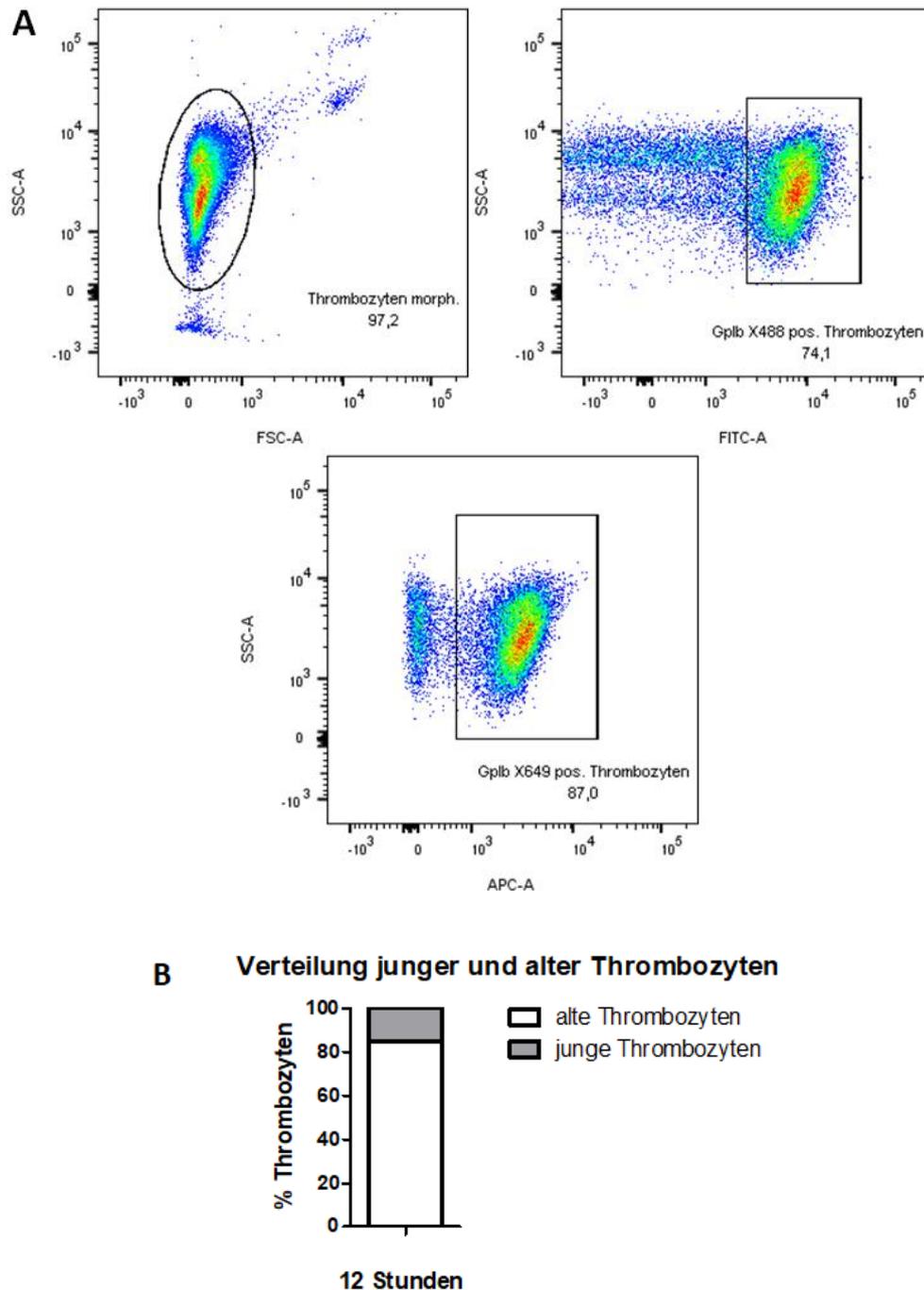


Abbildung 31: Detektion von jungen und alten Thrombozyten in vivo nach 12 Stunden

A: Repräsentatives Beispiel eines FACS-Plots für die Unterscheidung zwischen jungen und alten Thrombozyten in vivo, Links: Anhand des Forward- und Sideward-Scatter wurde die Population der Thrombozyten morphologisch eingegrenzt, Mitte: Überprüfung der morphologischen Population auf den 10 Minuten vor Blutentnahme applizierten GpIb X488 Antikörper = alle Thrombozyten, andere Zellen oder Zelltrümmer werden durch diesen Schritt aussortiert, Rechts: Überprüfung der GpIb X488 positiven Population auf den GpIb X649 Antikörper = Thrombozyten, die älter als 12 Stunden sind; Aus der Differenz 100% - 87% alte Thrombozyten ergibt sich der Anteil der in den letzten 12 Stunden gebildeten Thrombozyten, im vorliegenden Beispiel 13,0%; B: Verteilung junger und alter Thrombozyten nach 12 Stunden

8. Flusskammerversuche

8.1. Reaktivität junger und alter Thrombozyten in Flusskammerversuchen

Um in einem weiteren Versuchsaufbau die unterschiedliche Reaktivität von jungen und alten Thrombozyten zu untersuchen, wurden Flusskammerversuche durchgeführt. Hiermit sollte *in vitro* das arterioläre System nachgestellt werden, sprich die Durchflussraten der Flusskammern wurden so gewählt, dass sie einer arteriolären shear rate entsprachen. Für die Vorbereitung und Durchführung der Versuche siehe Kapitel IV 4.2.3 und 3.5. Die Flusskammern wurden im Anschluss mit einem Konfokalmikroskop analysiert (Abb. 32). Zusätzlich wurden sämtliche Proben mit einem Durchflusszytometer auf die Verteilung von jungen und alten Thrombozyten im Vollblut analysiert. Somit konnten die prozentualen Anteile adhärenter Thrombozyten beider Populationen in den Flusskammern mit deren Verteilung im Vollblut verglichen werden.

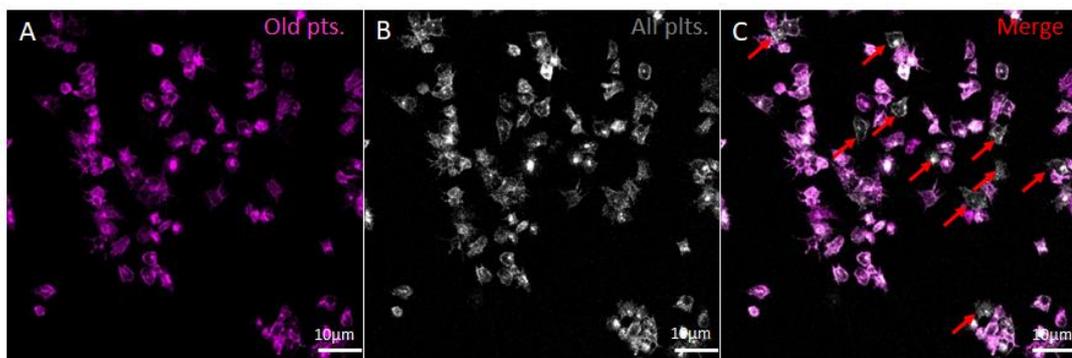


Abbildung 32: Repräsentatives Beispiel für die Identifizierung junger und alter Thrombozyten in Flusskammerversuchen

A: Alle für den zuerst injizierten GpIb X649 Antikörper positiven Thrombozyten; B: Alle für den zuletzt injizierten GpIb X488 Antikörper positiven Thrombozyten; C: Überlagerung beider Kanäle; roten Pfeile: Thrombozyten, die nur für den GpIb X488 Antikörper positiv sind und somit in den letzten 12 Stunden gebildet wurden.

8.1.1. Flusskammer beschichtet mit Kollagen

Nach händischer Auszählung der Anzahl adhärenter junger und alter Thrombozyten in den Flusskammern und Bestimmung der beiden Populationen im Vollblut mittels Durchflusszytometrie, konnten die Werte miteinander verglichen werden. Hierbei konnten wir feststellen, dass es im Vollblut keinen signifikanten Unterschied der beiden Populationen in der unbehandelten und der mit ASS behandelten Gruppe gab (unbehandelte Gruppe: alt Vollblut $87,8 \pm 1,6$, jung Vollblut $12,2 \pm 1,6$; ASS behandelte Gruppe: alt Vollblut $88,8 \pm 2,3$, jung Vollblut $11,2 \pm 2,3$, $p = \text{n.s.}$, $n = 6$) (Abb. 33). Im Gegensatz dazu adhärten die jungen Thrombozyten der mit ASS behandelten Gruppe

in den Flusskammerversuchen überproportional stark (unbehandelte Gruppe: alt FC $88,5 \pm 1,9$, jung FC $11,5 \pm 1,9$; ASS behandelte Gruppe: alt FC $81,5 \pm 2,1$, jung FC $18,5 \pm 2,1$, $p < 0,001$, $n = 6$) (Abb. 34). Dieser signifikante Unterschied weist darauf hin, dass junge Thrombozyten im Vergleich zu alten unter ASS-Behandlung vermehrt zu einer Aggregation neigen.

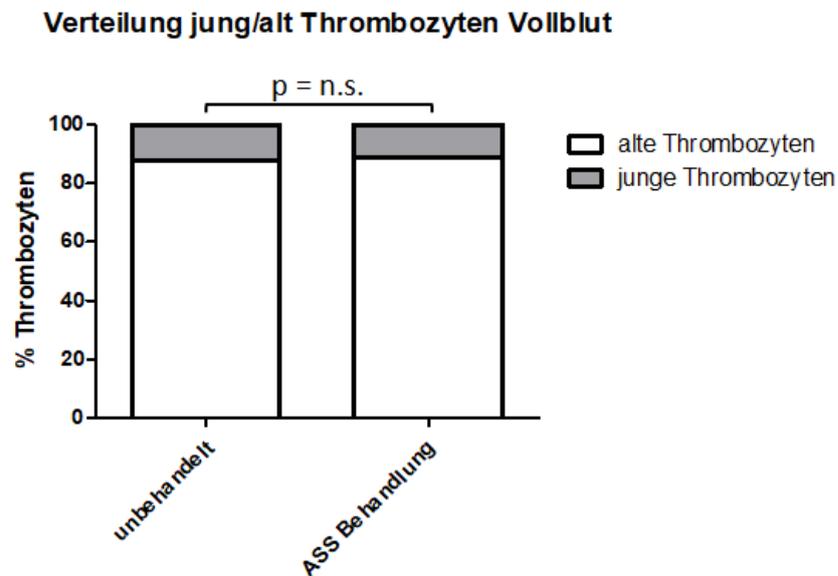


Abbildung 33: Verteilung der jungen und alten Thrombozyten im Vollblut

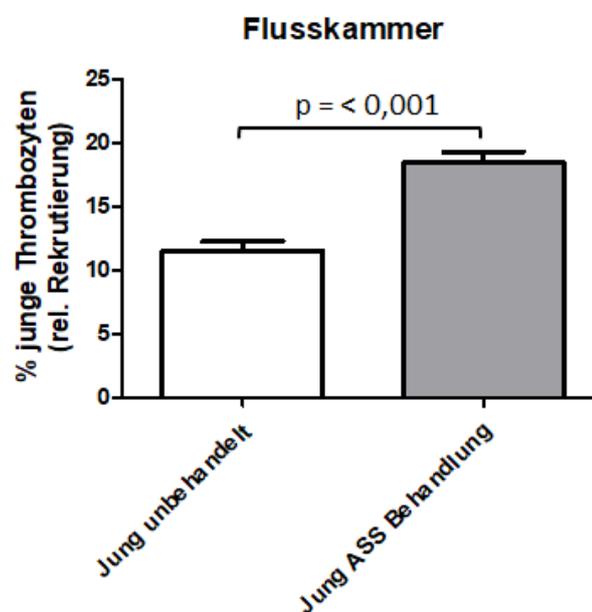


Abbildung 34: Relative Rekrutierung junger Thrombozyten in den Flusskammern beschichtet mit Kollagen

8.1.2. Flusskammer beschichtet mit humanem Plaquematerial

Durch die Beschichtung der Flusskammern mit humanem Plaquematerial sollte ex vivo die Situation eines rupturierten atherosklerotischen Plaque nachgestellt werden. Statt wie in den vorangegangenen Versuchen mit Kollagen, wirken so eine Vielzahl von Aktivierungsfaktoren der Gerinnungskaskade auf die durch die Flusskammer fließenden Thrombozyten ein. Für die Vorbereitung und Durchführung der Versuche siehe Kapitel IV 4.2.3 und 3.5. Nach durchflusszytometrischen Untersuchungen und Auswertung der mittels Konfokalmikroskopie gewonnenen Bilder, konnte auch in diesem Versuchsaufbau gezeigt werden, dass junge Thrombozyten unter Behandlung mit Acetylsalicylsäure reaktiver sind, als in einer Kontroll Gruppe. Während sich im Vollblut keine signifikanten Unterschiede zwischen jungen und alten Thrombozyten der unbehandelten und behandelten Gruppe zeigten (alt unbehandelt $83,5 \pm 3,3$, jung unbehandelt $16,5 \pm 3,3$, alt ASS behandelt $81,3 \pm 2,3$, jung ASS behandelt $18,7 \pm 2,3$, $p = n.s.$, $n = 5$, Abb. 35), so war bei den Flusskammerversuchen der prozentuale Anteil junger Thrombozyten in der mit Acetylsalicylsäure behandelten Gruppe signifikant erhöht (alt unbehandelt $88,9 \pm 1,3$, jung unbehandelt $11,1 \pm 1,3$, alt ASS behandelt $83,0 \pm 1,2$, jung ASS behandelt $17,0 \pm 1,2$, $p < 0,001$, $n = 5$, Abb. 36). Daraus lässt sich schließen, dass auch bei einer Beschichtung mit humanem Plaquematerial die jungen Thrombozyten nach Acetylsalicylsäure Behandlung im Vergleich zu alten Thrombozyten übermäßig an Aggregationsvorgängen beteiligt sind.

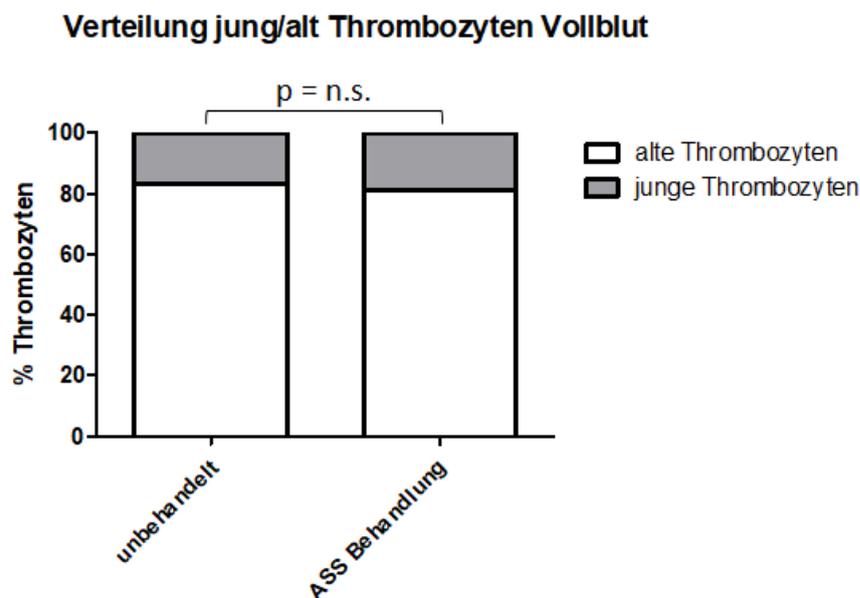


Abbildung 35: Verteilung der jungen und alten Thrombozyten im Vollblut

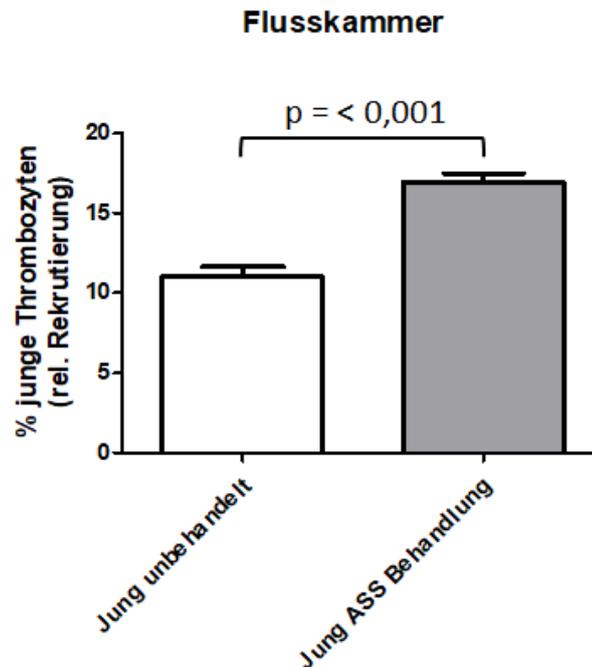


Abbildung 36: Relative Rekrutierung junger Thrombozyten in den Flusskammern beschichtet mit humanem Plaquematerial

9. Nachweis junger und alter Thrombozyten in der arteriellen Thrombose der *Arteria carotis*

Mit Hilfe der arteriellen Thrombose induziert durch eine FeCl_3 Schädigung und anschließender histologischer Aufarbeitung mit einem Konfokalmikroskop ist es uns erstmalig gelungen, zwischen den beiden Populationen Jung und Alt innerhalb des Thrombus zu unterscheiden und eine verminderte ASS Inhibition innerhalb der jungen Thrombozytenpopulation *in vivo* nachzuweisen. Für die Vorbereitungen und Durchführung der Versuche siehe Kapitel IV 2.6, 2.7.1 und 4.2.3 Wie schon bei den Flusskammerversuchen, nahmen die jungen Thrombozyten der mit ASS behandelten Gruppe überproportional an den Aggregationsprozessen teil. Außerdem dauerte es bei den mit Aspirin behandelten Mäusen signifikant länger, bis ein vollständiger Verschluss der *A. carotis* erreicht wurde (unbehandelt $5,00 \pm 0,79$ vs. ASS behandelt $7,90 \pm 0,74$, $p < 0,001$, $n = 5$), was für eine erfolgreiche und wirksame Applikation der Medikamente spricht (Abb. 37).

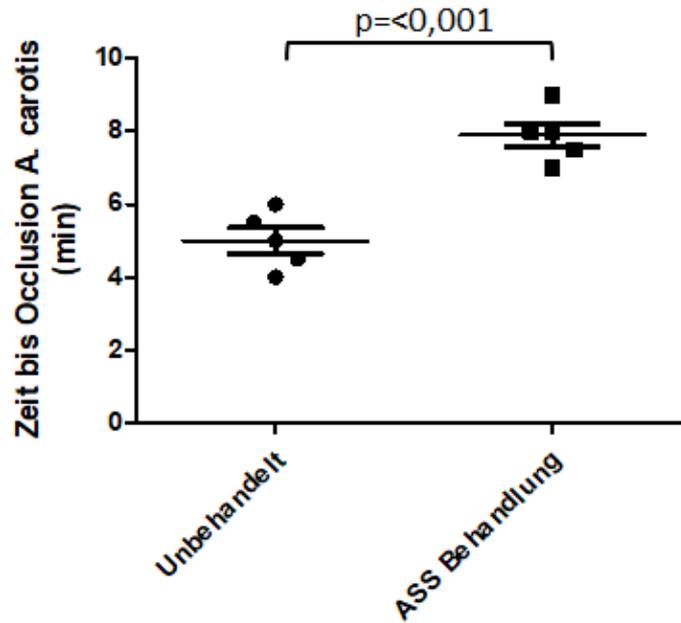


Abbildung 37: Zeit bis zum vollständigen Verschluss der A. carotis in einer unbehandelten und in einer mit ASS behandelten Gruppe

Von jedem generierten Thrombus wurden aus verschiedenen Abschnitten Proben gewonnen, pro Maus wurden so insgesamt 20 verschiedene Bilder eines Thrombus aufgenommen und mit ImageJ weiter analysiert.

Da auch hier eine Doppelfärbung der Thrombozyten angewendet wurde, konnte man innerhalb des Thrombus zwischen Bereichen mit alten Thrombozyten und Bereichen, in denen ausschließlich junge Thrombozyten präsent waren, unterscheiden, diese vermessen und die Ergebnisse in μm^2 festhalten (Abb. 38).

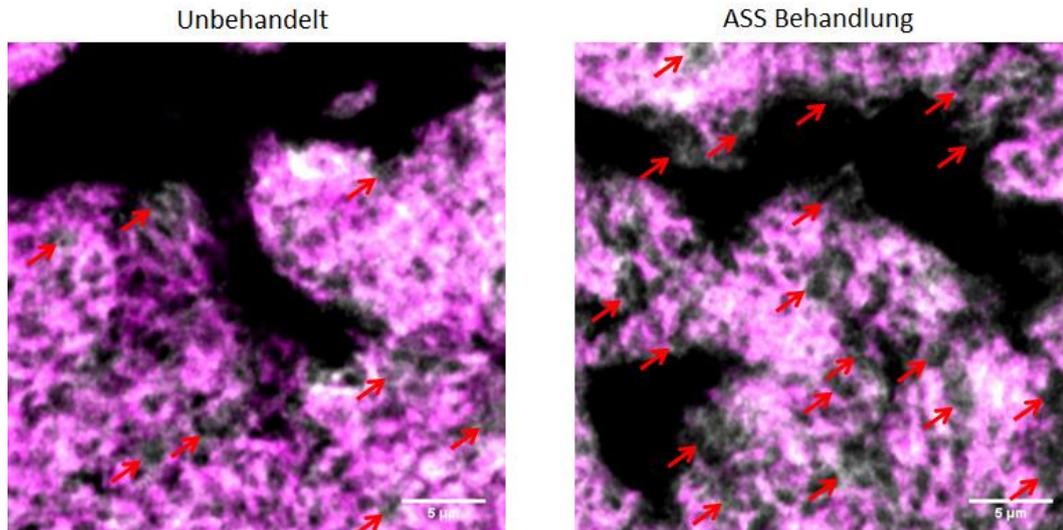


Abbildung 38: Repräsentatives Beispiel für die Unterscheidung zwischen Arealen mit jungen und alten Thrombozyten innerhalb einer arteriellen Thrombose

links: Ausschnitt eines Thrombus aus der *A. carotis* ohne vorherige Behandlung, rote Pfeile: Thrombozyten, die nur einfach positiv für den GpIb X488 Antikörper und somit jünger als 12 Stunden sind; rechts: Ausschnitt eines Thrombus aus der *A. carotis* mit Aspirin-Behandlung 1 Stunde vor Versuchsbeginn, rote Pfeile: einfach positive junge Thrombozyten, welche jünger als 12 Stunden sind, deutlich zu erkennen ist der flächenmäßig größere Anteil am Thrombus unter Aspirin Behandlung, zudem aggregieren die jungen Thrombozyten vermehrt untereinander und bilden Cluster.

Nach der Vermessung aller Thromben wurde ersichtlich, dass in der mit Aspirin behandelten Gruppe deutlich mehr junge Thrombozyten im Thrombosesgeschehen rekrutiert wurden, als im Vergleich zu der unbehandelten Gruppe. Um auch hier Vorerkrankungen der Tiere auszuschließen, wurde bei allen Mäusen zusätzlich Blut abgenommen, welches mit unserem Blutanalysegerät auf physiologische Thrombozytenwerte und mittels Durchflusszytometrie auf die Verteilung zwischen jungen und alten Thrombozyten untersucht wurde.

Im Mittel konnten im Vollblut $83,86\% \pm 2,591$ ($n = 5$) der Thrombozyten in der unbehandelten und $83,52\% \pm 1,567$ ($n = 5$) in der mit Aspirin behandelten Gruppe zu den alten Thrombozyten gezählt werden. Im Umkehrschluss waren $16,14\% \pm 2,591$ der Thrombozyten der unbehandelten und $16,48\% \pm 1,567$ der behandelten Gruppe den jungen Thrombozyten zuzuordnen. Somit ergab sich keine statistische Signifikanz zwischen der Verteilung beider Gruppen im Vollblut ($p = \text{n.s.}$, $n = 5$, Abb. 39).

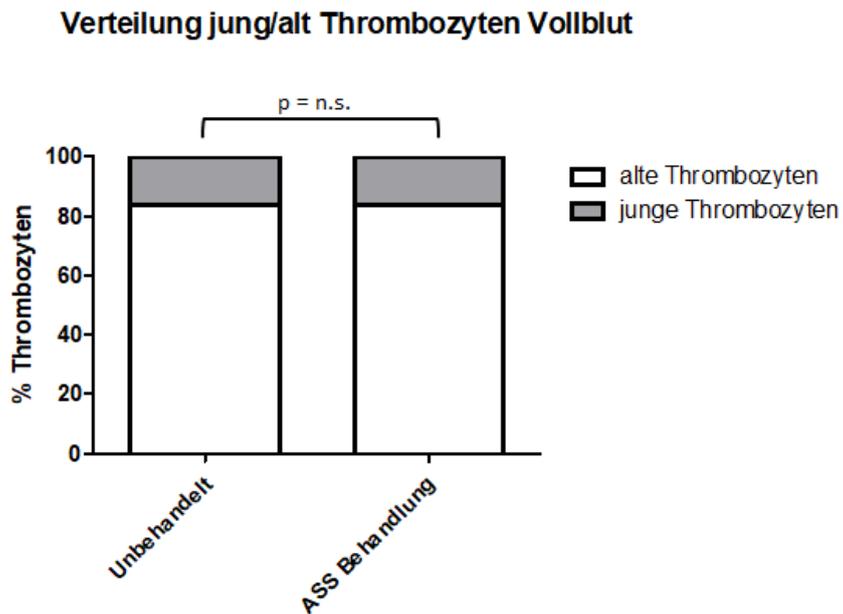


Abbildung 39: Prozentuale Verteilung von jungen und alten Thrombozyten im Vollblut beider Versuchsgruppen

mit/ohne ASS Behandlung, n=5

In der unbehandelten Gruppe gehörten im Mittel $92,59\% \pm 0,44$ ($n = 5$) der Thrombozyten, welche am Thrombosegeschehen beteiligt waren, zu der alten Population, während $7,41\% \pm 0,44$ der Thrombozyten der jungen Population zuzuordnen waren. In der mit Acetylsalicylsäure behandelten Gruppe hingegen gehörten lediglich $85,72\% \pm 1,05$ ($n = 5$) zu der alten, $14,25\% \pm 1,05$ der Thrombozyten jedoch zu der jungen Population. Während im Vollblut die prozentualen Anteile der jungen Populationen noch ausgeglichen waren, kam es durch die Behandlung mit Acetylsalicylsäure zu einer signifikant verstärkten Rekrutierung ($p = 0,008$) von jungen Thrombozyten, wodurch deren Beteiligung am Thrombosegeschehen ungefähr doppelt so groß war, wie in der unbehandelten Gruppe (Abb. 40).

Rel. Rekrutierung junger Thrombozyten

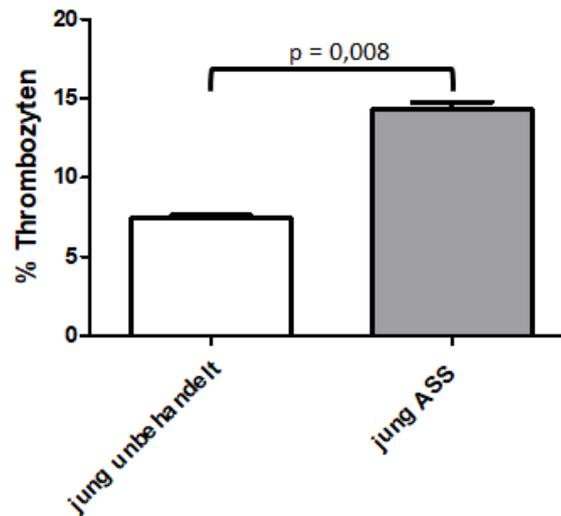


Abbildung 40: Prozentuale Verteilung der Flächen des Thrombus, welche ausschließlich aus einfach positiven, jungen Thrombozyten bestehen

10. Nachweis junger und alter Thrombozyten in der arteriölen Thrombose des *Musculus cremaster*

Neben der Makrozirkulation wollten wir überprüfen, ob es auch in der Mikrozirkulation möglich ist, zwischen jungen und alten Thrombozyten zu unterscheiden. Dies würde eine weitere Möglichkeit bieten, einzelne Zell-Zell-Interaktionen zu untersuchen. Die Wahl des Versuchsaufbaus ist hierbei auf die Induktion einer arteriölen Thrombose mittels FeCl_3 im *M. cremaster* gefallen. Für die Vorbereitung des Versuchs und die OP-Methodik siehe Kapitel IV 2.8 und 4.2.3.

Nach der *in vivo* Fixierung des *M. cremaster* und der histologischen Aufarbeitung wurden mit einem Konfokalmikroskop Aufnahmen der thrombotischen Bereiche angefertigt. Auch in diesem Versuchsaufbau war es möglich, innerhalb der aggregierten Thrombozyten aufgrund der Färbungen zwischen jungen und alten Plättchen zu unterscheiden. Da die Präparation des *M. cremaster* sehr anspruchsvoll ist und die Schädigung mit 1% FeCl_3 leicht zu einer kompletten Stase des Blutflusses innerhalb des Muskels führen kann, bedarf es noch einer weiteren Etablierung und Standardisierung dieses Versuchsaufbaus. Grundsätzlich konnte hiermit erstmals gezeigt werden, dass die Differenzierung zwischen der jungen und alten Population auch innerhalb der Mikrozirkulation möglich ist und noch hochauflösendere Bilder als in der *A. carotis* angefertigt werden können. Zusätzlich sollte es in diesem Modell auch möglich sein, Aufnahmen *in vivo* anzufertigen, wodurch einzelne Zell-Zell-Interaktionen von jungen und alten Thrombozyten in der Initialphase der Entstehung einer Thrombose untersucht werden könnten (Abb. 41).

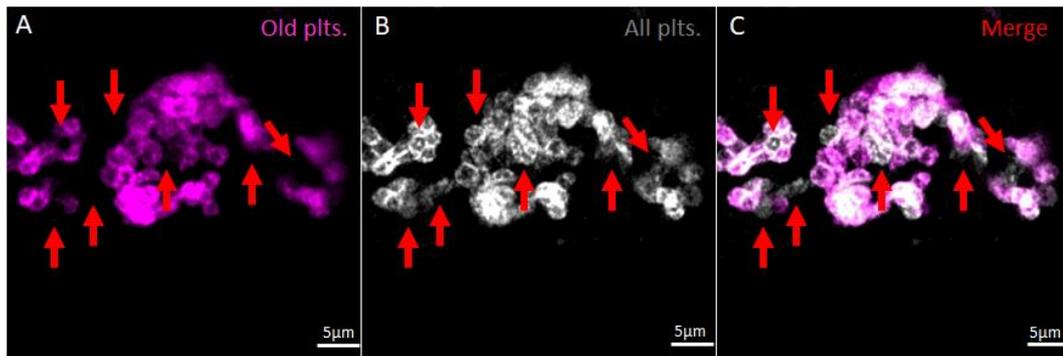


Abbildung 41: Repräsentatives Beispiel einer Thrombose ausgelöst im *M. cremaster* mittels 1% FeCl₃

Durch die in vivo durchgeführte Doppelfärbung kann man auch in der Mikrozirkulation zwischen jungen und alten Thrombozyten unterscheiden; A: Thrombozyten, die für den GpIb X649 Antikörper positiv sind; B: Thrombozyten, die für den GpIb X488 Antikörper positiv sind; C: Überlagerung beider Farbkanäle; rote Pfeile: Thrombozyten, die nur für den zuletzt injizierten GpIb X488 positiv sind und somit innerhalb der letzten 12 Stunden in den Blutkreislauf entlassen wurden.

VI. DISKUSSION

Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit war eine nähere Untersuchung der Funktion von retikulierten Thrombozyten im Kontext der arteriellen Thrombose *in vivo*. Die neu entwickelten Methoden für die Untersuchung von jungen und alten Thrombozyten und deren Beteiligung an Thrombosen soll es zukünftig ermöglichen, genauere Erkenntnisse über die Rolle der retikulierten Thrombozyten zu erlangen und so langfristig Therapien für die gezielte Inhibition dieser anbieten zu können.

1. Modell für die Untersuchung von retikulierten Thrombozyten *in vivo*

1.1. Antikörper-mediierte Depletion der Thrombozyten

Um eine gezielte Untersuchung von retikulierten Thrombozyten im Vergleich zu nicht retikulierten Thrombozyten zu ermöglichen, sollte durch die immunmedierte Thrombozytopenie der IPF-Wert an der Gesamtheit aller Thrombozyten deutlich erhöht werden. Durch entsprechende Zählungen der Thrombozytenwerte mittels Blutanalysegerät konnten wir nachweisen, dass die Depletion erfolgreich war und eine massive Thrombopoese ausgelöst wurde. Nach annähernd 72 Stunden lagen die Thrombozytenwerte wieder innerhalb der physiologischen Referenzwerte. Dieser Zeitpunkt wurde daher gewählt, um im Anschluss Thromboseversuche in der *A. carotis* durchzuführen. Zum einen ist nach 72 Stunden, wie wir zeigen konnten, der Anteil an retikulierten Thrombozyten im Blutkreislauf weiterhin deutlich erhöht, zum anderen reicht der Thrombozytenwert aus, um eine negative Beeinflussung der sich anschließenden Thrombose Versuche auszuschließen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass in diesem Modell die arterielle Thrombose der *A. carotis* ab einem Wert von $>300 \times 10^3$ Thrombozyten/ μl nicht mehr beeinflusst wird (181).

Bei den anschließenden Thrombose-Versuchen in der *A. carotis*, induziert durch eine oxidative FeCl_3 Schädigung, gab es weder bei der Zeit bis, der Dauer, noch bei der Anzahl der Okklusionen einen signifikanten Unterschied zwischen der depletierten und einer Kontroll-Gruppe. Der sehr vielversprechende Versuchsansatz der Immunthrombozytopenie scheint somit für die hier behandelte Fragestellung leider nicht geeignet zu sein, da die physiologischen Eigenschaften von retikulierten Thrombozyten zu stark beeinflusst werden. Dass dadurch unsere Hypothese einer erhöhten Reaktivität von jungen bzw. retikulierten Thrombozyten in diesem Modell nicht bestätigt werden konnte, scheint ein multifaktorielles Geschehen zu sein.

So konnten Hoffmann et al. zeigen, dass als Reaktion auf eine starke Thrombozytopenie die Thrombopoese um das 10fache gesteigert werden kann. Unter steady state Bedingungen wird bei der Produktion von Thrombozyten durch körpereigene Regulationsmechanismen streng darauf geachtet, dass die Anzahl der zirkulierenden Thrombozyten und deren mittleres Volumen (Plateletcrit = Anzahl der Thrombozyten x MPV) konstant bleibt. Kommt es aber zu Stresssituationen, wie z.B. zu der hier durch Antikörper medierte Thrombozytopenie, dann werden neue Thrombozyten zu einem früheren unreifen Stadium aus den Megakaryozyten entlassen und besitzen ein deutlich größeres Volumen als gewöhnlich (6). Ebenfalls konnten Ingram et al. zeigen, dass es bei einer gesteigerten Thrombopoese, ausgelöst durch einen akuten Blutverlust, zu einer Bildung von morphologisch abnormalen Thrombozyten kam (2).

Zeitgleich zu den hier durchgeführten Versuchen publizierte die Gruppe um Gupta et al. ähnliche Ergebnisse. In dieser Publikation wurde ebenfalls eine Antikörper medierte Thrombozytopenie mit anschließender Thrombose ausgelöst. Analog zu unseren Ergebnissen hat sich kein signifikanter Unterschied zwischen den depletierten Tieren und der Kontrollgruppe ergeben, was darauf hinweist, dass es in diesem Versuchsaufbau keine erhöhte Reaktivität seitens der retikulierten Thrombozyten gibt. Gupta et al. konnten hierbei nachweisen, dass der durch die Bindung von Kollagen an den GPVI-Rezeptor auf der Thrombozytenoberfläche aktivierte Signalweg bei durch einer akuten Thrombozytopenie neu gebildeten Thrombozyten teilweise inaktiv ist und erst nach einer gewissen Zeit im Blutkreislauf aktiviert wird. Dies wird mit dem hohen Gehalt an Kollagen im Knochenmark in Verbindung gebracht (besonders in den Sinusoiden), wo die neuen Plättchen gebildet werden und einen Teil ihrer Reifung erfahren. Würde der GPVI-Signalweg im Knochenmark vollständig aktiv sein, dann würden die neu produzierten Thrombozyten schon aktiviert werden, bevor sie überhaupt in die Blutzirkulation entlassen werden. Somit stellt die Inaktivierung einen Schutzmechanismus vor einer zu frühen Aktivierung der Thrombozyten dar (182).

1.2. Modell für die Untersuchung von retikulierten Thrombozyten im steady state

Mit der Annahme, dass retikulierte Thrombozyten gerade frisch in den Blutkreislauf entlassen wurden und somit mit ihrem Alter korrelieren, etablierten wir nun ein Modell für die Färbung der jungen Thrombozyten. Hierzu wurde zunächst die mediane Überlebenszeit muriner Thrombozyten bestimmt. Da in der Literatur die Angaben zwischen vier bis acht Tagen variiert, sollte so ein präziserer Wert ermittelt werden.

Bei unseren Untersuchungen stellte sich heraus, dass die Überlebenszeit ungefähr vier Tage betrug, folglich ca. 25% der Thrombozyten täglich erneuert wurden. Mäuse durchlaufen unter steady state Bedingungen einer fast doppelt so hohen Neubildung (turnover) der Thrombozyten, wie im Vergleich zum Menschen. Da der Anteil retikulierter Thrombozyten mit der Stärke der Thrombopoese korreliert, liegt bei der Maus somit ein relativ hoher IPF Wert vor. Der Anteil zirkulierender RP reflektiert die Aktivität der Megakaryopoese im Knochenmark (6, 8).

In weiteren Versuchsreihen wurde festgestellt, dass innerhalb von 12 Stunden ein genügend großer Anteil muriner Thrombozyten erneuert wurde, um diese junge Population in sich anschließenden Versuchen zu analysieren (siehe Kapitel V 8). Da im Vergleich zum Menschen murine Thrombozyten eine ungefähr halb so lange Überlebenszeit besitzen, reicht dieser Zeitraum aus, um genug junge Thrombozyten zu produzieren. Würde man selbigen Versuchsaufbau auf den Menschen übertragen, so müsste eine neue Zeitspanne bis zum Versuchsbeginn etabliert werden. Nach 12 Stunden wäre wahrscheinlich ein verschwindend geringer Anteil von Thrombozyten neu produziert worden und würde für eine genauere Untersuchung nicht ausreichen. Zusätzlich ist in der Literatur beschrieben, dass die anfänglich in den Thrombozyten enthaltene megakaryozytäre RNA erst innerhalb der ersten 24 Stunden nach Entlassung in den Blutkreislauf größtenteils abgebaut wird und die Plättchen in dieser Zeit noch zu einer Proteinbiosynthese befähigt sind (102, 104). Aus diesem Grund haben wir uns dazu entschieden, sämtliche im Anschluss durchgeführten Versuche 12 Stunden nach Injektion des Erstantikörpers durchzuführen. Somit konnte eine Standardisierung der Versuchsaufbauten mit einer großen Reproduzierbarkeit erreicht werden.

1.2.1. Korrelation von jungen Thrombozyten mit retikulierten Thrombozyten

Um die Ergebnisse bzw. die Hypothese der vorausgegangenen Versuche, dass ein Großteil der jungen Thrombozyten zu den RP gehört, abzusichern, wurden die beiden Populationen der Thrombozyten zusätzlich auf ihren RNA-Gehalt überprüft. Hierzu wurden neben der Doppelfärbung der Thrombozyten, mit der es möglich war, zwischen einer jungen und einer alten Population von Thrombozyten zu differenzieren (pulse labelling), RNA-Farbstoffe eingesetzt (TO, RNaselect, Syto13). Während es hierbei zu einer signifikanten Anfärbung der jungen Population mit RNA-Farbstoffen kam, färbte sich die alte Population der Thrombozyten kaum mit RNA-Farbstoffen an. Da die Fluoreszenzintensität mit der Anzahl der gebundenen RNA-Farbstoffe korreliert, lässt sich eine quantitative Aussage über den RNA-Gehalt der einzelnen Thrombozyten ableiten. Dieses Ergebnis ist eine weitere Bestätigung der Hypothese, dass ein großer Anteil der jungen Thrombozyten auch zu den retikulierten Thrombozyten gezählt werden kann.

Zusätzlich zu den durchflusszytometrischen Untersuchungen, wurden mit denselben Proben Aufnahmen an unserem Konfokalmikroskop angefertigt. Bei den Aufnahmen war deutlich zu erkennen, dass sich ausschließlich junge Thrombozyten mit den verwendeten RNA-Farbstoffen anfärben ließen, wodurch unsere Hypothese erneut bestätigt wurde. Diese Unterschiede konnten mit einem Konfokalmikroskop dargestellt werden, für die *in vivo* Versuche mit einem Epifluoreszenzmikroskop war die Fluoreszenz der RNA-Farbstoffe aber nicht stark genug.

Aus diesem Grund konnten wir mit unserem pulse labeling und der Doppelfärbung der Thrombozyten eine zuverlässige und reproduzierbare Methode entwickeln, um die junge und die alte Population der Thrombozyten zu identifizieren und deren Funktion genauer zu untersuchen. Die Korrelation von diesen mit ihrem messbaren RNA-Gehalt hat uns in dieser Entscheidung bestärkt. Im Gegensatz zu den RNA-Farbstoffen sind die beiden GpIb Farbstoffe *in vivo* einsetzbar, haben eine genügend starke Fluoreszenz, um diese zu detektieren und es kommt zu keiner unnötigen Manipulation der Thrombozyten, welche zu einer Voraktivierung hätte führen können. Zusätzlich ist für beide Antikörper beschrieben, dass sie *in vivo* weder die Thrombozytenadhäsion noch die Aggregation beeinflussen (175, 176). Limitierender Faktor bei dieser Methode bleibt, dass nicht alle Thrombozyten der jungen Population zu den retikulierten Thrombozyten gehören. Zwar wird im Schnitt erst innerhalb der ersten 24 Stunden nach Entlassung in den Blutkreislauf die RNA größtenteils abgebaut, teilweise wird dies aber auch schon früher der Fall sein. In den vorliegenden Versuchen waren alle jungen Plättchen nicht älter als 12 Stunden, wodurch diese Problematik umgangen werden sollte. Dennoch wird ein Teil von Ihnen bereits ihre RNA, zumindest partiell, abgebaut haben, wodurch sie streng genommen nicht mehr zu den retikulierten Thrombozyten gehören würden. Nichts desto trotz gibt es einen signifikanten Zusammenhang zwischen jungen Thrombozyten und deren RNA-Gehalt, was für einen hohen Anteil an RP innerhalb dieser Population spricht.

1.2.2. Charakterisierung von Oberflächen- und Aktivierungsmarkern der jungen und alten Thrombozyten

Im nächsten Schritt wurde eine Charakterisierung von wichtigen Oberflächen- und Aktivierungsmarkern der jungen und alten Thrombozyten vorgenommen. CD61 (Integrin $\beta 3$) bildet zusammen mit Integrin $\alpha 5$ einen heterodimeren Rezeptor, an den z.B. Thrombospondin oder der Von-Willebrand-Faktor binden können und ist an den Adhäsionsprozessen von Thrombozyten beteiligt (183). CD62-P (P-Selektin) ist ein Oberflächenprotein und vermittelt die Zellkontakte zwischen Thrombozyten und Leukozyten, ist somit ebenfalls an der Zelladhäsion beteiligt (184). GPIX (CD42a) bildet zusammen mit GpIb und GPV den von-Willebrand-Rezeptor-Komplex und ist über die

Bindung von Kollagen an der Thrombozytenadhäsion nach einer Gefäßverletzung beteiligt (185). GPVI ist ein Membranrezeptor der Thrombozyten und bindet direkt an Kollagen, wodurch die Aktivierung der Thrombozyten initiiert wird (186). JON/A (GpIIb/IIIa, CD41/CD61) ist ein zusammengesetztes Glykoprotein, kommt auf der Oberfläche von aktivierten Thrombozyten vor und kann den vWF, Fibronektin und Fibrinogen binden, wodurch die Aggregation von Thrombozyten gefördert wird (187). Mit Hilfe von durchflusszytometrischen Messungen konnten wir zeigen, dass alle hier untersuchten Oberflächen- und Aktivierungsmarker in der jungen Population überrepräsentiert waren. Lediglich JON/A wurde in beiden Populationen in etwa gleich stark exprimiert. CD62-P, GPVI und GPIX wurden hierbei signifikant höher in der Population der jungen Thrombozyten exprimiert. CD61 war ebenfalls deutlich stärker in der jungen Population zu finden, eine statistische Signifikanz wurde nur knapp verfehlt. Dass bis auf JON/A sämtliche Oberflächen- und Aktivierungsmarker vermehrt auf jungen Thrombozyten exprimiert wurden, ist ein eindeutiger Hinweis darauf, dass RP durch die erhöhte Anzahl leichter und schneller durch entsprechende Stimulantien aktiviert werden können, wodurch ihre Hyperreaktivität erklärt werden kann.

In einer Studie von Handtke et al. wurden Thrombozyten nach ihrer Größe sortiert, da diese ebenfalls mit dem Alter korreliert. Junge Thrombozyten weisen hierbei in der Regel ein größeres Volumen auf als alte Thrombozyten. In dieser Arbeit wurde ein anderer Ansatz verfolgt, um zwischen jungen und alten Thrombozyten zu unterscheiden, die Ergebnisse weisen aber in dieselbe Richtung, wie die hier in der Doktorarbeit gewonnenen Erkenntnisse (188). Zwar wurden teilweise andere Oberflächenmarker getestet, aber auch hier war eine unterschiedliche Verteilung zwischen den beiden Populationen zu erkennen. Große Thrombozyten, sprich vorwiegend die junge Population, wiesen 30-50% mehr GpIa, GpIb, GpIIa, GpVI und P₂Y₁₂-Rezeptoren auf ihrer Membran auf. Außerdem wiesen sie eine deutlich erhöhte Reaktivität bei ihrer Aggregation *in vitro* auf. Zu erwähnen bleibt, dass dieser quantitative Unterschied, zumindest in der Studie von Handtke et al., relativ zu der Größe der Thrombozyten war. Wurde die Größe aller Plättchen normiert, dann war das Verhältnis zwischen Oberfläche und Anzahl der Rezeptoren wieder gleich (Rezeptordichte). In unserer eigenen Arbeitsgruppe konnten wir in vorangegangenen Studien hingegen zeigen, dass RP unabhängig von ihrer Größe mehr Oberflächen- und Aktivierungsmarker exprimieren, sprich eine höhere Rezeptordichte besitzen (noch nicht veröffentlichte Daten). Studien anderer Gruppen unterstützen diese Erkenntnisse (189). Vorteile unserer Studie waren, dass wir mittels pulse labelling in Kombination mit der Doppelfärbung eine zuverlässige und reproduzierbare Methode entwickelt haben, um *in vivo* sämtliche Thrombozyten anzufärben und in der Folge zwischen einer alten und jungen Population unterscheiden zu können. Somit kam es außer bei der Blutentnahme und der

Zugabe der Antikörper für die Anfärbung der Oberflächen- und Aktivierungsmarker zu keiner mechanischen Manipulation der Thrombozyten, wodurch eine Aktivierung dieser größtenteils ausgeschlossen werden konnte. Besonders bei der Untersuchung von Oberflächen- und Aktivierungsmarkern ist dies ein wichtiger Aspekt, da diese nach Aktivierung der Thrombozyten vermehrt auf der Oberfläche exprimiert werden und die Versuchsergebnisse verfälschen.

Unabhängig davon, ob die Anzahl an Oberflächen- und Aktivierungsmarkern auf der Membran der Thrombozyten von ihrer Größe abhängt oder nicht, zeigt sich bei jungen Thrombozyten eine erhöhte absolute Rezeptordichte. Dadurch können mehr aktivierende Faktoren, wie z.B. Kollagen, direkt an GpVI und über die Bildung des von-Willebrand-Rezeptor-Komplexes an GPIIb/IIIa, oder Fibrinogen an JON/A binden. Auch ist es z.B. möglich, dass durch die erhöhte Expression von CD62-P eine vermehrte Interaktion zwischen Thrombozyten und Leukozyten in thromboinflammatorischen Prozessen ermöglicht wird. Sehr wahrscheinlich kommt es durch die vermehrte Anzahl zu einer schnelleren outside-in Signaltransduktion in den Thrombozyten. Durch die quantitative Erhöhung der Rezeptordichte reagieren junge Thrombozyten somit besonders sensitiv auf einen Stimulus.

2. Funktionelle Untersuchung von jungen und alten Thrombozyten

2.1. Spreadingversuche

Neben dem erhöhten RNA-Gehalt von jungen Thrombozyten, konnten wir die zuvor beschriebene Korrelation zwischen Alter und Größe mit Hilfe unserer Spreadingversuche nachweisen. Kommt es zu einer erfolgreichen Aktivierung der Thrombozyten, dann breiten sich diese in der Folge aus und es kommt zu einer Vergrößerung ihrer Oberfläche. Unabhängig davon, ob die Plättchen unstimuliert oder stimuliert (Thrombin, Kollagen) waren, gab es in allen Gruppen eine deutliche Tendenz, dass junge Thrombozyten eine größere Oberfläche aufweisen. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit der Feststellung, dass sie quantitativ mehr Oberflächen- und Aktivierungsmarker besitzen und auf eine Aktivierung schneller und reaktiver reagieren können. Zusätzlich kam es bei der Stimulation mit Thrombin zu einem signifikanten Unterschied der Oberflächen zwischen der alten und jungen Population, wobei die jungen Thrombozyten sich deutlich mehr ausgebreitet haben. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass sich junge Thrombozyten im Vergleich zu alten Thrombozyten übermäßig stark mit Thrombin stimulieren lassen.

2.2. Flusskammerversuche

Im nächsten Schritt sollten funktionelle Unterschiede zwischen jungen und alten Thrombozyten in Flusskammerversuchen analysiert werden. In den Flusskammern haben wir *in vitro* mit Hilfe der gewählten Durchflussrate ein arterioläres System nachgestellt, sprich shear rate und shear stress besaßen dieselben Werte, wie sie auch in Arteriolen vorkommen.

Die Flusskammern wurden hierbei sowohl mit Kollagen, als auch mit humanem Plaquematerial beschichtet. Die Beschichtung mit Plaquematerial hatte den Vorteil, dass wir *in vitro* die Ruptur eines atherosklerotischen Plaque simulieren konnten. Im Gegensatz zu den mit Kollagen beschichteten Kammern, kamen hierbei die Thrombozyten mit einer Vielzahl von aktivierenden Substanzen in Kontakt (z.B. Tissue Faktor, Kollagen, Fibrinogen, Thrombin, vgl. Kapitel II 2.4, Abb. 4).

Trotz der Hinweise auf eine erhöhte Reaktivität junger Thrombozyten in den vorausgegangenen Versuchen (quantitativ mehr wichtige Oberflächen- und Aktivierungsmarker in der jungen Population, Spreadingversuche mit einer übermäßig starken Aktivierung durch Thrombin), konnte diese im steady state mit unbehandelten Vollblut Proben nicht nachgewiesen werden. Die Verteilung der adhärenen jungen und alten Thrombozyten in den Flusskammern beschichtet mit Kollagen entsprach der Verteilung, wie sie auch im Vollblut vorlag. In den Flusskammern beschichtet mit humanem Plaquematerial konnten insgesamt sogar weniger junge Thrombozyten als im Vollblut nachgewiesen werden, allerdings ist dies auf die räumliche Ausdehnung des Plaquematerials zurückzuführen. Hierdurch kamen Thrombozyten teilweise übereinander zum Liegen, wodurch nicht alle jungen Thrombozyten zweifelsfrei als solche identifiziert werden konnten.

Dennoch konnte mit den Flusskammerversuchen in Verbindung mit unserem pulse labelling und der Doppelfärbung eine neue und gut reproduzierbare Methode entwickelt werden, um *in vitro* funktionelle Untersuchungen an jungen und alten Thrombozyten vorzunehmen.

2.3. Thromboseversuche mit der *Arteria carotis*

Im Anschluss an die Flusskammerversuche, wollten wir die funktionellen Unterschiede von jungen und alten Thrombozyten in einem *in vivo* System untersuchen, wobei die Wahl auf die Induktion einer arteriellen Thrombose in der *A. carotis* fiel. Im Gegensatz zu den bisherigen *in vitro* Versuchen kommt es hierbei zu keinerlei Manipulation der Thrombozyten, wodurch eine Voraktivierung ausgeschlossen werden kann. Mit Hilfe des pulse labellings und der Doppelfärbung der Thrombozyten war es auch hier möglich, zuverlässig und reproduzierbar zwischen alten und jungen Thrombozyten zu unterscheiden. Entscheidender Vorteil in diesem Modell ist, dass die physiologischen

Funktionen der Thrombozyten nicht beeinflusst werden, da sämtliche Vorgänge in einem *in vivo* System stattfinden.

Wie schon zuvor bei den Flusskammerversuchen, konnten wir in einer unbehandelten Versuchsgruppe keine funktionellen Unterschiede im Thrombosegeschehen zwischen der jungen und alten Population feststellen. Diese Ergebnisse sprechen erneut dafür, dass unter *steady state* Bedingungen junge Thrombozyten keine erhöhte Reaktivität aufweisen. Zwar waren im Thrombus selbst insgesamt weniger junge Thrombozyten nachweisbar als im Vollblut, allerdings lässt sich dies durch die Komplexität des entstandenen Thrombus erklären. Obwohl mit 5µm eine möglichst dünne Schnittdicke der histologischen Proben gewählt wurde, haben sich die Thrombozyten teilweise überlagert, wodurch nicht jeder junge Thrombozyt zweifelsfrei identifiziert werden konnte.

Auch wenn keine funktionellen Unterschiede bzw. eine erhöhte Reaktivität der jungen Thrombozyten im *steady state* nachweisbar waren, konnten wir durch die Etablierung unseres *pulse labellings* in Kombination mit der Doppelfärbung zeigen, dass man auch innerhalb von *in vivo* Versuchen zwischen einer jungen und einer alten Population von Thrombozyten unterscheiden kann. Für die Zukunft ergeben sich hieraus eine Vielzahl an neuen Untersuchungsmöglichkeiten.

2.4. Thromboseversuche mit dem *Musculus cremaster*

Mit den Thrombose Versuchen im *M. cremaster* war es uns möglich zu zeigen, dass die Etablierung unserer *in vivo* Färbung für die Differenzierung zwischen jungen und alten Thrombozyten auch in der Mikrozirkulation anwendbar ist. Wie bei den Versuchen in der *A. carotis* ist hier der entscheidende Vorteil, dass sämtliche Prozesse des Thrombosegeschehens in einem *in vivo* System unter physiologischen Bedingungen ablaufen. In Zukunft sollte es mit diesem Versuchsaufbau möglich sein, dass durch die hohe Auflösung der generierten Bilder einzelne Thrombozyten und deren Interaktion mit anderen Zellen (z.B. Leukozyten), oder mit dem Gefäßendothel analysiert werden können. In Bezug auf die Frage einer erhöhten Reaktivität junger Thrombozyten ist hier die Initialphase der Entstehung einer Thrombose von besonderem Interesse. So wäre es z.B. möglich, dass zum Beginn einer Thrombose vermehrt junge Thrombozyten rekrutiert werden und im weiteren Verlauf sämtliche andere Thrombozyten durch Ausschüttung ihrer Granula aktivieren. Insgesamt bietet sich durch die Etablierung der funktionellen Untersuchung in der Mikrozirkulation eine neue spannende Möglichkeit, um besonders *in vivo* die spezielle Funktion der RP weiter aufzuklären.

3. Hyperreaktivität der jungen Thrombozyten unter ASS-Behandlung

3.1. Validierung der intravenösen ASS-Applikation

Um die Ergebnisse der folgenden Flusskammer- und Thromboseversuche der *A. carotis* abzusichern, wurde zunächst mittels Multiplate-Analyse die Wirksamkeit unserer Acetylsalicylsäure-Applikation überprüft. Wie im Ergebnisteil bereits besprochen, kam es bei Stimulation mit AA zu keinerlei Aktivierung der mit ASS behandelten Gruppe, während es bei der Stimulation mit ADP in allen Gruppen zu einer starken Aktivierung kam (positiv Kontrolle), was für eine physiologische Funktion der Plättchen spricht. Die von uns gewählte Dosierung von 2µg/g KGW ASS war ausreichend, um eine vollständige Hemmung der Thrombozytenaggregation in den Multiplateversuchen zu erreichen. Dieser Test wird in der klinischen Chemie täglich zur Thrombozytenfunktionsdiagnostik angewendet und lässt eine verlässliche Beurteilung der Wirkung einer antithrombozytären Behandlung zu. Zusätzlich konnten Guthikonda et al. zeigen, dass sobald eine ausreichende Inhibition der Thrombozyten erreicht ist, eine Erhöhung der Dosierung keinen weiteren (positiven) Einfluss auf die Aggregationshemmung hat (11).

3.2. Klinische Relevanz der ASS

Da wir in der Flusskammer- und in den Thromboseversuchen unbehandelter Gruppen keine funktionellen Unterschiede zwischen jungen und alten Thrombozyten bzw. keine erhöhte Reaktivität von jungen Thrombozyten feststellen konnten, haben wir uns im Anschluss dafür entschieden, selbige Versuche unter ASS-Behandlung zu wiederholen. Aspirin besitzt bis heute eine große klinische Relevanz und wird sowohl für die primäre, als auch für die sekundäre Prävention bei kardiovaskulären Erkrankungen verwendet. ASS reduziert hierbei nicht nur signifikant das erstmalige Auftreten eines Herzinfarkts bei bereits vorliegenden kardiovaskulären Erkrankungen (primäre Prävention), sondern senkt auch signifikant das Risiko des Auftretens eines erneuten Herzinfarkts (sekundäre Prävention) (118, 120-122). Außerdem ist in der Literatur bereits beschrieben, dass kardiovaskuläre Erkrankungen oftmals in Verbindung mit einem erhöhten RP-Wert stehen und es dabei gleichzeitig zu einem schlechteren Ansprechen auf medikamentöse Behandlungen kommt (11, 109, 110).

3.3. Flusskammerversuche unter ASS-Behandlung

Bei der Durchführung der Flusskammerversuche unter ASS-Behandlung kam es zu einem signifikanten Anstieg der adhärennten jungen Thrombozyten im Vergleich zu der unbehandelten Gruppe, was auf eine verminderte Inhibition der Thrombozyten durch ASS hinweist. Diese Ergebnisse konnten wir sowohl in den Flusskammern beschichtet mit Kollagen, als auch bei der Beschichtung mit humanem Plaquematerial nachweisen. Im Vergleich zu anderen Studien besteht hier der große Vorteil, dass es uns durch unsere

Färbemethoden möglich war, mit Vollblut zu arbeiten. Somit war eine Aufarbeitung der Proben unnötig, wodurch es zu einer nicht unerheblichen mechanischen Manipulation kommen würde und die Versuchsergebnisse verfälscht werden. Außerdem wurde auch hier die Durchflussgeschwindigkeit der Flusskammern so berechnet, dass shear rate und stress identisch mit dem arteriellen System waren. Während die meisten Studien mit der Durchflusszytometrie arbeiten und dort die Aktivierung von Thrombozyten analysieren, haben wir deutlich physiologischere Bedingungen erreichen können.

3.4. Thrombose der *Arteria carotis* unter ASS-Behandlung

Neben den Flusskammerversuchen ist es uns erstmals gelungen, eine verminderte Inhibition der jungen Thrombozyten durch ASS auch in vivo in einer arteriellen Thrombose der *A. carotis* nachzuweisen. Wie schon in den in vitro Versuchen kam es unter ASS-Behandlung zu einer signifikant stärkeren Beteiligung der jungen behandelten Thrombozyten, im Vergleich zu jungen unbehandelten Thrombozyten im thrombotischen Geschehen. Der Vorteil des hier genutzten in vivo Systems liegt auch darin, dass sämtliche Vorgänge des Thrombosegeschehens unter physiologischen Bedingungen stattfinden und alle Aktivierungsfaktoren an den Adhäsions- und Aggregationsprozessen beteiligt sind.

Eine weitere Erkenntnis der Versuche war, dass junge Thrombozyten unter ASS-Behandlung scheinbar vermehrt untereinander Aggregate bilden. Während in den unbehandelten Gruppen die meisten jungen Thrombozyten vereinzelt in den Aggregaten zum Liegen kamen, bildeten die mit ASS behandelten Gruppen deutliche Aggregate innerhalb dieser Population aus. Diese Aussage wird durch die Publikation von Hoefler et al. unterstützt (190). Die Kernaussage dieser Arbeit ist, dass junge hyperreaktive Thrombozyten als Keimzentren für neu entstehende Aggregate fungieren können.

3.5. Hypothesen für die Hyperreaktivität junger Thrombozyten unter ASS-Behandlung

3.5.1. Junge inhibierte Thrombozyten dienen als Keimzentrum in einer entstehenden Thrombose

In den hier vorliegenden Versuchen konnte gezeigt werden, dass unter ASS-Behandlung junge Thrombozyten reaktiver sind als in einer unbehandelten Gruppe. Es könnte sein, dass sie hier als eine Art Keimzentrum für die sich bildenden Aggregate dienen und sie besonders wichtig in der Initialphase der sich bildenden Thrombose sind. Dieser Mechanismus lässt sich dadurch erklären, dass durch die verminderte ASS-Inhibition die Fraktion der RP in der Lage ist, weiterhin Thromboxan A₂ zu bilden und zu sezernieren. Sobald die nicht inhibierten Thrombozyten aktiviert wurden, wird so durch sie die Aggregation gestartet und sie aggregieren vermehrt untereinander, wodurch die

beobachteten Cluster entstehen. In dieser Phase können die älteren, inhibierten Thrombozyten, noch nicht an der Aggregation teilnehmen. Das von den aggregierten nicht inhibierten Plättchen freigesetzte Thromboxan A₂ wiederum führt zu einer Aktivierung der inhibierten älteren Population. Zwar hat die Cyclooxygenase dieser Thrombozyten irreversibel ASS gebunden und sie können kein eigenes Thromboxan A₂ aus Arachidonsäure synthetisieren, trotzdem sind sie sensitiv für eine Aktivierung durch dieses. Somit kommt es erst zu einer Aktivierung der jungen nicht inhibierten Thrombozyten, durch das von ihnen produzierte und sezernierte Thromboxan A₂ werden schließlich auch alle inhibierten Thrombozyten aktiviert.

3.5.2. Halbwertszeit der ASS

In den meisten anderen Publikationen wurden die Proben 6 - 24 Stunden nach der letzten medikamentösen Behandlung analysiert. Ein großes Problem hierbei ist die sehr kurze Halbwertszeit von ASS und P₂Y₁₂-Inhibitoren (Clopidogrel, Prasugrel) und die irreversible Inhibition. Sämtliche Thrombozyten, die nach der Gabe der Medikamente gebildet wurden, erfahren somit keine Inhibition mehr. Vier bis sechs Stunden nach der letzten Medikamentengabe können so wieder Plättchen mit aktiver Cyclooxygenase nachgewiesen werden (9). Da bei vielen Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen und klinischen Symptomen ein erhöhter turnover vorliegt, wird dieser Prozess noch deutlich beschleunigt, da in kürzerer Zeit mehr Thrombozyten neu gebildet werden. Besonders bei einer Zeitspanne von 24 Stunden hat somit ein beträchtlicher Anteil der Thrombozyten keine Inhibition mehr erfahren. Wie bereits beschrieben können diese Thrombozyten aus Arachidonsäure Thromboxan A₂ bilden, welches dann auch sämtliche inhibierten Plättchen aktivieren kann. Hoefler et al. konnten z.B. nachweisen, dass es bereits zu einer vollständigen Aktivierung aller Thrombozyten kommt, wenn 30% aller Cyclooxygenasen aktiv sind (190). In der Folge kamen diese Studien zu dem Schluss, dass die erhöhte Reaktivität von jungen Thrombozyten mit der kurzen Halbwertszeit der verwendeten Medikamente in Verbindung steht (Probenentnahme 6 - 24 Stunden nach letzter Medikamentengabe, Auftreten nicht inhibierter Thrombozyten nach 4 - 6 Stunden, s.o.). Durch die Neubildung von Thrombozyten nach der letzten Medikamentengabe steigt der Anteil an nicht inhibierten Plättchen stündlich an. In der Initialphase thrombotischer Ereignisse können diese normal aggregieren und aktivieren durch Ausschüttung ihrer Granula im weiteren Verlauf alle anderen Thrombozyten.

Um dieses Problem zu umgehen, haben wir sämtliche Versuche eine Stunde nach Applikation der Acetylsalicylsäure durchgeführt. Zum einen wird so die Halbwertszeit von ASS aus dem Spiel genommen, da die höchste Plasmakonzentration ungefähr nach einer Stunde vorliegt. Zum anderen wurde innerhalb dieser Stunde ein verschwindend geringer Anteil der Thrombozyten neu gebildet und dieser neu gebildete Teil kann noch durch zirkulierende ASS inhibiert werden, da die Wirkung erst nach zwei bis drei Stunden nachlässt (190). Durch diesen Versuchsaufbau wurden einige limitierende Faktoren eliminiert, trotzdem konnten wir eine deutlich erhöhte Reaktivität der jungen Thrombozyten unter ASS-Behandlung nachweisen. Die Argumentation der anderen Publikationen, dass diese Reaktivität mit der kurzen Halbwertszeit und der Neubildung nicht inhibierter Thrombozyten zusammenhängt, kann auf unsere Versuchsreihen nicht übertragen werden.

3.5.3. Wirkungsmechanismus der ASS

Eine weitere mögliche Erklärung ist der Wirkungsmechanismus von ASS, welche zu COX-1 eine ungefähr 100fach stärkere Affinität besitzt, als zu COX-2. Zwar ist die COX-1 Hauptproduzent des aktivierenden Thromboxan A₂, aber auch COX-2 nimmt an dieser Produktion teil. So konnten Guthikonda et al. nachweisen, dass trotz selektiver Inhibition der COX-1 (ASS und Sc-560) das Abbauprodukt Thromboxan B₂ im Serum nachgewiesen werden konnte. Erst nachdem zusätzlich die COX-2 selektiv gehemmt wurde, kam es zu einem starken Abfall und die Thromboxan B₂ Werte tendierten gegen null. Diese Erkenntnisse sprechen dafür, dass Arachidonsäure nicht nur von der COX-1 in den aktiven Metaboliten Thromboxan A₂ umgesetzt werden kann. Außerdem konnten sie zeigen, dass besonders bei jungen Thrombozyten vermehrt COX-2 exprimiert wird. Folglich sorgt eine gesteigerte Thrombopoese mit einhergehendem Anstieg der RP, welche in diversen kardiovaskulären Erkrankungen vorliegt, für eine deutliche Steigerung der Expression von COX-2 (110). Während sich unter steady state Bedingungen bei ca. 8-10% der Thrombozyten die COX-2 nachweisen lässt, steigt dieser Wert bei erhöhtem turnover auf 30-60% an (191-193). Durch diese Mechanismen wäre es möglich, dass besonders die jungen Thrombozyten durch die vermehrt exprimierte Cyclooxygenase 2 ausreichend Thromboxan A₂ bilden können, um eine erfolgreiche und vollständige Aggregation zu initiieren. Wie bereits beschrieben, sind auch die inhibierten Thrombozyten in der Lage über Thromboxan A₂ aktiviert zu werden. Lediglich zur eigenen Synthese sind sie nicht mehr befähigt. Daher wäre es durch die erhöhte Expression von COX-2, vor allem auf jungen Thrombozyten, möglich, zumindest teilweise die Inhibition durch ASS zu kompensieren. In der Initialphase der Aggregation können junge Thrombozyten somit als Kristallisationskern für den entstehenden Thrombus dienen, im zweiten Schritt werden

auch medikamentös behandelte alte Thrombozyten mit in das Geschehen einbezogen. Zusätzlich kommt die COX-2 nicht nur in Thrombozyten vor. Das Endothel, Monozyten und besonders Schaumzellen in atherosklerotischen Plaques weisen ebenfalls eine hohe Expression auf. Auch hier kann das für eine Aggregation benötigte Thromboxan A₂ gebildet werden. Um diese ubiquitär vorkommende Cyclooxygenase 2 vollständig über ASS zu inhibieren, wären so hohe Dosen notwendig, sodass die negativen Nebenwirkungen überwiegen.

3.5.4. Erhöhter RNA-Gehalt der jungen Thrombozyten

Ebenfalls bietet der erhöhte RNA-Gehalt von jungen bzw. retikulierten Thrombozyten einen Erklärungsansatz für die beobachtete verminderte Inhibition durch ASS. In der Literatur ist bereits mehrfach beschrieben, dass durch diesen RNA-Gehalt die Plättchen noch in der Lage sind, Proteinbiosynthese zu betreiben. Hierfür sind neben der RNA sämtliche Bestandteile der Proteinbiosynthese, wie z.B. rER, Golgi-Apparat, Spliceosome und Ribosome vorhanden (104). Harrison et al. konnten nachweisen, dass die RNA für 1600 - 3000 verschiedene Transkripte codiert (113). Neue Studien konnten sogar zeigen, dass bis zu 5000 verschiedene vorliegen, was ungefähr der Hälfte der in Megakaryozyten enthaltenen Transkripte entspricht (194, 195). Durch diese hohe Anzahl sind die jungen Thrombozyten befähigt, viele verschiedene Proteine zu synthetisieren. Die Produktion der Membranproteine GpIb-IX-V oder GpIIb/IIIa nach Stimulation wurde bereits nachgewiesen (94). In Zukunft bedarf es hier vermehrt Aufklärung, welche Proteine genau von den Plättchen gebildet werden können. Ebenfalls konnte bereits gezeigt werden, dass nach Aktivierung die Translation in den Thrombozyten stark ansteigt (104, 196). Analog hierzu könnte es ebenfalls zu einer starken Aktivierung der Translation nach Inhibition durch z.B. ASS kommen, sprich bei jeglicher Veränderung der steady state Bedingungen. Es wäre möglich, dass sobald die Cyclooxygenasen irreversibel gehemmt wurden, zur Kompensation neue Proteine für die Synthese von COX von den jungen Thrombozyten gebildet werden, um ihre physiologische Funktion wiederherzustellen. In der Folge würden junge Thrombozyten ihre verminderte Inhibition durch ASS erlangen. Besonders zu tragen kämen diese Effekte bei Patienten, die bereits an einer kardiovaskulären Krankheit leiden. Viele Krankheitsbilder sind mit einem erhöhten turnover verbunden und der prozentuale Anteil an RP, die noch Proteinbiosynthese betreiben können, ist deutlich erhöht (ACS, AITP, TTP etc.). Bei diesen Patienten würde es trotz medikamentöser Behandlung zu einer erhöhten Reaktivität der jungen Thrombozyten kommen (HTPR = high on treatment platelet reactivity). Eine weitere Hypothese wäre, dass die Proteinbiosynthese zu Produkten führt, die eine Hemmung durch ASS von Beginn an verhindern.

Abschließend bleibt zu sagen, dass wir mit dem pulse labelling und einer Doppelfärbung der Thrombozyten eine zuverlässige und reproduzierbare Methode entwickelt haben, um die Population der jungen Thrombozyten zu untersuchen, ohne mit den Problemen der RNA-Farbstoffe konfrontiert zu werden. Gleichzeitig konnten wir mit dieser Färbung in vitro in den Spreadingversuchen und der Charakterisierung von Oberflächen- und Aktivierungsmarkern Hinweise auf eine vermehrte Reaktivität von jungen Thrombozyten sammeln. Neben den Flusskammerversuchen konnten wir mit den Thromboseversuchen der arteriellen Thrombose in der *A. carotis* erstmalig zeigen, dass in vivo und unter physiologischen Bedingungen eine verminderte ASS-Inhibition der jungen Thrombozyten vorliegt. Dabei wurden zahlreiche limitierende Faktoren wie die mechanische Manipulation der Thrombozyten oder die kurze Halbwertszeit der Medikamente durch die Etablierung neuer Versuchsaufbauten eliminiert. Für die Zukunft bieten sich so eine Reihe neuer Untersuchungsmöglichkeiten, um noch gezielter die Funktion von jungen Thrombozyten zu analysieren. Langfristig sollen so neue medikamentöse Behandlungen etabliert werden, bei denen die spezifische Hemmung junger Plättchen forciert wird, um den klinischen Verlauf kardiovaskulärer Erkrankungen zu verbessern. Da es zwischen den einzelnen Individuen eine große Varianz bezüglich des Ansprechens auf eine medikamentöse Therapie gibt, gilt hierbei die Aufmerksamkeit auf die individuelle Anpassung der Behandlung an jeden einzelnen Patienten.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Die hier vorliegende Arbeit diente dazu, qualitative Unterschiede zwischen retikulierten und adulten Thrombozyten zu untersuchen. Retikulierte Thrombozyten (reticulated platelets, RP) stellen innerhalb aller Thrombozyten eine sehr junge Population dar, welche gerade erst vom Knochenmark in den Blutstrom entlassen wurden. Sie besitzen einen sehr hohen Gehalt an dichten Granula und bis zu 5.000 verschiedene Transkripte megakaryozytärer RNA. Zusätzlich enthalten sie alle Komponenten der Proteinbiosynthese, wodurch sie in der Lage sind, innerhalb der ersten 24 Stunden nach Entlassung in den Blutkreislauf, Proteine de novo zu synthetisieren. Abhängig vom verwendeten Messverfahren liegt der physiologische Referenzwert der RP zwischen 1 bis 15%. Zwar wird ein erhöhter Wert der retikulierten Thrombozyten mit diversen kardiovaskulären Erkrankungen in Verbindung gebracht und ihnen wird in der Literatur eine erhöhte Reaktivität zugeschrieben, die zugrundeliegenden Mechanismen sind bisher allerdings weitestgehend noch nicht aufgeklärt. Zusätzlich ist bisher nicht bekannt, ob erhöhte Werte der RP Ursache oder Folge der Erkrankungen sind. Hauptaugenmerk dieser Arbeit war es, eine zuverlässige Methode zu etablieren, um diese Subpopulation zu identifizieren. Im Anschluss sollten mittels Intravitalmikroskopie, Immunfluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie funktionelle Unterschiede gegenüber den adulten Thrombozyten identifiziert werden. Ein wichtiges Ziel dabei war es, die Hypothese der erhöhten Reaktivität der retikulierten Thrombozyten in vivo nachzuweisen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine immunmedierte Thrombozytopenie mit einer sich darauf anschließenden gesteigerten Thrombopoese, wodurch der RP-Wert von durchschnittlich 13,5% auf 42% an der Gesamtheit der Thrombozyten deutlich anstieg, für eine Untersuchung der Subpopulation nicht geeignet war, da die physiologischen Eigenschaften der RP zu stark beeinflusst wurden. In auf die Depletion folgenden Thromboseversuchen der *Arteria carotis* konnten wir keine Unterschiede in den Verschlusszeiten zwischen einer Kontroll- und einer depletierten Gruppe beobachten, wodurch die Hypothese einer erhöhten Reaktivität der RP in vivo nicht bestätigt werden konnte. Durch das neu entwickelte "pulse labelling" und der Doppelfärbung der Thrombozyten in Kombination mit RNA-Farbstoffen konnte gezeigt werden, dass eine signifikante Korrelation zwischen jungen und retikulierten Thrombozyten bestand, wodurch eine zuverlässige Methode zur Detektion dieser entwickelt wurde. Hierbei wiesen in durchflusszytometrischen Untersuchungen die jungen Thrombozyten im Vergleich zu alten Thrombozyten eine bis zu dreimal stärkere Fluoreszenzintensität der verwendeten RNA-Farbstoffen auf, wodurch gezeigt werden konnte, dass junge Thrombozyten reich an RNA sind. Zusätzlich konnten wir mit konfokalmikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass sich ausschließlich junge Thrombozyten mit den RNA-Farbstoffen anfärben ließen. Diese junge Population besitzt im Durchschnitt eine größere Zelloberfläche, was mit unseren Spreadingversuchen und anschließenden

mikroskopischen Aufnahmen gezeigt werden konnte. Gleichzeitig werden, auch unabhängig von der Größe, quantitativ mehr Oberflächen- und Aktivierungsmarker exprimiert, wodurch die verstärkte Reaktivität durch Aktivierung mit verschiedenen Stimulanzen (z.B. ADP, Thrombin, Kollagen etc.) in Teilen erklärt werden kann.

In den darauf folgenden Versuchen konnte zudem gezeigt werden, dass die junge Population sowohl *in vitro* als auch *in vivo* unter einer Behandlung mit Acetylsalicylsäure (ASS) eine erhöhte Reaktivität aufwies. In Flusskammern beschichtet mit Kollagen gehörten in der unbehandelten Gruppe 11,5% der adhärenenten Thrombozyten zu der jungen Population, während in der mit ASS behandelten Gruppe 18,5% zu der jungen Population gehörten. In selbigen Versuchen beschichtet mit humanem Plaquematerial waren 11,1% der adhärenenten Thrombozyten in der unbehandelten Gruppe junge Thrombozyten, während in der mit ASS behandelten Gruppe deren Anteil auf 17,0% anstieg. Um physiologischere Bedingungen zu erreichen, wurde schließlich die Reaktivität von jungen Thrombozyten unter ASS-Behandlung in einem *in vivo* System der Thrombose der *Arteria carotis* untersucht. In der unbehandelten Gruppe bestand der entstandene Thrombus im Durchschnitt zu 7,41% aus jungen Thrombozyten, während in der mit ASS behandelten Gruppe durchschnittlich 14,25% des Thrombus aus jungen Thrombozyten bestand. Somit bleibt festzuhalten, dass junge Thrombozyten unter ASS-Behandlung im Gegensatz zu unbehandelten eine bis zu doppelt so hohe Reaktivität aufweisen. In der hier vorliegenden Doktorarbeit ist hervorzuheben, dass wir erstmalig mittels Konfokalmikroskopie die erhöhte Reaktivität der jungen Thrombozyten im Vergleich zu alten Thrombozyten unter ASS-Behandlung *in vivo* nachweisen konnten.

Im Gegensatz zu anderen Studien zeigen die gewonnenen Ergebnisse, dass es unabhängig von der Pharmakokinetik/-dynamik und der geringen Halbwertszeit der Acetylsalicylsäure innerhalb der Population von jungen Thrombozyten eine Resistenz gegenüber der medikamentösen Behandlung gab. Durch die entwickelten Untersuchungsmethoden bieten sich neue Ansätze, die zugrundeliegenden Mechanismen zu untersuchen. Ein besonderes Interesse sollte hierbei auf die weitere Erforschung *in vivo* gelegt werden. Langfristig sollen so neue therapeutische Ansätze gefunden werden, um eine spezifische Therapie zu entwickeln, die den weiteren klinischen Verlauf von kardiovaskulären Erkrankungen und deren Mortalität verbessern.

VIII. SUMMARY

The aim of this dissertation is to examine the qualitative differences between reticulated and adult platelets. Reticulated platelets (RP) represent the youngest population within all platelets, having been just released from the bone marrow into the blood flow. They contain a very high content of dense granula and up to 5,000 different transcripts of megakaryocytic RNA. Additionally, they contain all the components for protein biosynthesis, whereby they are able to synthesize proteins *de novo* up to 24 hours after they were released into the blood flow. Depending on the measuring method used, the physiological reference range of RP varies between 1 and 15%. An increased reticulated platelet count is associated with multiple cardiovascular diseases and in the literature, they are attributed with a higher reactivity, yet the underlying mechanisms are still mostly unknown. In addition, it is not yet known, whether the increased value of the RP is the cause or the consequence of the underlying disease. The focus of this dissertation is to establish a reliable method of identifying this subpopulation of platelets. After which, we wanted to identify functional differences between young and adult platelets with the help of intravital microscopy, immunofluorescence microscopy and flow cytometry. One important aim of the study was to prove the hypothesis of a higher reactivity in relation to the reticulated platelets *in vivo*.

In this dissertation, we were able to show that an antibody-mediated thrombocytopenia with following increased thrombopoiesis, whereby the RP-count clearly increased from an average of 13,5% up to 42% of all platelets, was not suitable for analyzing this subpopulation because the physiological characteristics of the RP were highly affected. In following thrombotic experiments of the *arteria carotis* after depletion we observed no difference in the occlusion time between the control and the depleted groups. Therefore we were unable to confirm the hypothesis of higher reactivity of reticulated platelets *in vivo*. Utilizing newly established “pulse labelling” and double staining of platelets in combination with RNA dyes, we were able to demonstrate that, there is a significant correlation between young and reticulated platelets. This enabled us to develop a reliable method to detect this subpopulation. In flow cytometric measurements young platelets stained with RNA dyes showed up to three times higher fluorescence intensity than their non-reticulated counter parts, thereby demonstrating the higher RNA content of reticulated platelets. In addition, using confocal analysis we demonstrated that only young platelets were stained by the RNA dyes. With spreading experiments and microscopic analysis, we found that on average, this young population had an increased cell surface. At the same time, even independently from the size, they showed quantitatively more surface and activation markers, which partly provides an explanation for the higher reactivity after activation with different stimulants (e.g. ADP, thrombin, collagen etc.).

In further experiments, we were able to demonstrate that the young population exhibited a higher reactivity under acetylsalicylic acid (ASS) treatment, as well in vitro and in vivo. In flow chamber experiments coated with collagen, 11,5% of the adherent platelets in the untreated group were young platelets, compared to 18,5% in the ASS treated group. In flow chamber experiments coated with human plaque material, 11,1% of the adherent platelets in the untreated group were young, whereas in the ASS treated group this proportion increased to 17,0%. To analyze the reactivity of young platelets in a more physiological environment, thrombosis experiments in the *arteria carotis* were carried out. In the untreated group 7,41% of the thrombus consisted of the young platelets, whereas in the ASS treated group 14,25% of the thrombus was found to be young platelets. With this experiment we were able to show that, under ASS treatment the reactivity of young platelets is up to two times higher compared to untreated young platelets. In this dissertation we have to highlight that, we were the first group to demonstrate the higher reactivity of young platelets compared to old platelets under ASS treatment in vivo with the help of a confocal microscope.

In contrast to other groups our results point out that, the resistance of young platelets against a medical treatment is independent from the pharmacodynamic/-kinetics and the half-life of acetylsalicylic acid. Due to the established analytical methods, we offer new approaches to analyze the underlying mechanisms. Continued research should focus on in vivo analysis. New therapeutic approaches should be established in the future in order to develop better specific therapies. Thereby, the clinical outcome and the mortality of cardiovascular diseases should be improved.

IX. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AA	Arachidonsäure
ACS	Acute coronary syndrom
ADP	Adenosindiphosphat
AITP	Autoimmunthrombozytopenie
ALP	Alkalische Phosphatase
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenonsintriphosphat
AUC	Area under the curve
CAD	Coronary artery disease
CD	Cluster of differentiation
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX-1	Cyclooxygenase 1
COX-2	Cyclooxygenase 2
DIC	Disseminierte intravasale Koagulopathie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FC	Flow chamber
FDP	Fibrin degradation products
FeCl ₃	Eisen-III-Chlorid
Fgn	Fibrinogen
FSC	Forward scatter
GABA	γ-Aminobuttersäure
Gp	Glykoprotein
HCl	Chlorwasserstoffsäure/Salzsäure
HCM	Hypertrophe Kardiomyopathie
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HTPR	High on treatment platelet reactivity
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1
IL	Interleukin
IPC	Immature Platelet Count
IPF	Immature Platelet Fraction
IVC	Individually ventilated cage
KCl	Kaliumchlorid

KGW	Körpergewicht
LDL	Low-density Lipoprotein
MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1
MFI	Mean fluorescence intensity
MMF	Midazolam-Medetomidin-Fentanyl
MPV	Mean platelet volume
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOh	Natriumhydroxid
NFκB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer
NMB	New Methylene Blue
NO	Stickstoffmonoxid
NSAID	Non-steroidal anti-inflammatory drug
PAR-1	Protease-activated receptor 1
PBS	Phosphate-buffered saline
PCI	Percutaneous coronary intervention
PDGF	Platelet derived growth factor
PFA	Paraformaldehyd
PF4	Platelet factor 4
PGI ₂ -alpha	Prostacyclin I2
PLN	Protein-Losing-Nephropathie
PRP	Platelet rich plasma
RANTES	Regulated and normal t-cell expressed and secreted
rER	Raues endoplasmatisches Retikulum
ROS	Reactive oxygen species
RP	Reticulated platelets
rtPA	Rekombinanter Gewebefibrinolyseaktivator
SPF	Specific pathogen free
SSC	Sideward scatter
TF	Tissue factor
TFPI	Tissue factor pathway inhibitor
TM	Thrombomodulin
TO	Thiazol orange
tPA	Tissue plasminogen activator

TRAP	Thrombin Rezeptor aktivierendes Peptid
TTP	Thrombotisch thrombozytopenische Purpura
UFH	Unfraktioniertes Heparin
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
vWF	Von-Willebrand-Faktor
ZNS	Zentrales Nervensystem

X. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Inhaltsstoffe und Funktion der thrombozytären Granula.....	6
Tabelle 2: Plasmagerinnungsfaktoren.....	10
Tabelle 3: Farbstoffe für die Anfärbung der megakaryozytären RNA	62
Tabelle 4: Antikörper für die Untersuchung der Oberflächen- und Aktivierungsmarker der Thrombozyten.....	63

XI. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Typischer dreischichtiger Wandaufbau einer Arterie	3
Abbildung 2: Gerinnungskaskade	9
Abbildung 3: Virchow's Trias	12
Abbildung 4: Stadieneinteilung der Entwicklung der Atherosklerose	15
Abbildung 5: Arterielle Thrombose	16
Abbildung 6: Retikulierte Thrombozyten nach akutem Blutverlust	17
Abbildung 7: Retikulierte Thrombozyten	18
Abbildung 8: Retikulierte Thrombozyten und deren besondere Eigenschaften	19
Abbildung 9: Messung retikulierter Thrombozyten bei Hunden unter pathologischen Bedingungen	21
Abbildung 10: Angriffspunkte zur Behandlung der arteriellen Thrombose	24
Abbildung 11: Angriffspunkte zur Behandlung der venösen Thrombose	26
Abbildung 12: Darstellung der OP-Technik für die arterielle Thrombose der A. carotis	43
Abbildung 13: Darstellung der OP-Technik für die M. cremaster Präparation mit anschließender FeCl ₃ Schädigung	48
Abbildung 14: Die drei Hauptbestandteile eines Durchflusszytometers	55
Abbildung 15: Charakterisierung von Blutzellen anhand ihrer morphologischen Merkmale	55
Abbildung 16: Absorptionsspektren gebräuchlicher Fluorochrome	56
Abbildung 17: Emissionsspektren gebräuchlicher Fluorochrome	57
Abbildung 18: Antikörper-medierte Thrombozytopenie	66
Abbildung 19: Thrombose der A. carotis nach Antikörper-medierter Thrombozytopenie	67
Abbildung 20: Dauer der ersten Occlusion und Anzahl wiederkehrender Verschlüsse in der depletierten und in der Kontroll-Gruppe	68
Abbildung 21: Umsatz muriner Thrombozyten innerhalb von 24 Stunden	70
Abbildung 22: Repräsentativer FACS-Plot der Korrelation zwischen jungen und alten Thrombozyten und deren RNA-Gehalt	71
Abbildung 23: Graphische Darstellung der RNA-Fluoreszenzintensitäten innerhalb der jungen und der alten Population	73
Abbildung 24: Ermittlung der Korrelation junger Thrombozyten und deren RNA-Gehalt mittels Konfokalmikroskopie	75
Abbildung 25: Repräsentative Gating-Strategie zur quantitativen Messung von Oberflächen- und Aktivierungsmarkern	76
Abbildung 26: Messung der MFI der Oberflächen- und Aktivierungsmarker in der alten und jungen Population der Thrombozyten	78

Abbildung 27: Repräsentatives Beispiel eines Multiplateversuchs	80
Abbildung 28: Repräsentatives Beispiel der Spreadingversuche mit Thrombozyten	81
Abbildung 29: Messung der Oberfläche von jungen und alten Thrombozyten in μm^2 in einer unbehandelten Gruppe	82
Abbildung 30: Messung der Oberfläche von jungen und alten Thrombozyten in μm^2 in einer mit ASS behandelten Gruppe	83
Abbildung 31: Detektion von jungen und alten Thrombozyten in vivo nach 12 Stunden	84
Abbildung 32: Repräsentatives Beispiel für die Identifizierung junger und alter Thrombozyten in Flusskammerversuchen	85
Abbildung 33: Verteilung der jungen und alten Thrombozyten im Vollblut.....	86
Abbildung 34: Relative Rekrutierung junger Thrombozyten in den Flusskammern beschichtet mit Kollagen	86
Abbildung 35: Verteilung der jungen und alten Thrombozyten im Vollblut.....	87
Abbildung 36: Relative Rekrutierung junger Thrombozyten in den Flusskammern beschichtet mit humanem Plaquematerial	88
Abbildung 37: Zeit bis zum vollständigen Verschluss der A. carotis in einer unbehandelten und in einer mit ASS behandelten Gruppe	89
Abbildung 38: Repräsentatives Beispiel für die Unterscheidung zwischen Arealen mit jungen und alten Thrombozyten innerhalb einer arteriellen Thrombose ..	90
Abbildung 39: Prozentuale Verteilung von jungen und alten Thrombozyten im Vollblut beider Versuchsgruppen	91
Abbildung 40: Prozentuale Verteilung der Flächen des Thrombus, welche ausschließlich aus einfach positiven, jungen Thrombozyten bestehen	92
Abbildung 41: Repräsentatives Beispiel einer Thrombose ausgelöst im M. cremaster mittels 1% FeCl_3	93

XII. LITERATURVERZEICHNIS

1. Bansilal S, Castellano JM, Fuster V. Global burden of CVD: focus on secondary prevention of cardiovascular disease. *Int J Cardiol.* 2015;201 Suppl 1:S1-7.
2. Ingram M, Coopersmith A. Reticulated platelets following acute blood loss. *Br J Haematol.* 1969;17(3):225-9.
3. Koh KR, Yamane T, Ohta K, Hino M, Takubo T, Tatsumi N. Pathophysiological significance of simultaneous measurement of reticulated platelets, large platelets and serum thrombopoietin in non-neoplastic thrombocytopenic disorders. *Eur J Haematol.* 1999;63(5):295-301.
4. Watanabe K, Kawai Y, Takeuchi K. [Reticulated platelets--automated measurement and clinical utility]. *Rinsho Ketsueki.* 1995;36(4):267-72.
5. Sachdev R, Tiwari AK, Goel S, Raina V, Sethi M. Establishing biological reference intervals for novel platelet parameters (immature platelet fraction, high immature platelet fraction, platelet distribution width, platelet large cell ratio, platelet-X, plateletcrit, and platelet distribution width) and their correlations among each other. *Indian J Pathol Microbiol.* 2014;57(2):231-5.
6. Hoffmann JJ. Reticulated platelets: analytical aspects and clinical utility. *Clin Chem Lab Med.* 2014;52(8):1107-17.
7. Grove EL, Hvas AM, Kristensen SD. Immature platelets in patients with acute coronary syndromes. *Thrombosis and haemostasis.* 2009;101(1):151-6.
8. Ibrahim H, Schutt RC, Hannawi B, DeLao T, Barker CM, Kleiman NS. Association of immature platelets with adverse cardiovascular outcomes. *J Am Coll Cardiol.* 2014;64(20):2122-9.
9. Cesari F, Marcucci R, Gori AM, Caporale R, Fanelli A, Casola G, et al. Reticulated platelets predict cardiovascular death in acute coronary syndrome patients. Insights from the AMI-Florence 2 Study. *Thrombosis and haemostasis.* 2013;109(5):846-53.

-
10. Bernlochner I, Goedel A, Plischke C, Schupke S, Haller B, Schulz C, et al. Impact of immature platelets on platelet response to ticagrelor and prasugrel in patients with acute coronary syndrome. *Eur Heart J*. 2015;36(45):3202-10.
 11. Guthikonda S, Alviar CL, Vaduganathan M, Arikian M, Tellez A, DeLao T, et al. Role of reticulated platelets and platelet size heterogeneity on platelet activity after dual antiplatelet therapy with aspirin and clopidogrel in patients with stable coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52(9):743-9.
 12. Perl L, Lerman-Shivek H, Rechavia E, Vaduganathan M, Leshem-Lev D, Zemer-Wassercug N, et al. Response to prasugrel and levels of circulating reticulated platelets in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2014;63(6):513-7.
 13. Mangalpally KK, Siqueiros-Garcia A, Vaduganathan M, Dong JF, Kleiman NS, Guthikonda S. Platelet activation patterns in platelet size sub-populations: differential responses to aspirin in vitro. *J Thromb Thrombolysis*. 2010;30(3):251-62.
 14. Stratz C, Nuhrenberg T, Amann M, Cederqvist M, Kleiner P, Valina CM, et al. Impact of reticulated platelets on antiplatelet response to thienopyridines is independent of platelet turnover. *Thrombosis and haemostasis*. 2016;116(5):941-8.
 15. Armstrong PC, Hoefler T, Knowles RB, Tucker AT, Hayman MA, Ferreira PM, et al. Newly Formed Reticulated Platelets Undermine Pharmacokinetically Short-Lived Antiplatelet Therapies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37(5):949-56.
 16. Dudenredaktion (o.J.), "Arterie" auf Duden online, available from: <https://www.duden.de/node/128009/revision/128045>.
 17. Fahlke et. al., Taschenatlas der Physiologie, Urban & Fischer, ISBN 978-3-437-41917-1, 2008.
 18. Lüllmann-Rauch, Taschenlehrbuch der Histologie, Thieme, 2012.

-
19. Ulfig et. al., Kurzlehrbuch Histologie, 2. korrigierte Auflage, ISBN 3-13-135572-7, Thieme, 2005.
 20. Engelmann B, Massberg S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(1):34-45.
 21. Ribatti D, Crivellato E. Giulio Bizzozero and the discovery of platelets. *Leuk Res.* 2007;31(10):1339-41.
 22. Bizzozero G., Ueber einen neuen Formbestandteil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und Blutgerinnung. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med* 1882;90:261–332.
 23. Hellem AJ. The adhesiveness of human blood platelets in vitro. *Scand J Clin Lab Invest.* 1960;12 Suppl:1-117.
 24. O'Brien J R. Platelet aggregation: Part II Some results from a new method of study. *J Clin Pathol.* 1962;15(5):452-5.
 25. Born GV. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature.* 1962;194:927-9.
 26. Jurgens R, Braunsteiner H. [Pathogenesis of thrombosis]. *Schweiz Med Wochenschr.* 1950;80(52):1388-94.
 27. O'Brien J R. Platelet aggregation: Part I Some effects of the adenosine phosphates, thrombin, and cocaine upon platelet adhesiveness. *J Clin Pathol.* 1962;15(5):446-52.
 28. Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B. Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1975;72(8):2994-8.
 29. Roth GJ, Stanford N, Majerus PW. Acetylation of prostaglandin synthase by aspirin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1975;72(8):3073-6.

-
30. Marcus AJ. Aspirin as an antithrombotic medication. *N Engl J Med.* 1983;309(24):1515-7.
 31. Patrono C. Aspirin as an antiplatelet drug. *N Engl J Med.* 1994;330(18):1287-94.
 32. Battinelli EM, Hartwig JH, Italiano JE, Jr. Delivering new insight into the biology of megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *Curr Opin Hematol.* 2007;14(5):419-26.
 33. Junt T, Schulze H, Chen Z, Massberg S, Goerge T, Krueger A, et al. Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science.* 2007;317(5845):1767-70.
 34. Behnke O, Forer A. From megakaryocytes to platelets: platelet morphogenesis takes place in the bloodstream. *Eur J Haematol Suppl.* 1998;61:3-23.
 35. George JN. Platelets. *Lancet.* 2000;355(9214):1531-9.
 36. Rodgers GM. Overview of platelet physiology and laboratory evaluation of platelet function. *Clin Obstet Gynecol.* 1999;42(2):349-59.
 37. Kühnel W, Thrombozyten, In: Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie, Thieme, Stuttgart, New York, 9. Auflage, 1995.
 38. Kaushansky K. Thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. *Blood.* 1995;86(2):419-31.
 39. Kaushansky K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *J Clin Invest.* 2005;115(12):3339-47.
 40. Kaushansky K. Lineage-specific hematopoietic growth factors. *N Engl J Med.* 2006;354(19):2034-45.
 41. Segal JB, Moliterno AR. Platelet counts differ by sex, ethnicity, and age in the United States. *Ann Epidemiol.* 2006;16(2):123-30.

-
42. Hartley PS. Mice housed in groups of 4-6 exhibit a diurnal surge in their platelet count. *Platelets*. 2013;24(5):412-4.
 43. Moritz A, Hoffmann C. [Platelet count in the cat]. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere*. 1997;25(6):695-700.
 44. Zmigrodzka M, Guzera M, Winnicka A. Flow cytometric assessment of activation of peripheral blood platelets in dogs with normal platelet count and asymptomatic thrombocytopenia. *Pol J Vet Sci*. 2016;19(2):407-14.
 45. Blair P, Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev*. 2009;23(4):177-89.
 46. Gawaz M, , *Blood platelets*, Thieme Verlag, 2001.
 47. Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets*. 2001;12(5):261-73.
 48. Monroe DMBPUCPHaTJWS, Ltd; 2017. p. 1-11.
 49. Furie B, Furie BC. In vivo thrombus formation. *J Thromb Haemost*. 2007;5 Suppl 1:12-7.
 50. Watson SP, Herbert JM, Pollitt AY. GPVI and CLEC-2 in hemostasis and vascular integrity. *J Thromb Haemost*. 2010;8(7):1456-67.
 51. Meyers KM, Holmsen H, Seachord CL. Comparative study of platelet dense granule constituents. *Am J Physiol*. 1982;243(3):R454-61.
 52. Storey RF, Sanderson HM, White AE, May JA, Cameron KE, Heptinstall S. The central role of the P(2T) receptor in amplification of human platelet activation, aggregation, secretion and procoagulant activity. *Br J Haematol*. 2000;110(4):925-34.

-
53. Palta S, Saroa R, Palta A. Overview of the coagulation system. *Indian J Anaesth.* 2014;58(5):515-23.
 54. Smith SA, Travers RJ, Morrissey JH. How it all starts: Initiation of the clotting cascade. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2015;50(4):326-36.
 55. Osterud B, Rapaport SI. Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: additional pathway for initiating blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74(12):5260-4.
 56. Manook M, Kwun J, Sacks S, Dorling A, Mamode N, Knechtle S. Innate networking: Thrombotic microangiopathy, the activation of coagulation and complement in the sensitized kidney transplant recipient. *Transplant Rev (Orlando).* 2018;32(3):119-26.
 57. Wolberg AS, Aleman MM, Leiderman K, Machlus KR. Procoagulant activity in hemostasis and thrombosis: Virchow's triad revisited. *Anesth Analg.* 2012;114(2):275-85.
 58. Virchow R, *Gesammelte abhandlungen zur wissenschaftlichen medizin.* Frankfurt: Medinger Sohn & Co; 1856. p. 219-732.
 59. Bagot CN, Arya R. Virchow and his triad: a question of attribution. *Br J Haematol.* 2008;143(2):180-90.
 60. Dudenredaktion, "Thrombose" auf Duden online, URL: <https://www.duden.de/node/182229/revision/182265>.
 61. Ross R. Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol.* 1995;57:791-804.
 62. Seite „Arterielle Thrombose“. In: Wikipedia DfEBM, 18:23 UTC. URL: https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Arterielle_Thrombose&oldid=186718944 (Abgerufen: 29. Juli 2019, 15:04 UTC).

-
63. Seite „Atherosklerose“. In: Wikipedia DfEBM, 21:21 UTC. URL: <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Atherosklerose&oldid=188507129> (Abgerufen: 29. Juli 2019, 15:14 UTC).

 64. Dudenredaktion (o.J.) AaDo, available from URL: <https://www.duden.de/node/8880/revision/8907>.

 65. Massberg S, Schurzinger K, Lorenz M, Konrad I, Schulz C, Plesnila N, et al. Platelet adhesion via glycoprotein IIb integrin is critical for atheroprogession and focal cerebral ischemia: an in vivo study in mice lacking glycoprotein IIb. *Circulation*. 2005;112(8):1180-8.

 66. Sachs UJ, Nieswandt B. In vivo thrombus formation in murine models. *Circ Res*. 2007;100(7):979-91.

 67. Schwenke DC, Carew TE. Initiation of atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits. I. Focal increases in arterial LDL concentration precede development of fatty streak lesions. *Arteriosclerosis*. 1989;9(6):895-907.

 68. Berliner JA, Navab, M., Fogelman, A.M., Frank, J.S., Demer, L.L., Edwards, P.A., Watson, A.D., Lusis, A.J. Oxidation, Inflammation, and Genetics 91, 2488-2496 (1995).

 69. Young SG, Parthasarathy S. Why are low-density lipoproteins atherogenic? *West J Med*. 1994;160(2):153-64.

 70. Berliner JA, Territo MC, Sevanian A, Ramin S, Kim JA, Bamshad B, et al. Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. *J Clin Invest*. 1990;85(4):1260-6.

 71. Navab M, Berliner JA, Watson AD, Hama SY, Territo MC, Lusis AJ, et al. The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16(7):831-42.

-
72. Kume N, Cybulsky MI, Gimbrone MA, Jr. Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells. *J Clin Invest.* 1992;90(3):1138-44.
 73. Libby P, Hansson GK. Involvement of the immune system in human atherogenesis: current knowledge and unanswered questions. *Lab Invest.* 1991;64(1):5-15.
 74. Navab M, Liao F, Hough GP, Ross LA, Van Lenten BJ, Rajavashisth TB, et al. Interaction of monocytes with cocultures of human aortic wall cells involves interleukins 1 and 6 with marked increases in connexin43 message. *J Clin Invest.* 1991;87(5):1763-72.
 75. Quinn MT, Parthasarathy S, Steinberg D. Lysophosphatidylcholine: a chemotactic factor for human monocytes and its potential role in atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85(8):2805-9.
 76. Johnson-Tidey RR, McGregor JL, Taylor PR, Poston RN. Increase in the adhesion molecule P-selectin in endothelium overlying atherosclerotic plaques. Coexpression with intercellular adhesion molecule-1. *Am J Pathol.* 1994;144(5):952-61.
 77. Massberg S, Brand K, Gruner S, Page S, Muller E, Muller I, et al. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *The Journal of experimental medicine.* 2002;196(7):887-96.
 78. Tolle M, Levkau B, Kleuser B, van der Giet M. Sphingosine-1-phosphate and FTY720 as anti-atherosclerotic lipid compounds. *Eur J Clin Invest.* 2007;37(3):171-9.
 79. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(9):678-89.
 80. Michell DL, Andrews KL, Woollard KJ, Chin-Dusting JP. Imaging leukocyte adhesion to the vascular endothelium at high intraluminal pressure. *Journal of visualized experiments : JoVE.* 2011(54).

-
81. Ku G, Thomas CE, Akeson AL, Jackson RL. Induction of interleukin 1 beta expression from human peripheral blood monocyte-derived macrophages by 9-hydroxyoctadecadienoic acid. *J Biol Chem.* 1992;267(20):14183-8.
 82. Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Vascular smooth muscle cell in atherosclerosis. *Acta Physiol (Oxf).* 2015;214(1):33-50.
 83. Rosenfeld ME, Tsukada T, Chait A, Bierman EL, Gown AM, Ross R. Fatty streak expansion and maturation in Watanabe Heritable Hyperlipemic and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. *Arteriosclerosis.* 1987;7(1):24-34.
 84. Guyton JR, Klemp KF. Development of the lipid-rich core in human atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16(1):4-11.
 85. Bostrom K, Watson KE, Stanford WP, Demer LL. Atherosclerotic calcification: relation to developmental osteogenesis. *Am J Cardiol.* 1995;75(6):88b-91b.
 86. Stary HC. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(5):1177-8.
 87. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Jr., et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15(9):1512-31.
 88. By Transferred from en.wikipedia to Commons. CB-S, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=2816579>.
 89. Bailey G, Meadows J, Morrison AR. Imaging Atherosclerotic Plaque Calcification: Translating Biology. *Curr Atheroscler Rep.* 2016;18(8):51.
 90. Aikawa E, Nahrendorf M, Figueiredo JL, Swirski FK, Shtatland T, Kohler RH, et al. Osteogenesis associates with inflammation in early-stage atherosclerosis evaluated by molecular imaging in vivo. *Circulation.* 2007;116(24):2841-50.

-
91. Seite „Hydroxylapatit“. In: Wikipedia DfEJB, 15:49 UTC. URL: <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Hydroxylapatit&oldid=189803188>
 92. Geddings JE, Mackman N. New players in haemostasis and thrombosis. *Thrombosis and haemostasis*. 2014;111(4):570-4.
 93. Toschi V, Gallo R, Lettino M, Fallon JT, Gertz SD, Fernandez-Ortiz A, et al. Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation*. 1997;95(3):594-9.
 94. Dusse LM, Freitas LG. Clinical applicability of reticulated platelets. *Clin Chim Acta*. 2015;439:143-7.
 95. Stratz C, Bomicke T, Younas I, Kittel A, Amann M, Valina CM, et al. Comparison of Immature Platelet Count to Established Predictors of Platelet Reactivity During Thienopyridine Therapy. *J Am Coll Cardiol*. 2016;68(3):286-93.
 96. Sysmex, IPF (immature platelet fraction) - Die klinische Bedeutung der Bestimmung unreifer Thrombozyten für die XN-Serie. 2014.
 97. Booyse F, Rafelson ME, Jr. In vitro incorporation of amino-acids into the contractile protein of human blood platelets. *Nature*. 1967;215(5098):283-4.
 98. Booyse FM, Rafelson ME, Jr. Stable messenger RNA in the synthesis of contractile protein in human platelets. *Biochim Biophys Acta*. 1967;145(1):188-90.
 99. Boayse, F., Rafelson, M. Cell-free synthesis of contractile protein of human platelets: Its location and role in cellular adhesiveness. (Abstract). *Blood* 30, 553. 1967.
 100. Ault KA, Knowles C. In vivo biotinylation demonstrates that reticulated platelets are the youngest platelets in circulation. *Exp Hematol*. 1995;23(9):996-1001.
 101. Harrison P, Robinson MS, Mackie IJ, Machin SJ. Reticulated platelets. *Platelets*. 1997;8(6):379-83.

-
102. Angenieux C, Maitre B, Eckly A, Lanza F, Gachet C, de la Salle H. Time-Dependent Decay of mRNA and Ribosomal RNA during Platelet Aging and Its Correlation with Translation Activity. *PloS one*. 2016;11(1):e0148064.
 103. Berger G, Hartwell DW, Wagner DD. P-Selectin and platelet clearance. *Blood*. 1998;92(11):4446-52.
 104. Kieffer N, Guichard J, Farcet JP, Vainchenker W, Breton-Gorius J. Biosynthesis of major platelet proteins in human blood platelets. *Eur J Biochem*. 1987;164(1):189-95.
 105. Hanahachi A, Moritomo T, Kano R, Watari T, Tsujimoto H, Hasegawa A. Thiazole orange-positive platelets in healthy and thrombocytopenic dogs. *Vet Rec*. 2001;149(4):122-3.
 106. Katsman Y, Foo AH, Leontyev D, Branch DR. Improved mouse models for the study of treatment modalities for immune-mediated platelet destruction. *Transfusion*. 2010;50(6):1285-94.
 107. Maruyama H, Yamagami H, Watari T, Kano R, Fujino Y, Tsujimoto H, et al. Reticulated platelet levels in whole blood and platelet-rich plasma of dogs with various platelet counts measured by flow cytometry. *J Vet Med Sci*. 2009;71(2):195-7.
 108. Pankraz A, Ledieu D, Pralet D, Provencher-Bolliger A. Detection of reticulated platelets in whole blood of rats using flow cytometry. *Exp Toxicol Pathol*. 2008;60(6):443-8.
 109. Cesari F, Marcucci R, Caporale R, Paniccia R, Romano E, Gensini GF, et al. Relationship between high platelet turnover and platelet function in high-risk patients with coronary artery disease on dual antiplatelet therapy. *Thrombosis and haemostasis*. 2008;99(5):930-5.
 110. Guthikonda S, Lev EI, Patel R, DeLao T, Bergeron AL, Dong JF, et al. Reticulated platelets and uninhibited COX-1 and COX-2 decrease the antiplatelet effects of aspirin. *J Thromb Haemost*. 2007;5(3):490-6.

-
111. Hawker RJ, Aukland A. Platelet survival, atherosclerotic intermittent claudication and ticlopidine. *Atherosclerosis*. 1984;50(2):147-58.
 112. McBane RD, 2nd, Gonzalez C, Hodge DO, Wysokinski WE. Propensity for young reticulated platelet recruitment into arterial thrombi. *J Thromb Thrombolysis*. 2014;37(2):148-54.
 113. Harrison P, Goodall AH. "Message in the platelet"--more than just vestigial mRNA! *Platelets*. 2008;19(6):395-404.
 114. Zimmerman GA, Weyrich AS. Signal-dependent protein synthesis by activated platelets: new pathways to altered phenotype and function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28(3):s17-24.
 115. McRedmond JP, Park SD, Reilly DF, Coppinger JA, Maguire PB, Shields DC, et al. Integration of proteomics and genomics in platelets: a profile of platelet proteins and platelet-specific genes. *Mol Cell Proteomics*. 2004;3(2):133-44.
 116. Denis MM, Tolley ND, Bunting M, Schwertz H, Jiang H, Lindemann S, et al. Escaping the nuclear confines: signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets. *Cell*. 2005;122(3):379-91.
 117. Alberio L, Safa O, Clemetson KJ, Esmon CT, Dale GL. Surface expression and functional characterization of alpha-granule factor V in human platelets: effects of ionophore A23187, thrombin, collagen, and convulxin. *Blood*. 2000;95(5):1694-702.
 118. Mackman N. Triggers, targets and treatments for thrombosis. *Nature*. 2008;451(7181):914-8.
 119. Meadows TA, Bhatt DL. Clinical aspects of platelet inhibitors and thrombus formation. *Circ Res*. 2007;100(9):1261-75.
 120. Seite „Acetylsalicylsäure“. In: Wikipedia DfEBA, 16:13 UTC. URL: <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Acetylsalicyls%C3%A4ure&oldid=190953474>.

-
121. Berger JS, Roncaglioni MC, Avanzini F, Pangrazzi I, Tognoni G, Brown DL. Aspirin for the primary prevention of cardiovascular events in women and men: a sex-specific meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA*. 2006;295(3):306-13.
 122. Hennekens CH, Sechenova O, Hollar D, Serebruany VL. Dose of aspirin in the treatment and prevention of cardiovascular disease: current and future directions. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2006;11(3):170-6.
 123. Gachet C. The platelet P2 receptors as molecular targets for old and new antiplatelet drugs. *Pharmacol Ther*. 2005;108(2):180-92.
 124. Seite „Clopidogrel“. In: Wikipedia DfEBJ, 10:25 UTC. URL: <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Clopidogrel&oldid=189961574>.
 125. Seite „Prasugrel“. In: Wikipedia DfEBM, 02:44 UTC. URL: <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Prasugrel&oldid=188344739>.
 126. Seite „Ticagrelor“. In: Wikipedia DfEBA, 17:41 UTC. URL: <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Ticagrelor&oldid=180103415>
 127. Sabatine MS et al. Ticagrelor versus aspirin for acute coronary syndromes without percutaneous coronary intervention. *JAMA*.
 128. *J Med* 2007;345:494–502. Ticagrelor versus aspirin for acute coronary syndromes without percutaneous coronary intervention.
 129. Wiviott SD, Braunwald E, McCabe CH, Montalescot G, Ruzyllo W, Gottlieb S, et al. Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med*. 2007;357(20):2001-15.
 130. Kong DF, Califf RM, Miller DP, Moliterno DJ, White HD, Harrington RA, et al. Clinical outcomes of therapeutic agents that block the platelet glycoprotein IIb/IIIa integrin in ischemic heart disease. *Circulation*. 1998;98(25):2829-35.
 131. Ungar L, Rodriguez F, Mahaffey KW. Vorapaxar: emerging evidence and clinical questions in a new era of PAR-1 inhibition. *Coron Artery Dis*. 2016;27(7):604-15.

-
132. Lord ST. Fibrinogen and fibrin: scaffold proteins in hemostasis. *Curr Opin Hematol.* 2007;14(3):236-41.
 133. Intracerebral hemorrhage after intravenous t-PA therapy for ischemic stroke. The NINDS t-PA Stroke Study Group. *Stroke.* 1997;28(11):2109-18.
 134. Blais MC, Bianco D, Goggs R, Lynch AM, Palmer L, Ralph A, et al. Consensus on the Rational Use of Antithrombotics in Veterinary Critical Care (CURATIVE): Domain 3-Defining antithrombotic protocols. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio).* 2019;29(1):60-74.
 135. Boswood A, Lamb CR, White RN. Aortic and iliac thrombosis in six dogs. *J Small Anim Pract.* 2000;41(3):109-14.
 136. Arai S, Callan MB. Warfarin therapy in a dog with acute arterial thrombosis and pyometra. *Can Vet J.* 2014;55(11):1066-8.
 137. Lake-Bakaar GA, Johnson EG, Griffiths LG. Aortic thrombosis in dogs: 31 cases (2000-2010). *J Am Vet Med Assoc.* 2012;241(7):910-5.
 138. Tablin F, Schumacher T, Pombo M, Marion CT, Huang K, Norris JW, et al. Platelet activation in cats with hypertrophic cardiomyopathy. *J Vet Intern Med.* 2014;28(2):411-8.
 139. German AJ. The growing problem of obesity in dogs and cats. *J Nutr.* 2006;136(7 Suppl):1940s-6s.
 140. Novotny J, Chandraratne S, Weinberger T, Philippi V, Stark K, Ehrlich A, et al. Histological comparison of arterial thrombi in mice and men and the influence of Cl-amidine on thrombus formation. *PloS one.* 2018;13(1):e0190728.
 141. Frey, H.H., Löscher, W.,. *Pharmakologie des zentralen Nervensystems (ZNS).* (Enke Verlag, Stuttgart, 2010).

-
142. Erhardt W, Henke, J., Haberstroh, J., Baumgartner, C., Tacke, S., Kölle, P., Korbel, R., Kroker, R., Lendl, C., Lierz, M. Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier mit Exoten, Labortieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen. In: Erhardt, W., Henke, J., Haberstroh, J., Baumgartner, C., Tacke, S., editors. 2. vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage ed. Stuttgart: Schattauer; 2012.
 143. Massberg S, Eisenmenger S, Enders G, Krombach F, Messmer K. Quantitative analysis of small intestinal microcirculation in the mouse. *Res Exp Med (Berl)*. 1998;198(1):23-35.
 144. Bergmeier W, Rackebrandt K, Schroder W, Zirngibl H, Nieswandt B. Structural and functional characterization of the mouse von Willebrand factor receptor GPIb-IX with novel monoclonal antibodies. *Blood*. 2000;95(3):886-93.
 145. Elzey BD, Tian J, Jensen RJ, Swanson AK, Lees JR, Lentz SR, et al. Platelet-mediated modulation of adaptive immunity. A communication link between innate and adaptive immune compartments. *Immunity*. 2003;19(1):9-19.
 146. Nieswandt B, Bergmeier W, Rackebrandt K, Gessner JE, Zirngibl H. Identification of critical antigen-specific mechanisms in the development of immune thrombocytopenic purpura in mice. *Blood*. 2000;96(7):2520-7.
 147. Eckly A, Hechler B, Freund M, Zerr M, Cazenave JP, Lanza F, et al. Mechanisms underlying FeCl₃-induced arterial thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2011;9(4):779-89.
 148. Woollard KJ, Sturgeon S, Chin-Dusting JP, Salem HH, Jackson SP. Erythrocyte hemolysis and hemoglobin oxidation promote ferric chloride-induced vascular injury. *J Biol Chem*. 2009;284(19):13110-8.
 149. Li W, McIntyre TM, Silverstein RL. Ferric chloride-induced murine carotid arterial injury: A model of redox pathology. *Redox biology*. 2013;1:50-5.
 150. Chen K, Febbraio M, Li W, Silverstein RL. A specific CD36-dependent signaling pathway is required for platelet activation by oxidized low-density lipoprotein. *Circ Res*. 2008;102(12):1512-9.

-
151. Ghosh A, Li W, Febbraio M, Espinola RG, McCrae KR, Cockrell E, et al. Platelet CD36 mediates interactions with endothelial cell-derived microparticles and contributes to thrombosis in mice. *J Clin Invest.* 2008;118(5):1934-43.
 152. Li W, Febbraio M, Reddy SP, Yu DY, Yamamoto M, Silverstein RL. CD36 participates in a signaling pathway that regulates ROS formation in murine VSMCs. *J Clin Invest.* 2010;120(11):3996-4006.
 153. Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Multiplate und COBAS, Multiplate Analyzer für die Thrombozytenfunktionstestung, Broschüre. 2013.
 154. Hvas AM, Grove EL. Platelet Function Tests: Preanalytical Variables, Clinical Utility, Advantages, and Disadvantages. *Methods Mol Biol.* 2017;1646:305-20.
 155. Jameson DM, Croney JC, Moens PD. Fluorescence: basic concepts, practical aspects, and some anecdotes. *Methods Enzymol.* 2003;360:1-43.
 156. Oheim M, Michael DJ, Geisbauer M, Madsen D, Chow RH. Principles of two-photon excitation fluorescence microscopy and other nonlinear imaging approaches. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006;58(7):788-808.
 157. Ishikawa-Ankerhold HC, Ankerhold R, Drummen GP. Advanced fluorescence microscopy techniques--FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM. *Molecules.* 2012;17(4):4047-132.
 158. Lichtman JW, Conchello JA. Fluorescence microscopy. *Nat Methods.* 2005;2(12):910-9.
 159. Heimstädt, O. Das Fluoreszenzmikroskop, *Z Wiss Mikrosk*, 28, 330-337 (1911).
 160. Ellinger, P. Mikroskopische Untersuchung an lebenden Organen. I. Mitteilung. Methodik: Intravitalmikroskopie. *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte* 90, 791-802 (1929).

-
161. Klaus W. The Basic Principle of Airyscanning, 2014, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland.
 162. Huff J. The Airyscan detector from ZEISS: confocal imaging with improved signal-to-noise ratio and super-resolution. *Nature Methods*. 2015;12:1205.
 163. Scipioni L, Lanzano L, Diaspro A, Gratton E. Comprehensive correlation analysis for super-resolution dynamic fingerprinting of cellular compartments using the Zeiss Airyscan detector. *Nature communications*. 2018;9(1):5120.
 164. Thews, A., Einführung in die Durchflusszytometrie und ihre Anwendungen, Coulter-Immunotech-Diagnostics, Hamburg, Durchflusszytometrie, Stand 8/1997; 3-15.
 165. BD Deutschland, Grundlagen der Durchflusszytometrie, Arbeiten mit dem BD Fortessa und dem BD FACS ARIA III, Heidelberg, Germany, 2011.
 166. Einführung in die Durchflusszytometrie: Trainingsvorbereitung, BD Bioscience, Heidelberg, Germany, 2014.
 167. Ethier C, Lacy P, Davoine F. Identification of human eosinophils in whole blood by flow cytometry. *Methods Mol Biol*. 2014;1178:81-92.
 168. Ejim OS, Powling MJ, Dandona P, Kernoff PB, Goodall AH. A flow cytometric analysis of fibronectin binding to platelets from patients with peripheral vascular disease. *Thromb Res*. 1990;58(5):519-24.
 169. Wehmeier A, Tschöpe D, Esser J, Menzel C, Nieuwenhuis HK, Schneider W. Circulating activated platelets in myeloproliferative disorders. *Thromb Res*. 1991;61(3):271-8.
 170. Shattil SJ, Cunningham M, Hoxie JA. Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry. *Blood*. 1987;70(1):307-15.

-
171. Ault KA. The clinical utility of flow cytometry in the study of platelets. *Semin Hematol.* 2001;38(2):160-8.
 172. Ault KA. Flow cytometric measurement of platelet-associated immunoglobulin. *Pathol Immunopathol Res.* 1988;7(5):395-408.
 173. Ault KA, Mitchell J. Analysis of platelets by flow cytometry. *Methods Cell Biol.* 1994;42 Pt B:275-94.
 174. Zucker-Franklin D, Karpatkin S. Red-cell and platelet fragmentation in idiopathic autoimmune thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med.* 1977;297(10):517-23.
 175. Falati S, Gross P, Merrill-Skoloff G, Furie BC, Furie B. Real-time in vivo imaging of platelets, tissue factor and fibrin during arterial thrombus formation in the mouse. *Nat Med.* 2002;8(10):1175-81.
 176. Grosse J, Braun A, Varga-Szabo D, Beyersdorf N, Schneider B, Zeitlmann L, et al. An EF hand mutation in Stim1 causes premature platelet activation and bleeding in mice. *J Clin Invest.* 2007;117(11):3540-50.
 177. Lee LG, Chen CH, Chiu LA. Thiazole orange: a new dye for reticulocyte analysis. *Cytometry.* 1986;7(6):508-17.
 178. Robinson M, MacHin S, Mackie I, Harrison P. In vivo biotinylation studies: specificity of labelling of reticulated platelets by thiazole orange and mepacrine. *Br J Haematol.* 2000;108(4):859-64.
 179. Hille L, Cederqvist M, Hromek J, Stratz C, Trenk D, Nuhrenberg TG. Evaluation of an Alternative Staining Method Using SYTO 13 to Determine Reticulated Platelets. *Thrombosis and haemostasis.* 2019;119(5):779-85.
 180. Syto RNASelect Green Fluorescent Cell Stain MP, Invitrogen detection technologies <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/S32703>.

-
181. Morowski M, Vogtle T, Kraft P, Kleinschnitz C, Stoll G, Nieswandt B. Only severe thrombocytopenia results in bleeding and defective thrombus formation in mice. *Blood*. 2013;121(24):4938-47.
182. Gupta S, Cherpokova D, Spindler M, Morowski M, Bender M, Nieswandt B. GPVI signaling is compromised in newly formed platelets after acute thrombocytopenia in mice. *Blood*. 2018;131(10):1106-10.
183. Seite „Integrin β -3“. In: Wikipedia DfEBN, 13:44 UTC. URL: https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Integrin_%CE%B2-3&oldid=183032809 (Abgerufen: 12. September 2019, 18:10 UTC).
184. Seite „Thrombozyten-Selektin“. In: Wikipedia DfEBF, 09:49 UTC. URL: <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Thrombozyten-Selektin&oldid=162368074> (Abgerufen: 12. September 2019, 18:11 UTC).
185. Glycoprotein IX Wc, Wikipedia, The Free Encyclopedia. Date of last revision: 25 March 2019 06:18 UTC, Date retrieved: 12 September 2019 18:13 UTC, Permanent link: https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Glycoprotein_IX&oldid=889363112, Primary contributors: Revision history statistics, Page Version ID: 889363112.
186. Unsworth AJ, Bombik I, Pinto-Fernandez A, McGouran JF, Konietzny R, Zahedi RP, et al. Human Platelet Protein Ubiquitylation and Changes following GPVI Activation. *Thrombosis and haemostasis*. 2019;119(1):104-16.
187. Orban M, Goedel A, Haas J, Sandrock-Lang K, Gartner F, Jung CB, et al. Functional comparison of induced pluripotent stem cell- and blood-derived GPIIb/IIIa deficient platelets. *PloS one*. 2015;10(1):e0115978.
188. Handtke S, Steil L, Palankar R, Conrad J, Cauhan S, Kraus L, et al. Role of Platelet Size Revisited-Function and Protein Composition of Large and Small Platelets. *Thrombosis and haemostasis*. 2019;119(3):407-20.

-
189. Polanowska-Grabowska R, Raha S, Gear AR. Adhesion efficiency, platelet density and size. *Br J Haematol.* 1992;82(4):715-20.
 190. Hoefler T, Armstrong PC, Finsterbusch M, Chan MV, Kirkby NS, Warner TD. Drug-Free Platelets Can Act as Seeds for Aggregate Formation During Antiplatelet Therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35(10):2122-33.
 191. Rocca B, Secchiero P, Ciabattini G, Ranelletti FO, Catani L, Guidotti L, et al. Cyclooxygenase-2 expression is induced during human megakaryopoiesis and characterizes newly formed platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(11):7634-9.
 192. Weber AA, Zimmermann KC, Meyer-Kirchrath J, Schror K. Cyclooxygenase-2 in human platelets as a possible factor in aspirin resistance. *Lancet.* 1999;353(9156):900.
 193. Zimmermann N, Wenk A, Kim U, Kienzle P, Weber AA, Gams E, et al. Functional and biochemical evaluation of platelet aspirin resistance after coronary artery bypass surgery. *Circulation.* 2003;108(5):542-7.
 194. Macaulay IC, Tijssen MR, Thijssen-Timmer DC, Gusnanto A, Steward M, Burns P, et al. Comparative gene expression profiling of in vitro differentiated megakaryocytes and erythroblasts identifies novel activatory and inhibitory platelet membrane proteins. *Blood.* 2007;109(8):3260-9.
 195. Ouwehand WH. Platelet genomics and the risk of atherothrombosis. *J Thromb Haemost.* 2007;5 Suppl 1:188-95.
 196. Weyrich AS, Dixon DA, Pabla R, Elstad MR, McIntyre TM, Prescott SM, et al. Signal-dependent translation of a regulatory protein, Bcl-3, in activated human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(10):5556-61.

XIII. PUBLIKATIONEN IM RAHMEN DER LABORTÄTIGKEIT

Novotny J, Chandraratne S, Weinberger T, Philippi V, Stark K, Ehrlich A, et al. Histological comparison of arterial thrombi in mice and men and the influence of Cl-amidine on thrombus formation. *PloS one*. 2018;13(1):e0190728.

von Gamm M, Schaub A, Jones AN, Wolf C, Behrens G, Lichti J, Essig K, Macht A, Pircher J, Ehrlich A et al. Immune homeostasis and regulation of the interferon pathway require myeloid-derived Regnase-3. *The Journal of experimental medicine*. 2019.

Pircher J, Czermak T, Ehrlich A, Eberle C, Gaitzsch E, Margraf A, et al. Cathelicidins prime platelets to mediate arterial thrombosis and tissue inflammation. *Nature communications*. 2018;9(1):1523.

Lusebrink E, Warm V, Pircher J, Ehrlich A, Zhang Z, Strecker J, et al. Role of RXRbeta in platelet function and arterial thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2019.

Stocker TJ, Pircher J, Skenderi A, Ehrlich A, Eberle C, Megens RTA, et al. The Actin Regulator Coronin-1A Modulates Platelet Shape Change and Consolidates Arterial Thrombosis. *Thrombosis and haemostasis*. 2018;118(12):2098-111.

Petzold T, Thienel M, Dannenberg LK, Mourikis P, Helten C, Ayhan A, M'Pembele R, Achilles A, Trojovsky K, Konsek D, Zang Z, Regenauer R, Pircher J, Ehrlich A et al. Rivaroxaban Reduces Arterial Thrombosis by Inhibition of FXa Driven Platelet Activation Via Protease Activated Receptor-1. *Circulation Research*. 2019

XIV. DANKSAGUNG

Zuerst möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Christian Schulz für die Überlassung der hier vorliegenden Doktorarbeit bedanken. Dank der interessanten Aufgabenstellung und einer äußerst angenehmen Atmosphäre in seiner Arbeitsgruppe war es eine Freude, diese Arbeit anzufertigen.

Bei Herrn Prof. Dr. med. vet. Reinhard Straubinger möchte ich mich für die Übernahme, Durchsicht, Korrektur und Einreichung der vorliegenden Dissertation an der Tiermedizinischen Fakultät der LMU München ganz herzlich bedanken.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Betreuer Dr. med. Joachim Pircher für die Einarbeitung in das Projekt, die viele Unterstützung, die anregenden Gespräche und der gemeinsamen Findung von Lösungsansätzen für die Beantwortung der vorliegenden Fragestellung.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe Massberg/Schulz bedanke ich mich für die tolle Zusammenarbeit und für den großen Zusammenhalt untereinander. Die Atmosphäre im Team hat stark dazu beigetragen, die Arbeit jeden Tag ein Stück leichter zu machen. Ein besonderer Dank gilt hierbei Dr. med. vet. Susanne Sauer, Michael Lorenz, Zeljka Susic und Anna Titova, die stets ein offenes Ohr für Fragen hatten.

Ein weiterer Dank geht an Leo Nicolai für die vielen anregenden Gespräche und der technischen Anleitung der Flusskammerversuche.

Bei Artid Skenderi und Lisa Wasner bedanke ich mich für die Unterstützung bei den Spreading- und Multiplateversuchen.

Vielen Dank auch an Dominik van den Heuvel für die technischen Hilfestellungen am Konfokalmikroskop und für die Korrektur der Arbeit.

Bei meinen Eltern und meiner Schwester möchte ich mich an dieser Stelle von ganzem Herzen für euer vieles Verständnis, die aufbauenden Worte und Hilfe bei der Korrektur der Arbeit bedanken. Ohne euch hinter mir zu wissen, wären viele Ziele unerreicht geblieben. Dank euch habe ich meinen Platz im Leben gefunden. Ein weiterer großer Dank geht an meine Partnerin Maren, für deine unermüdliche Unterstützung, für deine Geduld, dafür, dass du mir jeden Tag den Rücken freigehalten hast. Du hast es geschafft, mich immer wieder auf ein Neues zu motivieren. Vielen Dank auch an deine Mutter Ines für ihre unermüdliche und gründliche Korrektur.

Abschließend gilt mein Dank all meinen Freunden, ohne die das Gelingen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.