

**Validierung der Eignung verschiedener Tiermodelle
zur Aufarbeitung von Fragestellungen
aus dem kardiovaskulären Bereich**

von Manuela Bettina Büttcher

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Validierung der Eignung verschiedener Tiermodelle
zur Aufarbeitung von Fragestellungen
aus dem kardiovaskulären Bereich**

von Manuela Bettina Büttcher
aus Stuttgart – Bad Cannstatt

München 2020

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

Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Priv.-Doz. Dr. Sven Reese

Angefertigt an der

Medizinischen Klinik – Innere Medizin III – Kardiologie und Angiologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

Mentor: Univ.-Prof. Dr. med. Meinrad Gawaz, Ärztlicher Direktor

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

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

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Sven Reese

Korreferent: Prof. Dr. Gerhard Wess

Tag der Promotion: 25. Juli 2020

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Schrifttum	5
2.1	Blutgefäße	5
2.1.1	Aufbau und Funktion	5
2.1.2	Verletzung von Blutgefäßen	8
2.2	Thrombusbildung	9
2.2.1	Beteiligte Zellen und Chemokine	9
2.3	Untersuchung der Thrombusbildung	13
2.3.1	Methoden zur Untersuchung der Thrombusbildung <i>in vitro</i>	13
2.3.1.1	Verfahren zur Bestimmung von Thrombozytenanzahl und Blutgerinnung im klinischen Alltag	13
2.3.1.2	Verfahren zur Untersuchung des Thrombozytenaufbaus, der beteiligten Proteine und durch Thrombozyten gebildeten Substanzen	14
2.3.1.3	Verfahren zur Untersuchung der Thrombozytenfunktion	15
2.3.2	Methoden zur Untersuchung der Thrombusbildung <i>in vivo</i>	17
2.3.2.1	Blutungszeit	17
2.3.2.2	Immunfluoreszenz an Gewebeschnitten	18
2.3.2.3	Ischämie/Reperfusion	18
2.3.2.4	Intravitalmikroskopie an der Mikro- und Makrozirkulation	19
2.4	Verletzungsmodelle zum Auslösen einer Thrombusbildung in Blutgefäßen	19
2.5	Intravitalmikroskopie	23

2.6	Andere bildgebende Verfahren	24
2.6.1	Flussmessung mit Laser Doppler <i>Imaging</i>	24
2.7	Anfärbung von Thrombozyten zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung <i>in vivo</i>	26
2.7.1	Färbelösungen zur Markierung von Thrombozyten	26
2.7.2	Antikörper zur Markierung von Thrombozyten.....	28
2.7.3	Genetische Markierung von Thrombozyten.....	30
3	Eigene Untersuchungen	33
3.1	Zielsetzung	33
3.2	Material und Methoden	34
3.2.1	Versuchstiere	34
3.2.1.1	Mauslinien	34
3.2.1.2	Haltung der Tiere	35
3.2.2	Verletzungsmethoden	36
3.2.2.1	Anästhesie.....	37
3.2.2.2	Instrumente und Geräte	37
3.2.2.3	Vorbereitung und Lagerung für den Eingriff	39
3.2.2.4	Der operative Eingriff.....	42
3.2.3	Bildgebung	47
3.2.3.1	Intravitalmikroskopie.....	47
3.2.3.2	Laser Doppler <i>Imaging</i>	49
3.2.4	Datenerhebung	51

3.2.4.1	Intravitalmikroskopie.....	51
3.2.4.2	Laser Doppler <i>Imaging</i>	52
3.2.5	Statistische Verfahren zur Datenanalyse.....	53
3.3	Ergebnisse	54
3.3.1	Methodische Ergebnisse.....	54
3.3.1.1	Verifikation der Eignung der verwendeten Mauslinie.....	54
3.3.1.2	Untersuchung der intraarteriellen Thrombusbildung in der <i>A. carotis communis</i> .	56
3.3.1.2.1	FeCl ₃ -Modell	56
3.3.1.2.2	Carotis-Ligatur-Modell.....	63
3.3.1.2.3	Modell Carotis-Ligatur mit Reststenose	69
3.3.1.3	Vergleich der Thrombosemodelle	74
3.3.1.4	Vergleich der Auswertungsmethoden bei intravitalmikroskopischen Untersuchungen	78
3.3.2	Ergebnisse einer Auswahl bearbeiteter Projekte	79
3.3.2.1	Einfluss des löslichen Rezeptors JamA auf die Thrombusbildung <i>in vivo</i>	79
3.3.2.2	Wirkung einer anti-thrombotischen Testsubstanz zur Inhibition oder Reduktion der Thrombusbildung.....	82
3.3.2.3	Entwicklung eines neuen Thrombosemodells zur Verstärkung der Thrombusbildung im Thrombosemodell der Carotis-Ligatur.....	86
4	Diskussion	91
5	Zusammenfassung.....	109
6	Summary.....	113

7	Literaturverzeichnis	117
8	Tabellenverzeichnis	127
9	Abbildungsverzeichnis	129
10	Abkürzungsverzeichnis	135
11	Anhang.....	137

1 Einleitung

Die Hämostase und die Bildung von Thromben sind von großer Bedeutung für den Organismus um Blutverluste zu vermeiden. Eine überschießende Thrombusbildung hat jedoch auch negative Effekte, wie den Verschluss von Blutgefäßen, die für die Versorgung bestimmter Bereiche im Organismus wichtig sind, und Thromboembolien, die zu Schlaganfall, Myokardinfarkt oder einer Lungenembolie führen können und in der Folge nicht selten zum Tod des Patienten. Durch Thromboembolien ausgelöste Erkrankungen stellen die führende Todesursache für die Bevölkerung in Industrienationen dar. Aus diesem Grunde ist es unerlässlich, ein tiefes Verständnis für die Vorgänge bei der Thrombusbildung zu erlangen. Nur wenn alle Mechanismen vollständig bekannt sind, kann optimal therapeutisch in Krankheitsgeschehen eingegriffen werden, die auf der unerwünschten Bildung von Thromben beruhen. Ein wichtiges Ziel ist dabei, das Blutungsrisiko durch eine verminderte Blutgerinnung möglichst gering zu halten.

Viele Methoden wurden entwickelt, um die Thrombusbildung *in vitro* zu studieren. Alle diese Methoden stoßen jedoch an ihre Grenzen, da das komplexe Zusammenspiel von Geweben, Zellen und Chemokinen nicht in Gänze *in vitro* nachgestellt werden kann.

Aus diesem Grunde ist es unerlässlich, *in vivo* Versuche durchzuführen mit denen die Thrombusbildung im realen Geschehen näher beleuchtet werden kann und die Wirkung von Substanzen und Rezeptoren auf den Aufbau und die Stabilität von Thromben näher untersucht werden kann. Dazu wurden über die Jahre mehrere Modelle mit Erfolg eingesetzt. Die Versuche werden in der Regel an Mäusen und Ratten durchgeführt und sind mittlerweile gut etabliert.

Bei *in vivo* Versuchen ist immer der Nutzen für die Wissenschaft und im vorliegenden Fall für die Gesundheit des Menschen gegenüber dem Tierwohl abzuwägen. Daher haben tierexperimentell arbeitende Wissenschaftler eine große Verantwortung gegenüber den in ihren Versuchen eingesetzten Tieren. Als ethische Richtlinie kann daher das Prinzip der „3R“ angesehen werden. Die drei „R“ stehen für die Begriffe *Replace* (Ersetzen, Vermeiden), *Reduce* (Verringern), *Refine* (Verbessern) und wurden von den britischen Forschern William

Russell und Rex Burch in ihrem Buch „*The Principles of Humane Experimental Technique*“ (Russel und Burch 1959) beschrieben. Für die praktische Umsetzung des ersten „R“ (*Replace*) bedeutet das, unnötige Versuche an Tieren zu **vermeiden**. Daher sollten beispielsweise auch lang bewährte Verfahren immer wieder im Hinblick auf ihre Sinnhaftigkeit überprüft werden und mögliche Alternativen in Betracht gezogen werden. Um Tierzahlen zu **verringern** (*Reduce*), können möglicherweise Verfahren verbessert werden, sei es über den Einsatz von geeigneteren Organismen mit einer genetischen Ausstattung, die eine bessere Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen erlaubt, oder über Verfahren, die größere Gruppenunterschiede erlauben, damit die Signifikanz der Ergebnisse erhöhen und in der Folge zu einer Reduktion der Tierzahlen führen. Diese Verbesserung und Verfeinerung der Versuchsdurchführung wird auch vom dritten „R“ (*Refine*) repräsentiert. Neben **Verfeinerungen** die zu verbesserten Ergebnissen führen, ist hier auch die Senkung der Belastung für das einzelne Versuchstier ein wesentlicher Punkt. Über den Einsatz von passenden Anästhetika und Analgetika kann das Leiden der Tiere reduziert werden. Die Durchführung von Finalversuchen, also Experimenten, die mit dem Einleiten einer Allgemeinanästhesie beginnen, aus der das Tier vor seinem Tod nicht wieder erwacht, ist Versuchen vorzuziehen, bei denen Tiere nach einem Eingriff wieder erwachen und noch für eine gewisse Zeit weiterleben, wenn damit vergleichbare Ergebnisse erzielt werden können. Durch gute Untersuchungen und Beobachtung von Tieren im Laufe ihres Lebens, sowie der Sektion des Tierkörpers nach ihrem Tod, können mögliche Belastungen erkannt werden, denen genetisch veränderte Versuchstiere aufgrund ihrer Mutationen ausgesetzt sind. Mit diesem Wissen können Maßnahmen getroffen werden, um diese Belastungen zu reduzieren. Häufig kann das über eine veränderte Haltung erreicht werden, oder die Tiere werden aus dem Versuch oder aus der Zucht genommen, bevor eine solche Belastung auftritt.

Im Zusammenhang mit Untersuchungen zur Thrombusbildung fällt die Entscheidung, welches *in vivo* Modell für welche Fragestellung gewählt werden sollte, nicht immer leicht und hängt von vielen Faktoren ab. Nicht jedes Modell liefert für jede Fragestellung gleichermaßen die gewünschte Antwort, auch wenn die Thrombusbildung auf den ersten Blick ähnlich abläuft.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, zwei bewährte Modelle für die Erforschung der Thrombusbildung an Mäusen auf ihren Wert für diese Forschung zu evaluieren, sie zu vergleichen, ihre Vorteile und Grenzen näher zu untersuchen und Möglichkeiten für Verbesserungen dieser Modelle zu eruieren. Im Zuge dessen wurde eines der Modelle modifiziert und weiterentwickelt und somit ein weiteres Modell entwickelt, welches in Zukunft für Fragestellungen aus dem Bereich der Thrombusbildung eingesetzt werden kann.

2 Schrifttum

2.1 Blutgefäße

Der Blutkreislauf besteht einerseits aus dem Herz und andererseits aus den Blutgefäßen. Ihre Funktion ist der Transport von Zellen, Flüssigkeit, Sauerstoff, Antikörpern und vielen weiteren Stoffen, die den intravasalen Druck aufrechterhalten, der Ernährung von Zellen des Körpers dienen und als Botenstoffe zwischen unterschiedlichen Organen und Zellen vermitteln. Sie dienen außerdem dem Abtransport von Stoffwechselprodukten und der Thermoregulation (Gabella 1995, Secomb 2016).

2.1.1 Aufbau und Funktion

Abhängig von der Menge des zu transportierenden Bluts, der Funktion und des herrschenden Blutdrucks in den verschiedenen Gefäßen eines Organismus unterscheidet sich deren Aufbau. Der grundsätzliche Aufbau aus einer *Tunica externa (adventitia)*, *Tunica media* und einer *Tunica interna (Intima)* ist jedoch bei jedem größeren Blutgefäß der gleiche (Gabella 1995, Kummer und Welsch 2018, Rhodin 1980).

Die größte Wandstärke und damit alle Wandelemente in voller Ausprägung findet man bei den großen Arterien (Abbildung 1). Die *Tunica interna*, auch *Intima* genannt, setzt sich zusammen aus einem einschichtigen Endothel, der Basalmembran und dem bindegewebigen *Stratum subendotheliale* mit der *Membrana elastica interna*. Bei großen Arterien ist die *Tunica media* deutlich ausgeprägt und umfasst eine relativ dicke Muskelschicht aus mehreren Lagen glatter Muskulatur, die von elastischen und kollagenen Fasern durchzogen wird. Der Muskelschicht liegt außen die *Membrana elastica externa* an, die den Übergang zur *Tunica adventitia* bildet. Diese besteht aus lockerem Bindegewebe, das von kleinen Blutgefäßen (*Vasa vasorum*) und Nervenfasern durchzogen wird und die Arterie mit dem angrenzenden Gewebe verbindet. Die *Vasa vasorum* versorgen die äußeren Anteile der Gefäßwand, einschließlich der *Tunica media*. Die inneren Schichten werden durch das Blut versorgt, das im Lumen der Arterie fließt (Gabella 1995, Kummer und Welsch 2018, Rhodin 1980).

Arterien müssen im Inneren hohe Drücke aushalten. Ein Stoffaustausch mit der Umgebung ist bei dieser Gefäßgattung jedoch zweitrangig. Sie transportieren das Blut vom Herzen über weite Strecken zu peripheren Geweben und Organen, wo es gebraucht wird. Die kräftige Muskelschicht und die zahlreichen elastischen Fasern sorgen dafür, dass in einer sich wellenförmig fortpflanzenden Querschnittsänderung des Lumens (Puls) das in der Systole des Herzens ausgeworfene Blut weiter befördert wird (Gabella 1995, Herman 2007, Secomb 2016). Nach einer mehrfachen Aufzweigung zu immer kleiner werdenden Arterien, bei denen sowohl das Lumen wie auch der Anteil an elastischen Fasern und schließlich auch die Dicke der Muskelschicht abnimmt, werden die Gefäße als Arteriolen bezeichnet. Sie sind die kleinsten noch mit einer Muskelschicht ausgestatteten Gefäße und verlaufen schon innerhalb der Zielgewebe. Häufig fehlt auch eine eindeutige *Membrana elastica interna*. Sie münden in die kleinsten Gefäße des Organismus – die Kapillaren (Gabella 1995, Kummer und Welsch 2018, Rhodin 1980).

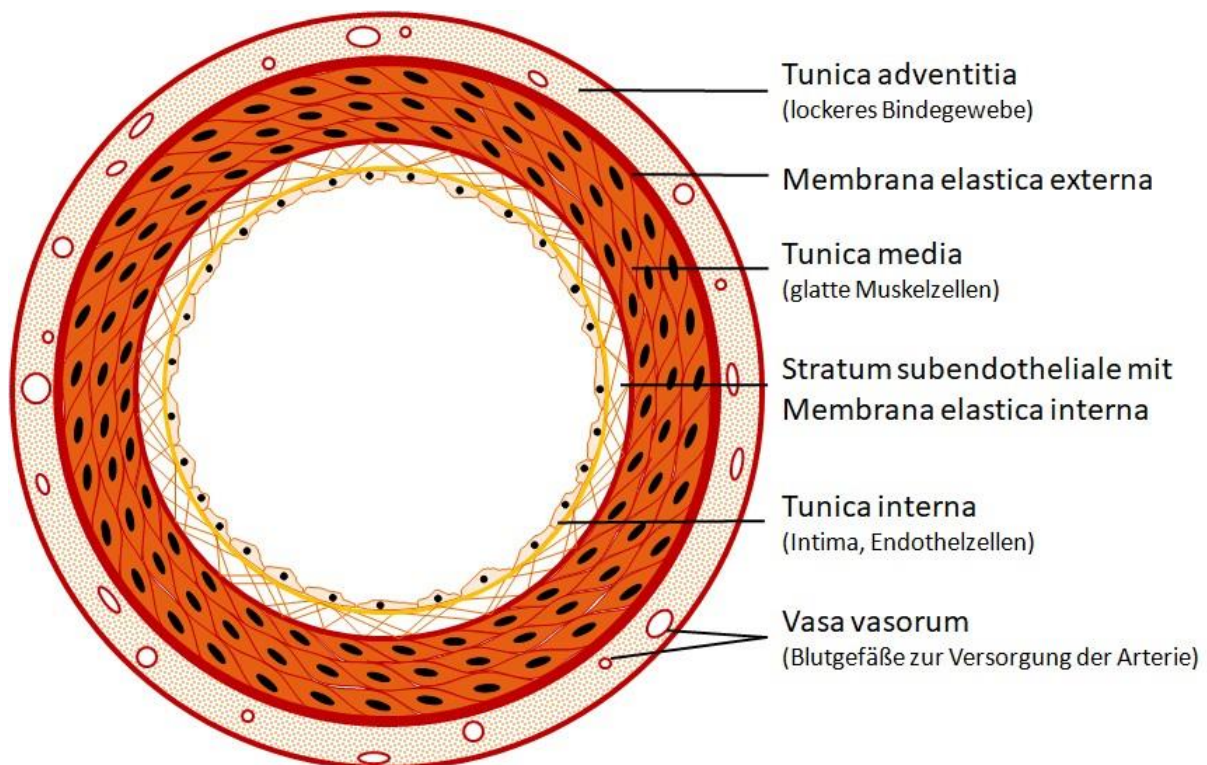


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Wandbaus einer dickwandigen Arterie ähnlich der *A. carotis communis* (eigene Grafik in Anlehnung an Gabella 1995 und Kummer und Welsch 2018)

Kapillaren bilden die Endstrombahn des Kreislaufs. Sie dienen unmittelbar der Versorgung von Organen und Geweben mit Nährstoffen, Sauerstoff und Zellen. Sie nehmen Stoffwechselprodukte auf und sorgen für einen Ausgleich des Flüssigkeitshaushalts (Kummer und Welsch 2018, Sperandio und Brandes 2019). Ihre Wand ist auf eine Schicht Endothel (geschlossen, fenestriert oder offen) und eine, je nach Versorgungsgebiet durchgängige, fenestrierte oder sogar fehlende Basalmembran reduziert. Der Basalmembran liegen an der Außenseite häufig Perizyten an (Rhodin 1980). Aus den Kapillaren gelangt das Blut in Venolen mit vereinzelt glatten Muskelfasern. Venolen dienen unter anderem auch als Blutspeicher und laufen zu Venen zusammen, die auf ihrem Weg zum Herz zurück weiträumiger werden und eine stärkere Wand besitzen, bei der *Tunica externa (adventitia)*, *Tunica media* und *Tunica interna (Intima)* gut unterschieden werden können. Im Vergleich zu Arterien besitzen Venen keine *Membrana elastica interna* und die *Tunica media* ist weniger stark ausgeprägt. Der Anteil glatter Muskelfasern in der *Tunica media*, die weniger in Schichten als in Bündeln angeordnet sind, ist sehr viel geringer als bei Arterien, dafür ist der Anteil kollagener und elastischer Fasern sehr groß, was die hohe Dehnbarkeit der Venen erklärt (Kummer und Welsch 2018). Venen liegen meist in enger Nachbarschaft zur Körpermuskulatur und deren Kontraktion unterstützt den Rücktransport des Blutes zum Herzen hin (Herman 2007, Secomb 2016). Ein Rückstrom wird durch sogenannte Venenklappen verhindert, die aus Duplikaturen der *Tunica interna* bestehen, die mit Kollagen und elastischen Fasern verstärkt sind. Die Anordnung der Endothelzellen der taschenförmigen Venenklappen unterscheidet sich je nachdem ob sie lumenseitig (longitudinal angeordnet) oder wandseitig (transversal angeordnet) liegen (Gabella 1995).

Dem Endothel kommt im Zusammenhang mit der intravasalen Thrombusbildung eine besondere Bedeutung zu. Als einschichtiges Plattenepithel ist es sehr anpassungsfähig und besitzt Poren für eine verbesserte Permeabilität (Rhodin 1980). Es kleidet alle Blutgefäße aus und trennt dabei das Blut von der subendothelialen Matrix. Auf diese Weise verhindert das Endothel in einem gesunden, unverletzten Blutgefäß die Aktivierung und Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten. Auf der Oberfläche von Endothelzellen wird Thrombomodulin exprimiert, das Thrombin bindet und dabei inhibitorisch in mehrere Schritte der Blutgerinnung eingreift. Zudem wirkt der Thrombomodulin-Thrombin-Komplex über die Aktivierung der Protease Protein C fibrinolytisch. Als weiterer antithrombotischer

Mechanismus befindet sich auch Heparansulfat auf der Endothelzellmembran, welches die inaktivierende Wirkung von Antithrombin III auf Thrombin verstärkt. Die gleiche Wirkung hat Heparin, welches von Endothelzellen und Mastzellen gebildet und freigesetzt wird (Buddecke 2007, Heinle 2007, Kaspers und Göbel 2005, Nawroth 1997, Sperandio und Brandes 2019).

2.1.2 Verletzung von Blutgefäßen

Auf die Verletzung eines Blutgefäßes reagiert der Körper zunächst mit einer Vasokonstriktion des betroffenen Gefäßes. Außerdem bildet sich ein Thrombozytenaggregat an der Stelle der Verletzung und die Blutgerinnung setzt ein. Eine Heilung durch die Bildung von Bindegewebe beginnt erst nach mehreren Stunden oder Tagen. Kleine Verletzungen passieren auch unter physiologischen Bedingungen immer wieder und verheilen durch diese Mechanismen meist unerkant (Silverthorn 2009).

Für die Thrombusbildung spielt vor allem die Verletzung des Endothels eine große Rolle. Fehlen Endothelzellen, liegt die subendotheliale Matrix frei und die zuvor aufgeführten antithrombotischen Mechanismen fallen weg. Thrombozyten lagern sich an Proteine des Stratum subendotheliale an, wie zum Beispiel an Laminin, Fibronektin und vor allem Kollagen. Dabei ist Kollagen das am stärksten thrombogen wirkende Protein, welches auch *in vitro* zur Plättchenaktivierung verwendet werden kann. *In vivo* wird die Thrombozytenadhäsion in erster Linie durch den von-Willebrand-Faktor (vWF) vermittelt, welcher von Endothelzellen und Megakaryozyten gebildet wird. Im Zuge einer Gefäßverletzung bindet vWF an Kollagenstrukturen und verändert dabei seine Konformation, was wiederum zu einer Bindung an den Rezeptor-Komplex aus den Glykoproteinen Ib, V und IX (GPIb-V-IX) auf Thrombozyten führt. Durch diese Bindung wird eine Adhäsion der Thrombozyten im Bereich der freiliegenden Matrix erreicht und ebenfalls eine Aktivierung der Thrombozyten, welche für die Anziehung und Aktivierung weiterer Thrombozyten notwendig ist (Massberg *et al.* 2003, Kaspers und Göbel 2005).

Durch dieses Thrombozytenaggregat wird der Endotheldefekt temporär verschlossen. Es kann nicht aufgelöst werden, kann sich jedoch durch den Blutfluss ablösen. Daher wird es im

Zuge der einsetzenden Blutgerinnung durch Fibrin vernetzt und stabilisiert, bis sich die Läsion durch die Bildung neuer Endothelzellen verschlossen hat (Scharf 1997).

2.2 Thrombusbildung

Der Aufbau eines Thrombus ist ein komplexer Vorgang (Renne *et al.* 2006, Sachs und Nieswandt 2007), der nicht alleine mit *in vitro* Experimenten untersucht werden kann. *In vivo* Experimente sind notwendig, um den Vorgang in Gänze zu verstehen. Noch immer gibt es eine Menge offener Fragestellungen, die über die nächsten Jahre zu klären sind.

2.2.1 Beteiligte Zellen und Chemokine

An der Thrombusbildung sind mehrere Gewebetypen, Zellen und Chemokine beteiligt. Auf die antithrombotischen Eigenschaften intakten Endothels wurde im vorigen Kapitel schon kurz eingegangen. Der Untergang von Endothelzellen jedoch führt dazu, dass prothrombotische Stoffe frei werden und eine Thrombusbildung am verletzten Areal einleiten. Einer dieser Stoffe ist der von-Willebrand-Faktor vWF. Dieser wird unter anderem in Endothelzellen gebildet und von diesen an das Blut und die subendotheliale Matrix abgegeben. Wenn diese subendotheliale Matrix durch den Untergang von Endothelzellen frei gelegt wird, tritt vWF aus und heftet sich an kollagene Fasern. Diese Bindung vermittelt daraufhin die Bindung des Rezeptorkomplexes GPIIb-V-IX auf Thrombozyten an das freiliegende Kollagen mit vWF als Brücke (Jelkmann 2019). vWF wird auch von Megakaryozyten gebildet, in Thrombozyten gespeichert und bei deren Aktivierung zusammen mit vielen anderen Stoffen freigesetzt. Die Bindung von Thrombozyten an Kollagen über den GPIIb-V-IX-Komplex und den vWF ist vor allem bei hohen Scherraten unverzichtbar, um einen ersten Kontakt herzustellen und den Weg für die Bindung von weiteren Rezeptoren an Kollagen zu bereiten (Kaspers und Göbel 2005, Sachs und Nieswandt 2007, Varga-Szabo *et al.* 2008). Als weiterer wichtiger Kollagen-Rezeptor auf Thrombozyten ist GPVI bekannt, der durch die Bindung an Kollagen Thrombozyten zu aktivieren vermag. Insbesondere werden dadurch zwei weitere Rezeptoren aktiv, die

Integrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Glykoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa)) und $\alpha_2\beta_1$, die damit ebenfalls bindungsfähig an Kollagen werden. Dabei bindet Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, wie der GPIb-V-IX-Komplex, mit Hilfe des vWF, wohingegen Integrin $\alpha_2\beta_1$ direkt an Kollagen bindet (Jelkmann 2019). Das Glykoprotein VI (GPVI) ist ein plättchenspezifischer Rezeptor bei dessen Fehlen Thrombozyten keine Reaktion mehr auf Kollagen zeigen, sie können jedoch an andere Matrixproteine weiterhin binden. Außer der Aktivierung der beiden Integrine, veranlasst eine Bindung von GPVI an Kollagen den Thrombozyten auch dazu, unter anderem ADP und Thromboxan A₂ (TXA₂) auszuschütten, Stoffe die weitere Thrombozyten aktivieren und damit Bindungen der Thrombozyten untereinander vermitteln. Eine Bindung zwischen Thrombozyten geschieht in erster Linie durch den Rezeptor Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa) in seiner aktiven Form via vWF, Fibrinogen und Fibronektin (Denis und Wagner 2007, Sachs und Nieswandt 2007). Dieser Rezeptor wird durch Adenosindiphosphat (ADP) aktiviert, das unter anderem von aktivierten Thrombozyten sezerniert wird (Jelkmann 2019).

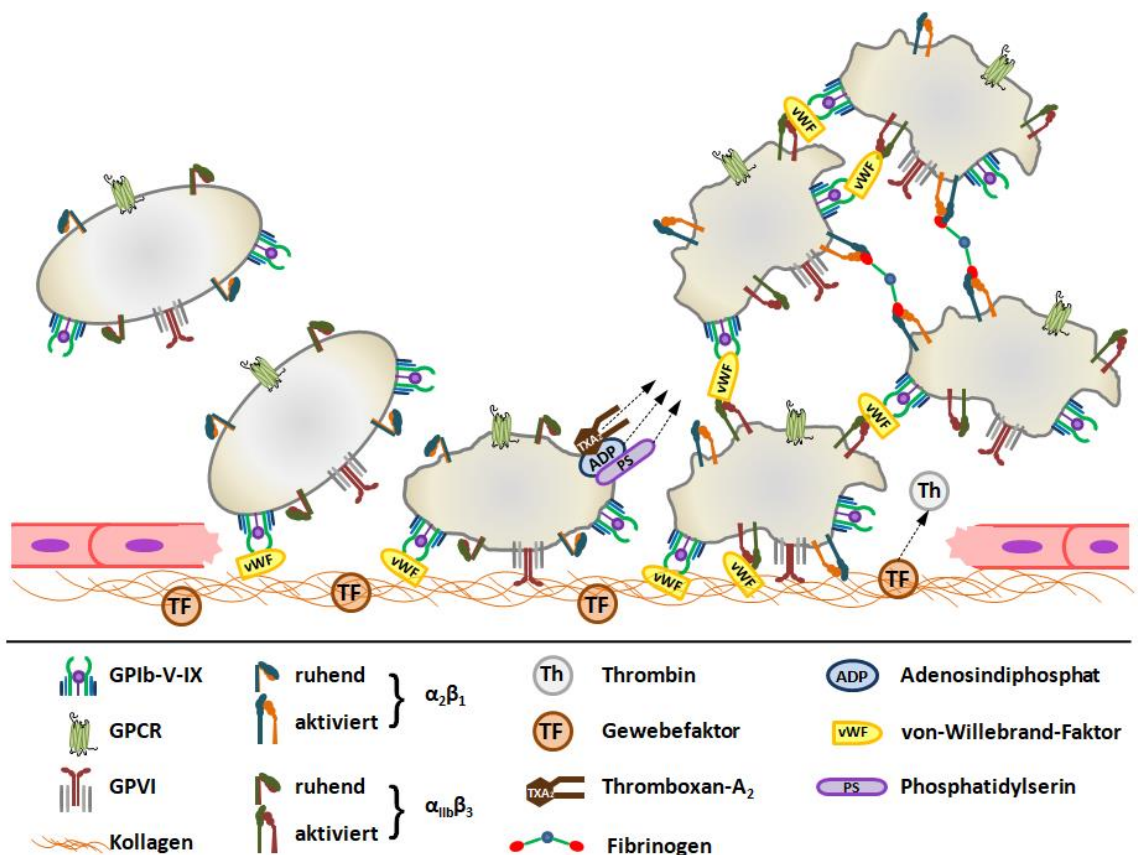


Abbildung 2: Thrombozyten-Adhäsion an die subendotheliale Matrix und untereinander im Bereich einer Endothel-Verletzung (eigene Grafik in Anlehnung an Sachs und Nieswandt 2007 und Varga-Szabo *et al.* 2008)

Ein weiterer Stoff, der bei aktivierten Plättchen an der Membranoberfläche erscheint, ist Thromboxan A₂ (TXA₂). Es aktiviert weitere Thrombozyten, sorgt für deren Formänderung, Sekretion, die Hydrolyse von Phosphoinositiden und eine Protein-Phosphorylierung. Außerdem erhöht es den Calciumspiegel im Zytosol des Thrombozyten (Sachs und Nieswandt 2007, Varga-Szabo *et al.* 2008). Das ebenfalls auf der Thrombozytenmembran von aktivierten Plättchen erscheinende Phosphatidylserin (PS) fördert durch die Bereitstellung von Bindungsstellen für Gerinnungsfaktoren die Bildung von Thrombin an der Verletzungsstelle, einem der stärksten Thrombozytenaktivatoren. Thrombin begünstigt eine Formänderung, Sekretion und Aggregation bei Plättchen. Außerdem vermittelt Thrombin im Zuge der Blutgerinnung den Umbau von Fibrinogen in Fibrin und sorgt damit für eine stabile Vernetzung des entstehenden Thrombus. Auch auf der Thrombozytenmembran ist Thrombin zu finden. Die Bildung von Thrombin durch Thrombozyten wird durch den von Gefäßmuskelzellen, Fibroblasten und anderen Zellen exprimierten und freigesetzten Gewebefaktor (*Tissue Factor*, TF) unterstützt. Dieser spielt als Gerinnungsfaktor III daher auch im Rahmen des extrinsischen Wegs der Blutgerinnung bei der Bildung von Fibrin eine Rolle. *Tissue Factor* kommt durch eine Endothelverletzung mit dem Gerinnungsfaktor VIIa in Kontakt und führt über weitere Schritte der Blutgerinnungskaskade zur Aktivierung von Thrombin (Abbildung 2) (Kaspers und Göbel 2005, Gaertner und Massberg 2016).

Zusätzlich zu den schon genannten Integrinen und dem GPIb-V-IX-Komplex enthält die Thrombozytenmembran noch weitere Rezeptoren. Einige davon gehören der Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) an und haben verschiedene Funktionen. Rezeptoren der Thrombozytenmembran sind hauptsächlich Chemokin-Rezeptoren, welche sowohl autokrin wie auch parakrin angesprochen werden können. Der Einfluss der Rezeptoren und deren Liganden auf die Thrombusbildung kann, je nach Rezeptor-Ligand-Kombination, pro- oder antithrombotisch sein. Die Chemokin-Rezeptoren, die auf Thrombozyten bislang gefunden wurden, sind CCR1, CCR3, CCR4, CXCR2, CXCR4, CXCR6, CXCR7 und CX3CR1. Dabei sind Faktoren wie CCL3, CCL5, CCL7, CCL17, CXCL1, CXCL5, CXCL8, CXCL11, CXCL12, CXCL16 und MIF mögliche Agonisten für diese Rezeptoren (Chatterjee und Gawaz 2017).

Im Blut zirkulierendes Fibrinogen spielt einerseits eine Rolle bei der Bindung von Thrombozyten untereinander, wird im Rahmen der Blutgerinnung jedoch auch zu Fibrin

umgebaut, das für die feste Vernetzung eines stabilen Thrombus verantwortlich ist. An der Blutgerinnung, die an die Bildung eines Thrombozytenaggregats an der Stelle der Verletzung anschließt, sind zahlreiche Faktoren beteiligt. Dabei werden zwei unterschiedliche aber zusammenlaufende Wege unterschieden. Durch den Kontakt von Blut mit der subendothelialen Matrix nach einer Verletzung wird die Kaskade des extrinsischen Wegs ausgelöst, der intrinsische Weg läuft im Lumen des Gefäßes ab und bedient sich Faktoren, die von Blutzellen gebildet werden oder im Plasma gelöst vorliegen.

Der extrinsische Weg ist der physiologische Trigger für die Fibrinbildung. Dazu bildet Faktor VIIa einen Komplex mit dem TF auf Zellen des Subendotheliums (Faktor III) und startet so die Gerinnungskaskade. Im unverletzten Blutgefäß wird der Faktor VIIa vom TF durch das intakte Endothel getrennt, was eine Blutgerinnung verhindert. Der entstehende Komplex spaltet Faktor X zu Xa, welcher mit dem Cofaktor Va einen Komplex bildet. Im Rahmen der Gerinnungskaskade findet von Stufe zu Stufe eine Verstärkung der Reaktionen statt, was durch den Komplex Xa/Va letztlich zu einer Aktivierung von Prothrombin (Faktor II) zu Thrombin (Faktor IIa) führt, der wichtigsten Protease der Blutgerinnung. Diese spaltet von Fibrinogen (Faktor I) mehrere kleine Peptide ab, was zur Bildung von Fibrin und einer Polymerisierung zu Fibrinfäden führt, die durch den Faktor XIIIa (ebenfalls durch Thrombin aktiviert) zu einem Fibrinnetz quervernetzt werden (Kaspers und Göbel 2005).

Durch den Kontakt von Faktor XII mit negativ geladenen Oberflächen wird dieser aktiv und startet dadurch das intrinsische System über Faktor XI und IX, welcher als Faktor IXa daraufhin mit dem Cofaktor VIIIa einen Enzymkomplex bildet, der wie im extrinsischen System den Faktor X aktiviert und damit an der Bildung von Thrombin mitwirkt. Als negativ geladene Kontaktpartner von Faktor XII kommen diverse Moleküle in Frage, die in der subendothelialen Matrix vorliegen, wie zum Beispiel Glucosaminoglykane, Kollagen, Nukleotide, Sulfatide, lösliche Polyanionen, aber auch Glasoberflächen und Polymere, was die Auslösung der intrinsischen Gerinnungskaskade *in vitro* ermöglicht (Renne *et al.* 2006).

2.3 Untersuchung der Thrombusbildung

Zur Erforschung des Aufbaus eines Thrombus, seiner Bildung und der beteiligten Zellen und löslichen Stoffe stehen heute verschiedenste Methoden zur Verfügung. Einfache Fragestellungen zu Bindungen von Rezeptoren und Liganden können oft in ausreichendem Maße mit *in vitro* Versuchen geklärt werden. Um das komplexe Zusammenspiel vieler verschiedener Vorgänge im Rahmen der Thrombusbildung zu untersuchen, sind jedoch häufig *in vivo* Versuche notwendig. Ergebnisse aus *in vitro* Versuchen werden regelmäßig *in vivo* verifiziert, um sicher zu gehen, dass sie auch unter realen Bedingungen gelten (Rand *et al.* 2003, Picker 2011). *In vitro* kann ein und derselbe Versuch sowohl mit humanem, wie auch mit murinem Blut durchgeführt werden. Auf diese Weise kann die Übertragbarkeit von Ergebnissen aus murinen Modellen und damit die Eignung des gewählten Tiermodells für einen *in vivo* Versuch verifiziert werden. Es muss sichergestellt werden, dass das Tiermodell stellvertretend für den menschlichen Organismus verwendet werden kann (Baaten *et al.* 2018).

2.3.1 Methoden zur Untersuchung der Thrombusbildung *in vitro*

2.3.1.1 Verfahren zur Bestimmung von Thrombozytenanzahl und Blutgerinnung im klinischen Alltag

Vor allem vor chirurgischen Eingriffen aber auch bei Verdacht auf Gerinnungsstörungen ist es oft notwendig, die Blutgerinnung eines Patienten zu überprüfen. Dazu stehen einige Verfahren zur Verfügung, die routinemäßig eingesetzt werden, um jeweils einen oder mehrere Schritte der Gerinnungskaskade zu testen.

Durch Zellzählung kann überprüft werden, ob die Thrombozytenzahl im physiologischen Bereich liegt. Die Thromboplastinzeit TPZ (Quick-Test) gibt Aufschluss über den Ablauf des extrinsischen Wegs. Dazu wird dem Blut TF zugesetzt und die Zeit bestimmt, bis Fibrinfäden entstehen. Die aktivierte partielle Thromboplastinzeit aPTT und die aktivierte Gerinnungszeit ACT repräsentieren den intrinsischen Weg. Hierbei erfolgt die Aktivierung über Phospholipide (Plättchenfaktor 3) und oberflächenaktive Substanzen wie Kaolin. Ein Maß für

die gemeinsame Endstrecke beider Wege, die Bildung von Fibrin aus Fibrinogen, ist die Thrombinzeit, bei der dem Blut Thrombin zugesetzt wird. Die Fibrinogenkonzentration im Blut kann entweder über die Fibrinbildungsgeschwindigkeit oder immunologisch bestimmt werden.

Darüber hinaus stehen mehrere kommerzielle Systeme, vorwiegend auf der Basis aggregometrischer Messungen, zur Verfügung, um die Thrombozytenfunktion zu messen und weitere Systeme, mit denen sich Gerinnselfestigkeit und –bestandsdauer bestimmen lassen.

Weitere Möglichkeiten, um zum Beispiel eine verstärkte Blutgerinnungsneigung zu erkennen, bestehen in der Bestimmung von Antithrombin III (AT III) oder von Spaltprodukten des Fibrins, der D-Dimere (Barthels 2008).

2.3.1.2 Verfahren zur Untersuchung des Thrombozytenaufbaus, der beteiligten Proteine und durch Thrombozyten gebildeten Substanzen

Einen wesentlichen Anteil an der Hämostase und damit am Aufbau eines Thrombus tragen Thrombozyten. Informationen über ihre Gestalt, ihren Aufbau und der Interaktionen, die sie mit unterschiedlichsten Stoffen und anderen Zellen eingehen, werden auf vielfältige Weise gewonnen.

Die Gestalt von ruhenden und aktivierten Thrombozyten unterscheidet sich wesentlich, was sich gut mit verschiedenen mikroskopischen Verfahren zeigen lässt. Die konfokale Lichtmikroskopie und die Transmissionselektronenmikroskopie eignen sich besonders, Thrombozyten detailgenau zu untersuchen. Bei der konfokalen Lichtmikroskopie handelt es sich um ein Rasterverfahren, bei dem das Objekt mit einem feinen Lichtstrahl abgetastet wird und das von jedem Punkt des Objekts erhaltene Signal zu einem kompletten Bild verarbeitet wird. Dabei können für die konfokalmikroskopische Untersuchung Strukturen im Inneren der Zellen oder auf ihrer Oberfläche mit fluoreszierenden Markern angefärbt werden und damit die Verteilung und Anordnung dieser Strukturen genau untersucht werden.

Eines ähnlichen Verfahrens bedient sich die Immunfluoreszenzmikroskopie, bei der

Fluorochrom-markierte Antikörper an Proteine wie zum Beispiel Rezeptoren und Zytoskelett von Zellen binden und die zu untersuchenden Proteine damit mikroskopisch sichtbar gemacht werden. Diese Art der Immunfärbung kann sowohl für hochauflösende mikroskopische Verfahren, wie die Konfokalmikroskopie, verwendet werden, wie auch für einfache quantitative Proteinbestimmungen mit Photometrie.

Auch in der Durchflusszytometrie (FACS = fluorescence-activated cell sorting) wird die Immunfärbung mit monoklonalen Antikörpern häufig eingesetzt. Damit kann die Zellzahl sehr exakt bestimmt werden und das Vorhandensein oder Fehlen von bestimmten Aktivierungsmarkern und Rezeptoren oder an Rezeptoren gebundenen Liganden auf den verschiedenen Zelllinien festgestellt werden. In Abhängigkeit von der Zeit kann die zunehmende Aktivierung von Thrombozyten unter dem Einfluss von Aktivatoren untersucht werden und auch die Veränderung der Expression bestimmter Rezeptoren an der Zelloberfläche oder des Gehalts eines bestimmten Stoffes in der Zelle. Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate oder auch reine Thrombozyten-Aggregate können erkannt werden und der Erfolg von therapeutischen Stoffen überprüft werden, die in die Funktion und Bildung von Thrombozyten eingreifen (Saboor, Ayub *et al.* 2013, Saboor, Moinuddin *et al.* 2013).

Weitere Methoden, um das Vorhandensein oder Fehlen bestimmter Proteine nachzuweisen, sind Western Blot und ELISA (Massberg *et al.* 2004, Seizer *et al.* 2015, Yun *et al.* 2016).

2.3.1.3 Verfahren zur Untersuchung der Thrombozytenfunktion

Um Informationen über die Thrombozytenfunktion zu erhalten, werden in der Forschung weitere Verfahren eingesetzt.

Da die Aktivierung von Thrombozyten maßgeblich von Kalzium abhängig ist, kann der Einstrom und Ausstrom von Kalzium in bzw. aus der Zelle als ein Maß für die Aktivierung bestimmt werden. Ein dauerhaft erhöhter Kalziumspiegel im Zytoplasma von Thrombozyten kann auf verschiedene krankhafte Zustände, wie Bluthochdruck, arterielle oder venöse Thrombosen, hinweisen. Die Messung erfolgt mit einem Kalzium-Spektrum-Fluorometer (Jy *et al.* 1987, Jy und Haynes 1987).

Im Zuge der Adhäsion und Aktivierung von Thrombozyten ändern diese ihre Form von bikonkaven Plättchen zu flachen Zellen mit langen dünnen Fortsätzen (Filopodien) oder flächigen Ausläufern (Lamellipodien). Die Beobachtung dieses Phänomens gab Aufschluss über die Vorgänge, die im Rahmen der Abdichtung von Endotheldefekten stattfinden. Mit der mikroskopischen Beobachtung der Reaktion von Thrombozyten auf Fibrinogen oder Kollagen unter dem Einfluss verschiedener Substanzen kann auf das thrombozytenaktivierende Potential dieser Substanzen geschlossen werden und beteiligte Chemokine und Rezeptoren untersucht werden. Diese Methode wird als *Spreading* bezeichnet. Zur Visualisierung wird hierbei häufig ein Durchlichtmikroskop im differentiellen Interferenzkontrast (DIC) eingesetzt (Aslan *et al.* 2012, Lee *et al.* 2012).

Die optische Aggregometrie basiert auf der Tatsache, dass aktivierte Thrombozyten untereinander Bindungen eingehen. Dabei nimmt die Transparenz einer Thrombozytensuspension für Licht zu, je mehr Aggregate sich bilden, also je weniger frei in der Flüssigkeit verteilte Thrombozyten vorhanden sind. Transmittiertes Licht wird dabei photometrisch gemessen. Der Thrombozytensuspension in einer Küvette wird ein Thrombozyten-Agonist zugefügt. Dieser führt zur Aggregation der Thrombozyten und eine Kurve der Lichtintensität über die Zeit kann aufgezeichnet werden, aus welcher sich eine Dichte in Prozent bestimmen lässt. Diese Methode wird häufig zur Diagnose angeborener und erworbener Funktionsstörungen der Thrombozyten und für das Monitoring antithrombotischer Therapien eingesetzt, benötigt jedoch ein großes Probenvolumen, eine aufwändige Vorbereitung und eine lange Messdauer (Koltai *et al.* 2017).

Zur Untersuchung der Bindung von Thrombozyten einerseits untereinander aber andererseits auch an eine beschichtete Oberfläche, wird die Flusskammer verwendet. Dazu wird Vollblut oder Plättchenreiches Plasma (PRP) mit einer konstanten Flussgeschwindigkeit durch einen dünnen Spalt zwischen zwei Glasflächen geleitet, von denen eine mit Adhäsivproteinen oder extrazellulärer Matrix beschichtet wird. Die an der beschichteten Oberfläche haftenden Thrombozytenansammlungen werden dann mikroskopisch aufgenommen und ihre Dichte und Ausdehnung ausgewertet (Niesen 2011, Roest *et al.* 2011, Schoeman, Lehmann *et al.* 2017, Schoeman, Rana *et al.* 2017).

Mit all diesen Methoden können selektiv bestimmte Rezeptoren und Liganden auf ihren Einfluss auf die Bindungsfähigkeit von Thrombozyten getestet werden. Da jedoch nicht alle an der Thrombusbildung beteiligten Stoffe und Zellen bei diesen Methoden zur Verfügung stehen, können damit nur vorläufige Aussagen getroffen werden, die später noch *in vivo* überprüft werden und gegebenenfalls modifiziert werden müssen.

2.3.2 Methoden zur Untersuchung der Thrombusbildung *in vivo*

Beobachtungen, die *in vitro* gemacht wurden, bedürfen in vielen Fällen einer Überprüfung in einem intakten Organismus, der sich, aufgrund seiner Komplexität, nicht vollständig *in vitro* simulieren lässt. Einige Einflussfaktoren können auch nur im Zusammenspiel mit allen an der Thrombusbildung beteiligten Zellen und Proteinen ausreichend gut untersucht werden. Daher werden in der Regel *in vivo* Versuche an Tiermodellen benötigt. Die Verwendung von Mäusen für diese Versuche hat zudem den Vorteil, durch bei dieser Spezies mögliche genetische Veränderungen gezielt einzelne Einflussfaktoren von physiologischen Vorgängen näher zu untersuchen oder krankhafte Zustände zu simulieren (Baaten *et al.* 2018).

Im Folgenden werden einige häufig verwendete Methoden für die Untersuchung der Thrombusbildung *in vivo* kurz vorgestellt.

2.3.2.1 Blutungszeit

Die Bestimmung der Blutungszeit wird häufig in der präoperativen Diagnostik eingesetzt, um Vorhersagen über die Wahrscheinlichkeit eines hohen Blutungsrisikos zu treffen. Die Blutungszeit wird ebenfalls bestimmt, um die Thrombozytenfunktion bei Patienten mit einer bekannten gestörten Blutgerinnung zu prüfen. Zur Diagnostik von solchen Erkrankungen wird diese Methode nur selten eingesetzt (Burns und Lawrence 1989).

In der Forschung wird die Blutungszeit häufig im Tierversuch an Nagern bestimmt. Sie ist dort einer der Bausteine, die zur Erlangung eines Gesamtbilds über die Blutgerinnung und Thrombozytenfunktion verwendet werden. Die Wirkung antithrombotischer Wirkstoffe kann überprüft werden und bei der Verwendung von genetisch veränderten Tieren kann der

Einfluss einzelner Komponenten der Blutgerinnung (Rezeptoren, Liganden und andere beteiligte Stoffe) evaluiert werden (Liu *et al.* 2012).

Üblicherweise werden dazu wenige Millimeter des Schwanzes einer narkotisierten Maus oder Ratte mit einem scharfen Skalpell abgetrennt und die Zeit gemessen, bis die Blutung zum Stillstand gekommen ist (Massberg *et al.* 2004).

2.3.2.2 Immunfluoreszenz an Gewebeschnitten

Immunfluoreszenzfärbungen sind nicht nur an einzelnen Zellen durchführbar, sondern auch an Geweben. Damit lässt sich eine Anreicherung und die Verteilung des zu untersuchenden Proteins oder der gewünschten Zellen in einem Gewebeschnitt fluoreszenzmikroskopisch darstellen. Für die Thrombozytenforschung sind hier insbesondere Schnitte von Thromben und Blutgefäßen mit dem sie umgebenden Bindegewebe von Interesse. Gewebeschnitte werden sowohl von pathologischen Präparaten von Patienten angefertigt, wie auch im Rahmen von Tierversuchen, um nach der Tötung des Versuchstiers weitere Ergebnisse zu den durchgeführten Versuchen zu erhalten (Massberg *et al.* 2004, Nosaka *et al.* 2017, Sauter *et al.* 2018).

2.3.2.3 Ischämie/Reperfusion

Um die Auswirkungen von Gefäßverschlüssen auf das von diesem Blutgefäß versorgte Gebiet zu erforschen, werden gezielt Versuche durchgeführt, bei denen ein permanenter Gefäßverschluss erzeugt wird und das Tier danach für eine gewisse Zeit beobachtet wird, bevor die Auswirkungen dieses Gefäßverschlusses mit unterschiedlichen Methoden untersucht werden.

Zu dieser Art Versuchen zählen sowohl Infarktversuche, wie die Simulierung von Myokardinfarkt oder Schlaganfall (Llovera *et al.* 2014, Muthuramu *et al.* 2014), wie auch Versuche zur Neogenese von Blutgefäßen wie z.B. *Hindlimb* Versuche, bei denen die *Arteria femoralis* ligiert wird und danach die Blutversorgung der distalen Gliedmaße regelmäßig gemessen wird, um die Bildung von neuen Blutgefäßen zur Versorgung der distalen Gliedmaße zu verfolgen (Niiyama *et al.* 2009, Parikh *et al.* 2018, Poon *et al.* 2018).

Weitere Versuche mit ähnlichem Ziel sind Versuche, bei denen nur ein temporärer Gefäßverschluss erzeugt wird. Nach einer gewissen Zeit wird der Blutfluss wiederhergestellt und die Auswirkungen der temporären Ischämie und der Reperfusionserkrankung im betroffenen Gebiet zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht. Hier lassen sich regelmäßig Entzündungsreaktionen nachweisen, die auf beteiligte Zellen und Gewebsveränderungen, sowie auf Chemokine und andere Stoffe untersucht werden. Auch Langzeitauswirkungen und Therapien zur Regeneration von Geweben können auf diese Weise studiert und evaluiert werden (Schönberger *et al.* 2014, Schleicher *et al.* 2015).

2.3.2.4 Intravitalmikroskopie an der Mikro- und Makrozirkulation

Die Intravitalmikroskopie ist ein Werkzeug, das in den letzten Jahren immer häufiger für unterschiedliche Fragestellungen angewandt wurde. Mit ihr lassen sich Bilder und Filmsequenzen von lebenden Geweben in Echtzeit sowohl auf zellulärer Ebene wie auch von physiologischen und pathologischen Abläufen an Gewebsoberflächen aufnehmen und auswerten. Für Fragestellungen im Rahmen der Herz-Kreislauf-Forschung sind insbesondere die Mikro- und Makrozirkulation von Interesse. Die Mikrozirkulation umfasst Kapillargebiete, Arteriolen und Venolen, während Versuche an der Makrozirkulation sich den großen Gefäßen (Arterien und Venen) im Körper des Versuchstiers widmen (Nishimura *et al.* 2008, Cooley 2011, Masedunskas *et al.* 2012).

Diese Untersuchungsmethode wird in Kapitel 2.5 näher beschrieben und wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit an der *A. carotis communis* angewandt.

2.4 Verletzungsmodelle zum Auslösen einer Thrombusbildung in Blutgefäßen

Es sind heute mehrere unterschiedliche Modelle in Gebrauch, um den Thrombusaufbau *in vivo* experimentell zu untersuchen. Bei allen diesen Modellen wird die Thrombusbildung durch eine Verletzung eines Blutgefäßes ausgelöst. Dafür werden unterschiedliche Methoden verwendet, die auf die Gefäßwand einwirken und daher nur einen Teil der

Faktoren widerspiegeln, die die Thrombusbildung im realen Krankheitsgeschehen auslösen. Durch die verschiedenen Verletzungsmethoden werden jeweils etwas unterschiedliche Vorgänge angestoßen, was zu einer Variation der Thrombusbildung führt. Die entstehenden Thromben unterscheiden sich daher in den verschiedenen Modellen und der Informationsgewinn ist höher, wenn in einem Forschungsvorhaben mehrere Modelle kombiniert verwendet werden (Massberg *et al.* 2003, Eckly *et al.* 2011).

Üblicherweise werden die Experimente an Mäusen oder Ratten durchgeführt, deren Hämostase und Thrombusbildung der von Menschen ähnlich sind (Sachs und Nieswand 2007), die jedoch von ihrer Physiologie her nicht anfällig für Erkrankungen sind, die mit der Entwicklung von Atherothrombose einhergehen. Daher werden bei diesen Tieren gesunde Blutgefäße verletzt, um eine Thrombusbildung auszulösen. Das kann durch mechanische, (photo-)chemische, thermische oder elektrische Einwirkung erzielt werden (Falati *et al.* 2004, Rumbaut *et al.* 2005, Westrick *et al.* 2007).

Eins der am häufigsten verwendeten Modelle, um sowohl die Makrozirkulation wie auch die Mikrozirkulation zu untersuchen, bedient sich der chemischen Verletzung der Gefäßwand mit Eisen(III)Chlorid (FeCl_3). Dieses Modell wurde erstmals 1990 beschrieben zur Untersuchung der Thrombusbildung in der *A. carotis communis* bei Ratten (Kurz *et al.* 1990) und die Wirkmechanismen dieses Thrombusmodells wurde 20 Jahre später von Eckly und Li genauer untersucht (Eckly *et al.* 2011, Li *et al.* 2013). Sie fanden Rundkörper, die Eisenionen enthielten, auf den Zellmembranen der Endothelzellen und auch im Lumen des Blutgefäßes. Diese Vesikel wurden aus den Endothelzellen abgeschnürt und hinterließen Schädigungen an den Zellen, wobei die Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen eine große Rolle zu spielen schien. Es ist bekannt, dass FeCl_3 zu oxidativem Stress führt, der durch die Entstehung freier Radikale verursacht wird, was zu Lipidperoxidation führt und zur Zerstörung von Zellen. Auf der Oberfläche der beschriebenen Rundkörper wurde zudem *Tissue Factor* exprimiert, welcher zur Bildung von signifikanten Mengen an Thrombin führen kann. FeCl_3 Moleküle schienen durch die gesamte Gefäßwand zu diffundieren und dabei alle Schichten zu schädigen außer der *Membrana elastica interna*, die unabhängig von der Konzentration der verwendeten Lösung in jedem Fall intakt blieb. Die Schädigung der Zellen war geringer, wenn der Rezeptor CD36 fehlte, der an vielen oxidativen Prozessen beteiligt ist und

natürlicherweise auf der Membran von unterschiedlichen Zelltypen vorkommt, unter anderem auf Thrombozyten und Endothelzellen. Die Autoren fanden Thrombozyten, die sich an die raue Oberfläche der Rundkörper und an die freigelegte Basalmembran anhefteten. Überdies wurde eine veränderte Funktion der Adhäsionsproteine festgestellt, was zu einer Reduktion der Interaktion von Thrombozyten mit Kollagen führte und den Einfluss von GPVI und β_1 Integrinen auf die FeCl_3 -induzierte Thrombose herabsetzte. β_1 Integrine spielen bei diesem Modell daher nur eine untergeordnete Rolle, wohingegen im Experiment ein wichtiger Einfluss der Rezeptoren GPIIb/IIIa und Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ bestätigt werden konnte. Betreffend des Rezeptors GPVI wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen widersprüchliche Versuchsergebnisse erzielt und so ist dessen Einfluss im Rahmen dieses Modells noch nicht abschließend geklärt (Massberg *et al.* 2003, Eckly *et al.* 2011).

Ein wichtiger Thrombozytenaktivator in diesem Modell ist das Thrombin, vWF scheint hier nur einen geringen Einfluss auf die Thrombusbildung zu besitzen. Bei der Untersuchung der Vesikel wurden Fibrinfasern auf der Oberfläche gefunden, welche ebenfalls bei der Anheftung von Thrombozyten eine Rolle spielen könnten.

Die Geschwindigkeit des Thrombusaufbaus hängt von der Größe und der Art des gewählten Blutgefäßes ab und außerdem von der Dauer der Anwendung und der Konzentration der verwendeten FeCl_3 Lösung. Mehrere Studien wurden durchgeführt, um die am besten geeignete Konzentration für unterschiedliche Anwendungsgebiete herauszufinden (Surin *et al.* 2010, Owens *et al.* 2011).

Der gebildete Thrombus in diesem Modell ist im Allgemeinen relativ stabil, was dazu führt, dass er bis zu einem vollständigen Verschluss des Blutgefäßes anwachsen kann. Deshalb wird als Messgröße bei Experimenten in diesem Modell meist die Verschlusszeit, das heißt die Zeit vom Anwenden des FeCl_3 an der Gefäßoberfläche bis zum vollständigen Verschluss des Blutgefäßes, bestimmt und verglichen (Owens *et al.* 2011).

Eine weitere Verletzungsmethode, um eine Thrombusbildung in Arterien auszulösen, besteht in der Ligatur eines solchen Blutgefäßes. In der Literatur wurden mehrere Ligatur-Modelle beschrieben. Kumar und Lindner (Kumar und Lindner 1997) ligierten die linke *A. carotis communis* permanent um das Wachstum von Neointima in Mäusen zu beobachten. Massberg *et al.* (Massberg *et al.* 2003, Massberg *et al.* 2004) verwendeten ein Ligatur-Modell, um die Adhäsion von Plättchen zu untersuchen. Sie verletzten dazu das Endothel

durch eine Ligatur der Carotis für 5 Minuten und beobachteten in der Folge fluorochrommarkierte Thrombozyten und ihre Interaktion mit der Gefäßwand.

Die Schädigung der Gefäßwand bei diesem Modell ist etwas unterschiedlich zu der bei einer Verletzung durch FeCl₃. Durch den Druck, den der Ligaturfaden auf die Gefäßwand ausübt, werden Zellen zerstört (Massberg *et al.* 2003). Am empfindlichsten auf Druck reagieren dabei die Endothelzellen der Gefäßauskleidung. Sie gehen zu Grunde und die subendotheliale Matrix liegt frei. Auch die Muskelschicht der Gefäßwand erfährt eine gewisse Schädigung, welche jedoch für die Untersuchungen der Zell-Wand-Interaktion keine Rolle spielt und auch die Funktion der Arterie nur wenig einschränkt. Es beginnt der unter 2.2.1 beschriebene extrinsische Weg der Blutgerinnung mit der Adhäsion von Thrombozyten an der subendothelialen Matrix. Bei diesem Modell ist die Aggregation von Thrombozyten jedoch nicht sehr stark ausgeprägt und es findet keine stabile Vernetzung des entstehenden Thrombus statt. Massberg *et al.* beobachteten, dass im verletzten Wandbereich Thrombozyten mit der geschädigten Gefäßwand interagierten. Sie untersuchten das Verhalten der Thrombozyten und Thrombozytenaggregate an der Gefäßwand, indem sie Rollen, Haften und Abschwimmen der Zellen unter verschiedenen Bedingungen auswerteten (Massberg *et al.* 2003, Massberg *et al.* 2004).

Mit einer Ligatur kann der Durchmesser eines Blutgefäßes auch verringert werden und eine Stenose verursacht werden, wie von Singh (Singh *et al.* 2003) beschrieben, der diese Technik an der *Vena cava inferior* in Mäusen anwendete. Eine ähnliche Technik wurde von Brill und Geddings einige Jahre später beschrieben (Brill *et al.* 2011, Geddings *et al.* 2014). Sasaki *et al.* berichteten von einem kombinierten Modell, bei dem die *A. carotis communis* permanent ligiert wurde und gleichzeitig eine nicht-okklusive Manschette 2 mm proximal der Ligatur angelegt wurde. Unter diesen Umständen bildete sich nach einigen Tagen ein okklusiver Thrombus. Sie berichteten, dass sich nur kleine Thromben oder keine Thromben bildeten, wenn das Gefäß entweder nur ligiert wurde, oder ohne Ligatur eine Manschette angelegt wurde (Sasaki *et al.* 2004). Andere Stenose-Modelle benutzen Mikrospiralen, die um ein Blutgefäß herum angelegt werden (Shibata *et al.* 2007, Hattori *et al.* 2015) oder Ameroid Manschetten die ein hygroskopisches Material enthielten, das über die Zeit den Innendurchmesser der Manschette reduzierte und so eine immer enger werdende Stenose

verursachte (Hattori *et al.* 2015, Hattori *et al.* 2016).

Üblicherweise gehen atherosklerotische Läsionen, die zu thrombotischen Ereignissen beim Menschen führen, mit einem reduzierten Querschnitt des betroffenen Blutgefäßes einher. Dabei begünstigen Faktoren wie niedrige Flussgeschwindigkeit, niedrige Scherspannung, reversierende Änderungen der Flussrichtung und turbulente Strömungen eine Atherosklerose mit nachfolgender Thrombusbildung im stenotischen Bereich. Bereiche mit laminarer Strömung sind weniger anfällig für atherosklerotische Läsionen (VanderLaan *et al.* 2004). Unter diesen Bedingungen werden die Aktivierung von Thrombozyten und der darauf folgende Thrombusaufbau durch Flusstörungen verstärkt (Tovar-Lopez *et al.* 2011). Daher kann vermutet werden, dass Modelle, die eine Stenose simulieren, die realen Vorgänge besser nachstellen können als jene, die die innere Form des Blutgefäßes unbeeinflusst lassen.

2.5 Intravitalmikroskopie

Das erste Instrument, das verwendet wurde, um Thromben *in vivo* zu untersuchen, war ein Temperaturfühler basierend auf einem Thermoelement (Kurz *et al.* 1990). Später wurden von mehreren Arbeitsgruppen Ultraschall-Flusssonden für diesen Zweck eingesetzt (Wang *et al.* 2005, Wang und Xu 2005, Surin *et al.* 2010, Owens *et al.* 2011). Heute benutzen die meisten Wissenschaftler die Intravitalmikroskopie, um Thromben sichtbar zu machen und sehr viel mehr Informationen über den Thrombusaufbau zu bekommen, als nur das Versiegen des Blutflusses.

Seit die Intravitalmikroskopie (IVM) im 19. Jahrhundert zum ersten Mal beschrieben wurde, hat sie eine enorme Weiterentwicklung erfahren. Epifluoreszenz-Intravitalmikroskopie in hoher Auflösung wird heute verwendet, um Zellen und oberflächliche Gefäßstrukturen sichtbar zu machen. Mit der Anwendung von Konfokalmikroskopie oder sogar Multiphotonenmikroskopie wird eine Bildgebung bis in eine Tiefe von 200-500 μm möglich (Taqueti und Jaffer 2013).

Eine der Fragestellungen, für die die IVM häufig verwendet wird und gute Ergebnisse erzielt, ist die Untersuchung von Vorgängen im Inneren von Blutgefäßen. Interaktionen von Zellen

mit der Gefäßwand wurden schon vor vielen Jahren von einigen Arbeitsgruppen untersucht (Atherton und Born 1972, Schmid-Schonbein *et al.* 1980a, Schmid-Schonbein *et al.* 1980b). Eine Kombination von unterschiedlichen Verletzungsmethoden der Gefäßwand und anschließender Durchführung der Intravitalmikroskopie, um den Thrombusaufbau zu beobachten, wurde von mehreren Gruppen beschrieben (Falati *et al.* 2004, Hoff *et al.* 2005, Rumbaut *et al.* 2005, Westrick *et al.* 2007, Cooley 2011, Kuijpers und Heemskerk 2012, Bonnard und Hagemeyer 2015). Eine sehr gute Beschreibung der Intravitalmikroskopie zur Bearbeitung diverser wissenschaftlicher Fragestellungen wurde 2012 von Masedunskas *et al.* veröffentlicht (Masedunskas *et al.* 2012).

2.6 Andere bildgebende Verfahren

2.6.1 Flussmessung mit Laser Doppler *Imaging*

Schon seit etwa 30 Jahren kann der Blutfluss in Geweben und Blutgefäßen mit Hilfe von Laser-Doppler-Flussmessern bestimmt werden. Dieses Verfahren wird unter anderem dafür eingesetzt, die Schwere von Verbrennungen abzuschätzen. Dafür wird der Blutfluss im Bereich der verbrannten Haut gemessen und so auf die Tiefe einer Verbrennung geschlossen. Außerdem kann der Heilungsverlauf von Brandwunden mit Hilfe dieser Methode nichtinvasiv verfolgt werden (Niazi *et al.* 1993, Hop *et al.* 2013, Venclauskiene *et al.* 2014). Auch bei der Verfolgung des Heilungsverlaufs anderer Wunden kann die Flussmessung eine wertvolle Hilfe sein. So kann sie beispielsweise für ein postoperatives Monitoring von Hautflaps verwendet werden und so ein rasches Eingreifen im Falle von Zirkulationsstörungen ermöglichen (Kaariainen *et al.* 2018).

Auch andere Krankheitsgeschehen im Bereich der Haut können mit Hilfe der Laser-Doppler-Flussmessung näher untersucht und der Verlauf kontrolliert werden.

Diese Methode wurde unter anderem schon bei der Untersuchung von Störungen der Mikrozirkulation im Rahmen von Mikroangiopathien durch systemische Sklerose und *Diabetes Mellitus* erfolgreich eingesetzt (Kulikov *et al.* 2018, Yu *et al.* 2018).

Haj-Hosseini *et al.* berichteten über einen intraoperativen Einsatz der Laser-Doppler-Flussmessung zur Identifikation und dem Auffinden von Tumorgewebe im Gehirn bei der Biopsie. Dabei waren die das Tumorgewebe versorgenden Blutgefäße leichter identifizierbar, was das Risiko bei der Biopsieentnahme senkte (Haj-Hosseini *et al.* 2018).

Auch im Tierversuch hat die Laser-Doppler-Flussmessung in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen. Bei jungen Mäusen wurde, zusammen mit weiteren Parametern, die Nierendurchblutung mit Hilfe der Laser-Doppler-Flussmessung bestimmt, um Nierenfunktionsstörungen näher zu untersuchen (Abdulmahdi *et al.* 2018) und Ingberg *et al.* evaluierten die Praktikabilität dieser Methode für eine Verwendung im Rahmen von Schlaganfallexperimenten im Rattenmodell (Ingberg *et al.* 2018).

Außer der punktuellen Laser-Doppler-Flussmessung wird immer häufiger Laser-Doppler-*Imaging* (LDI) verwendet um ein zweidimensionales Flussbild des zu untersuchenden Gewebes zu erhalten.

Im Jahre 1992 beschrieb Wårdell diese Weiterentwicklung der Laser-Doppler-Flussmessung zur Erzeugung eines Perfusionsbildes im Rahmen ihrer Doktorarbeit (Wårdell 1992, Wardell *et al.* 1993). Das Prinzip ist seitdem gleich geblieben, die Auflösung des Bildes, das mit dieser Methode erhalten wird, ist jedoch ständig gestiegen.

Seither wurden einige Vergleichsstudien veröffentlicht, in denen Messdaten des Flowmeters mit denen des LDIs verglichen wurde (Seifalian *et al.* 1994, Svedman *et al.* 1998, Kernick und Shore 2000, Petersen 2013). Alle fanden eine gute Korrelation der erhaltenen Daten und befanden LDI für Untersuchungen an der Hautoberfläche gut geeignet.

In der jüngeren Vergangenheit wurde die Methode des LDIs auch verstärkt bei Experimenten an Mäusen eingesetzt. Zunehmende Auflösung des Bildes erlaubt nun auch die detailgetreue Untersuchung der Mikrozirkulation kleiner Areale der Hautoberfläche. Die Wirkung unterschiedlicher Anästhetika auf die Mikrozirkulation der Haut wurde mit Hilfe von LDI an der Plantarfläche des Mittelfußes untersucht und die Vor- und Nachteile dieser Methode für diese Art des Versuchs berichtet (Gargiulo *et al.* 2013).

Als weit verbreitetes Modell zur Untersuchung der Neovaskularisation wird bei Mäusen das *Hindlimb*-Modell verwendet, bei dem die Femoralarterie permanent ligiert wird und im

weiteren Verlauf die Reperfusion der Plantarfläche des Mittelfußes beobachtet wird. Bei diesen Versuchen wird die Methode des Laser-Doppler-*Imaging* mittlerweile mit großem Erfolg eingesetzt (Niiyama *et al.* 2009, Jing *et al.* 2018, Parikh *et al.* 2018, Poon *et al.* 2018).

2.7 Anfärbung von Thrombozyten zur fluoreszenz-mikroskopischen Untersuchung *in vivo*

Um Plättchen für *in vivo* Versuche sichtbar zu machen, ist es notwendig, sie vom umliegenden Gewebe, bzw. vom Untergrund auf dem sie haften, unterscheiden zu können. Es gibt unterschiedliche Möglichkeiten um dies zu erreichen. Zellen im Blutstrom können unspezifisch angefärbt werden, wofür mehrere Substanzen zur Verfügung stehen. Außerdem können mit Fluorochromen konjugierte Antikörper verwendet werden, die spezifisch an bestimmte Rezeptoren auf der Zelloberfläche binden. Eine dritte Möglichkeit besteht in der Verwendung von genetisch veränderten Tieren, bei denen auf bestimmten Zelllinien fluoreszierende Proteine exprimiert werden (Jenne *et al.* 2011, Da *et al.* 2018).

2.7.1 Färbelösungen zur Markierung von Thrombozyten

Schon seit den 70er Jahren des 20. Jahrhunderts wird Acridin Orange unter anderem verwendet, um die Unversehrtheit von Thrombozyten *in vitro* zu überprüfen. Intakte Thrombozyten nehmen Acridin Orange auf, welches in der Folge fluoreszenzmikroskopisch im Innern der Zellen nachweisbar ist (Hofmann *et al.* 1979, Popov *et al.* 1987, Popov *et al.* 1988). Im Jahr 1982 berichteten Tangelder *et al.* von *in vivo* Versuchen an Kaninchen, bei denen, nach Injektion von Acridin Rot, in Mesenterialarterien zirkulierende Plättchen mikroskopisch dargestellt werden konnten (Tangelder *et al.* 1982).

Trypaflavin wurde gemeinsam mit Acridin Orange verwendet, um *in vitro* eine zweifarbige Markierung von Plättchen zu erreichen, bei denen das Zytoplasma grün fluoreszierte und Granula rot-orange (Makarov *et al.* 2014).

Durch die Bindung an Nukleinsäuren werden junge Thrombozyten von Thiazol Orange angefärbt. Diese Substanz wurde daher oft verwendet, um retikuläre Plättchen zu detektieren (Fujii *et al.* 2000, Robinson *et al.* 2000). Sowohl Thiazol Orange wie auch das Acridin-Derivat Mepacrin färben darüber hinaus unspezifisch Granula in Plättchen (Hourdille *et al.* 1982, Robinson *et al.* 2000).

Für *in vivo* Versuche können Thrombozyten *ex vivo* mit fluoreszierenden Substanzen inkubiert werden und anschließend dem Versuchstier intravenös verabreicht werden. Dieses Vorgehen erlaubt eine spezifische Markierung der Zellen, die untersucht werden sollen. Ein Nachteil dieser Methode ist das Risiko einer Aktivierung der Plättchen und damit einer Funktionsänderung. Werden zudem Thrombozyten eines anderen Individuums verwendet, kann dies aufgrund immunologischer Reaktionen den Versuchserfolg beeinflussen.

Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurden unterschiedliche Fluoreszein-Derivate beschrieben, um Thrombozyten *ex vivo* für Versuche zu färben. Sowohl für *in vitro* Versuche, wie auch für die Verwendung *in vivo* wurde Fluoreszein Isothiocyanat (FITC) beschrieben (Klaverkamp und Volkl 1984). 5-Chloromethylfluoreszein Diacetat (CMFDA) ist eine Substanz, die erst nach Kontakt mit dem Zytosol in eine fluoreszierende Form umgebaut wird und sich ebenfalls eignet, Zellen intrazellulär zu färben (Baker *et al.* 1997). Als weiteres Fluoreszein-Derivat für die *ex vivo* Färbung von Thrombozyten wurde Carboxyfluoreszein Diacetat Succinimidyl Ester (CFDA-SE) beschrieben. Er war in der Lage, Thrombozyten für einen langen Zeitraum fluoreszierend zu markieren und eignete sich daher gut dafür, *ex vivo* markierte Zellen in ein Versuchstier zu transfundieren und mehrstündige Versuche durchzuführen und quantitativ auszuwerten (Waldner *et al.* 2007). Von zwei weiteren polyanionischen Fluoreszein-Derivaten berichteten Heger *et al.* Sie verglichen die Fähigkeit, ruhende und aktivierte Thrombozyten anzufärben, der zwei lipophoben Fluoreszein-Derivate 5,6-Carboxyfluoreszein und Calcein miteinander und kamen zum dem Schluss, dass beide Derivate für diesen Zweck geeignet seien (Heger *et al.* 2009). Calcein wurde zuvor auch schon von anderen Arbeitsgruppen für die Färbung von Thrombozyten in unterschiedlichen Studien angewandt (Weibrich *et al.* 2004, Hartley *et al.* 2006).

Eine Alternative zur *ex vivo* Zubereitung von Thrombozyten und der anschließenden Transfusion in ein Versuchstier stellt die direkte intravenöse Verabreichung von

fluoreszierenden Substanzen dar. Dafür wird eine relativ große Menge der jeweiligen Substanz benötigt und die meisten Substanzen markieren außer Thrombozyten auch andere Zellen. Eine Beeinflussung der Funktion der Zellen durch die verabreichten Substanzen kann häufig nicht ganz ausgeschlossen werden.

Eine Möglichkeit, um Plättchen *in vivo* für die Intravitalmikroskopie zu färben, ist die intravenöse Verabreichung von Rhodamin 6G. Ein Nachteil dieses fluoreszierenden Farbstoffes ist seine geringe Spezifität, was er mit anderen Färbelösungen in gewissem Umfang gemeinsam hat. Rhodamin reichert sich in allen Blutzellen an und in geringem Maße auch in den Zellen des Endotheliums. Durch Hämoglobin wird ein großer Teil der Fluoreszenz in Erythrozyten abgeschirmt, so dass diese nur in geringem Umfang an der Gesamtfluoreszenz beteiligt sind. Leukozyten fluoreszieren stark nach der Aufnahme von Rhodamin, spielen jedoch bei der initialen Thrombusbildung nur eine geringe Rolle. Die im Thrombus beobachtete Fluoreszenz bei dieser Färbemethode stammt daher in erster Linie von Thrombozyten (Cooley 2015, Herr *et al.* 2015).

Plättchen können auch mit radioaktiven Elementen wie ^{111}In und ^{51}Cr markiert werden, um zum Beispiel die Lebensdauer von Plättchen unter verschiedenen Bedingungen zu studieren. Neben anderen Nachteilen ist die radioaktive Markierung umstritten, wenn es sich um *in vivo* Versuche an menschlichen Probanden handelt (Baker *et al.* 1997, van der Meer *et al.* 2010). Über eine mögliche Alternative wurde 2012 von Aurich *et al.* berichtet. Sie verwendeten für die Markierung von Plättchen superparamagnetische Nanopartikel mit und ohne FITC-Markierung, welche von den Plättchen endozytiert wurden und dann sowohl mit der Durchflusszytometrie wie auch durch Kernspintomografie detektiert werden konnten (Aurich *et al.* 2012).

2.7.2 Antikörper zur Markierung von Thrombozyten

Nicht nur durch die Aufnahme von radioaktiven Partikeln in die Zelle können Thrombozyten markiert werden, sondern auch durch die Bindung von mit Radionukleotiden markierten Antikörpern an Rezeptoren an der Thrombozytenoberfläche. Auf diese Weise können Zellen einer bestimmten Zelllinie spezifisch markiert werden, wenn Antikörper verwendet werden,

die an Rezeptoren binden, die exklusiv für diese Zelllinie sind.

Berichtet wurde in diesem Zusammenhang von Radionukleotiden von Jod, Indium und Technetium, die von mehreren Arbeitsgruppen mit Erfolg eingesetzt wurden. Gebunden waren diese Nukleotide häufig an den Antikörper 7E3, der an den Glykoprotein IIb/IIIa Komplex bindet (Srivastava 1992).

Nicht für alle Versuche eignet sich die radioaktive Markierung. Versuche, die sich optischer Nachweismethoden bedienen, benötigen eine optisch detektierbare Markierung der Zellen von Interesse. Auch für die Markierung mit Hilfe von Antikörpern eignen sich hier fluoreszierende Stoffe.

Der Vorteil einer Verwendung von monoklonalen Antikörpern besteht in der Möglichkeit einer spezifischen Markierung bestimmter Zellen direkt im zu untersuchenden Organismus. Eine *ex vivo* Inkubation von Zellen mit anschließender Transfusion in den Zielorganismus ist dabei nicht notwendig (Falati *et al.* 2002, Jenne *et al.* 2011, Da *et al.* 2018).

Verschiedene Rezeptoren auf Thrombozyten wurden bisher als Zielrezeptoren für eine Bindung an Fluorochrom-markierte Antikörper gewählt (Falati *et al.* 2002, Wada *et al.* 2010, von Bruhl *et al.* 2012). Bei der Wahl des Antikörpers muss sehr sorgfältig sein Einfluss auf die physiologische Funktion des von ihm blockierten Rezeptors geachtet werden, um den Ausgang des Experiments nicht zu beeinflussen. Seine einzige Aufgabe sollte sein, Thrombozyten sichtbar zu machen, ohne die Funktion der Thrombozyten zu verändern. Jenne *et al.* nannten solche Konflikte für die Rezeptoren CD41 (GPIIb) und CD42c (GPIb β) und hatten selbst gute Ergebnisse mit dem Rezeptor CD49b (GPIa) (Jenne *et al.* 2011).

In einer anderen Studie wurde jedoch gezeigt, dass ein DyLight[®] 488-konjugierter anti-GPIb β Antikörper keinen Einfluss auf die Thrombozytenadhäsion und –aggregation hatte (Da *et al.* 2018).

Ein solcher Antikörper wurde mit guten Ergebnissen für einige im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche verwendet.

2.7.3 Genetische Markierung von Thrombozyten

Gänzlich unabhängig von der Applikation von fluoreszierenden Substanzen oder Antikörpern können Versuche an Mäusen und Ratten durchgeführt werden, wenn dafür Tiere verwendet werden, die selbst ein fluoreszierendes Protein exprimieren können. In der Literatur sind verschiedene Methoden beschrieben, wie solche Tiere erzeugt werden können (Vacaru *et al.* 2014).

Im Jahr 2007 wurde von einer transgenen Maus berichtet, die am CD41 Rezeptor das gelb fluoreszierende Protein YFP exprimierte, was eine Fluoreszenz spezifisch für Megakaryozyten und Thrombozyten erzeugte. Leider konnte die Fluoreszenz nur bei 10-40% aller Thrombozyten beobachtet werden, was es notwendig machte, vor den Versuchen von jedem Tier Blut zu untersuchen, um vergleichbare Tiere zu identifizieren (Zhang *et al.* 2007, Jenne *et al.* 2011).

Den gleichen Rezeptor, jedoch ein neues, grün fluoreszierendes Protein, verwendeten Mizuno *et al.* für die Generierung einer transgenen Ratte für die Intravitalmikroskopie. Bei diesen Ratten fluoreszierten im Schnitt knapp 84% der Thrombozyten (Mizuno *et al.* 2016).

Ein Ansatz, die Fluoreszenz für verschiedene Gewebetypen und Zelllinien variabel zu gestalten, ist das Einfügen von Schaltsequenzen in das Genom der Maus. Das Enzym Cre-Rekombinase (Cre) kann als ein solcher Schalter fungieren und die Expression einer Mutation auf bestimmte Zelllinien begrenzen (Romagnani *et al.* 2015). Cre steht für den Ausdruck „*cyclization recombination*“ und ist der Name eines Enzyms, welches seinen Ursprung im Bakteriophagen P1 hat. Es katalysiert die Rekombination zwischen zwei Erkennungssequenzen (loxP), was dazu führt, dass ein Teil der DNA, welcher zwischen diesen Sequenzen liegt, aus dem Chromosom herausgeschnitten wird. Wird das Cre-Transgen an einen Promotor gekoppelt, kann damit bestimmt werden, in welchen Zellen Cre exprimiert wird. Das erlaubt die Herstellung von Tieren mit einem gewebespezifischen *Knockout* (Lukowski *et al.* 2005). Enthält die DNA-Sequenz zwischen den loxP-Stellen ein Stop-Codon, an dem die Ablesung der DNA endet, kann die Rekombination der DNA durch Cre dazu führen, dass nach der Rekombination das Ablesen bis zum nächsten Stop-Codon fortgesetzt wird und dabei ein alternatives Gen abgelesen wird. Auf diese Weise wird das Cre/loxP-System zu einem Schalter zwischen zwei Genen (Romagnani *et al.* 2015) (Abbildung 3).

Schon im Jahr 2007 wurde von Muzumdar *et al.* eine globale Cre Reporter Maus mit einer doppelten Fluoreszenz eingeführt. Diese Maus exprimiert ein rot fluoreszierendes tdTomato (mT) Protein ubiquitär auf allen Zellmembranen solange keine Sequenz der DNA durch die entsprechende Cre Rekombinase entfernt wurde. Nach einer solchen Exzision, welche zu einer Cre-gesteuerten Rekombination von DNA einer bestimmten Zelllinie führte, wurde EGFP (mG) anstatt von mT exprimiert. Das Ergebnis war eine grüne Fluoreszenz des gewünschten Zielgewebes bzw. Zelltyps.

Die Autoren berichteten, dass die Tiere durch diese Mutation keine Einschränkung der Funktion der entsprechenden Zellen erfuhren und keinen belastenden Phänotyp aufwiesen. Daher sollte die fluoreszierende Farbe der Versuchstiere keinen Einfluss auf das Ergebnis von Experimenten zur Untersuchung von funktionellen Eigenschaften haben (Muzumdar *et al.* 2007).

Bei intravitalmikroskopischen Experimenten wurden solche Tiere bereits schon mit Erfolg eingesetzt. Masedunskas *et al.* berichteten 2013 von Untersuchungen an doppelt fluoreszierenden Mäusen im IVM, um zelluläre Strukturen in den Speicheldrüsen dieser Mäuse abzubilden (Masedunskas *et al.* 2013).

Für die Versuche im Rahmen dieser Arbeit wurde eine doppelt fluoreszierende Maus gezüchtet, die aus der Verpaarung von mT/mG Mäusen, wie von Muzumdar *et al.* beschrieben, mit PF4-Cre transgenen Mäusen entstand. PF4-Cre ist dabei das Enzym Cre, das an einen Promotor für das Protein Plättchenfaktor 4 (PF4) gekoppelt ist, welches ausschließlich in Megakaryozyten exprimiert wird. Das führt dazu, dass auch die Cre-Rekombinase nur in Megakaryozyten exprimiert wird und daher eine Wirkung dieser Rekombination nur bei Megakaryozyten und damit auch Thrombozyten zu beobachten ist (Tiedt *et al.* 2007). Auf diese Weise entstanden Tiere (Cre-positiv) mit einer ubiquitären roten Fluoreszenz auf allen kernhaltigen Körperzellen außer Megakaryozyten, welche eine grüne Fluoreszenz aufwiesen. Thrombozyten als Produkte einer Abschnürung aus Megakaryozyten zeigten ebenfalls eine grüne Fluoreszenz. Bei Tieren ohne die entsprechende Cre-Rekombinase (Cre-negative Tiere) fluoreszierten alle kernhaltigen Körperzellen rot.

Da einige der Versuche auch an Wildtyp-Mäusen mit Hilfe eines fluoreszierenden Antikörpers durchgeführt wurden, konnten die Fluoreszenzeigenschaften beider Methoden

verglichen werden.

Ein solcher Vergleich von Antikörper-basierten Lösungen mit genetisch basierten Lösungen wurde in der jüngsten Vergangenheit auch schon von anderen Arbeitsgruppen durchgeführt. Da *et al.* veröffentlichten zwei Studien, in denen sie die Verwendung von R26R-EYFP^{F/F}/PF4-Cre Mäusen mit DyLight® 488-konjugierten anti-GPIIb β Antikörpern verglichen. Sie fanden eine zufriedenstellende Detektierbarkeit von Thrombozyten *in vivo* für beide Methoden, jedoch signifikante Unterschiede in der Thrombozyten-Funktion *ex vivo*, was sie dem Kreuzungsschema und der einige Generationen zurückliegenden Verwendung von Mäusen einer anderen Hintergrundlinie zuschrieben (Da *et al.* 2018).

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Zielsetzung

Grundlagenforschung zu physiologischen Vorgängen und auch Untersuchungen mit dem Ziel, neue Wirkstoffe zur Behandlung von Erkrankungen im humanmedizinischen und veterinärmedizinischen Bereich zu entwickeln, verlangen in den meisten Fällen Tierversuche. Da die Vorgänge innerhalb des Körpers sehr komplex sind und nur in Teilen *in vitro* untersucht werden können, ist die tierexperimentelle Forschung bis heute nicht komplett durch andere Methoden zu ersetzen.

Herz-Kreislauf-Erkrankungen, denen ein thrombotischer Verschluss eines oder mehrerer Blutgefäße zugrunde liegt, sind vor allem für die Humanmedizin von großer Bedeutung. Die Pathogenese dieser Erkrankungen ist noch nicht vollständig verstanden und es wird laufend an neuen Therapiemöglichkeiten geforscht. Dazu ist es notwendig, die Prozesse, die in den Blutgefäßen bei der Thrombusbildung ablaufen, möglichst genau nachzustellen. Verschiedene Modelle wurden dafür schon entwickelt und werden teilweise routinemäßig verwendet. Nicht immer liefern die Versuche für jede Fragestellung das erwartete Ergebnis. Die Wahl des richtigen Modells ist wichtig bei der Planung von Tierversuchen, um keine Versuche durchzuführen, die sich im Nachhinein als nicht notwendig herausstellen und um mit möglichst kleinen Tierzahlen möglichst optimale Ergebnisse zu erreichen.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war der Vergleich zweier unterschiedlicher, bereits bewährter Thrombosemodelle in der *A. carotis communis* und deren Analyse mit verschiedenen Verfahren. Es sollten dabei die Vor- und Nachteile der verschiedenen Modelle evaluiert werden und Erkenntnisse gewonnen werden, die die Auswahl des jeweils am besten geeigneten Modells für zukünftige Fragestellungen im Bereich der Thrombusbildung erleichtern können. Zusätzlich wurde im Rahmen dieser Arbeit eines der Modelle modifiziert und weiterentwickelt und damit ein neues Modell entwickelt, welches zukünftig für solche Fragestellungen eingesetzt werden kann.

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Versuchstiere

3.2.1.1 Mauslinien

Für die hier beschriebenen Versuche kamen unbelastete Mauslinien auf C57BL/6J-Basis (**B6**) zum Einsatz. Ausschließlich Tiere aus Eigenzucht wurden verwendet. „Wildtyp“ Mäuse waren entweder reine B6 Mäuse, oder aber Tiere der Kreuzungslinie C57BL/6-Tg (Pf4-Cre)Q3Rsko/J x B6.129 (Cg) -Gt (ROSA) 26Sor^{tm4} (ACTB-tdTomato-GFP) Luo/J (**PF4Cre x Rosa**), die grün fluoreszierendes Protein (EGFP) auf den Zelloberflächen der Megakaryozyten und damit auch der Thrombozyten exprimierten und rot fluoreszierendes Protein (tdTomato) auf den Zelloberflächen aller übrigen kernhaltigen Zellen (Abbildung 3, Abbildung 15, siehe auch 2.7.3). Erythrozyten waren ungefärbt.

Für einige der hier beschriebenen Projekte kamen Linien zweier unterschiedlicher plättchenspezifischer *Knockouts* zum Einsatz. Die Linie B6.129P2-Cxcr4^{tm2Yzo}/J x C57BL/6-Tg (Pf4-cre)Q3Rsko/J (**CXCR4**) besitzt eine genetische Mutation, durch die in Cre-positiven, homozygot geflochten Tieren der, zur Familie der GPCR gehörende, Rezeptor CXCR4 auf der Oberfläche von Thrombozyten und Megakaryozyten ausgeschaltet wird. Cre-negative Tiere entsprachen phänotypisch Wildtyp-Mäusen der Linie B6 und konnten daher als passende Kontrolltiere verwendet werden. Ebenfalls zum Einsatz kamen für Versuche mit Intravitalmikroskopie Kreuzungsprodukte dieser Linie mit der oben angeführten Linie B6.129 (Cg) -Gt (ROSA) 26Sor^{tm4} (ACTB-tdTomato-GFP) Luo/J (**Rosa**), die dann im Cre-positiven Falle auch grün fluoreszierende Thrombozyten aufwiesen. Diese Kreuzungslinie wird im Folgenden als **CXCR4 x Rosa** bezeichnet. Da in den Fällen, in denen mit diesen Tieren gearbeitet wurde, nur Cre-positive Tiere verwendet werden konnten (wegen der Notwendigkeit der grünen Fluoreszenz), wurde bei diesen Versuchen für die Kontrollgruppen auf die oben schon beschriebenen PF4Cre x Rosa Mäuse zurück gegriffen. Als zweite *Knockout* Linie wurde die Linie B6.Cg-Thy1^a-Ackr3^{tm1Fma} x C57BL/6-Tg (Pf4-cre)Q3Rsko/J (**CXCR7**) verwendet, ebenfalls mit und ohne Einkreuzung von Rosa. Analog zur oben beschriebenen CXCR4 Linie war hier der CXCR7-Rezeptor, ebenfalls

ein GPCR, bei positivem PF4Cre plättchenspezifisch ausgeschaltet. Die Kreuzungslinie mit Rosa wird im Folgenden mit **CXCR7 x Rosa** bezeichnet.

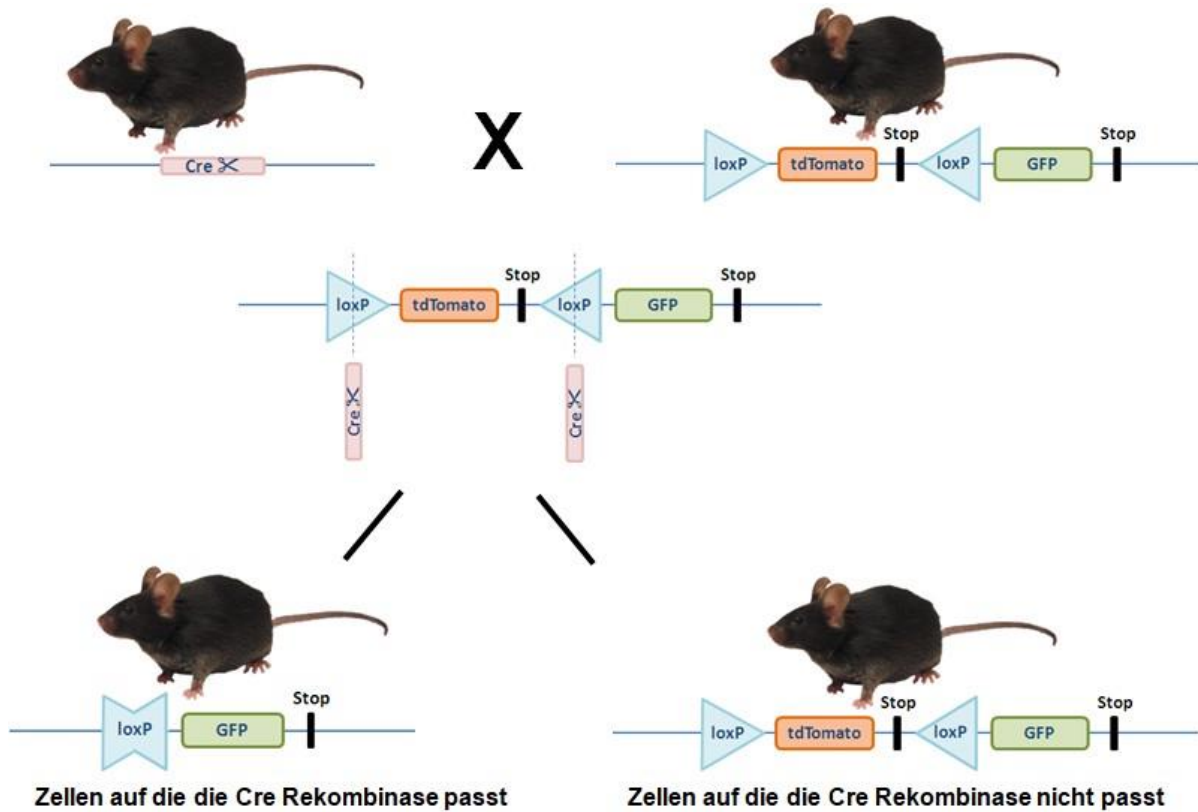


Abbildung 3: Kreuzungsschema von PF4Cre-Mäusen mit "Rosa"-Mäusen zu einer Linie, die eine plättchenspezifische Expression von eGFP aufweist.

3.2.1.2 Haltung der Tiere

Die Versuchstiere lebten nach dem Absetzen in nach Geschlecht getrennter offener Gruppenhaltung mit zu bis zu fünf Tieren pro Gruppe in Makrolon Typ II long Käfigen. Die Haltung entsprach SPF-Richtlinien mit moderater Hygienebarriere. Die Einstreu war entstaubtes, autoklaviertes Weichholzgranulat, welches einmal pro Woche gewechselt wurde. Als Nestbaumaterial wurden sterilisierte Zellstofftücher angeboten. Ein pelletiertes Standardfutter und Wasser standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Holzröhren zum Klettern und Verstecken wurde Weibchengruppen und einzeln sitzenden Männchen zur Verfügung gestellt. Bei Gruppen aus männlichen Tieren wurde darauf verzichtet, um das

Auftreten von Rankämpfen nicht zu fördern. Bei Anzeichen von Rankämpfen wurden männliche Tiere getrennt.

Alle Tierversuche der vorliegenden Arbeit wurden durch das Regierungspräsidium Tübingen gemäß §8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes genehmigt (Aktenzeichen M8/14, M18/14, M8/17 und M23/17) und von der Autorin selbst durchgeführt.

Die in dieser Arbeit vorstellten Versuche und Ergebnisse sind Teile von Forschungsprojekten, die unabhängig vom Ziel der Arbeit realisiert wurden. Daher mussten, außer für die Entwicklung eines neuen Ligaturmodells mit Reststenose, für diese Arbeit keine zusätzlichen Tiere verwendet werden.

3.2.2 Verletzungsmethoden

In mehreren Projekten kamen insgesamt drei unterschiedliche Thrombosemodelle für die *Arteria carotis communis* zum Einsatz, wobei eines der Modelle im Rahmen dieser Arbeit erst entwickelt wurde und noch nicht für die Beantwortung von Fragestellungen aus dem Bereich der Thrombusbildung eingesetzt werden konnte. Im Folgenden werden hier die in den Thrombosemodellen verwendeten Verletzungsmethoden beschrieben. Die beiden schon bewährten Methoden wurden nach Standardprotokollen durchgeführt. Zur Untersuchung der Bildung von stabilen Thromben mit Gefäßverschluss wurde das FeCl_3 -Modell verwendet, bei dem eine Verletzung des Endothels durch Einwirkung von FeCl_3 von außen auf die Gefäßwand erreicht wurde. Um mehr Informationen über die Adhäsion und Stabilität von Plättchen-Endothel- und Plättchen-Plättchen-Verbindungen zu erhalten kam das Ligaturmodell zum Einsatz, bei dem das Gefäß mit einem Faden für einige Minuten sehr fest ligiert wurde, um eine Schädigung des Endothels zu erreichen. Da sich bei einigen Versuchen mit dem Ligaturmodell herausstellte, dass kleine Gruppenunterschiede aufgrund der häufig geringen Thrombusbildung in diesem Modell ungenügend gut zu erkennen waren, wurde eine Weiterentwicklung dieses Modells angestrebt. Dazu wurden Versuche zur Etablierung eines Stenosemodells der *A. carotis communis* durchgeführt, welches dem Ligaturmodell ähnlich ist, jedoch den Vorgängen in realen Krankheitsgeschehen näher ist und eine im Vergleich zum Ligaturmodell erhöhte und verlängerte Thrombusbildung aufwies.

3.2.2.1 Anästhesie

Um die Belastung der Versuchstiere möglichst gering zu halten, wurden die erforderlichen Eingriffe unter Allgemeinanästhesie durchgeführt. Da es sich bei den Versuchen ausnahmslos um Experimente ohne Wiederherstellung der Lebensfunktion (Finalversuche) handelte, war eine Analgesie nur im Rahmen der Narkose notwendig.

Die Einleitung der Allgemeinanästhesie erfolgte durch intraperitoneale Injektion von einer Mischung aus Midazolam (5 mg/kg KGW), Medetomidin (0,5 mg/kg KGW) und Fentanyl (0,05 mg/kg KGW). Zur besseren Handhabung und auch, um einem Flüssigkeitsverlust der Tiere während des Eingriffs vorzubeugen, wurde diese geringe Menge (ca. 80 µl) auf ein Volumen von 0,3-0,4 ml mit 0,9 %iger NaCl-Lösung verdünnt. Um die Tiere nicht unnötigem Stress auszusetzen, wurden sie zuvor in einer Narkosebox durch die Inhalation von 5,0 Vol. % Isofluran in Sauerstoff (1 l/min) betäubt.

Die Erhaltung der Narkose erfolgte während des operativen Eingriffs und der anschließenden Messungen, zusätzlich zur Injektionsnarkose, durch die Zuführung von 1,0 Vol. % Isofluran in Sauerstoff (1 l/min) über eine Nasenmaske.

3.2.2.2 Instrumente und Geräte

Zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur der Maus wurde eine Wärmematte verwendet, auf der die Maus während des gesamten Versuchs lag. Zur Temperaturkontrolle kam ein Temperaturfühler in Form einer Rektalsonde zum Einsatz. Die Regelung erfolgte manuell.

Um den operativen Eingriff bei der geringen Größe der Versuchstiere zu vereinfachen, wurde der Eingriff unter einem Stereomikroskop mit Kaltlichtquelle (Carl Zeiss AG, Göttingen) mit 5-10-facher Vergrößerung durchgeführt.

Zum Enthaaren durch Auftragen einer Enthaarungscreme, zur Entfernung der Creme und Reinigung des Operationsfeldes, sowie um überschüssige Flüssigkeiten, wie Blut oder Benetzungsflüssigkeit zum Feuchthalten des Gewebes, aus dem Operationsfeld zu entfernen, wurden Wattestäbchen verwendet.

Zur besseren Zugänglichkeit des Operationsfeldes wurde der Hals der Maus leicht überstreckt und die Hülse einer Kanüle unter dem Hals platziert.

Für die Eingriffe wurden nur wenige Instrumente benötigt (Tabelle 1 + Abbildung 4). Zwei feine gewinkelte Pinzetten und eine chirurgische Schere kamen bei allen drei Modellen zum Einsatz. Außerdem wurde bei allen Verletzungsmodellen das zu untersuchende Blutgefäß auf ein kleines Stück schwarzer Kunststoffolie gelagert, um es einerseits an die Oberfläche zu verlagern und es andererseits optisch und räumlich vom umgebenden Gewebe zu trennen und damit seine Verletzung zu vereinfachen, ohne das umgebende Gewebe zu schädigen.

Beim FeCl₃-Modell wurde außerdem noch ein schmaler Streifen festes Filterpapier benötigt, das mit der 10 %igen FeCl₃ Lösung getränkt wurde.

Beim Ligaturmodell wie auch beim Stenosemodell wurde ein feiner, nicht arretierbarer Nadelhalter benötigt und monofile Fäden unterschiedlicher Stärke.

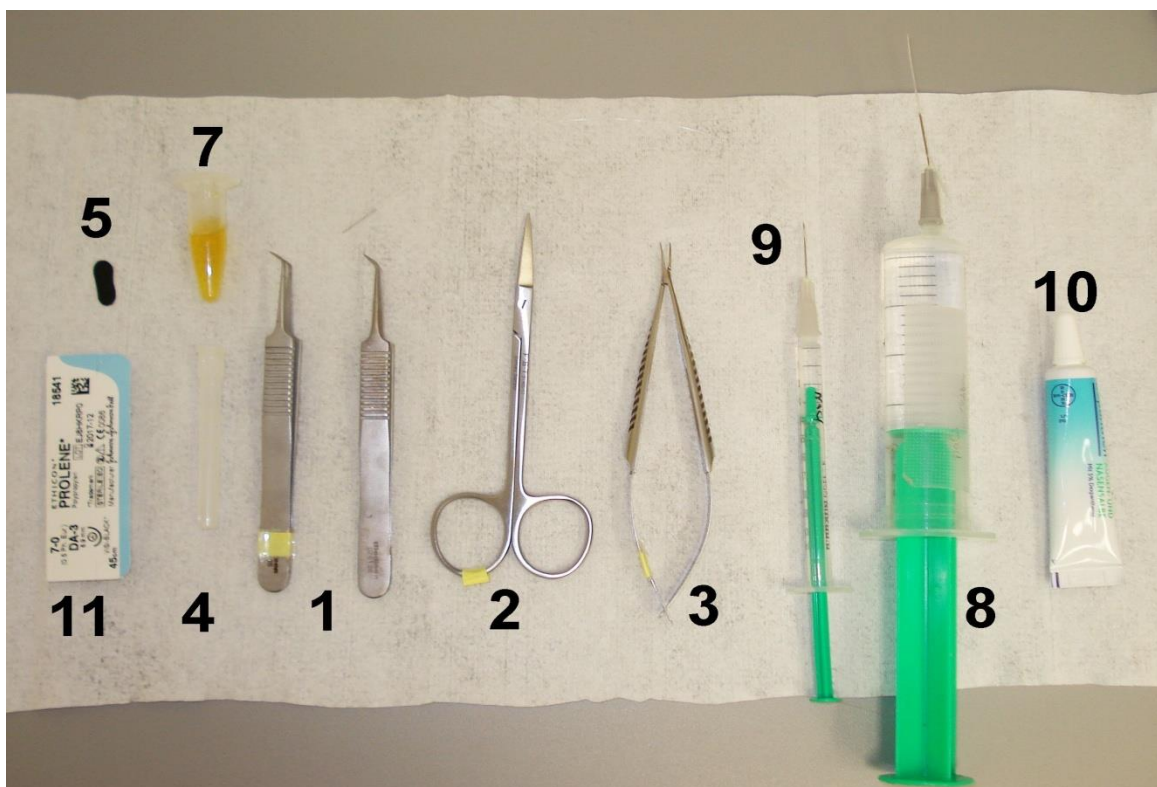


Abbildung 4: Beispiel eines vorbereiteten Arbeitsplatzes für die Durchführung von Gefäßverletzungen im Ligatur- und FeCl₃-Modell. Nummerierung der einzelnen Gegenstände wie in Tabelle 1

Tabelle 1: Benötigte Instrumente und Materialien für die Durchführung der Gefäßverletzung in den unterschiedlichen Thrombosemodellen

	Instrumente für das Ligatur- und das Stenose-Modell	Instrumente für das FeCl₃-Modell
1	2 gewinkelte Pinzetten	2 gewinkelte Pinzetten
2	Chirurgische Schere	Chirurgische Schere
3	Nadelhalter	Nadelhalter
4	Kanülenhülse	Kanülenhülse
5	1 Stück schwarze Kunststoffolie (ca. 12 x 4 mm)	1 Stück schwarze Kunststoffolie (ca. 12 x 4 mm)
6		Filter Papier (ca. 1 x 5 mm)
7		10 %ige FeCl ₃ Lösung
8	0,9 %ige NaCl-Lösung zur Benetzung des Operationsfeldes	0,9 %ige NaCl-Lösung zur Benetzung des Operationsfeldes
9	Injektionsspritze mit Schwanzvenenkatheter zur i.v. Applikation von Substanzen	Injektionsspritze mit Schwanzvenenkatheter zur i.v. Applikation von Substanzen
	Augensalbe	Augensalbe
10	Nahtmaterial:	
11	Prolene [®] , 7-0 (Ligatur Modell)	
	Prolene [®] , 8-0 (Stenose Modell)	
	Prolene [®] , 5-0 (Stenose Modell)	

3.2.2.3 Vorbereitung und Lagerung für den Eingriff

Die Vorbereitung und Lagerung war bei allen drei Verletzungsmodellen die gleiche. Um die *Cornea* der Augen vor Austrocknung zu schützen, wurde nach Anfluten der Narkose

Bepanthen® Augensalbe auf die *Cornea* der geöffneten Augen aufgetragen.

War für den jeweiligen Versuch die Verabreichung von zu untersuchenden und/oder färbenden Substanzen notwendig, wurden diese den Mäusen in Narkose intravenös in die Schwanzvene verabreicht. Bei mehr als einer zu verabreichenden Substanz bewährte sich hier das Legen eines Schwanzvenenkatheters (Abbildung 5).

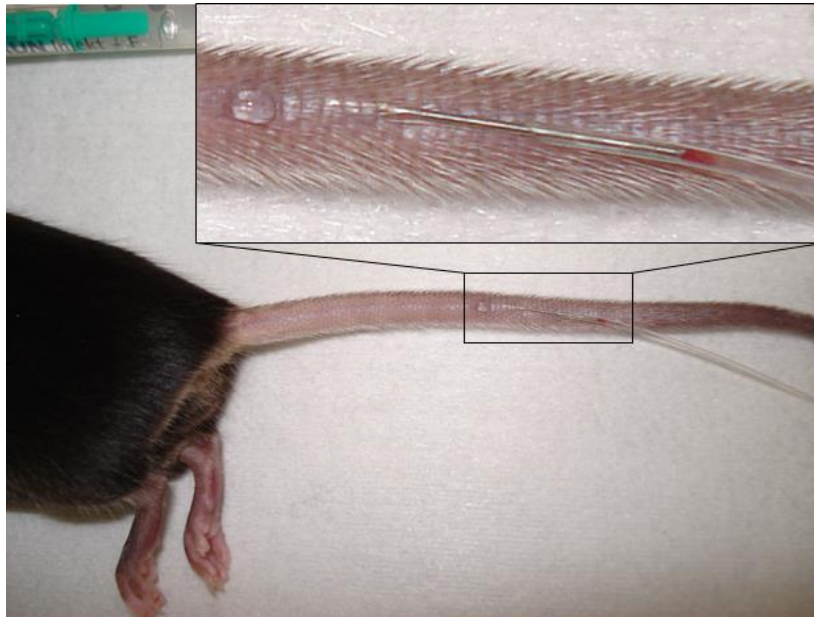


Abbildung 5: Legen eines Schwanzvenenkatheters zur intravenösen Applikation von Substanzen in den Blutkreislauf der Maus

Zur Enthaarung des Halsbereichs wurde Enthaarungscreme (Veet® Sensitive) verwendet. Enthaarungscreme hat das Potential, Hautreizungen und Juckreiz zu verursachen. Sie sollte daher nicht in Versuchen verwendet werden, bei denen die Tiere nach dem Eingriff wieder aufwachen. Da es sich bei den hier beschriebenen Versuchen jedoch um Finalexperimente handelte, konnte diese sehr einfache und gründliche Methode der Enthaarung verwendet werden. Eine etwa erbsengroße Menge Creme wurde mit einem Wattestäbchen auf die ventrale Halsregion zwischen Kieferwinkel und Sternum aufgetragen und in das Fell eingerieben. Nach etwa einer Minute wurden Creme und Haare mit einem trockenen Wattestäbchen entfernt und der Bereich mit einem in Wasser getränkten Wattestäbchen gründlich gereinigt und anschließend getrocknet (Abbildung 6).

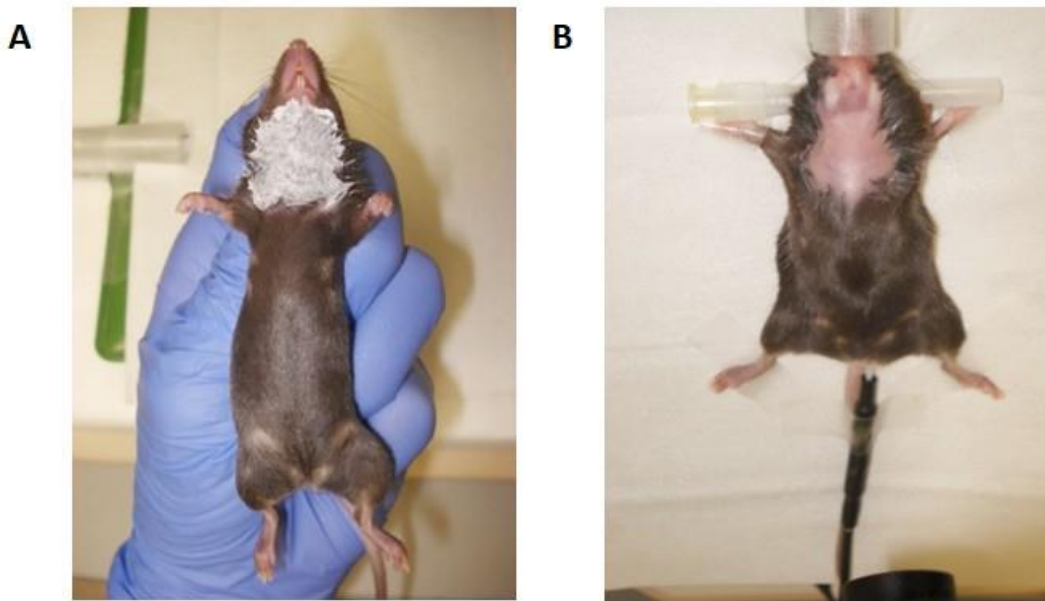


Abbildung 6: Vorbereitung der Maus für alle drei Modelle: (A) Auftragen von Enthaarungscreme. (B) Lagerung der enthaarten Maus für den Versuch

Daraufhin wurde die Maus in Rückenlage mit der Nase in der Atemmaske auf der mit einer sauberen Unterlage bedeckten Wärmematte fixiert. Die Unterlage, ein doppelt gelegtes festes Zellstoff-Tuch, erfüllte hierbei zweierlei Funktionen: Einerseits eine hygienische Funktion, da sie möglicherweise beim Versuch frei werdende Flüssigkeiten (Blut, Urin, Benetzungsflüssigkeit) aufnahm und andererseits auch die Funktion, die Maus vor einer punktuellen Überhitzung an den Knochenvorsprüngen wie Hinterkopf, Schulterblätter, Becken und Gliedmaßen zu schützen.

Die Gliedmaßen wurden mit Klebeband an der Matte befestigt, die Rektalsonde ins Rektum eingeführt und ebenfalls zusammen mit dem Schwanz fixiert. Dann wurde eine Kanülenhülle unter den Hals der Maus geschoben und der Hals so leicht überstreckt. Durch das Einführen der Nasen-Maul-Partie in die fest mit der Wärmematte verbundene Atemmaske wurde der Kopf der Maus zusätzlich auf der Unterlage fixiert. Über die Atemmaske wurde daraufhin 1,0 Vol. % Isofluran in Sauerstoff bei einem Flow von 1 Liter pro Minute zugeführt.

3.2.2.4 Der operative Eingriff

Die Tiefe der Narkose wurde durch Kneifen der Zwischenzehenhaut und der Zehe selbst mit einer Pinzette überprüft. Nach Aussetzen des Flexorreflexes wurde mit der Operation begonnen.

Mit einer kleinen chirurgischen Schere wurde eine Hautfalte in der Medianen im Halsbereich eingeschnitten und dieser Hautschnitt bis zum Brusteingang erweitert. Die daraufhin sichtbaren Speicheldrüsen wurden stumpf getrennt und jeweils nach lateral verlagert. Zu beiden Seiten der Trachea wurden dann in der Tiefe die beiden *Aa. carotides communes* sichtbar (Abbildung 7). Diese mussten sorgfältig vom umgebenden Gewebe frei präpariert werden, um die Gefäßwände nicht zu verletzen. Anliegend an die Arterie läuft auf beiden Seiten der *Truncus vagosympathicus*, der vorsichtig von der Arterie getrennt werden musste, ohne ihn zu beschädigen. Eine Beschädigung dieses Nervenstrangs, oder auch des nahe der Trachea verlaufenden *Nervus laryngeus recurrens*, kann zu einem Ausfall des Sympathikus im Kopfbereich oder zu Atemproblemen bei der Maus führen, da die Stimmritze sich nicht mehr ausreichend öffnen kann. Waren beide Arterien frei präpariert, wurden sie auf ein 4 mm x 12 mm großes Stück einer festen schwarzen Kunststoffolie gelagert und darauf geachtet, dass das Niveau der Blutgefäße etwas unterhalb des Niveaus der Wundränder lag. Damit war gewährleistet, dass die Gefäße mit 0,9 %iger NaCl-Lösung überschichtet werden konnten, ohne dass die Flüssigkeit über die Wundränder ablief.

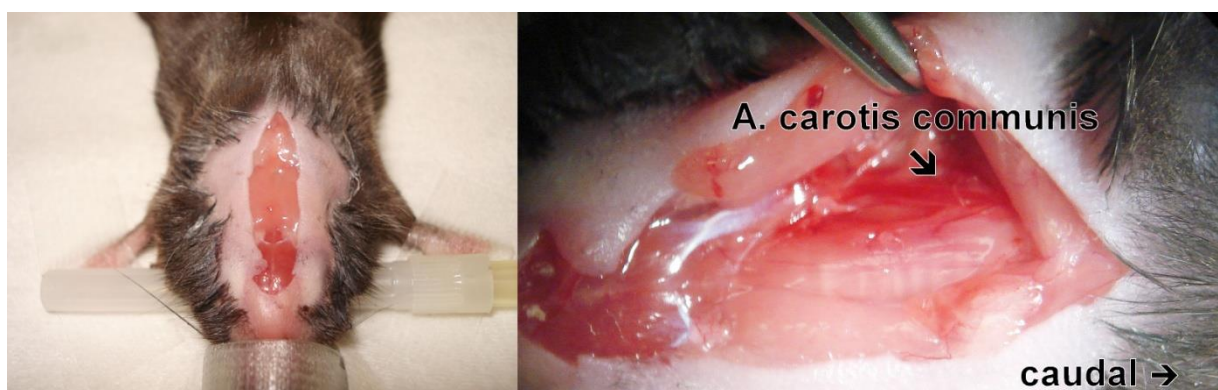


Abbildung 7: Links: Operationssitus nach Hautschnitt. In der Mitte der Inzision sind die Speicheldrüsen erkennbar. Rechts: Nach stumpfem Trennen der Speicheldrüsen wurde neben der Trachea in der Tiefe die *A. carotis communis* sichtbar

In diesem Stadium des Versuchs wurden mit dem Intravitalmikroskop Aufnahmen der noch unverletzten Gefäße angefertigt, um einerseits sicher zu stellen, dass die Gefäßwände durch die Präparation keine Schädigung erlitten hatten, die zu einer verfrühten Thrombusbildung führen könnte, und um später eine Bestimmung des Gefäßdurchmessers durchführen zu können. Bei Verwendung des Moor LD12 für die Flussmessung anstatt des Intravitalmikroskops wurde ebenfalls ein Standbild des unverletzten Gefäßes aufgenommen, um einen Initialwert des Flusses zu ermitteln.

Das weitere Vorgehen war dann für die verschiedenen Verletzungsmodelle unterschiedlich und wird im Folgenden separat beschrieben.

Verletzung mit FeCl₃

Bevor das FeCl₃ aufgebracht werden konnte, wurde die Flüssigkeit mit Wattestäbchen komplett aus dem OP-Bereich entfernt, um die Gefäßwände so trocken wie möglich zu bekommen. Dann wurde ein kleines Stück (ca. 1 mm x 5 mm) eines festen Filterpapiers in 10 %iger FeCl₃ Lösung getränkt, die überschüssige Flüssigkeit abgestreift und der Papierstreifen quer über das Blutgefäß gelegt. Er wurde dann um das Blutgefäß herum noch etwas angeformt, um einen möglichst großen Anteil des Umfangs zu berühren und daraufhin die Stoppuhr gestartet (Abbildung 8). Nach exakt einer Minute wurde der Papierstreifen entfernt, die Uhr neu gestartet und die Arterie zweimal mit etwas 0,9 %iger NaCl-Lösung abgespült und die Flüssigkeit aufgenommen. Anschließend wurde der Bereich wieder mit 0,9 %iger NaCl-Lösung überschichtet, die Maus unter das Intravitalmikroskop, bzw. das Laser Doppler Instrument verbracht und die Messung gestartet. Die verstrichene Zeit zwischen dem Ende der Verletzung und dem Beginn der Messung wurde notiert. Die Messdauer mit dem Intravitalmikroskop betrug in der Regel 20 min. Bei einer Versuchsreihe, bei der an Stelle der intravitalmikroskopischen Untersuchung eine Laser Doppler Flussmessung durchgeführt wurde, wurde 40 min lang gemessen.



Abbildung 8: Verletzung durch FeCl_3 . Ein Filterpapier getränkt mit 10% FeCl_3 Lösung wurde auf das rechte Blutgefäß aufgelegt und an den Seiten etwas angeformt

Verletzung durch Fadenligatur

Bei dieser Methode konnte die überschichtende Flüssigkeit im OP-Bereich verbleiben. Die Arterie wurde mit einer geschlossenen Pinzette von unten etwas angehoben, um mit einem Nadelhalter die Nadel eines monofilen, nicht resorbierbaren Fadens der Stärke 7-0 (Prolene® 7-0) unter dem Gefäß hindurch zu führen. Daraufhin wurde unter Belassung einer Schlaufe ein einfacher Zugknoten gebildet und sehr fest angezogen (Abbildung 9). Es bewährte sich, vor dem festen Anziehen mit dem Nadelhalter einmal umzugreifen und den Faden nicht am Scheitelpunkt der Schlaufe, sondern nahe des Knotens zu greifen, um die Bildung von scharfen Graten am Faden zu reduzieren. Es kann dazu auch eine Pinzette verwendet werden, die noch etwas schonender zum Faden ist, jedoch leichter abrutscht. Scharfe Grate haben das Potential, beim Öffnen des Knotens die Gefäßwand zu verletzen. Außerdem sollte eine Dehnung des Gefäßes beim Ligieren vermieden werden, um ausschließlich durch den Fadendruck induzierte Schäden der Gefäßwand zu erhalten. Die Ligatur verblieb für 5 min

am Gefäß. In dieser Zeit wurde die Maus unter das Intravitalmikroskop umgelagert und ein Standbild des ligierten Gefäßes aufgenommen. Das Öffnen der Ligatur erfolgte nach 5 min bei vorher gestarteter Aufnahmefunktion, um die Thrombusbildung von Beginn an beobachten zu können. Dazu wurde zum Auffinden des kurzen Fadenendes das Operationsfeld kurz mit einer Taschenlampe beleuchtet, die nach Greifen des Fadenendes mit dem Nadelhalter wieder ausgeschaltet wurde. Danach wurden beide Fadenenden langsam auseinander gezogen und darauf geachtet, dass wie schon beim Ligieren, die Arterie auch beim Öffnen in keine Richtung gedehnt wurde. Nach dem Öffnen des Knotens wurde der Faden vollständig entfernt und der Focus des Mikroskops nachgeregelt, um möglichst schnell ein scharfes Bild der verletzten Stelle zu erhalten. Die Messdauer mit dem Intravitalmikroskop betrug 20 min.

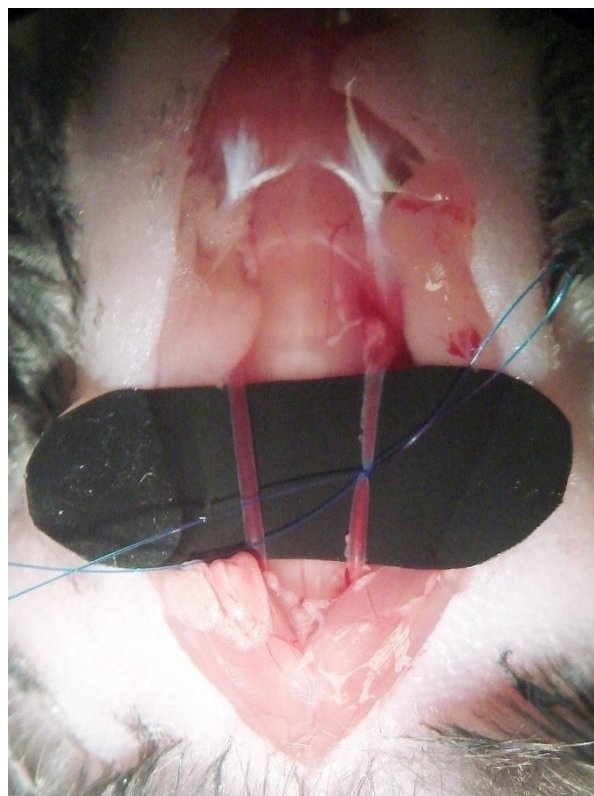


Abbildung 9: Verletzung im Ligaturmodell. Die linke *A. carotis communis* wurde mit einem monofilen Faden (Prolene® 7-0) ligiert. Eine Schlaufe wurde belassen, um die Ligatur später leicht wieder öffnen zu können

Verletzung durch Fadenligatur mit anschließender Reststenose

Die Durchführung dieses Verletzungsmodells war sehr ähnlich der des einfachen Fadenligaturmodells. Der Ligaturfaden, der eine Fadenstärke dünner gewählt wurde als beim Ligaturmodell (Prolene® 8-0), wurde wie oben beschrieben unter der Arterie platziert und ein lockerer chirurgischer Knoten ohne Zugschleife vorgelegt. Daraufhin wurde die entstandene Fadenschleife so um das Blutgefäß herum gedreht, dass sich die zum Knoten geschlungenen Fadenanteile unterhalb der Arterie befanden. Ein etwa 4 cm langes Stück eines Prolene® 5-0 Fadens wurde dann parallel zum Blutgefäß mit in die Fadenschleife des Ligaturfadens eingelegt und der Ligaturfaden daraufhin kräftig angezogen (Abbildung 10).

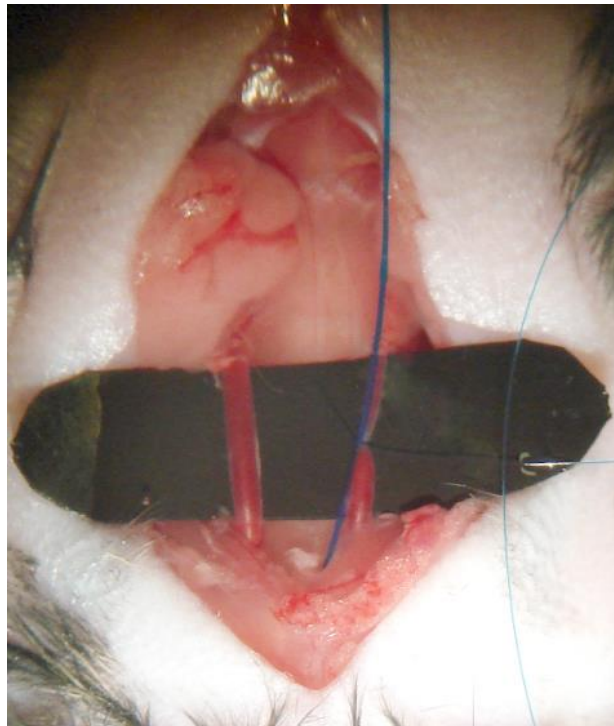


Abbildung 10: Verletzung im Ligaturmodell mit Reststenose. Die linke *A. carotis communis* wurde mit einem monofilen Faden (8-0) ligiert. Ein Faden der Stärke 5-0 wurde als Platzhalter mit in die Ligatur einbezogen

Auch hier wurde die Ligatur für 5 min am Gefäß belassen. Es stellte sich als günstig heraus, das Fadenstück, das als Platzhalter verwendet wurde, zuvor auf scharfe Kanten und Grate zu untersuchen. Bewährt hat es sich, diesen Faden schräg anzuschneiden, um ihn später einfach und ohne Widerstände aus der Ligatur entfernen zu können. Auch hier wurde die

Maus während der Ligaturzeit schon unter dem Mikroskop platziert, um die Aufnahme vor der Wiederherstellung des Blutflusses starten zu können. Nach Ablauf der Zeit wurde der Platzhalterfaden vorsichtig aus der Ligatur gezogen und die Arterie entfaltetete sich bis zum von der Ligatur vorgegebenen Durchmesser, die in etwa dem Querschnitt des Platzhalterfadens entsprach. Ein Blutfluss durch die entstandene Engstelle wurde dadurch wiederhergestellt. Als Aufnahmedauer wurden 20 min gewählt.

Die Vorversuche auf dem Weg zum oben beschriebenen Protokoll für diese Verletzungsmethode werden in Kapitel 3.3.2.3 detailliert beschrieben.

In Abhängigkeit des Versuchsdesigns und wenn bei der Präparation keine unbeabsichtigte Verletzung der Gefäßwand auftrat konnten bei den Mäusen in allen Modellen beide *Aa. carotides communes* nacheinander verwendet werden.

Nach Beendigung aller Messungen an einem Tier wurde die Narkose durch die Erhöhung des Isoflurananteils im Atemgas auf 5,0 Vol. % vertieft und die Maus anschließend durch zervikale Dislokation getötet.

3.2.3 Bildgebung

3.2.3.1 Intravitalmikroskopie

Für die intravitalmikroskopischen Untersuchungen wurde ein Fluoreszenzmikroskop Nikon Eclipse Ni-E (*multi-color fluorescent imaging*) verwendet. Dieses war mit zwei Kameras ausgestattet, zwischen denen umgeschaltet werden konnte. Außerdem konnte der Strahlengang direkt auf ein Binokular geschaltet werden. Es stand eine monochrome Kamera mit einem Sensorformat von 1344 x 1024 Pixeln zur Verfügung und eine polychrome Kamera mit einem vorgeschalteten Splitter, der es erlaubte, jeweils ein Bild von zwei verschiedenen Fluoreszenz-Kanälen gleichzeitig darzustellen. Daher stand bei dieser Kamera pro Kanal nur die Hälfte des Sensorformats von 2048 x 2048 Pixeln zur Verfügung. Vorgeschaltet waren dafür zwei Filtersets. Für das grüne Fluoreszenzsignal wurde das Set FITC HC BrightLine Basic mit dem Fluorochrom Alexa Fluor® 488, BODIPY, FITC (Filter 475/35 nm, Filter 530/43 nm, Strahlenteiler Schwelle: 499 nm) verwendet, für das rote Fluoreszenzsignal das Set TxRed HC

BrightLine Basic mit dem Fluorochrom Texas Red® (Filter 559/34 nm, Filter 630/69 nm, Strahlenteiler Schwelle: 585 nm). Als Objektiv wurde ein Trockenobjektiv mit 10-facher Vergrößerung verwendet, um auch mit der polychromen Kamera die volle Breite des untersuchten Blutgefäßes abbilden zu können (Abbildung 11). Außerdem standen für die Untersuchung von feineren Strukturen ein Wasserimmersionsobjektiv mit 20-facher Vergrößerung und ein Trockenobjektiv mit 40-facher Vergrößerung zur Verfügung, die für die hier beschriebenen Versuche jedoch nicht benötigt wurden.

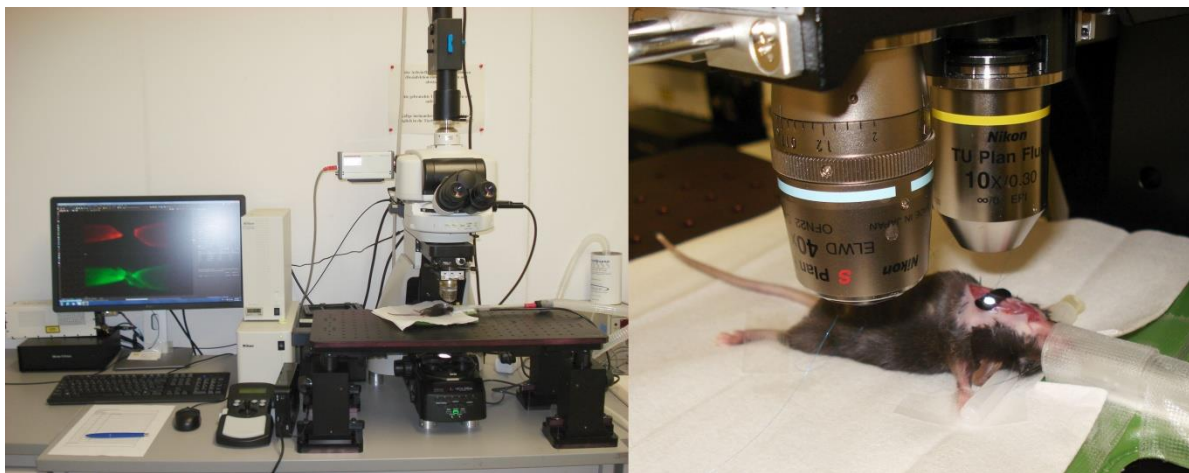


Abbildung 11: Links: Aufbau der Apparatur für die intravitalmikroskopische Untersuchung. Rechts: Lagerung der Maus unter dem Intravitalmikroskop. Hier vor Beginn der Untersuchung im Ligaturmodell

Mit der mitgelieferten Software Nikon NIS Elements Version 4.30 waren sowohl das Anzeigen des Kamerabildes in Echtzeit, wie auch die Aufnahme und spätere Bearbeitung der Filme möglich. Bei Angabe des verwendeten Objektivs konnte eine Vermessung von Strukturen im Bereich des Kamerabildes erfolgen.

Eine Funktion, die vor allem für die bessere Veranschaulichung von Daten zum Einsatz kam, die mit der Ligaturmethode erzeugt wurden, war die Möglichkeit, Intensitätskurven über die Zeit zu erstellen. Dazu errechnete das Programm für jedes aufgenommene Bild eine mittlere Intensität des gemessenen Fluoreszenzlichtes. Anstatt das gesamte Bild zu betrachten, konnten beliebige „Regions of Interest“ (ROIs) definiert werden. Dabei wurde die mittlere Intensität in jedem Einzelbild immer im gleichen, vorher festgelegten, Bereich ermittelt. Auch die Definition von mehr als einer ROI pro Film war möglich, was es erlaubte, durch

Plättchen erzeugte Fluoreszenz deutlicher von der Hintergrundfluoreszenz zu unterscheiden.

3.2.3.2 Laser Doppler *Imaging*

Für die Flussmessung mit der Laser Doppler Anemometrie macht man sich den sogenannten Dopplereffekt zu Nutze (Abbildung 12). Dabei trifft infrarotes Licht eines Lasers auf eine bewegte Oberfläche, wird von dieser reflektiert und das reflektierte Licht von einem Sensor gemessen. Durch die Bewegung des reflektierenden Objekts wird die Frequenz des reflektierten Lichts geringfügig verändert, was vom Gerät wahrgenommen wird (Abbildung 13). Aus der Frequenzänderung und der Menge des zurück reflektierten Lichts kann dann auf die Geschwindigkeit und die Anzahl der reflektierenden Objekte geschlossen werden. Bei dem hier verwendeten Messgerät erfolgte eine Rasterabtastung des vorher eingestellten Bereichs, so dass pro Pixel ein Wert ermittelt wurde. Es konnte dann eine Falschfarbendarstellung des gerasterten Bereichs erzeugt werden und außerdem eine Flusskurve erstellt werden, bei der jeweils der Mittelwert des gemessenen Flusses in einer „*Region of Interest*“ (ROI) über die Zeit aufgetragen wurde. Als ROI wurde ein möglichst kleiner Bereich um die *A. carotis communis* gewählt. Das Gewebe proximal und distal der freigelegten Arterie wurde dabei nach Möglichkeit ausgespart.

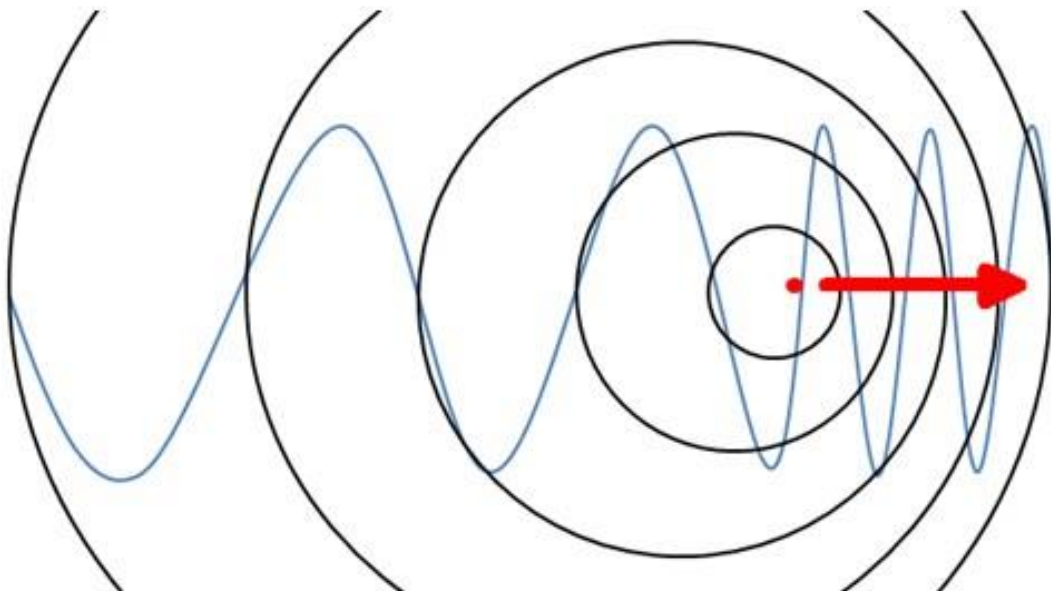


Abbildung 12: Schematische Darstellung des Dopplereffektes. Die rote Schallquelle bewegt sich im Bild nach rechts, was zu einer Verkürzung der Wellenlänge des emittierten Tons in Bewegungsrichtung führt

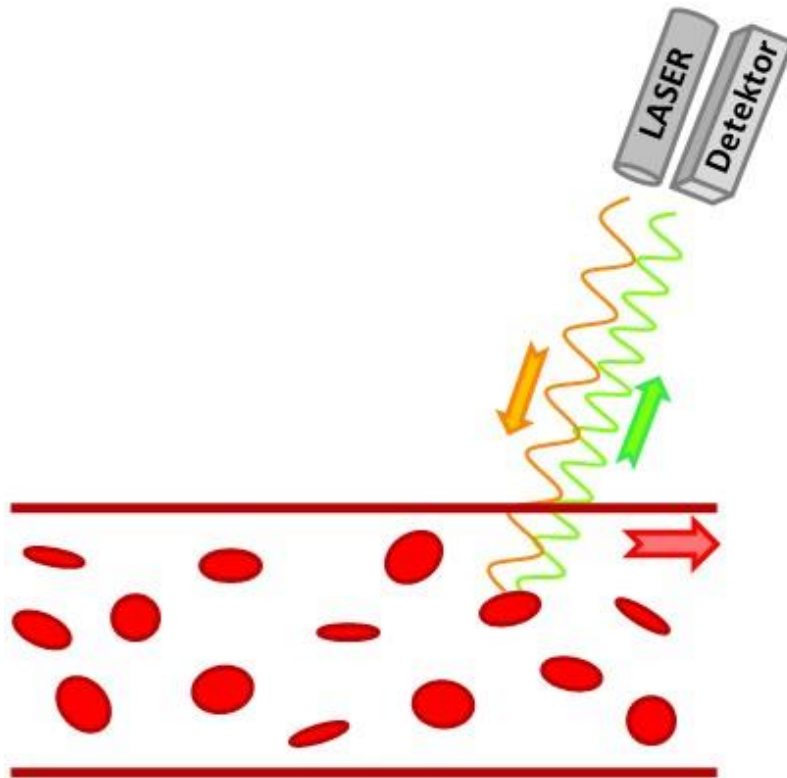


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Funktion der Laser-Doppler-Flussmessung. Einfallendes Licht einer bestimmten Frequenz wird von sich im Blutstrom bewegenden Zellen reflektiert und vom Detektor wahrgenommen. Dabei werden höhere Frequenzen gemessen, wenn sich die Zellen auf den Detektor zu bewegen und niedrigere Frequenzen, wenn sich die Zellen vom Detektor wegbewegen

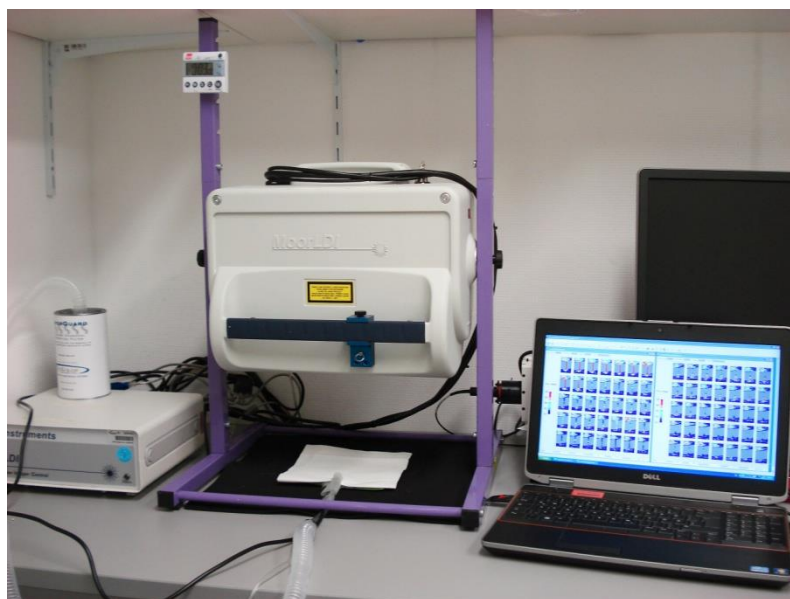


Abbildung 14: Aufbau der Apparatur für die Laser-Doppler-Flussmessung

3.2.4 Datenerhebung

Je nach gewähltem Messverfahren standen mehrere Methoden zur Verfügung, die erhobenen Daten auszuwerten. Da die erhobenen Daten bei den beiden verwendeten Messverfahren etwas unterschiedlich waren, war auch die Herangehensweise bei der Auswertung nicht dieselbe. Die jeweils zur Auswertung verwendeten Methoden werden daher getrennt nach dem gewählten Messverfahren kurz vorgestellt.

3.2.4.1 Intravitalmikroskopie

Die Aufnahmen mit dem Intravitalmikroskop lieferten Bilder, deren Auflösung in einem bestimmten Rahmen wählbar war. Die Belichtungsstärke und –dauer mit Anregungslicht war ebenfalls variabel. Darüber hinaus standen zwei unterschiedliche Kameras zur Verfügung und das Umgebungslicht hatte einen großen Einfluss auf die gemessenen Intensitätswerte des emittierten Fluoreszenzlichts. Überdies war der Genotyp der Mäuse bezüglich der Expression fluoreszierender Proteine entscheidend für die Intensität des emittierten Lichts.

Sollte eine Auswertung der Daten über die Fluoreszenzsignale erfolgen, war es daher unabdingbar, bei allen Experimenten die oben genannten Variablen immer gleich zu halten.

Von der Software des Intravitalmikroskops wurden Intensitätswerte für jedes Pixel der Aufnahmen geliefert und natürlich die Aufnahmen (Videos), deren Anzeigeparameter (z.B. Helligkeit und Kontrast) angepasst werden konnten, was keinen Einfluss auf die tatsächlich gemessenen Intensitätswerte hatte. Eine Möglichkeit der Auswertung bestand darin, die gemessenen Intensitäten des emittierten Fluoreszenzlichts in einem festgelegten Bereich über die Zeit zu betrachten.

Der **Vergleich der Intensitätskurven** lieferte qualitative Informationen über die Geschwindigkeit des Thrombusaufbaus, die Stabilität der Thromben und die maximale Leuchtkraft der Thromben, was mit der Anzahl der beteiligten Thrombozyten und damit mit dem Gesamtvolumen der Thromben einherging.

Quantitative Vergleiche waren möglich durch die Betrachtung von Werten für die **mittlere Intensität in Bildern zu bestimmten Zeitpunkten** der Messung.

Eine weitere Möglichkeit der Auswertung bestand über die Messung der im Bild sichtbaren **fluoreszierenden Flächen, bezogen auf eine Gesamtfläche**. Verwendet wurde als Gesamtfläche einerseits die gesamte im Bild sichtbare Fläche der Arterie und andererseits eine frei wählbare ROI. Welche Referenzfläche zur Auswertung gewählt wurde, hing unter anderem vom durchgeführten Thrombusmodell ab. Die Software des Mikroskops bot eine Funktion an, die Flächen mit Intensitätswerten oberhalb eines wählbaren Schwellenwerts selbstständig zu markieren und zu berechnen, da sich diese Funktion jedoch in der Praxis als sehr fehleranfällig herausstellte, wurde die Markierung und Berechnung der Flächen von Hand mit Hilfe des Programms Zeiss AxioVision LE64 (AxioVs40x64 V4.9.1.0, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland) vorgenommen.

Bei Messungen im FeCl₃-Modell konnte zusätzlich zu diesen oben genannten Auswertemethoden der Zeitpunkt bestimmt werden, zu dem der Blutfluss durch das Gefäß für die Dauer von mindestens einer Minute zum Erliegen kam. Dieser Zeitpunkt wurde als **Verschlusszeit** bezeichnet. Der Zeitpunkt wurde visuell während des Versuchs oder später beim Betrachten der aufgezeichneten Videos bestimmt.

3.2.4.2 Laser Doppler *Imaging*

Bei der Laser Doppler Flussmessung war es nicht möglich, die Thrombusbildung als solche zu beobachten. Es handelte sich um ein Rasterverfahren, das für jeden Punkt einen Wert für den an dieser Stelle zu dieser Zeit gemessenen Fluss zurück gab. Der Fluss im Inneren der Arterie änderte sich erst deutlich kurz bevor sich das Blutgefäß vollständig oder zumindest weitestgehend verschloss. Daher wurde dieses Verfahren nur im Rahmen des FeCl₃-Modells erfolgreich eingesetzt.

Die Kenngröße, die mit diesem Verfahren sehr gut zu bestimmen war, war die **Verschlusszeit**. Aufgrund der geringen zeitlichen Auflösung des Messverfahrens war die Bestimmung der gemessenen Zeit jedoch nur +/- 30 Sekunden genau möglich.

Die **Anzahl der Verschlüsse** im Messzeitraum war ein weiterer Parameter, der mit der Laser Doppler Flussmessung gut bestimmbar war.

3.2.5 Statistische Verfahren zur Datenanalyse

Für die grafische Darstellung der Versuchsergebnisse wurde das Computerprogramm GraphPad Prism (Versionen 6 und 8, GraphPad Software, USA) verwendet. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM: „*standard error of the mean*“) angegeben. Dabei ist SEM definiert als der Quotient der Standardabweichung der Stichprobe und der Wurzel des Stichprobenumfangs. In der tierexperimentellen Forschung wird aus Tierschutzgründen üblicherweise die kleinstmögliche Stichprobe gewählt, mit der sich ein signifikantes Ergebnis noch erzielen lässt. Aus diesem Grund sind die in dieser Arbeit verwendeten Gruppengrößen relativ klein. Daher wurde für Mittelwertvergleiche zwischen zwei Gruppen mit dem Fisher-Pitman-Test ein exakter Test verwendet, der unabhängig von der Verteilung der Daten ist und bei dem zudem die geringe Schätzgenauigkeit des p-Wertes nicht zum Tragen kommt, welche bei Anwendung asymptotischer Testverfahren, wie dem t-Test und dem Mann-Whitney-U-Test, im Falle von Stichprobenumfängen unter 10 auftritt.

Für die Vergleiche der Thrombusfläche zu verschiedenen Zeitpunkten bei der Darstellung der methodischen Ergebnisse wurden *post hoc* Tests nach Dunnett in einem gemischten linearen Modell (REML) verwendet.

Ein p-Wert von $p < 0,05$ galt als signifikant. In allen Grafiken wurde jeweils ein p-Wert von $p < 0,05$ mit einem Stern, ein p-Wert von $p < 0,01$ mit zwei Sternen markiert.

Für die im FeCl₃-Modell und im Carotis-Ligatur-Modell durchgeführten Versuche, deren Ergebnisse hier als Beispiele für das jeweilige Modell gezeigt werden, wurde *a priori* der optimale Stichprobenumfang auf Basis einer Power von 80 % und einem Signifikanzniveau von 5 % berechnet.

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Methodische Ergebnisse

3.3.1.1 Verifikation der Eignung der verwendeten Mauslinie

Um die Eignung der in Kapitel 3.2.1.1 beschriebenen Mauslinie für die geplanten Versuche zu verifizieren, wurde eine Durchflusszytometrie (FACS) durchgeführt. Mit dieser konnte die Fluoreszenz von nativen Thrombozyten aus dem Blut jeweils einer Maus der Genotypen „B6“ (Wildtyp), „Rosa“ und „PF4Cre x Rosa“ quantitativ dargestellt werden. Signale zweier verschiedener Fluoreszenzproteine (tdTomato mit roter Fluoreszenz und EGFP mit grüner Fluoreszenz) wurden gemessen und ausgewertet. Am Gerät wurde für die rote Fluoreszenz die Einstellung für das üblicherweise verwendete Fluoreszenzprotein Phycoerythrin (PE) gewählt und für die grüne Fluoreszenz die Einstellung für die fluoreszierende Substanz Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC). Wildtyp-Thrombozyten erzeugten ein geringes Signal für beide Fluoreszenzfarben, welches von der Eigenfluoreszenz von Zellbestandteilen verursacht wurde. Das Signal der grünen Fluoreszenz von Thrombozyten einer Cre-negativen mT/mG-Maus (Rosa) unterschied sich nicht von dem der Wildtyp-Thrombozyten. Es zeigte sich jedoch eine, im Vergleich zum Wildtyp, deutlich erhöhte rote Fluoreszenz. Thrombozyten einer Cre-positiven mT/mG-Maus (PF4Cre x Rosa) verhielten sich im bezüglich der roten Fluoreszenz wie Wildtyp-Thrombozyten, erzeugten aber ein deutlich erhöhtes Signal für die grüne Fluoreszenz. Mit diesen Messungen ließ sich nachweisen, dass Thrombozyten von Mäusen des Genotyps „Rosa“ ein rot fluoreszierendes Protein besaßen und Thrombozyten von Mäusen des Genotyps „PF4Cre x Rosa“ ein grün fluoreszierendes Protein.

Auch mit der Intravitalmikroskopie konnten beide Fluoreszenzproteine gut detektiert und dargestellt werden (Abbildung 15).

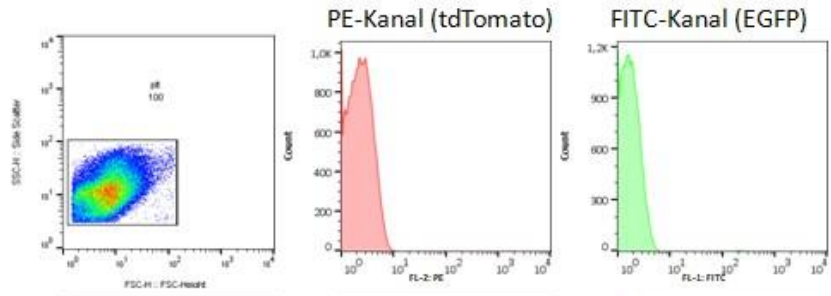
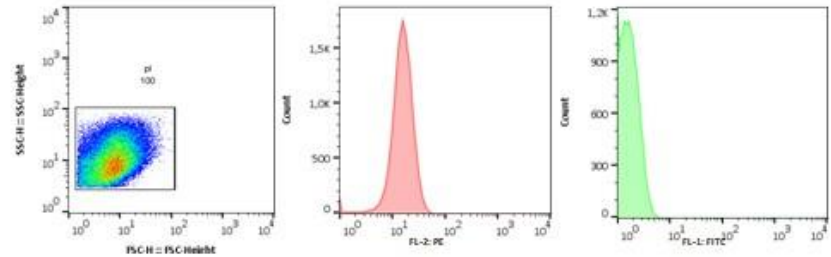
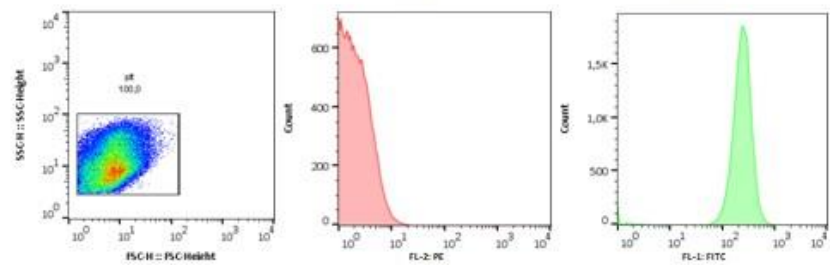
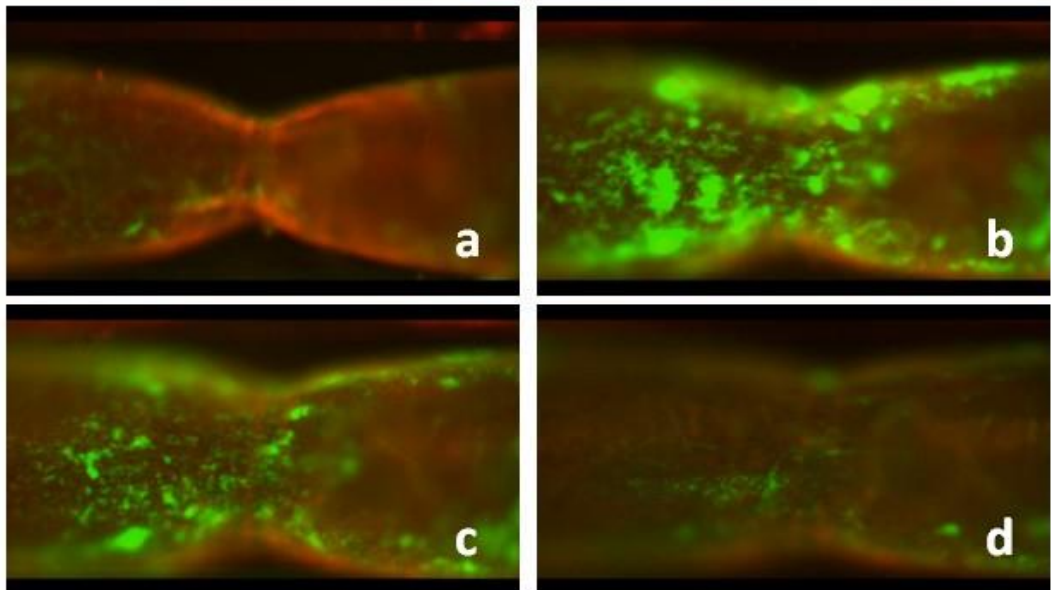
A**Wildtyp****ROSA mT/mG-PF4-Cre -****ROSA mT/mG-PF4-Cre +****B**

Abbildung 15: Verifikation der genetischen Expression von EGFP auf der Zelloberfläche der Thrombozyten von Mäusen des Genotyps „PF4Cre x Rosa“. (A) Ergebnisse der FACS-Untersuchung. (B) Sichtbare Thrombenentwicklung über die Zeit in der *A. carotis communis* im Ligaturmodell. (Zeit nach Öffnen der Ligatur: a: 0 min; b: 1 min; c: 2 min; d: 10 min)

3.3.1.2 Untersuchung der intraarteriellen Thrombusbildung in der *A. carotis communis*

Mit dem Ziel, die Unterschiede zwischen unterschiedlichen Thrombusmodellen zu untersuchen und dadurch Rückschlüsse auf ihre Eignung zum Einsatz für unterschiedliche Fragestellungen zu ziehen, wurden die Resultate von Untersuchungen in drei verschiedenen Thrombusmodellen verglichen.

Erlaubte es das jeweilige Versuchsdesign und traten bei der Präparation keine Zwischenfälle auf, wurden bei den Mäusen beide *Aa. carotides communes* nacheinander für die Messungen verwendet. Die Mäuse tolerierten auch einen kompletten Verschluss dieser beiden Gefäße gut für die Dauer der Experimente. Ein kompletter Verschluss durch Thromben kann beim FeCl₃-Modell auftreten, aber weder beim einfachen Ligaturmodell noch beim Ligaturmodell mit anschließender Stenose ist dies zu erwarten.

3.3.1.2.1 FeCl₃-Modell

Für Untersuchungen im FeCl₃-Modell an der *A. carotis communis* wurden zwei unterschiedliche Messverfahren verwendet, um Informationen über die Kinetik der Thrombusbildung zu erhalten.

Mit dem Intravitalmikroskop konnte die Thrombusbildung in Echtzeit beobachtet werden. Anschließend wurden die erzeugten Videos ausgewertet.

Mit der Blutflussmessung mittels Laser-Doppler-Anemometrie stand ein weiteres Verfahren zur Verfügung, die Auswirkungen der Thrombusbildung auf den Blutfluss in diesem Modell zu untersuchen.

Intravitalmikroskopische Untersuchungen

Die Intravitalmikroskopie erlaubte eine Beobachtung der Thrombusbildung in Echtzeit mit einer hohen zeitlichen und räumlichen Auflösung. Das Wachstum des Thrombus und dessen Auswirkungen auf den Blutstrom konnte während der Messung verfolgt und aufgezeichnet

werden. Die Beurteilung, ob und wann das Blutgefäß durch den Thrombus vollständig verschlossen war, war jedoch oft schwer zu objektivieren.

Nach einer Blutgefäßverletzung mit FeCl_3 wurde sofort nach der Einwirkung der Chemikalie eine veränderte Fluoreszenz der Gefäßwand sichtbar. An den Bereichen, die mit FeCl_3 in Kontakt kamen, verlor das Gewebe einen Teil seiner Eigenfluoreszenz und stellte sich im intravitalmikroskopischen Bild dunkel dar. Bis die ersten Anzeichen einer Thrombusbildung sichtbar wurden dauerte es in der Regel mehrere Minuten. Eine schematische Darstellung des Verlaufs über die Zeit zeigt Abbildung 16.

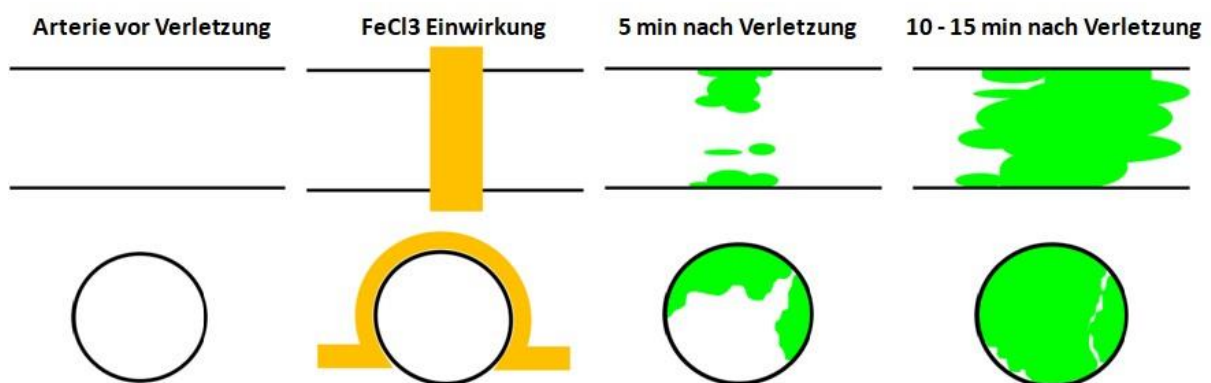


Abbildung 16: FeCl_3 -Modell. Schematische Darstellung. Oben: Die Längsansicht entspricht der Darstellung im mikroskopischen Bild. Unten: Querschnittsdarstellung zur besseren Veranschaulichung der dreidimensionalen Thrombusausdehnung. In Gelb ist das mit FeCl_3 getränkte Filterpapier dargestellt

Sah man sich nach Beendigung der Versuche die zuvor mit FeCl_3 verletzten Arterien an, konnte man eine weißlich-gelbliche Verfärbung der Gefäßwand an der Verletzungsstelle erkennen und der durch die Gefäßwand sichtbare Thrombus blockierte in den meisten Fällen den Blutfluss komplett oder zu einem großen Teil. Die Ausdehnung des entstandenen Thrombus ging in allen Fällen über die der Verletzung hinaus und erstreckte sich vor allem distal der Verletzung und nur zu einem kleinen Teil proximal (Abbildung 17).

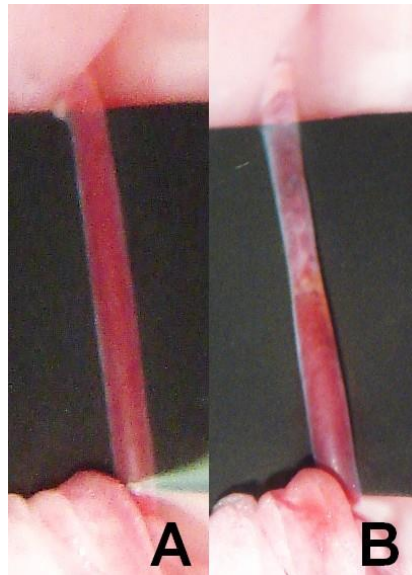


Abbildung 17: FeCl₃-Modell. Zustand des Blutgefäßes vor dem Versuch (A) und nach Beendigung des Versuchs (B). Unten im Bild: proximal, oben im Bild: distal. Die Verletzung durch FeCl₃ wurde mittig am freipräparierten Arterienabschnitt vorgenommen

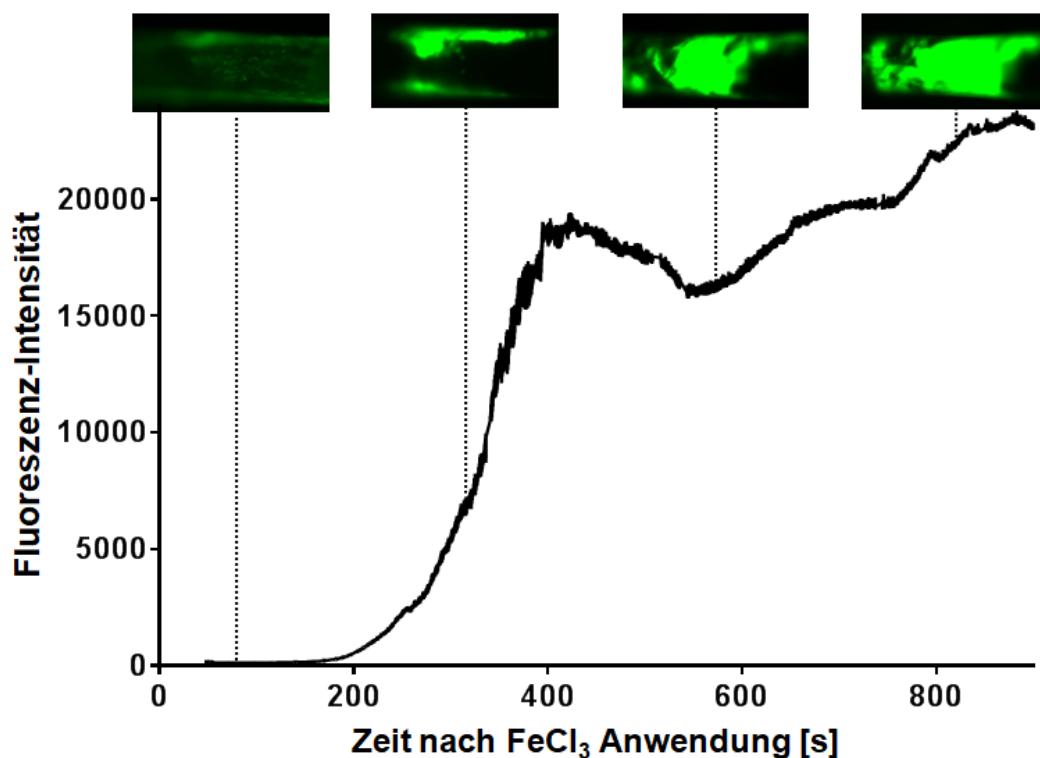


Abbildung 18: FeCl₃-Modell. Mittlere Intensität des Fluoreszenzlichts in einer festgelegten ROI über die Zeit

Abbildung 18 zeigt einen von der Mikroskop-Software gemessenen Verlauf der FITC Fluoreszenz-Intensität über die Zeit. Dargestellt ist ein Beispiel eines typischen Verlaufs, wie er üblicherweise bei den durchgeführten Experimenten auftrat. Zur besseren Veranschaulichung wurde die Kurve durch das manuelle Entfernen von durch Artefakte bedingte kurzfristige Schwankungen hier etwas geglättet. Man erkennt deutlich, dass sich die Fluoreszenz in den ersten Minuten wenig bis gar nicht veränderte, nach Beginn der Thrombusbildung jedoch schnell anstieg, bis eine gewisse Sättigung (maximale Thrombusgröße) erreicht war. Zu diesem Zeitpunkt füllte normalerweise der Thrombus einen Großteil der Arterie aus und brachte den Blutfluss zum Stillstand, was dann als Verschlusszeit zur Auswertung gelangte.

Außer über die Intensität, kann der Thrombusaufbau auch über die von ihm verursachte fluoreszierende Fläche im mikroskopischen Bild grafisch dargestellt werden. Die folgende Abbildung 20 zeigt den Prozentsatz der von Thrombus bedeckten Fläche an der im Mikroskopbild dargestellten Gesamtfläche des Gefäßes über die Zeit. Zur Auswertung wurden hier Standbilder von Messungen an Wildtypmäusen zu diskreten Zeitpunkten der Messung verwendet und für jeden Zeitpunkt Mittelwerte über alle Experimente einer Versuchsgruppe berechnet. Ein Beispiel für eine Flächenberechnung zeigt Abbildung 19. Hierbei wurden im Programm Zeiss AxioVision LE64 (AxioVs40x64 V4.9.1.0) alle als Thrombus identifizierten Flächen markiert (im Bild rot umrandet) und der Flächeninhalt berechnet. Die Thrombusgesamtfläche wurde daraufhin in Relation zur Gesamtfläche des im Bild dargestellten Gefäßabschnittes gesetzt. N war hier die Anzahl ausgewerteter Arterien.

Zur statistischen Auswertung wurde ein *post hoc* Test nach Dunnett in einem gemischten linearen Modell verwendet. Ab dem Zeitpunkt 300 Sekunden ergab sich eine signifikant erhöhte Thrombusbildung im Vergleich zum unverletzten Blutgefäß (Abbildung 20, Tabelle 4).

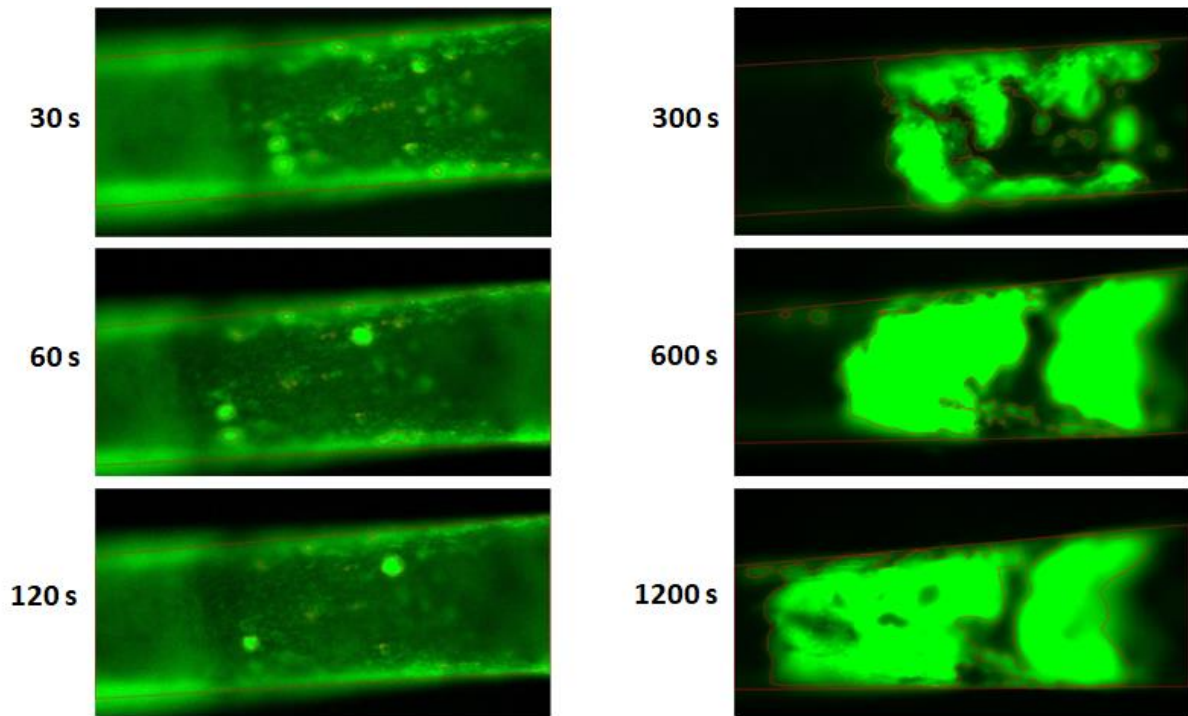


Abbildung 19: FeCl₃-Modell. Beispiel einer Auswertung über die Thrombusfläche in Relation zur Gesamtfläche des dargestellten Gefäßabschnitts

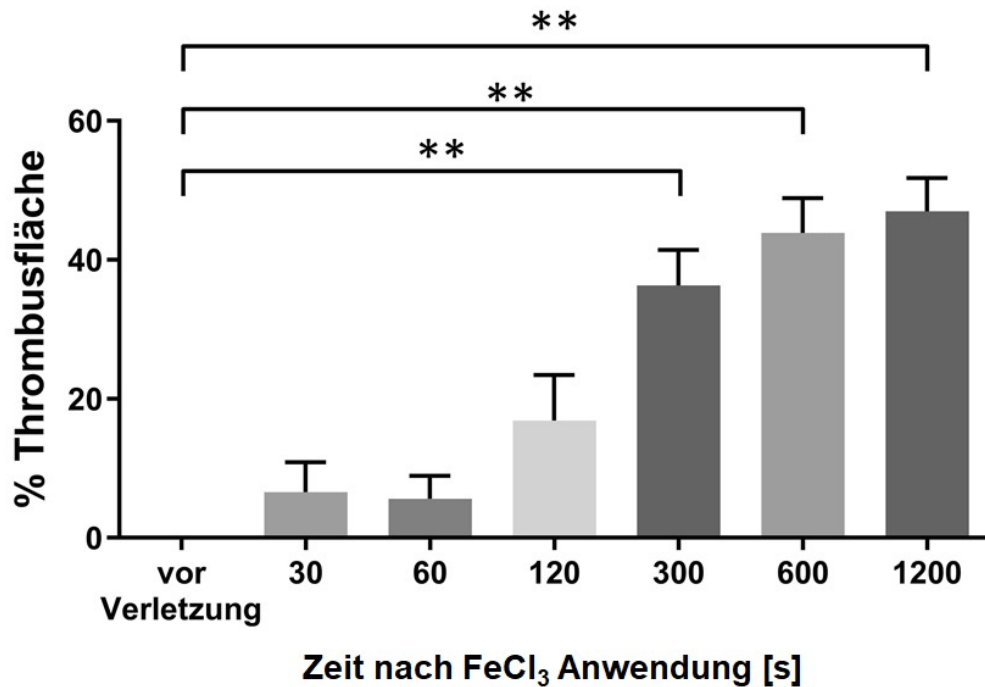


Abbildung 20: FeCl₃-Modell. Thrombusfläche anteilig an der Gesamtfläche einer festgelegten ROI zu diskreten Zeitpunkten. N=10, Dunnett-Test, *: p<0,05, **: p<0,01

Bei Experimenten mit dem FeCl_3 -Modell wurde beobachtet, dass nach Beginn der Messung die Thrombusbildung erst spät einsetzte, dann jedoch schnell zunahm und ein Thrombus bis zum Ende der Messdauer nach 20 min immer vorhanden war. Zum Ende hin nahm das Volumen des Thrombus häufig ab und ein Blutfluss setzte in vielen Fällen wieder ein, jedoch verschwand der Thrombus nie völlig.

Untersuchung mittels Flussmessung mit dem Moor LD12

Als weiteres Messverfahren zum Gewinn von Informationen über die Kinetik der Thrombusbildung im FeCl_3 -Modell kam das unter 3.2.3.2 beschriebene Laser Doppler *Imaging* zur Anwendung. Für die Versuche wurden Tiere der Kreuzungslinie CXCR7 x Rosa verwendet, die Kontrolltiere waren heterozygot gefloxt und ungefloxt Wurfgeschwister. Im FeCl_3 -Modell war hier vor dem abrupten Abfall des Flusses (Verschluss des Blutgefäßes) ein kurzer Anstieg zu beobachten (Abbildung 22). Der Abfall des Flusses repräsentierte hier die Verschlusszeit. Da mit diesem Messverfahren für den gewählten Bereich nur eine Bildfrequenz von 2 Bildern pro Minute möglich war, konnte die Verschlusszeit nur mit +/- 30 Sekunden angegeben werden.

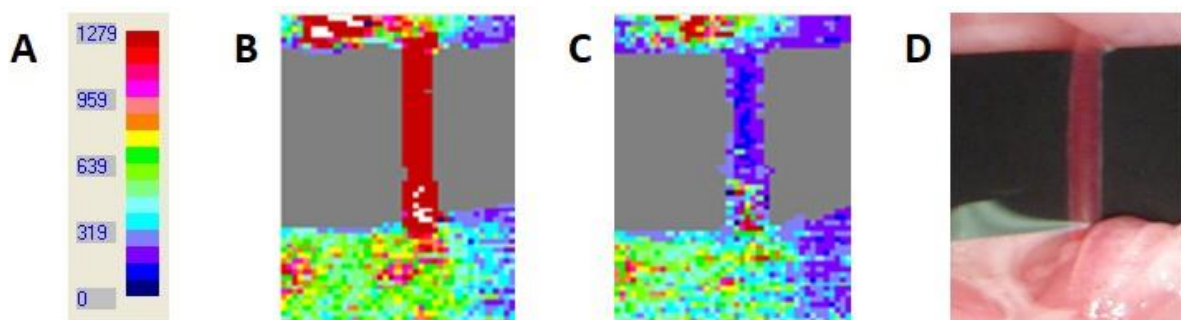


Abbildung 21: FeCl_3 -Modell (Laser Doppler Flussmessung). Falschfarbendarstellung. A: Farblegende; B: Flussbild vor Verschluss bei t = 0 s; C: Flussbild nach Verschluss bei t = 16 min; D: Beispielfoto einer vorbereiteten Arterie zur Flussmessung

In der Falschfarbendarstellung erkennt man zum Zeitpunkt des Gefäßverschlusses einen deutlichen Farbumschlag von Rot (=hoher Fluss) zu Blau (=geringer Fluss) (Abbildung 21).

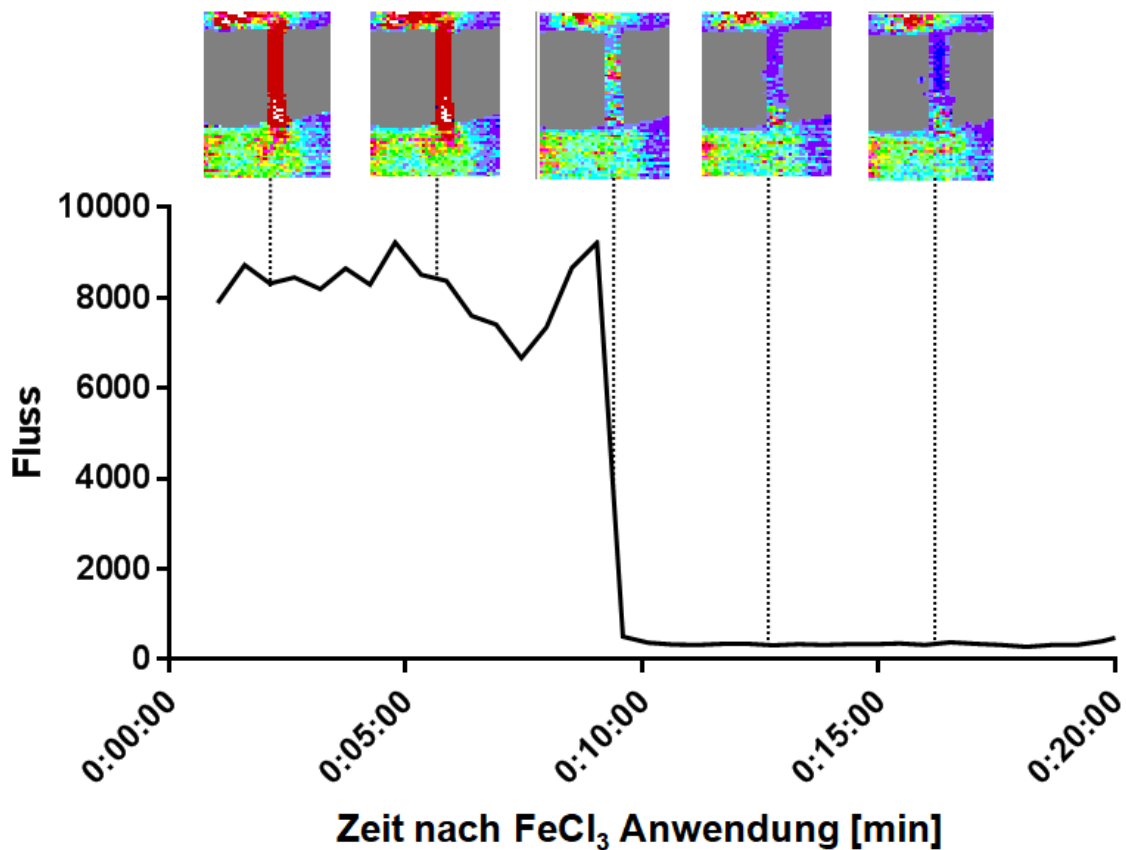


Abbildung 22: FeCl₃-Modell (Laser Doppler Flussmessung). Blutfluss in der Arterie über die Zeit. Ein Verschluss im Messzeitraum

Zusätzlich zur Verschlusszeit konnte mit diesem Verfahren die Anzahl der Verschlüsse im Messzeitraum bestimmt werden. Ein Blutgefäß kann nach einem erfolgten Verschluss entweder verschlossen bleiben, oder sich wieder öffnen. Dann ist ein erneuter Verschluss möglich. Abbildung 22 zeigt eine Blutflussmessung, bei der das Blutgefäß nach einmaligem Verschluss verschlossen blieb. Im Vergleich dazu ist in Abbildung 23 eine Messung dargestellt, bei der sich die verschlossene Arterie nach sieben Minuten wieder öffnete und bei der der Blutfluss nach weiteren drei Minuten erneut sistierte.

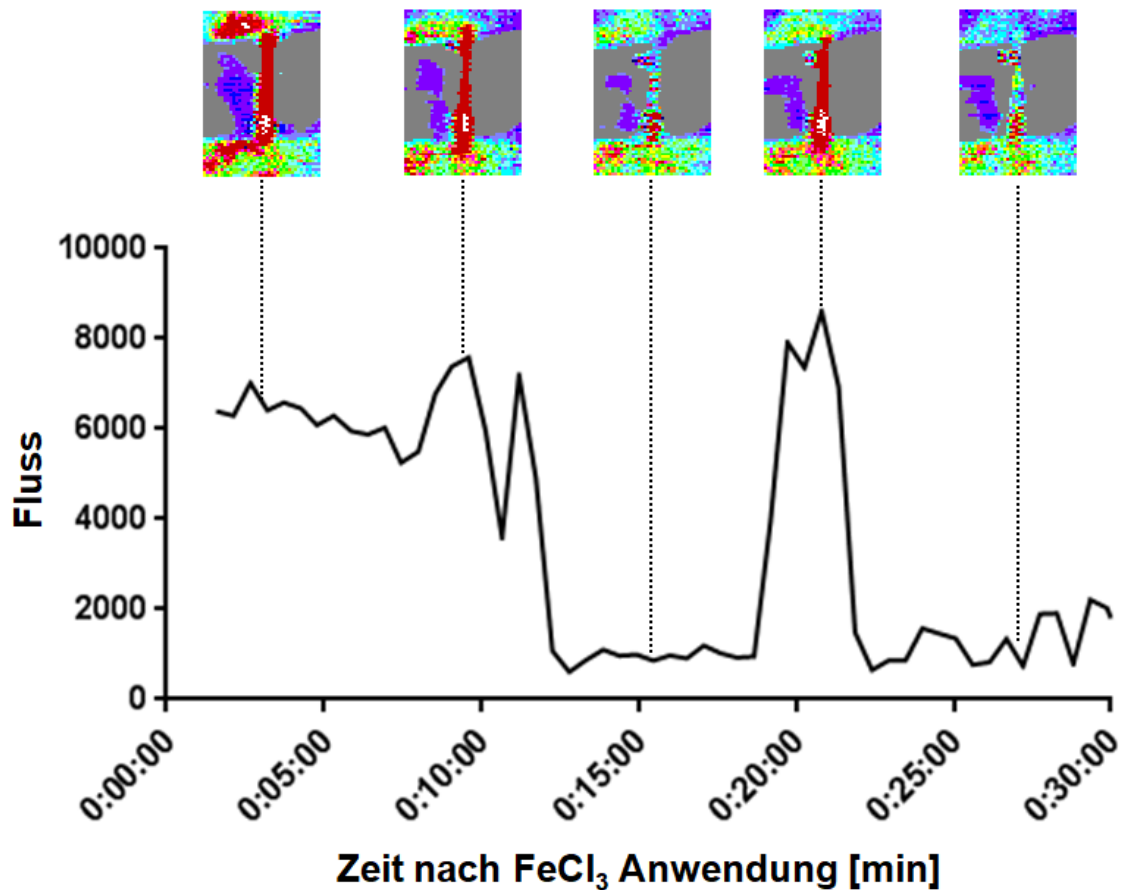


Abbildung 23: FeCl₃-Modell (Laser Doppler Flussmessung). Blutfluss in der Arterie über die Zeit. Zwei Verschlüsse im Messzeitraum. Bei den blau/violetten Flächen seitlich neben der Arterie handelt es sich um Artefakte durch die 0,9 %ige NaCl-Lösung, die verwendet wurde, um das Gewebe während der Messung vor dem Austrocknen zu schützen. Für die Auswertung wurde eine rechteckige *Region of Interest* (ROI) definiert, welche möglichst genau den von der Arterie erzeugten Signalbereich markierte

Die Bestimmung des Verschlusszeitpunktes mit Hilfe der Laser-Doppler-Flussmessung erwies sich als einfach und objektiv, war jedoch aufgrund der niedrigen Bildfrequenz nicht sekundengenau möglich.

3.3.1.2.2 Carotis-Ligatur-Modell

Für Untersuchungen im Carotis-Ligatur-Modell wurde als Messverfahren die Intravitalmikroskopie gewählt, mit der die Thrombusbildung in Echtzeit beobachtet werden konnte. Anschließend wurden die erzeugten Videos ausgewertet.

Die Laser-Doppler-Anemometrie erwies sich für dieses Modell als wenig geeignet, da im

Ligatur-Modell keine wesentlichen Änderungen des Blutflusses durch die entstehenden Thromben verursacht wurden.

Intravitalmikroskopische Untersuchungen

Auch im Ligaturmodell konnte der verletzte Bereich zunächst durch eine Abschwächung der Gewebsfluoreszenz, die durch das rot fluoreszierende Protein tdTomato erzeugt wurde, identifiziert werden. Die grüne Fluoreszenz der verletzten Gefäßwand nahm jedoch rasch zu, was unabhängig von den sich bildenden Thromben auf der gesamten Fläche des verletzten Endothels beobachtet werden konnte.

Bei diesem Verletzungsmodell begann eine Thrombusbildung unmittelbar nach dem Öffnen der Ligatur. Die entstehenden Thromben waren jedoch so instabil, dass sie sich leicht ablösten und ein Aufbau bis zum Verschluss des Gefäßes in keinem Fall beobachtet werden konnte.

Abbildung 24 zeigt den schematischen Verlauf des Experiments.

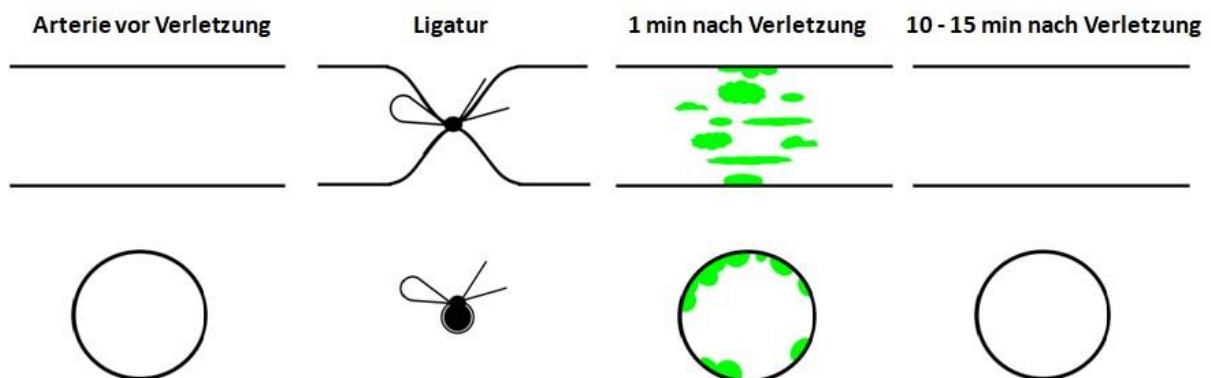


Abbildung 24: Ligaturmodell. Schematische Darstellung. Oben: Die Längsansicht entspricht der Darstellung im mikroskopischen Bild. Unten: Querschnittsdarstellung zur besseren Veranschaulichung der dreidimensionalen Thrombusausdehnung

Bei der Betrachtung der Arterien, bei denen zuvor eine Verletzung mit dem Ligaturmodell durchgeführt wurde, fiel auf, dass das Blutgefäß nach Abschluss der Versuche äußerlich

unverändert erschien und seine Funktion als arterielles Versorgungsgefäß nicht eingeschränkt war. Eventuell verbleibende Thromben waren in keinem Fall von außen makroskopisch sichtbar (Abbildung 25).

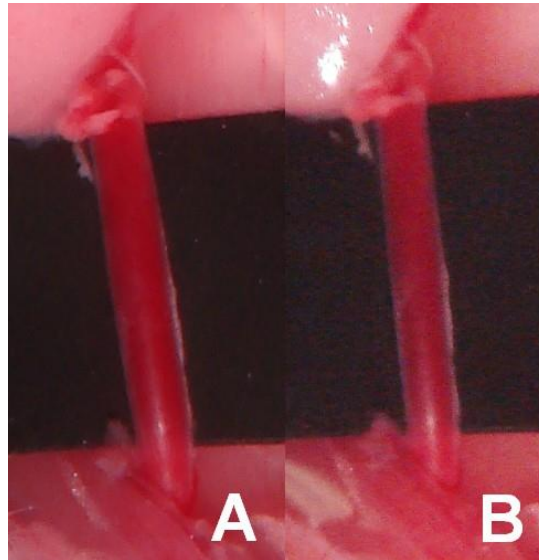


Abbildung 25: Ligaturmodell. Zustand des Blutgefäßes vor dem Versuch (A) und nach Beendigung des Versuchs (B). Unten im Bild: proximal, oben im Bild: distal

Ein typischer Verlauf der Intensitätskurve für die Intensität der durch das Protein EGFP erzeugten grünen Fluoreszenz ist in Abbildung 26 dargestellt. Charakteristisch waren ein schneller Anstieg der Fluoreszenz in den ersten Sekunden nach dem Öffnen der Ligatur und ein anschließender kontinuierlicher Abfall. Selten kam es zu einem erneuten Ansteigen in der zweiten Minute der Messung. Spätestens nach 5 min konnte nicht mehr mit einem Aufbau von neuen Thromben gerechnet werden.

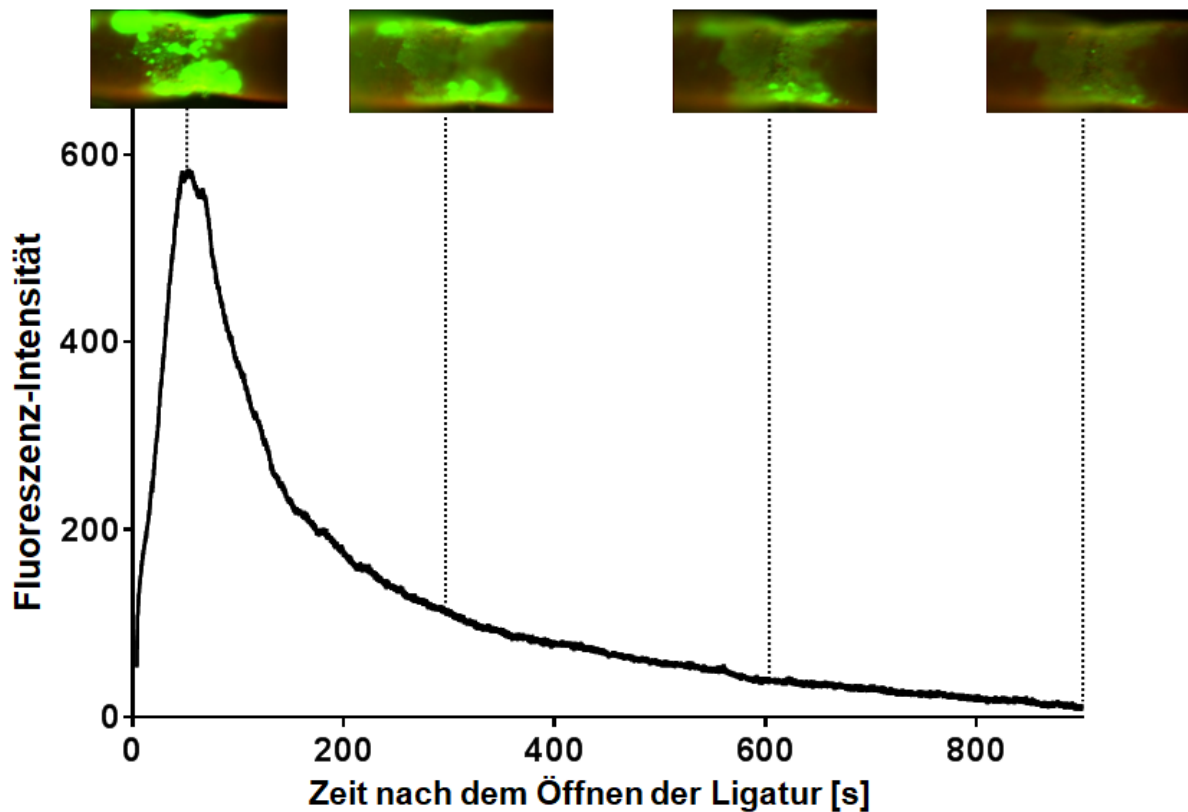


Abbildung 26: Ligaturmodell. Mittlere Intensität des Fluoreszenzlichts in einer festgelegten ROI über die Zeit

Der in der Intensitätskurve dargestellte Verlauf konnte auch bei der Berechnung der mit grün fluoreszierendem Material bedeckten Fläche bestätigt werden. Für diese Auswertung wurden die stark fluoreszierenden Thromben markiert und der Prozentsatz dieser markierten Fläche in Relation zu einer Gesamtfläche berechnet. Da beim Ligaturmodell im Bereich des verletzten Endothels eine erhöhtes Signal für die grüne Fluoreszenz auftrat und zudem eine Thrombusbildung außerhalb dieses Bereichs nicht beobachtet werden konnte war es möglich, als Bezugsfläche für eine Auswertung entweder die gesamte Fläche des im Bild dargestellten Gefäßabschnitts zu wählen (in Abbildung 27 mit A markiert) oder aber die Fläche des durch die Ligatur verletzten Bereichs (in Abbildung 27 mit B markiert).

Ein Beispiel der grafischen Darstellung einer Versuchsreihe im Carotis-Ligatur-Modell zeigt Abbildung 28. Als Bezugsgröße für die Thrombusfläche wurde hier die Gesamtfläche des im Bild dargestellten Gefäßabschnitts gewählt.

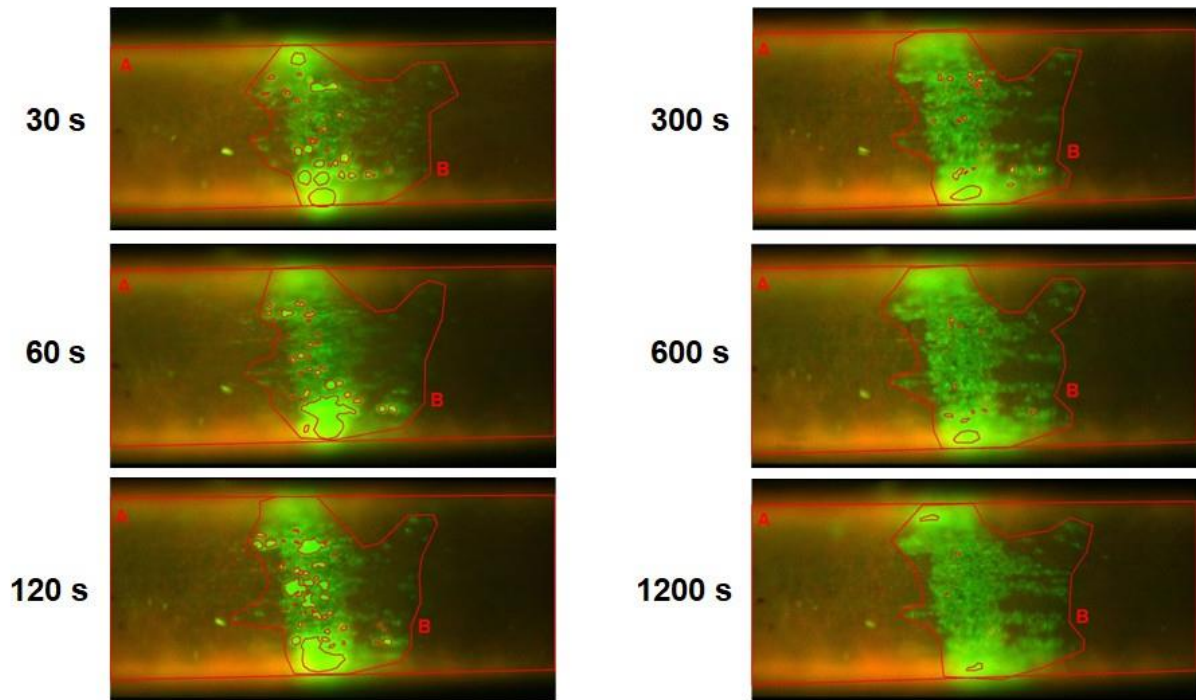


Abbildung 27: Ligaturmodell. Auswertung eines Versuchs über die Thrombusfläche in Relation zur Gesamtfläche des dargestellten Gefäßabschnitts (A) und in Relation zur verletzten Fläche (B)

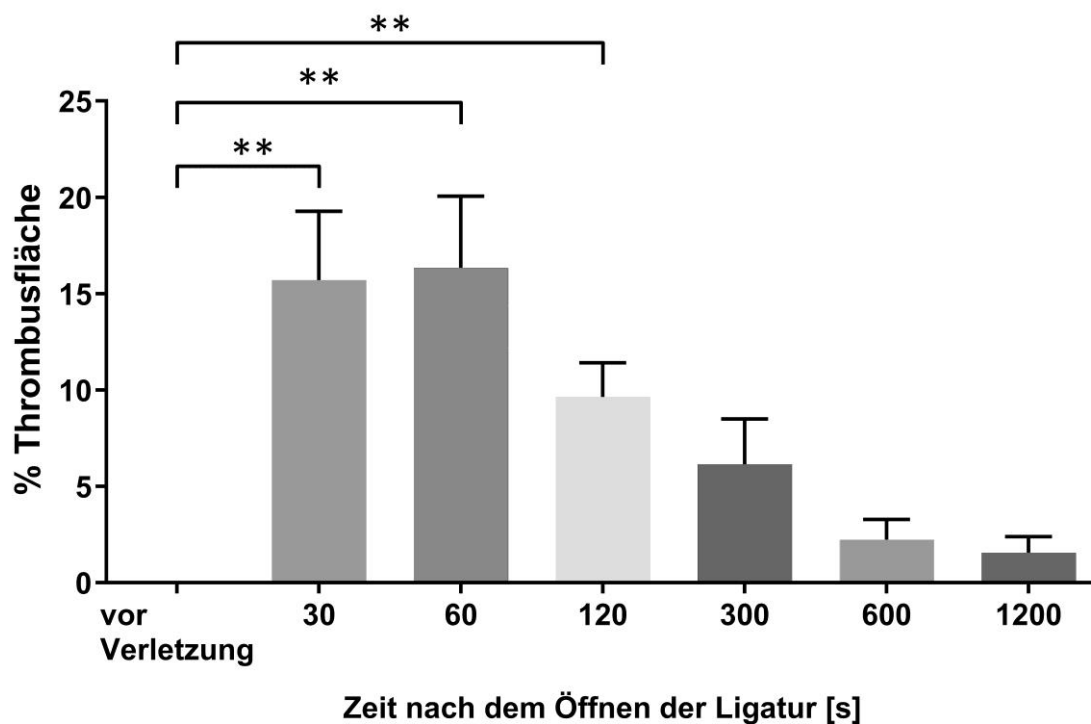


Abbildung 28: Ligaturmodell. Thrombusfläche anteilig an der Gesamtfläche einer festgelegten ROI zu diskreten Zeitpunkten. N=11, Dunnett-Test, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$

Für die statistische Auswertung wurde ein *post hoc* Test nach Dunnett in einem gemischten linearen Modell durchgeführt (Tabelle 5). Dabei ergab sich für alle Zeitpunkte $t \leq 120$ s eine signifikant erhöhte Thrombusbildung im Vergleich zum unverletzten Blutgefäß.

Am Ende jeder Messung (zu Zeiten > 10 min) waren im Carotis-Ligatur-Modell üblicherweise die Thromben fast vollständig abgebaut.

Bei den Experimenten, die mit diesem Verletzungsmodell durchgeführt wurden, konnte beobachtet werden, dass sich im Bereich um die Verletzung und entlang von feinen Längslinien proximal und distal der Verletzung die Fluoreszenz leicht erhöhte. Dieses Phänomen war flächiger Natur und schien unabhängig von den zusätzlich anhaftenden Thromben zu sein. Auch nach Abbau aller Thromben blieb diese Fläche mit erhöhter Fluoreszenz sichtbar (Abbildung 29). Dieses Phänomen konnte daher zur Bestimmung der verletzten Fläche genutzt werden.

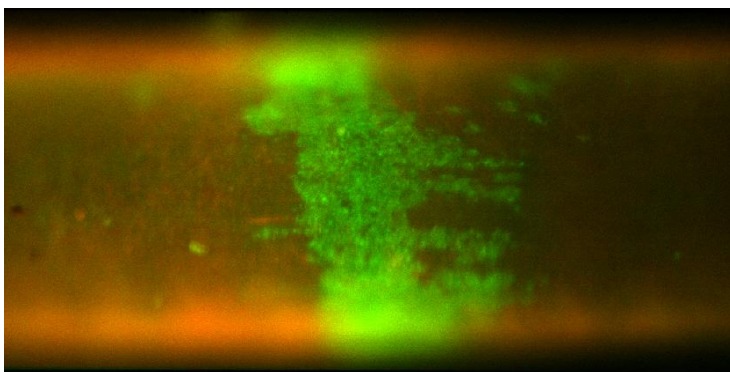


Abbildung 29: Ligaturmodell. Beispiel eines Fluoreszenzbildes zum Zeitpunkt 20 min nach dem Öffnen der Ligatur. Fluoreszierende Verletzungsfläche nach Abbau der Thromben

Untersuchung mittels Flussmessung mit dem Moor LDI2

Im Ligaturmodell, welches nur einmalig zum Test mit diesem Messverfahren durchgeführt wurde (2 Carotiden in einem Versuchstier), war keine signifikante Änderung des Flusses im Messzeitraum zu beobachten.

Die Falschfarbendarstellung und den Blutfluss über die Zeit für das Ligaturmodell an einer *A. carotis communis* zeigt Abbildung 30.

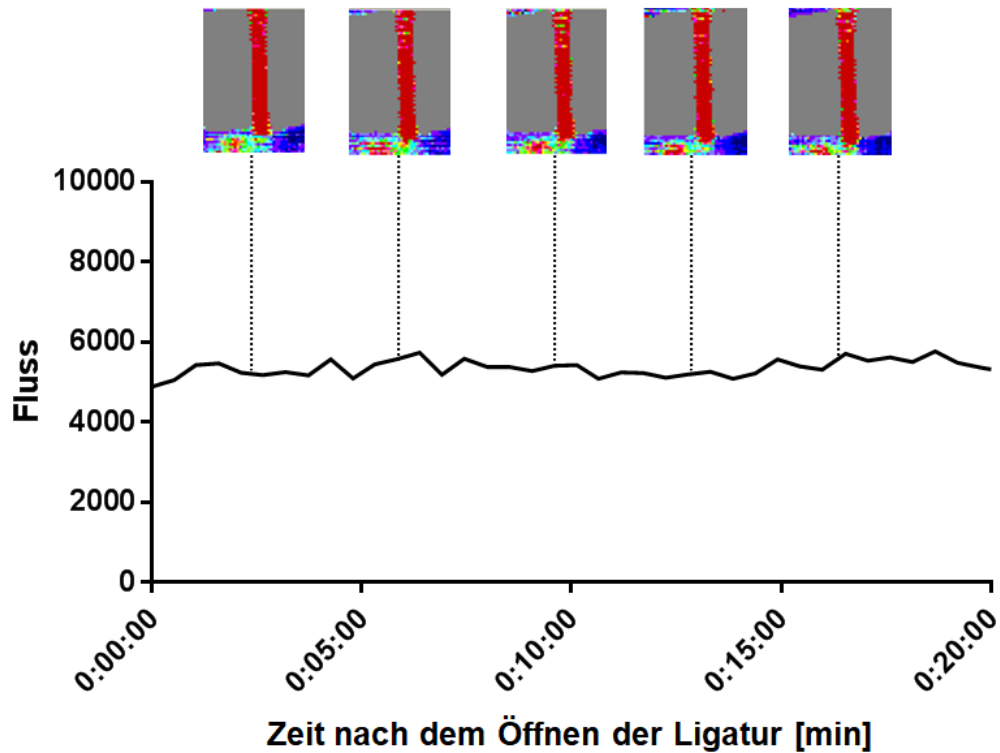


Abbildung 30: Ligaturmodell (Laser Doppler Flussmessung). Blutfluss in der Arterie über die Zeit

3.3.1.2.3 Modell Carotis-Ligatur mit Reststenose

Das Carotis-Ligatur-Modell mit Reststenose wurde im Rahmen dieser Arbeit erst entwickelt. Für dieses Vorhaben wurde eine geringe Tierzahl beantragt und verwendet. Nach dem Erreichen eines zufriedenstellenden Protokolls wurden drei Versuche mit diesem Protokoll durchgeführt, deren Ergebnisse hier vorgestellt werden. Die Vorversuche, die zu diesem Protokoll geführt hatten, sind in Kapitel 3.3.2.3 beschrieben.

Für die Etablierung dieses Modells wurde als Messverfahren die Intravitalmikroskopie gewählt, mit der die Thrombusbildung in Echtzeit beobachtet werden konnte. Während der Messung wurden die Qualität der Stenose, die Sichtbarkeit der Vorgänge im Blutgefäßlumen und die Reproduzierbarkeit der Wiederherstellung des Blutflusses beurteilt. Anschließend

wurden die erzeugten Videos ausgewertet.

Die Laser-Doppler-Anemometrie wurde für dieses Modell nicht eingesetzt, da aufgrund der nur moderaten Änderung des Gefäßquerschnitts im Vergleich zum unveränderten Querschnitt beim Ligaturmodell und der geringen Auflösung des Gerätes ein ähnlicher Verlauf wie im einfachen Ligaturmodell erwartet wurde.

Intravitalmikroskopische Untersuchungen

Der Thrombusaufbau bei diesem Verletzungsmodell entsprach in den meisten Punkten dem des einfachen Ligaturmodells. Ein schematischer Verlauf des Versuchs ist in Abbildung 31 dargestellt.

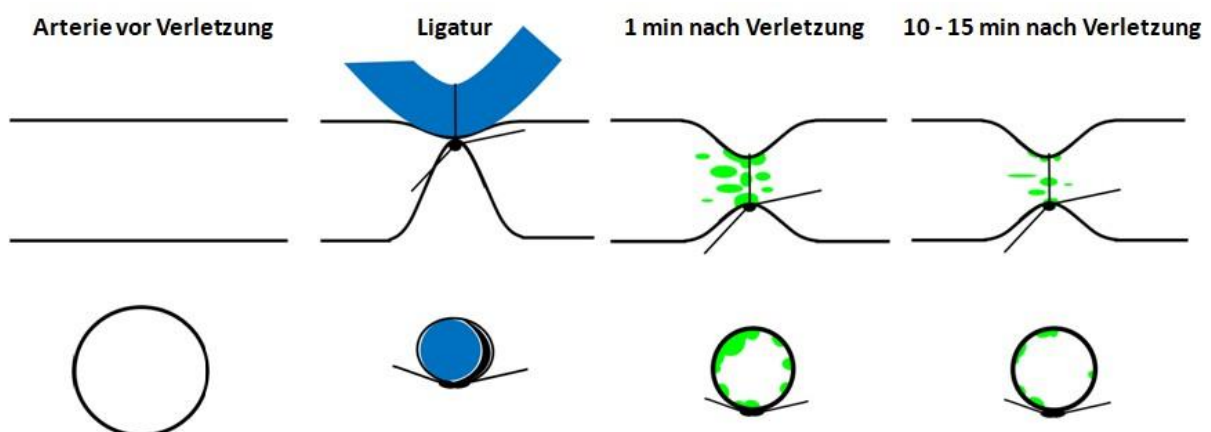


Abbildung 31: Ligaturmodell mit Reststenose. Schematische Darstellung. Oben: Die Längsansicht entspricht der Darstellung im mikroskopischen Bild. Unten: Querschnittsdarstellung zur besseren Veranschaulichung der dreidimensionalen Thrombusausdehnung. In blau ist der als Platzhalter verwendete Faden dargestellt

Wie auch schon im Ligaturmodell beobachtet, war am Ende der Experimente die zuvor verletzte Arterie ohne makroskopisch sichtbare Auffälligkeiten. Ihre Funktion war nach Beendigung des Versuchs ausschließlich durch die verbleibende Reststenose eingeschränkt. Eventuell verbleibende Thromben waren in keinem Fall von außen makroskopisch sichtbar (Abbildung 32).

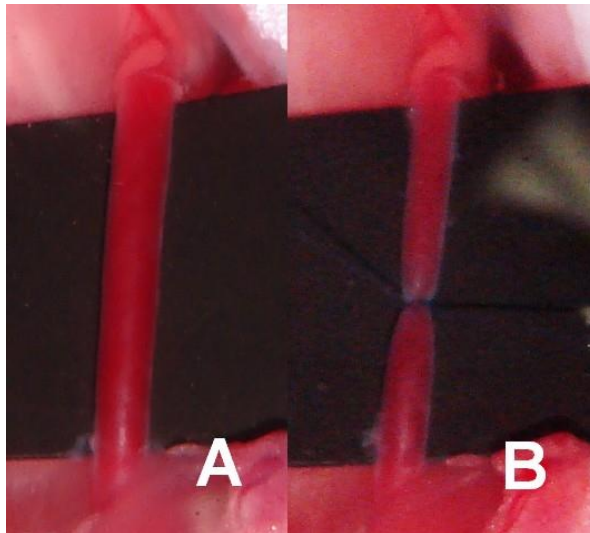


Abbildung 32: Ligaturmodell mit Reststenose. Zustand des Blutgefäßes vor dem Versuch (A) und nach Beendigung des Versuchs (B). Unten im Bild: proximal, oben im Bild: distal. Der die Stenose erzeugende Ligaturfaden verblieb bis nach Beendigung des Versuchs am Blutgefäß

Die Querschnittsfläche der Öffnung im stenotischen Bereich konnte mit Hilfe der folgenden Formel berechnet werden: Fläche $A = \pi \cdot (d/2)^2$, wobei d der innere Durchmesser des Gefäßes war, der am mikroskopischen Bild ausgemessen werden konnte. Die errechnete Querschnittsfläche entsprach ungefähr dem Querschnitt des als Platzhalter verwendeten Fadens.

Es konnte in diesem Modell pro Fläche eine etwas stärkere Thrombusbildung beobachtet werden, bzw. ein etwas langsamerer Abbau, als beim Ligaturmodell ohne Reststenose. Dieses führte dazu, dass auch zu späteren Zeitpunkten noch Thromben vorhanden waren und sich auch noch neue Thromben bildeten. Ein gewisses Gleichgewicht zwischen der Neubildung von Thromben und deren Abbau war für lange Zeit vorhanden (Abbildung 33, Abbildung 35). Meist waren auch noch zum Ende des Messzeitraums Thromben vorhanden. Wie im Ligaturmodell ohne Reststenose konnte hier eine Auswertung der Thrombenbildung über die Bestimmung der im Bild sichtbaren Thrombenfläche erfolgen. Abbildung 34 zeigt die markierte Thrombenfläche und außerdem die markierte Fläche des verletzten Endothels. Für die Auswertung wurden die Thrombenflächen addiert und durch die verletzte Fläche geteilt. Man erhielt so den Prozentsatz der mit Thromben bedeckten Fläche in Relation zur verletzten Gesamtfläche.

In Abbildung 35 wird als Beispiel eine so durchgeführte Auswertung eines Versuchs mit einer geringen Tierzahl (N=3, Tabelle 6) gezeigt.

Aufgrund dieser geringen Fallzahl wurde für die Versuche mit diesem Modell keine statistische Auswertung durchgeführt. Die Auswertung dieser Versuche erfolgte rein deskriptiv.

In den aufgenommenen Filmen waren immer wieder fluoreszierende Partikel (Zellen) im Blutstrom zu sehen, die poststenotisch eine Wirbelbewegung entgegen des eigentlichen Blutstroms zeigten. Diese Zellen konnten daher die turbulente Strömung, die durch die Stenose verursacht wurde, sichtbar machen.

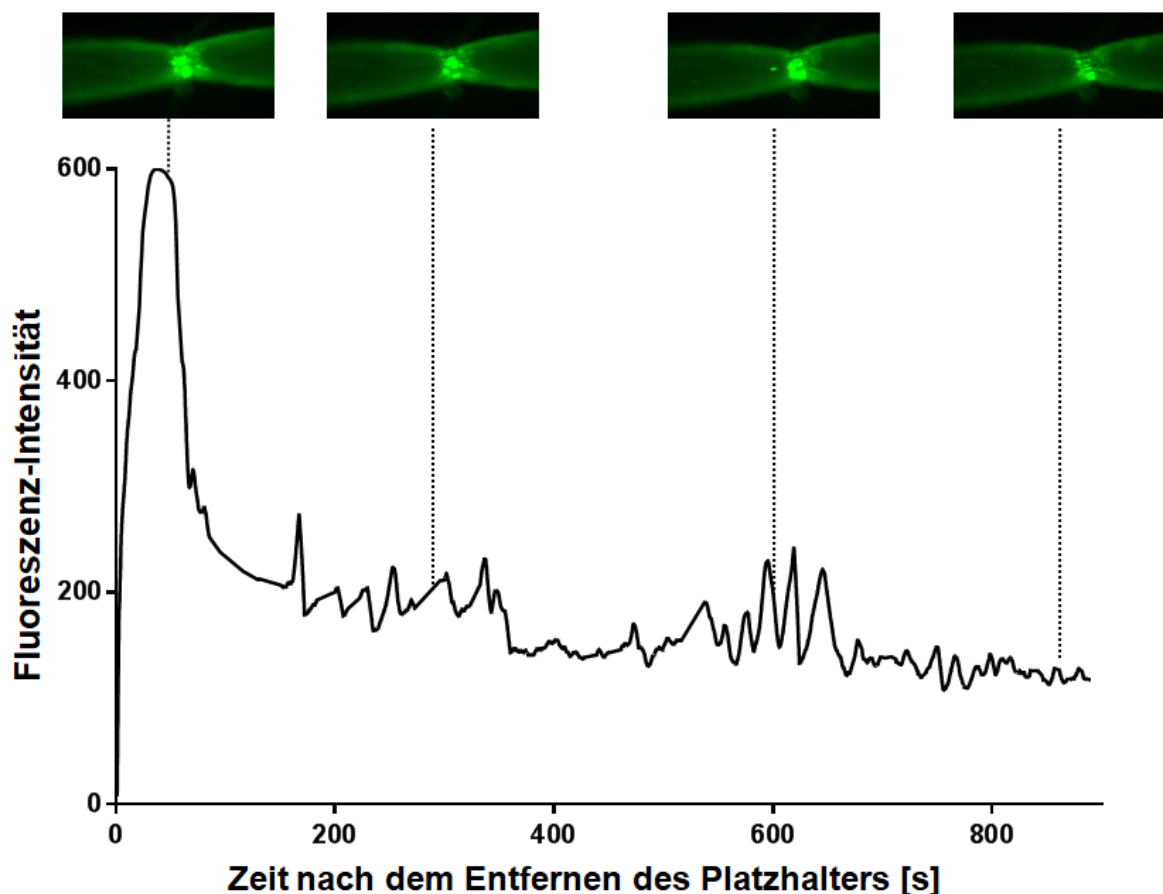


Abbildung 33: Ligaturmodell mit Reststenose. Mittlere Intensität des Fluoreszenzlichts in einer festgelegten ROI über die Zeit

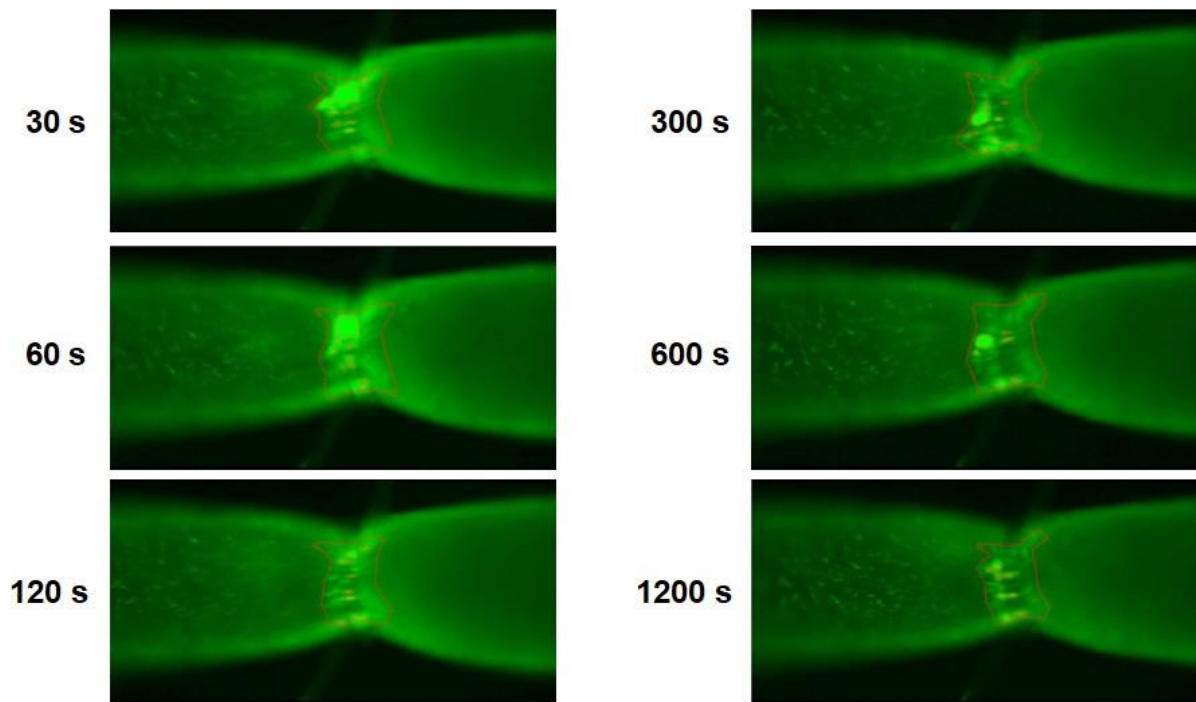


Abbildung 34: Ligaturmodell mit Reststenose. Auswertung eines Versuchs über die Thrombusfläche in Relation zur verletzten Fläche

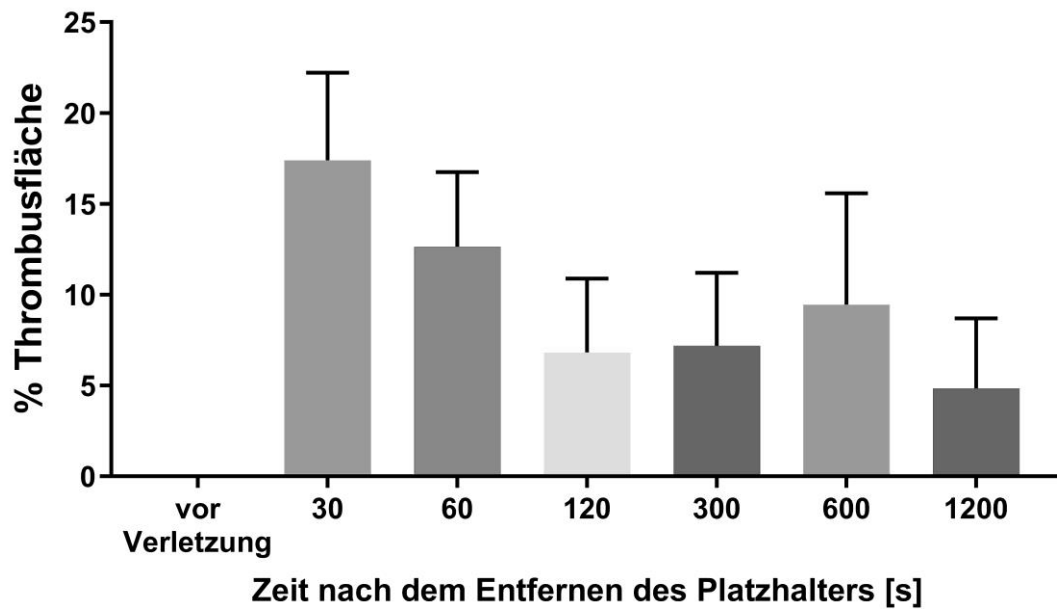


Abbildung 35: Ligaturmodell mit Reststenose. Thrombusfläche anteilig an der Gesamtfläche einer festgelegten ROI zu diskreten Zeitpunkten

3.3.1.3 Vergleich der Thrombosemodelle

In Abbildung 36 sind repräsentative Bilder zu definierten Zeitpunkten zu sehen aus Versuchen, die mit den drei unterschiedlichen Verletzungsmodellen durchgeführt wurden. Im Vergleich fällt auf, dass sich der Zeitraum zwischen der Verletzung und dem Einsetzen der Thrombusbildung deutlich unterschied (Abbildung 36). Bei den beiden Modellen, bei denen die Verletzung durch eine Ligatur der Arterie hervorgerufen wurde, fand unmittelbar nach dem Wiederherstellen des Blutflusses eine verstärkte Adhäsion von Thrombozyten am verletzten Endothel statt und damit eine Thrombusbildung. Nach einem zunächst schnellen Wachstum der Thromben und ihrer Anzahl, lösten sich diese recht bald wieder ab und für eine kurze Zeit stellte sich ein Gleichgewicht ein zwischen der Neubildung von Thromben und deren Abbau, bzw. Abschwimmen. Diese Gleichgewichtsphase war im Ligaturmodell mit Reststenose sehr viel länger, was dazu führte, dass in diesem Modell in der Regel bis zum Ende des Messzeitraums Thromben zu beobachten waren. Im Ligaturmodell ohne Reststenose überwog schon nach wenigen Minuten der Abbau der Thromben und neue Thromben wurden nur noch sehr selten gebildet. Nach Minute 10 waren daher in den meisten Fällen keine Thromben mehr im Gefäß zu beobachten. Eine, im Vergleich zum unverletzten Endothel, leicht verstärkt fluoreszierende Fläche im Bereich der Verletzung blieb jedoch bis zum Schluss sichtbar. Im FeCl_3 -Modell begann die Thrombusbildung erst nach mehreren Minuten, stieg dann rasch an und führte in den meisten Fällen nach einigen Minuten zu einem Verschluss der Arterie. Meist war jedoch auch danach noch ein feiner Strom von Blutzellen zu beobachten, was im weiteren Verlauf häufig zu einem Dichteverlust und teilweisen Abbau des Thrombus führte und in der Intravitalmikroskopie die Bestimmung der Verschlusszeit schwierig machte. Die Verschlusszeit für die Auswertung der Versuche war definiert als die Zeit, nach der ein Thrombus für mindestens 1 Minute den Blutstrom blockierte.

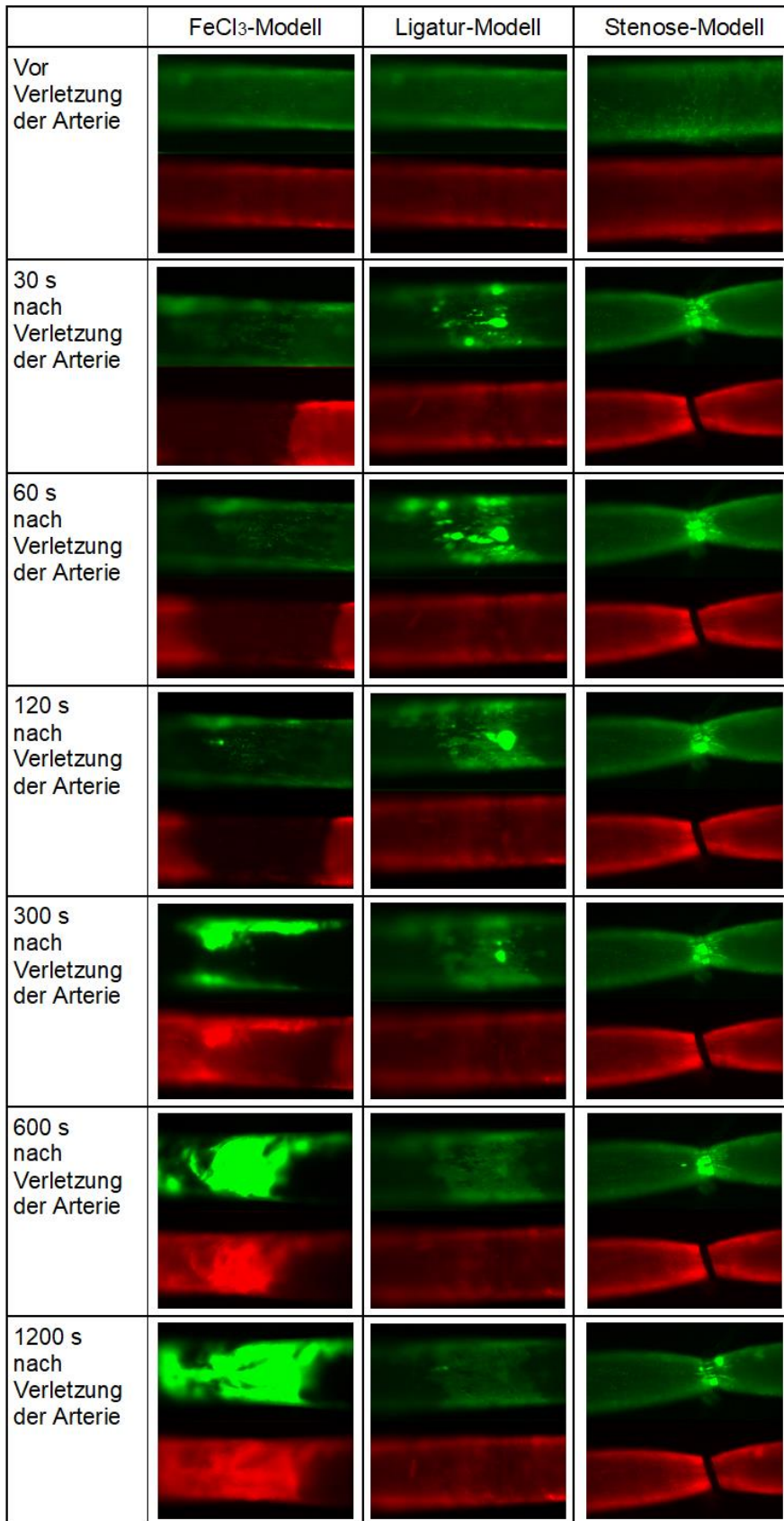


Abbildung 36: Vergleich der intravitalmikroskopischen Ergebnisse der drei unterschiedlichen Thrombosemodelle

Auch der Zustand der Arterie nach Beendigung des Versuchs unterschied sich je nach gewähltem Modell. Bei den beiden Ligatur-Modellen erschien das Blutgefäß äußerlich unverändert. Eine sichtbare Verletzung der Gefäßwand und/oder eine Einschränkung der Funktion des Gefäßes durch die Verletzung und/oder die Thrombusbildung lag nach dem Versuch nicht vor (Abbildung 25, Abbildung 32). Nach der Anwendung von FeCl_3 war die Gefäßwand an der Verletzungsstelle weißlich-gelblich verfärbt und die Arterie durch den entstandenen Thrombus blockiert. Ein Blutfluss distal des Thrombus konnte makroskopisch in den meisten Fällen nicht mehr beobachtet werden, die Arterie erschien in diesem Bereich dann blutleer (Abbildung 17 B).

Bei der Untersuchung mittels Flussmessung mit dem Moor LD12 ließ sich für das FeCl_3 -Modell auf einfache Weise eine Verschlusszeit ermitteln, die jedoch nicht sekundengenau war. Auch das erneute Öffnen der Arterie und ein eventuell später stattfindender weiterer Verschluss konnten gut identifiziert werden. Für das Ligaturmodell bot diese Methode keinen Erkenntnisgewinn.

In Tabelle 2 sind die wesentlichen Ergebnisse der verwendeten Thrombosemodelle im Vergleich zusammengefasst.

Tabelle 2: Vergleich der wesentlichen Ergebnisse bei Durchführung der drei unterschiedlichen Thrombosemodelle

	FeCl₃-Modell	Ligatur-Modell	Stenose-Modell
Zeitpunkt des Beginns der Thrombusbildung	Später Beginn der Thrombusbildung	Beginn der Thrombusbildung unmittelbar nach Verletzung	Beginn der Thrombusbildung unmittelbar nach Verletzung
Stabilität des Thrombus	Stabiler Thrombus	Instabiler Thrombus	Instabiler Thrombus
Verlauf der Thrombusbildung	Thrombus bis Versuchsende vorhanden, viel Aufbau, wenig Abbau	Thromben werden nach initialem Aufbau schon nach wenigen Minuten abgebaut	Thromben werden nach initialem Aufbau langsam abgebaut. Bis Versuchsende immer wieder Neubildungen
Bevorzugte Auswertungsmethode	Auswertung über Verschlusszeit	Auswertung über thrombusbedeckte Fläche	Auswertung über thrombusbedeckte Fläche
Zustand der Arterie nach dem Versuch	Zustand der Arterie nach dem Versuch deutlich verändert	Zustand der Arterie nach dem Versuch makroskopisch unverändert	Zustand der Arterie nach dem Versuch makroskopisch unverändert
Flussmessung mit Laser Doppler <i>Imaging</i>	Flussmessung sinnvoll	Flussmessung nicht sinnvoll	Flussmessung wurde nicht durchgeführt

3.3.1.4 Vergleich der Auswertungsmethoden bei intravitalmikroskopischen Untersuchungen

Zur Auswertung von Daten aus intravitalmikroskopischen Untersuchungen können unterschiedliche Methoden verwendet werden. Folgende Methoden wurden für Experimente im Rahmen dieser Arbeit angewandt:

- Zeit bis zum Gefäßverschluss
- Anzahl der Verschlüsse im Messzeitraum
- Fluoreszenzintensität zu diskreten Zeitpunkten
- Thrombusfläche im Verhältnis zu einer Gesamtfläche zu diskreten Zeitpunkten

Für die ersten beiden Methoden war es unabdingbar, dass bei den Versuchen regelmäßig Gefäßverschlüsse auftraten. Von den hier beschriebenen Thrombosemodellen besaß nur das FeCl_3 -Modell das Potential, einen Gefäßverschluss durch einen Thrombus auszulösen. Die Gefäßverschlüsse sollten idealerweise bei gleichen Versuchsbedingungen und der Verwendung der gleichen Mauslinie in einem engen Zeitfenster liegen, was sie bei den durchgeführten Experimenten nicht immer taten. Auch konnte nicht bei jedem Einzelexperiment ein Verschluss der Arterie beobachtet werden. Die Verschlusszeit gab über die Stärke der Thrombusbildung Aufschluss, wohingegen die Anzahl der Verschlüsse ein Maß für die Stabilität der entstandenen Thromben sein konnte.

Für alle Thrombosemodelle kamen die Auswertung über die Fluoreszenzintensität und die Auswertung über die Thrombusfläche in Frage. Da die Intensität über die Versuchszeit kontinuierlich aufgezeichnet wurde, wurden zu den Gruppenvergleichen bestimmte Zeitpunkte gewählt, die besonders gut den üblichen Verlauf der Fluoreszenz über die Zeit für das jeweilige Thrombosemodell wiedergaben. Ein Vorteil der Verwendung der Fluoreszenzintensität zur Auswertung war die Unabhängigkeit von der Subjektivität der Person, die die Auswertung durchführte. Die Werte wurden vom System geliefert und waren daher nicht der Interpretation durch die auswertende Person unterworfen. Als Nachteil stellte sich heraus, dass die Stärke der gemessenen Fluoreszenz während des Versuchs von sehr vielen Einflussfaktoren abhing und zu einer guten Vergleichbarkeit der Werte peinlich genau darauf geachtet werden musste, alle Versuchsbedingungen gleich zu halten.

Die Auswertung über die Thrombusfläche hing stark von der subjektiven Wahrnehmung der auswertenden Person und von den Einstellungen bei der Erzeugung des Bildmaterials ab. Dafür waren technisch bedingte Einflussfaktoren wie z.B. Umgebungslicht und Artefakte bei dieser Methode kein großes Problem, weil diese visuell leicht identifiziert werden konnten und daher auf die Auswertung keinen Einfluss hatten.

3.3.2 Ergebnisse einer Auswahl bearbeiteter Projekte

Die zuvor beschriebenen Beobachtungen und Ergebnisse wurden im Rahmen von realen Forschungsprojekten gewonnen, für die die beschriebenen Thrombosemodelle eingesetzt wurden. Im Folgenden werden nun Ergebnisse einiger Versuche präsentiert, die im Rahmen dieser Projekte durchgeführt wurden.

3.3.2.1 Einfluss des löslichen Rezeptors JamA auf die Thrombusbildung *in vivo*

Von unserer Arbeitsgruppe durchgeführte *in vitro* Versuche deuteten darauf hin, dass der lösliche Rezeptor JamA Thrombose fördernde Eigenschaften besitzt. Dies sollte *in vivo* überprüft und, wenn möglich, verifiziert werden. Dazu wurde das Thrombosemodell der Gefäßverletzung mit FeCl₃ gewählt.

Die Versuche wurden mit männlichen und weiblichen Wildtyp Mäusen des Stammes C57BL/6J (B6) im Alter zwischen 7 und 12 Wochen durchgeführt. Die Tiere stammten aus Eigenzucht. In beiden Versuchsgruppen wurden jeweils 6 Tiere untersucht.

Die Tiere der Verumgruppe erhielten 30 Minuten vor der Verletzung mit FeCl₃ 50 µg JamA in 100 µl Lösung intravenös über einen Schwanzvenenkatheter appliziert. Den Tieren der Kontrollgruppe wurde die gleiche Menge BSA auf dem gleichen Wege verabreicht. Eine Anfärbung der Thrombozyten für die Intravitalmikroskopie wurde in jedem Versuchstier durch die Injektion eines Fluorochrom-markierten Antikörpers (emfret analytics X488-GPIIb β , 0,1 µg/g KGW in 100 µl Lösung) realisiert. Dieser wurde einige Minuten vor Beginn des chirurgischen Eingriffs ebenfalls über den schon vorhandenen Schwanzvenenkatheter

intravenös appliziert.

Die weitere Durchführung der Versuche entsprach dem unter 3.2.2.4 beschriebenen Protokoll für das FeCl₃-Modell.

Die Messung der Thrombusbildung erfolgte mit Intravitalmikroskopie und die Auswertung wurde einerseits über die Bestimmung der Verschlusszeiten und andererseits über die Flächenberechnung der im Bild sichtbaren Thromben relativ zur Gesamtfläche des dargestellten Gefäßabschnitts realisiert. Dazu wurden Bilder ausgewertet, die zu den Zeitpunkten 30 Sekunden, 60 Sekunden, 2, 5, 10, 15 und 20 Minuten nach dem Entfernen der FeCl₃ Lösung von der Arterienoberfläche aus dem aufgenommenen Video extrahiert wurden.

Beim Vergleich der aus den Videos extrahierten Bilder konnte eine Tendenz der JamA-Gruppe zu einem früheren Beginn der Thrombusbildung erkannt werden (Abbildung 37).

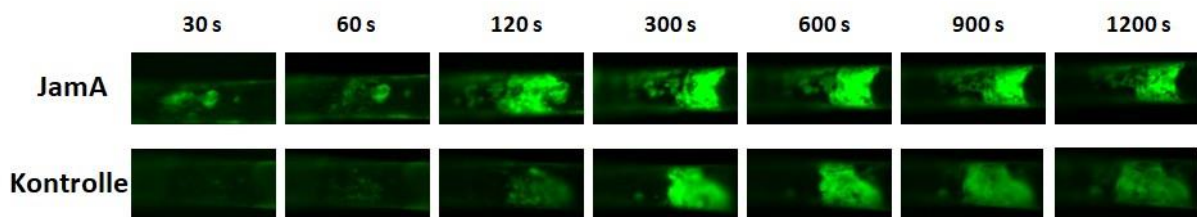


Abbildung 37: Einfluss von JamA auf die Thrombusbildung. Vergleich der aus den Filmen extrahierten Bilder zu bestimmten Zeitpunkten

Bei Arterien, bei denen die Thrombusbildung nicht zum Verschluss des Blutgefäßes führte, war eine Bestimmung der Verschlusszeit für diese Messungen nicht möglich. Diese Arterien wurden daher nicht in die Auswertung der Verschlusszeiten mit einbezogen. Für jedes untersuchte Tier konnte für mindestens eine *A. carotis communis* eine Verschlusszeit bestimmt werden. Wenn für ein Tier von zwei Arterien eine Verschlusszeit vorlag, wurde ein Mittelwert beider Einzelwerte gebildet. Im Mittel lag die Verschlusszeit für Tiere der Kontrollgruppe bei 528,3 Sekunden (+/- 90,0 s) und für Tiere der JamA-Gruppe bei 387,5 Sekunden (+/- 38,4 s) (Tabelle 7), was den Gruppenunterschied nicht signifikant werden ließ. Mit dem Fisher-Pitman-Test (exakter Test) ergab sich ein p-Wert von $p = 0,10$. Abbildung 38 zeigt die Verschlusszeiten für die einzelnen Tiere beider Gruppen.

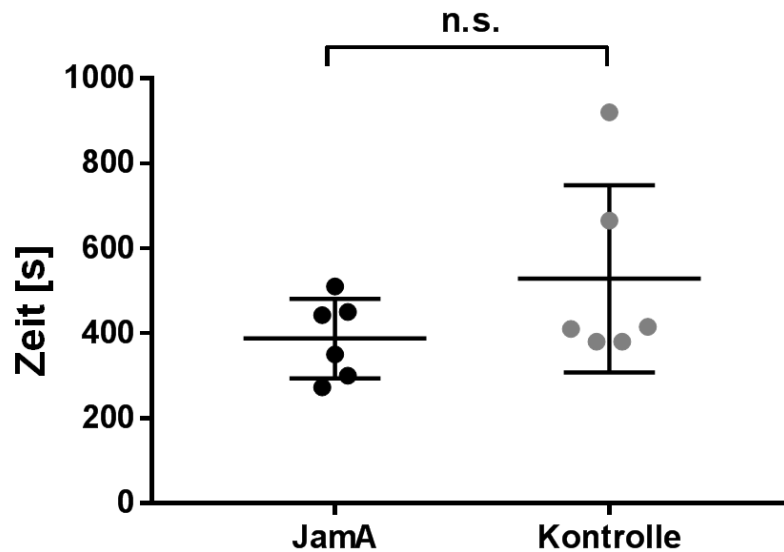


Abbildung 38: Einfluss von JamA auf die Thrombusbildung. Vergleich der Verschlusszeiten im FeCl₃-Modell. N=6, Fisher-Pitman-Test, n.s: p≥0,05

Auch bei der Auswertung über die Thrombusfläche war zwar eine Tendenz der JamA-Gruppe zu einer gegenüber der Kontrollgruppe leicht erhöhten Thrombusbildung zu erkennen, der Unterschied war jedoch nur zum Zeitpunkt 600 s signifikant (Abbildung 39, Tabelle 8). Die mit Thromben bedeckte Fläche wurde hier in Bezug auf die Gesamtfläche des im Bild dargestellten Gefäßabschnitts berechnet. Vor der Verletzung war in den untersuchten Arterien keine Thrombusbildung zu beobachten.

Da JamA als Rezeptor auf Thrombozyten und hier im Versuch in löslicher Form im Blut nicht ausschließlich an der Gefäßwand wirkt, wurde für diesen Versuch zurecht das Verletzungsmodell mit FeCl₃ gewählt, bei dem vor allem die Interaktion der Thrombozyten untereinander und die Bildung eines stabilen Thrombus im Vordergrund stehen.

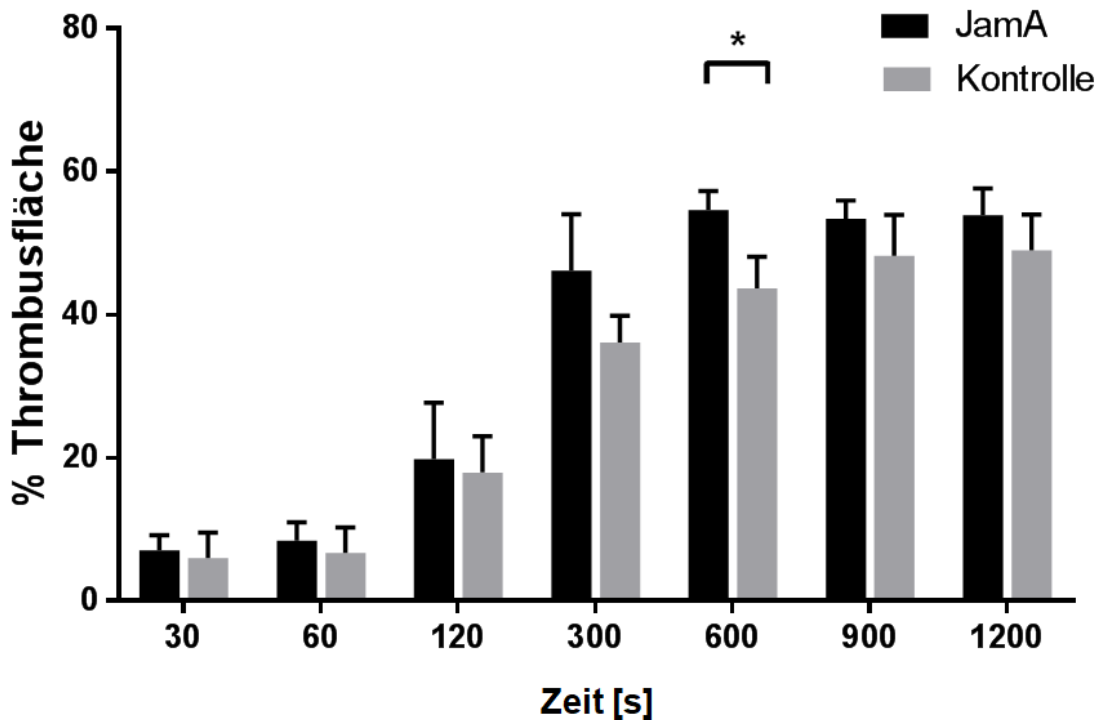


Abbildung 39: Einfluss von JamA auf die Thrombusbildung. Auswertung der Experimente über die mit Thromben bedeckten Flächen. N=6, Fisher-Pitman-Test, *: p=0,04

3.3.2.2 Wirkung einer anti-thrombotischen Testsubstanz zur Inhibition oder Reduktion der Thrombusbildung

Es wurde eine Testsubstanz untersucht, die sich zuvor *in vitro* als anti-thrombotisch erwiesen hatte. Diese sollte nun *in vivo* im Carotis-Ligatur-Modell getestet werden. Die Studie war verblindet. Die untersuchte Tierzahl war N = 6 in der Antikörpergruppe und N = 5 in der Kontrollgruppe.

Als Versuchstiere wurden männliche und weibliche Mäuse der Linie PF4Cre x Rosa im Alter zwischen 27 und 33 Wochen verwendet. Die Tiere erhielten 30 min vor der Ligatur 100 µl einer nummerierten Substanz intravenös in die Schwanzvene appliziert. Dabei handelte es sich entweder um die Testsubstanz in PBS, oder um reines PBS.

Danach wurde die Thrombusbildung für 20 min intravitalmikroskopisch beobachtet und aufgezeichnet. Die Auswertung erfolgte über die Berechnung der mit Thromben bedeckten

Fläche im Verhältnis zur Gesamtfläche des aufgezeichneten Gefäßabschnittes und des verletzten Endothels. Die verletzte Fläche war durch ihre, im Vergleich mit dem unverletzten Endothel, stärkere Fluoreszenz zu erkennen. Beide Auswertungen wurden durchgeführt, um die Korrelation der beiden Methoden zu verifizieren.

Abbildung 40 zeigt den Vergleich der Thrombusbildung der untersuchten Gruppen. Dazu wurden Momentaufnahmen zu bestimmten Zeitpunkten aus den aufgenommenen Videos der intravitalmikroskopischen Untersuchung verglichen. In der Folge wurden diese Momentaufnahmen quantitativ ausgewertet.

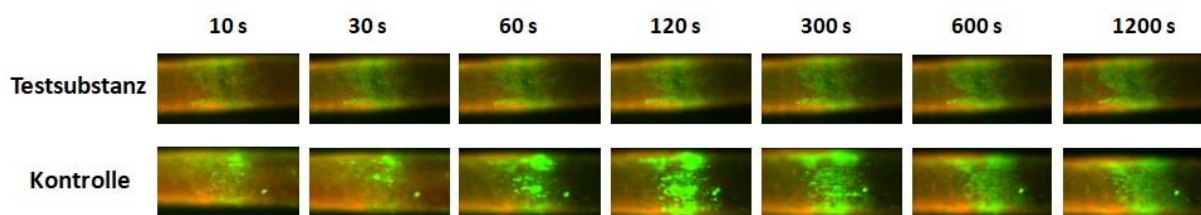


Abbildung 40: Einfluss einer anti-thrombotischen Tests substanz auf die Thrombusbildung. Vergleich der aus den Filmen extrahierten Bilder zu bestimmten Zeitpunkten

In Abbildung 41 ist die Auswertung der Thrombusfläche dargestellt, bei der als Bezugsgröße die Gesamtfläche des im Film dargestellten Gefäßabschnitts gewählt wurde. Es ergaben sich bei dieser Auswertungsmethode mit dem Fisher-Pitman-Test signifikante Unterschiede zu allen untersuchten Zeitpunkten (Tabelle 9).

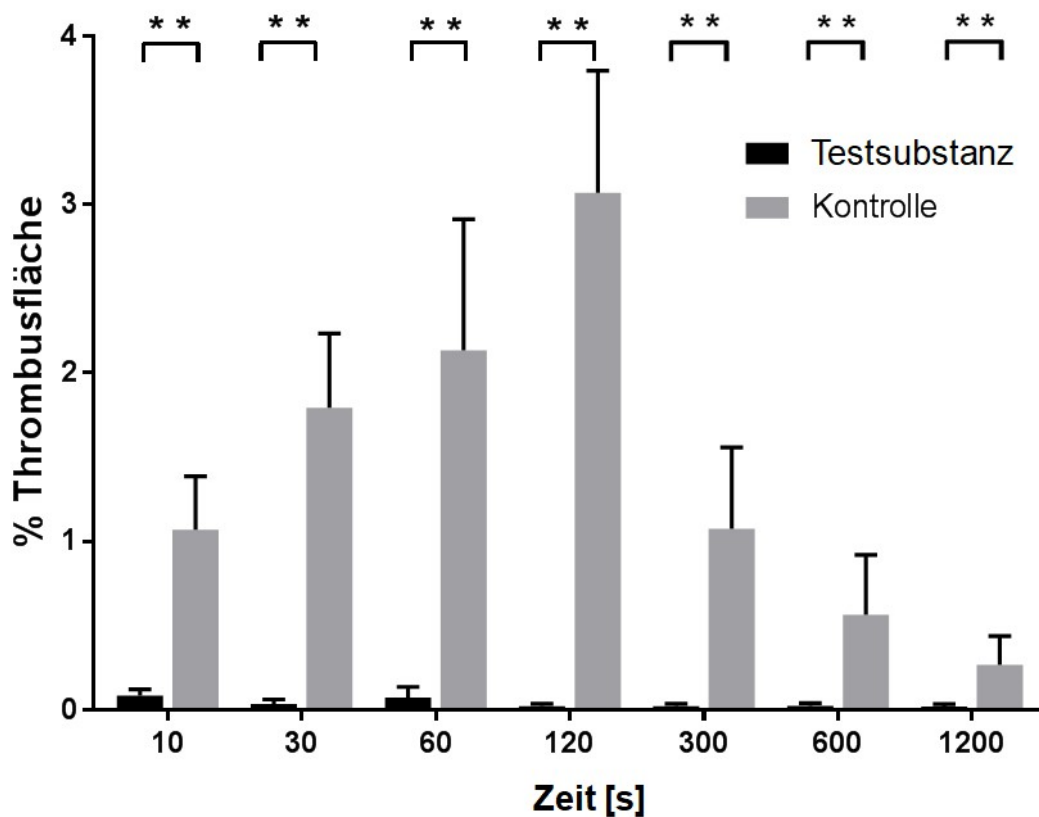


Abbildung 41: Einfluss einer anti-thrombotischen Testsubstanz auf die Thrombusbildung. Anteil der Thrombusfläche an der Gesamtfläche des dargestellten Gefäßabschnittes. N=6, Fisher-Pitman-Test, *: p<0,05; **: p<0,01

In Abbildung 42 ist die Auswertung der Thrombusflächen dargestellt, zu der als Bezugsgröße die verletzte Fläche herangezogen wurde. Diese Auswertungsmethode stellte sich für das Ligaturmodell als sehr präzise heraus und wurde bei späteren Projekten als Methode der Wahl verwendet.

Zur statistischen Auswertung wurde die Testsubstanz mit der Kontrollsubstanz mit Hilfe eines exakten Fisher-Pitman-Tests verglichen. Hier waren die Unterschiede zwischen den Gruppen zu allen Zeitpunkten, außer 600 s und 1200 s, signifikant (Tabelle 10).

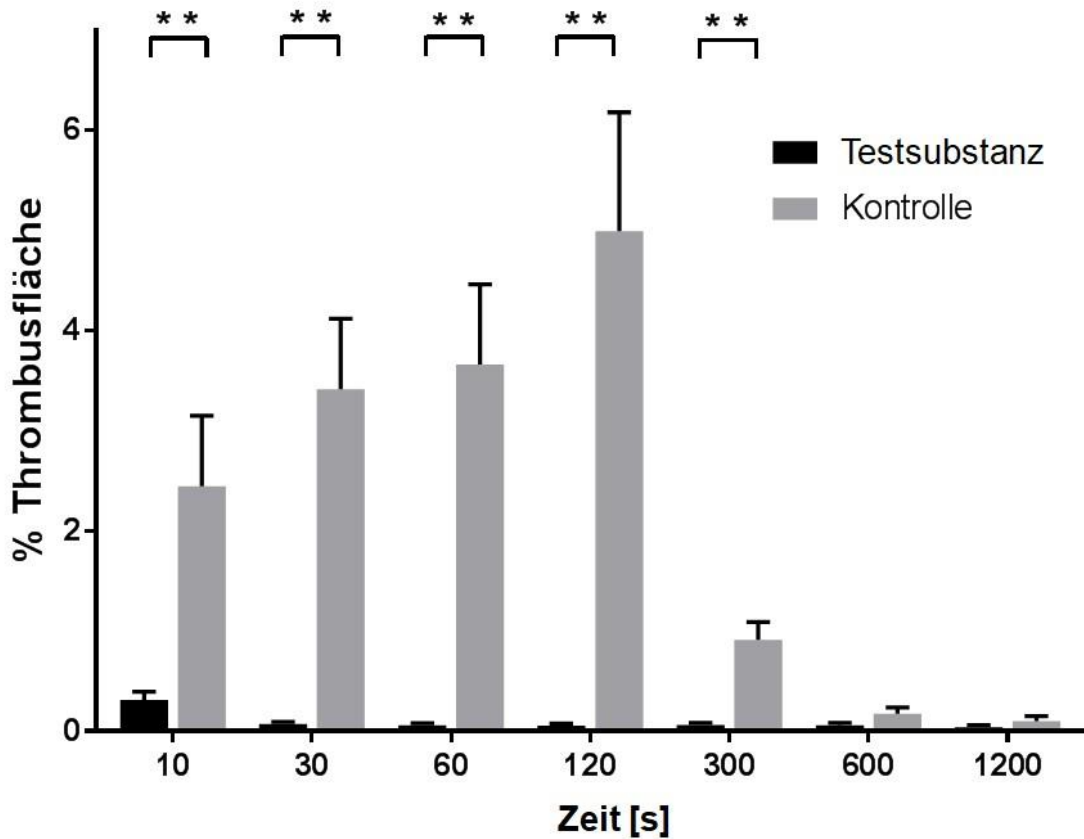


Abbildung 42: Einfluss einer anti-thrombotischen Testsubstanz auf die Thrombusbildung. Anteil der Thrombusfläche an der verletzten Gesamtfläche. N=6, Fisher-Pitman-Test, *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$

Aufgrund der Ergebnisse der hier durchgeführten Experimente kann davon ausgegangen werden, dass die untersuchte Testsubstanz die Bildung von Thromben negativ beeinflusst.

Das Fadenligatur-Modell wurde gewählt, da aus *in vitro* Versuchen bekannt war, dass die untersuchte Substanz in erster Linie die Wechselwirkung von Thrombozyten mit Kollagen beeinflusst. Daher war es wichtig, ein Modell zu wählen, in welchem sich diese Wechselwirkung gut darstellen ließ. Da der Gruppenunterschied bei diesen Versuchen hoch signifikant war, stellte sich diese Wahl als richtig heraus.

3.3.2.3 Entwicklung eines neuen Thrombosemodells zur Verstärkung der Thrombusbildung im Thrombosemodell der Carotis-Ligatur

Für die Entwicklung eines neuen Thrombosemodells basierend auf dem Modell der Carotis-Ligatur, jedoch zusätzlich mit einer Reststenose nach dem Öffnen der Ligatur, wurden Mäuse der Linie Pf4Cre x Rosa sowie heterozygot gefloخته und ungefloخته Mäuse aus unterschiedlichen Kreuzungslinien verwendet, die sich phänotypisch wie Wildtypmäuse verhielten.

Die Mäuse erhielten keine Substanzen injiziert und wurden nach dem in Kapitel 3.2.2.4 beschriebenen Protokoll für die intravitalmikroskopische Untersuchung vorbereitet. Dabei wurden im Verlauf der Versuchsreihe die Position des Knotens und die Fadenstärken für Ligaturfaden und Platzhalter variiert, bis ein gutes Ergebnis erzielt war. Wichtig waren dabei die Punkte Sichtbarkeit des Geschehens innerhalb der Arterie mittels Intravitalmikroskopie, Sicherheit der Wiederherstellung des Blutflusses durch Entfernen des Platzhalters und eine genügend enge Stenose, um sichtbare strömungsphysikalische Änderungen des Blutflusses herbeizuführen.

Da es sich bei den hier durchgeführten Versuchen nur um Versuche zur Entwicklung eines neuen Thrombosemodells handelte, konnten bisher keine Informationen über die Eignung dieses Modells in einem realen Versuchsgeschehen gewonnen werden.

Das beste Ergebnis wurde mit einem 5-0 Prolene® Faden (monofil, blau) als Platzhalter und einem 8-0 Prolene® Faden (monofil, blau) als Ligaturfaden erzielt. Der Platzhalter wurde schräg angeschnitten, um ein einfaches Herausziehen des Fadens aus der Ligatur zu ermöglichen. Als Knoten für den Ligaturfaden bewährte sich ein chirurgischer Knoten ohne Zugschleife, der unterhalb des Blutgefäßes platziert wurde. Durch seine Transparenz ermöglichte der Faden Sicht auf die darunterliegenden Gefäßwandflächen, jedoch führte die zylindrische Form des Fadens zu einem wahrnehmbaren Lupeneffekt und Objekte unterhalb des Fadens erschienen geringfügig vergrößert gegenüber Objekten, die sich an anderen Stellen im Strahlengang befanden. Durch den geringen Durchmesser des Fadens hatte dieser Effekt jedoch keinen wesentlichen Einfluss auf die Auswertung der Bilder.

Versuche mit einem Vicryl®-Faden (8-0) als Ligaturfaden zeigten eine geringe Zugstabilität des Fadens, der beim festen Anziehen riss. Bei der Verwendung eines Seidenfadens (7-0) für die Ligatur öffnete sich das Lumen der Arterie nicht ausreichend nach dem Entfernen des Platzhalters. Dies konnte auf eine zu hohe Steife des Fadens im Knotenbereich und eine zu geringe Formstabilität des Fadens im Bereich der Schlinge zurückgeführt werden.

Ein Knoten oberhalb des Gefäßes verdeckte einen zu großen Bereich der Fläche, an der die Bildung von Thromben zu erwarten war. Aus diesem Grund erwies sich auch die Verwendung eines transparenten Fadens (Prolene®) als überlegen gegenüber nicht transparenten Fäden (Vicryl® und Seide).

Deutliche strömungsdynamische Veränderungen des Blutflusses im Bereich der Stenose waren erst bei der Verwendung von dünneren Fäden (4-0, 5-0) als Platzhalter zu beobachten. Ein anfangs verwendeter Faden mit der Stärke 2-0 verringerte den Querschnitt des untersuchten Blutgefäßes auf ca. 50 %, hatte aber wenig Einfluss auf die Thrombusbildung in diesem Bereich und auch die im intravitalmikroskopischen Bild sichtbare Strömung des Blutes erschien unverändert.

Im Verlauf der durchgeführten Versuche stellte sich heraus, dass einfach mit der Schere abgeschnittene Platzhalterfäden an der Schnittstelle kleine Widerhaken aufwiesen, die das Entfernen aus der Ligatur erschwerten und die Lage des Ligaturfadens in einigen Fällen veränderten. Bewährt hat sich daher ein schräges Anschneiden des Fadens an der Seite, die aus der Schlinge der Ligatur gezogen wurde.

Eine Übersicht über die im Verlauf der Methodenentwicklung verwendeten Variationen von Fäden und Techniken gibt Tabelle 3.

Zur Demonstration der Machbarkeit wurden am Ende der Versuchsreihe drei *Aa. carotides communes* bei drei verschiedenen Mäusen (N=3) mit Hilfe dieses Modells untersucht.

Die Thrombusbildung zu bestimmten Zeitpunkten bei diesen drei *Aa. carotides communes* ist in Abbildung 43 dargestellt.

Tabelle 3: Etablierung eines Ligaturmodells mit Reststenose. Zusammenfassung der Beobachtungen bei der Entwicklung des Modells

Ligaturfäden	Vicryl® 8-0 pseudomonofil, violett	Riss beim Anziehen Eigenfluoreszenz
	Seide 7-0 geflochten, schwarz	Gefäß nicht geöffnet (Faden zu steif)
	Prolene® 8-0 monofil, blau	Gut, Transparenz ausreichend, wahrnehmbarer Lupeneffekt
Platzhalterfäden	PDS II® 2-0 monofil, violett	Zu dick, daher ungenügende Stenose
	Prolene® 4-0 monofil, blau	Deutliche Veränderung der Strömungsdynamik
	Prolene® 5-0 monofil, blau	Noch etwas effektiver in seiner Wirkung auf Strömungsdynamik und Thrombusbildung
Knoten	einfach oben auf dem Blutgefäß	Verdeckte den interessanten Bereich hohes Lockerungspotential
	chirurgisch oben auf dem Blutgefäß	Verdeckte den interessanten Bereich
	chirurgisch unterhalb des Blutgefäßes	Sehr gut

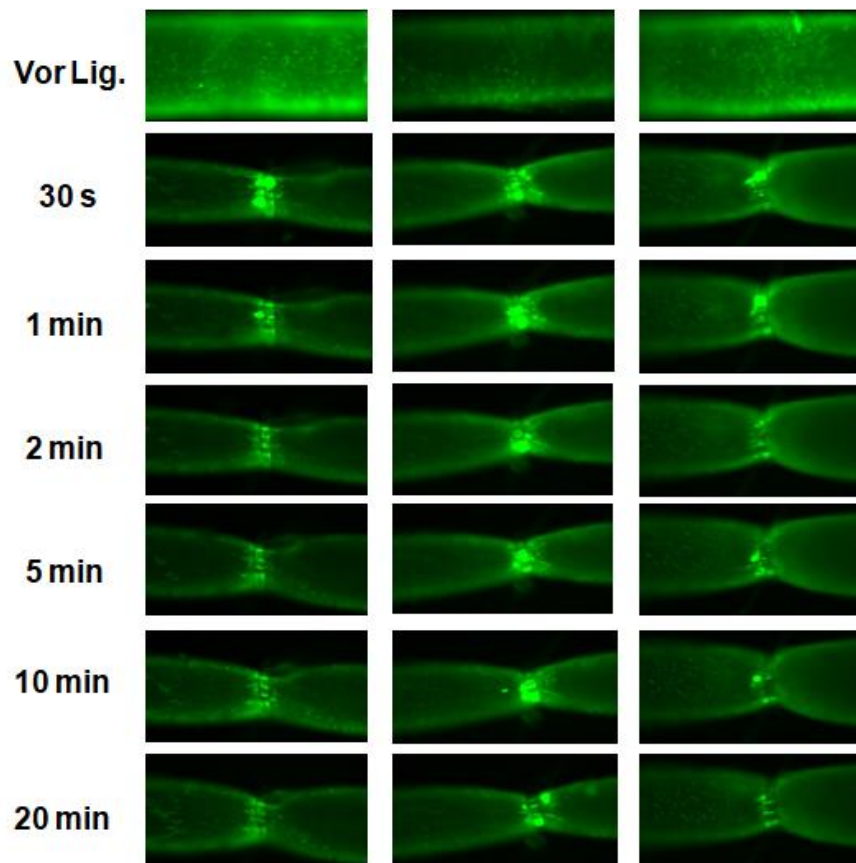


Abbildung 43: Etablierung eines Ligaturmodells mit Reststenose. Thrombusbildung im Verlauf des Experiments bei drei Mäusen

In Abbildung 44 ist die Auswertung der Thrombusflächen gemittelt über die drei untersuchten *Aa. carotides communes* aus Abbildung 43 zu sehen. Als Bezugsgröße für die Fläche wurde der verletzte Bereich gewählt, der durch eine erhöhte Fluoreszenz vom unverletzten Bereich zu unterscheiden war. Eine statistische Auswertung erfolgte, aufgrund der kleinen Stichprobe, nicht.

Im Vergleich zum Ligaturmodell ohne Reststenose konnte eine deutlich verlängerte Thrombusbildung und ein verringertes Abschwimmen von entstandenen Thromben beobachtet werden. Daher waren bei allen Versuchen dieses neuen Modells auch bei Beendigung der Aufnahme nach 20 Minuten noch unterschiedlich große Reste von Thromben vorhanden. Ein Verschluss des Gefäßes wurde auch bei diesem Modell bisher zu keinem Zeitpunkt beobachtet.

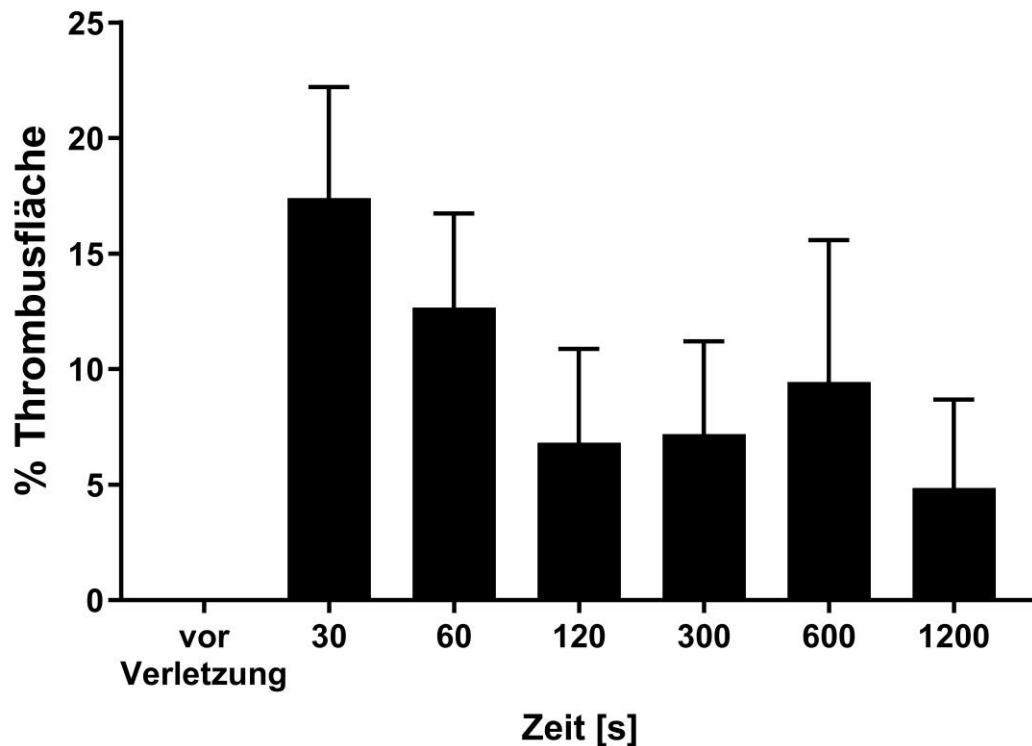


Abbildung 44: Etablierung eines Ligaturmodells mit Reststenose. Thrombusfläche anteilig an der Gesamtfläche einer festgelegten ROI zu diskreten Zeitpunkten. N=3, Tabelle 6

Die Verwendung eines Prolene® 8-0 Fadens für die Ligatur mit einem chirurgischen Knoten unterhalb der Arterie in Verbindung mit einem Prolene® 5-0 Faden als Platzhalter stellte sich im Verlauf des Versuchs als die am besten geeignete Kombination heraus. Ein Vergleich von fünf mit dieser Fadenkombination erzeugten Stenosen zeigte jedoch eine deutliche Varianz der stenotischen Durchmesser. Da der als Platzhalter verwendete Faden jedes Mal den gleichen Durchmesser gehabt haben sollte, wäre ein ungefähr gleicher Durchmesser der Stenose zu erwarten gewesen, der ungefähr dem Durchmesser des verwendeten Fadens entsprechen sollte und der auch weitgehend unabhängig vom ursprünglichen Arterien-Durchmesser sein sollte. Der Durchmesser eines Fadens mit einer Fadenstärke von 5-0 ist mit 100 – 149 µm angegeben. Drei der in Tabelle 11 (im Anhang) aufgeführten Werte für den Stenosedurchmesser d lagen nahe an diesem Wert. Zwei Werte wichen jedoch deutlich davon ab. Gemessen wurde mit Hilfe der im Intravitalmikroskop eingebauten Messfunktion (siehe Kapitel 3.2.3.1). Die Querschnittsfläche der Stenose kann mit der Formel $A=\pi*(0,5*d)^2$ berechnet werden, wenn eine runde Querschnittsfläche vorausgesetzt wird.

4 Diskussion

Markierung von Thrombozyten

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Mäuse der Linie C57BL/6-Tg (Pf4-Cre) Q3Rsko/J x B6.129 (Cg) -Gt (ROSA) 26Sor^{tm4} (ACTB-tdTomato-GFP) Luo/J (PF4Cre x Rosa) exprimierten ubiquitär ein Membranprotein, das rot fluoreszierte (tdTomato) und plättchenspezifisch ein Protein (EGFP), das die Membran von Thrombozyten und Megakaryozyten grün fluoreszieren ließ. Sowohl mit Hilfe der Durchflusszytometrie, wie auch mit der Intravitalmikroskopie konnte eine erhöhte Fluoreszenz der Thrombozyten dieses Mausstamms verglichen mit denen von C57BL/6J Mäusen gezeigt werden (siehe Kapitel 3.3.1.1).

Außerdem wurden einige Versuche an Mäusen ohne endogen exprimierte Fluoreszenzproteine durchgeführt, denen aber ein fluorochrom-markierter GPIb Antikörper injiziert wurde, um die Thrombozyten im passenden Anregungslicht mikroskopisch sichtbar zu machen.

Da *et al.* untersuchten das Adhäsions- und Aggregationsverhalten von Plättchen in *in vitro* und *in vivo* Experimenten. Sie verglichen dabei Mäuse, die plättchenspezifisch EYFP auf der Zellmembran exprimierten (B6.129X1-Gt (ROSA) 26Sor^{tm1} (EYFP) Cos/J mit Plättchen Faktor 4 (PF4)-Cre^{W/T}) mit ihren Cre-negativen Wurfgeschwistern und außerdem mit C57BL/6 Mäusen (Wildtyp) mit und ohne Markierung der Thrombozyten mit einem DyLight® 488-konjugierten Anti-Maus GPIIb/3 Antikörper (Da *et al.*, 2018).

Bei diesem Vergleich zeigte sich eine leicht erhöhte Adhäsions- und Aggregationsneigung der Thrombozyten der oben beschriebenen EYFP-Mäuse, unabhängig davon ob sie Cre-positiv oder Cre-negativ waren, gegenüber Wildtypmäusen. Eine Markierung der Plättchen mit markierten Antikörpern hatte keine signifikanten Änderungen des Aggregationsverhaltens zur Folge (Da *et al.*, 2018).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden, was jedoch vor allem daran lag, dass nicht beide Methoden der Markierung von Thrombozyten in einem Versuch parallel verwendet wurden. Es wurden jeweils Mäuse des gleichen Genotyps in den

Versuchen verglichen. Bei einigen Versuchen wurden Tiere verwendet, die sich hinsichtlich eines anderen Gens (Rezeptor der Gruppe der GPCR auf Thrombozyten) unterschieden, nicht jedoch in der Expression der Fluoreszenzproteine. Man sollte den möglichen Einfluss, den eine Veränderung der genetischen Ausstattung von Zellen auf deren Funktion haben kann, jedoch im Auge behalten und bei der Planung von Versuchen berücksichtigen. Es ist daher wichtig, im Rahmen einer Fragestellung möglichst alle Versuche mit Tieren des gleichen Genotyps durchzuführen, um eine möglichst gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erhalten.

Da *et al.* untersuchten auch, ob die Fluoreszenz von genetisch markierten Thrombozyten mit der von durch Antikörper markierten Thrombozyten vergleichbar ist. Sie fanden beide Methoden gleichermaßen geeignet für die durchgeführten Versuche (Da *et al.*, 2018).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass die Fluoreszenz von antikörpermarkierten Thrombozyten zwar für das FeCl_3 -Modell ausreichte, das Intravitalmikroskop jedoch bei den Ligatur-basierten Modellen (Ligaturmodell und Stenosemodell) wegen der geringen Signalstärke an seine Grenzen kam. Bei diesen Modellen, bei denen oft nur kleine Anhäufungen von Plättchen oder gar nur einzelne Zellen an der Gefäßwand haften, reichte die Fluoreszenz der antikörpermarkierten Thrombozyten nicht aus, um gutes Bildmaterial zu erzeugen. Das Signal von einzelnen fluorochrom-markierten Thrombozyten hob sich nicht deutlich genug vom Hintergrundrauschen ab, um mit der verwendeten Kameraausstattung eine auswertbare Bildqualität zu ermöglichen. Die Fluoreszenz des EGFP der in dieser Arbeit verwendeten transgenen Mäuse war jedoch sowohl im homozygoten wie auch im heterozygoten Fall stark genug, um kontrastreiche Bilder zu ermöglichen. Beim Aufbau von großen Thromben im FeCl_3 -Modell war es hingegen oft etwas problematisch, die Begrenzungen des Blutgefäßes und die mit dem Blut strömenden Zellen zu erkennen, da sie von der starken Fluoreszenz des schon gebildeten Thrombus überstrahlt wurden. Dieses Problem tritt jedoch immer auf, wenn sich eine Anhäufung von stark strahlenden Partikeln in engem räumlichem Zusammenhang mit den jeweiligen Einzelpartikeln befindet und ist nicht spezifisch für diese Art der Fragestellung.

Auswertemethoden

Die Aufnahme von Videos und Standbildern liefert allein noch keine statistisch auswertbaren Ergebnisse. Es ist daher notwendig, Methoden zu finden, die eine objektive Auswertung des Bildmaterials erlauben und Zahlenwerte liefern, die in der Folge verglichen werden können. Welche Auswertemethode geeignet ist, hängt von vielen Einflussfaktoren ab. Einerseits spielt das verwendete Verletzungsmodell eine große Rolle, aber auch die Aufnahmemethode und nicht zuletzt die Art der Daten, die das eingesetzte Mess- bzw. Aufnahmegerät zu liefern vermag.

In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Messmethoden verwendet, die sehr unterschiedliche Daten lieferten.

Bei der Laser-Doppler-Flussmessung konnte im FeCl₃-Verletzungsmodell sehr gut eine Verschlusszeit ermittelt werden, die jedoch nur auf ± 30 Sekunden genau war. Dazu wurden die vom Gerät errechneten Falschfarbenbilder, aber auch die, über die Zeit aufgetragenen, zugehörigen Zahlenwerte für die mittlere Flussstärke in einem festgelegten Bereich verwendet. Üblicherweise wurde ein Verschluss als solcher gewertet, wenn der Thrombus das Gefäß für mindestens 60 Sekunden verschloss. Es gab jedoch Fälle, in denen der Thrombusaufbau schnell und heftig vonstattenging, der Thrombus jedoch jedes Mal wieder abriss, sobald das Gefäß verschlossen war. Solche Verschlüsse wären aufgrund ihrer kurzen Dauer nicht gewertet worden und das Gefäß hätte schließlich als unverschlossen gelten müssen, obwohl eine starke Thrombusbildung stattfand. Als weitere Größe konnte daher die Anzahl der Verschlüsse in einem Zeitintervall, unabhängig von ihrer Dauer, bestimmt werden. Diese konnte als Maß für die Stabilität eines Thrombus angesehen werden, da sehr stabile Thromben eher dazu neigten, ein Blutgefäß irreversibel zu verschließen und wenig stabile Thromben leicht abrisen und daher der Blutfluss wiederhergestellt wurde. Da die Thrombusbildung jedoch weiter ging, entstanden in der Folge neue Thromben. Bei instabilen Thromben konnte daher eine mehrfache Wiederholung von Neubildung und Abschwemmung beobachtet werden (siehe Kapitel 3.3.1.2.1).

Für die nach einer Ligatur der *A. carotis communis* einsetzende Thrombusbildung war die Laser-Doppler-Flussmessung nicht geeignet, da sich die Flusseigenschaften durch die

randständigen, meist kleinen, Thromben im Bereich der Endothelverletzung nicht ausreichend stark auf die Flusseigenschaften des Blutes auswirkten, um mit dieser Methode Informationen über den Verlauf der Thrombusbildung zu erhalten (siehe Kapitel 3.3.1.2.2). Bei der Entwicklung der modifizierten Ligaturmethode mit Reststenose wurde keine Laser-Doppler-Flussmessung durchgeführt, da erwartet wurde, dass das Ergebnis dieser Messung in etwa dem der Ligaturmethode ohne Reststenose entsprechen würde.

Da bei der Intravitalmikroskopie die Messung über die Aufnahme von Bildern und Videos mit einer Kamera abläuft, ist die Erzeugung von vergleichbaren Daten hier wesentlich komplexer, vor allem wenn man aus der Dynamik der Vorgänge mehr Informationen ziehen möchte als nur die Verschlusszeit und die Anzahl der Verschlüsse. Beim Verletzungsmodell mit FeCl_3 konnten diese beiden Größen auch bei den intravitalmikroskopisch erhaltenen Aufnahmen bestimmt werden, was häufig jedoch subjektiv war, da nur in Ausnahmefällen jeglicher Blutfluss zum Erliegen kam. Eine kleine Lücke im Thrombus war fast immer zu beobachten, durch die sich auch im Verschlussfall noch ein feiner Strom von Blutzellen bewegte. Daher war es wichtig, dass alle Videos durch ein und dieselbe Person ausgewertet wurden, welche immer die gleichen Kriterien anlegte, wann ein Gefäß als verschlossen galt. Auch war es schwierig zu entscheiden, ab wann eine Zunahme des Blutstroms als eine erneute Öffnung des Gefäßes zu werten war. Eine Verblindung und Auswertung der Aufnahmen durch eine sonst im Versuch nicht involvierte Person könnte hier die subjektive Komponente bei der Bestimmung der Verschlusszeit möglicherweise abschwächen und zu verlässlicheren Ergebnissen führen.

Dafür konnten aus den Videos zusätzliche Informationen erhalten werden, die mit der Laser-Doppler-Flussmessung nicht zugänglich waren. Besonders notwendig war dies bei Verletzungsmodellen, die nicht wie das FeCl_3 -Modell einen Gefäßverschluss zum Ziel hatten. Nach einer Gefäßwandverletzung durch Fadenligatur haften zwar Thrombozyten an der freiliegenden Matrix und es bildeten sich an diesen Stellen kleine Thromben, die jedoch niemals auf eine Größe anwachsen, die ausreichend wäre das Gefäß vollständig zu verschließen. Für Experimente mit dem Ligaturmodell oder dessen Weiterentwicklung zum Stenosemodell mussten daher andere Methoden gefunden werden, um auswertbare Daten zu erheben.

Da die Intensität des Fluoreszenzlichts direkt mit der Anzahl der beteiligten Thrombozyten

korreliert, konnte bei allen verwendeten Modellen aus der Intensitätskurve über die Zeit auf das Wachstum des Thrombus geschlossen werden. Bei den ligaturbasierten Verletzungsmodellen stieg die Thrombusanzahl und -größe nach dem Wiederherstellen des Blutflusses rasch an und fiel nach Erreichen eines Maximums allmählich wieder ab. Am Ende jedes Messvorgangs war das Blutgefäß in den meisten Fällen ohne sichtbare Thromben. Um vergleichbare Zahlenwerte zu erhalten, wurden bei der Auswertung diskrete Zeitpunkte ausgewählt und die zu diesen Zeitpunkten vorliegenden Werte für die mittlere Signalstärke der Fluoreszenz im Messbereich verglichen. Es war dabei wichtig, dass die Messungen unter identischen Bedingungen durchgeführt wurden und auch die Abmessungen der untersuchten Carotis-Arterien nicht stark voneinander abwichen. Mögliche Fehlerquellen waren unter anderem eingeschaltete Raumbelichtung, kurz zuvor aufgetropfte Benetzungsflüssigkeit, Verschiebung des Objekts um Beobachtungen im weiteren Verlauf des Blutgefäßes nicht zu übersehen, starke Respirationsbewegungen des Brusteingangs, Verwendung von Mäusen mit unterschiedlichem Genotyp (heterozygot auf das Transgen mT/mG bzw. homozygot), starke Variabilität der Gefäßdurchmesser, unsaubere Präparation, Blutungen oder Blutreste an der Gefäßoberfläche, Austrocknung der Gefäßoberfläche und Fremdkörper wie z.B. Haare der Maus oder Fasern der verwendeten Wattestäbchen im Messfenster. Bei Verwendung von fluorochrommarkierten Antikörpern führte eine unterschiedliche Menge der Antikörper relativ zum Verteilungsvolumen zu unterschiedlich intensiver Fluoreszenz; veränderte Einstellungen am Gerät und die bewusste oder versehentliche Verwendung von Filtern konnten die vom Gerät gespeicherten Daten ungünstig beeinflussen und zu großen Schwankungen führen. Alle diese Einflussfaktoren veränderten die gemessene Fluoreszenzintensität und hatten daher Einfluss auf die Auswertung über diese Intensität. Nicht zuletzt lag das Intensitätsmaximum nicht bei allen Messungen im gleichen Zeitfenster und so ergab eine Mittelung zu bestimmten Zeitpunkten nicht immer das Ergebnis, das nur durch Betrachten der Intensitätskurven zu erwarten gewesen wäre.

Aus diesen Gründen wurde eine weitere Möglichkeit gesucht, eine objektive Auswertung zu erreichen die weniger fehleranfällig sein sollte. Es wurden dafür aus den aufgezeichneten Videos Standbilder zu bestimmten Zeiten nach dem Auslösen der Gefäßwandverletzung extrahiert. Mit Hilfe der Software AxioVision wurden dann alle durch ihre Fluoreszenz

sichtbaren Thrombozytenaggregate bzw. Thromben manuell im Bildbereich markiert und deren Gesamtfläche im Verhältnis zu einer Referenzfläche bestimmt. Als Referenzfläche wurde entweder die Fläche des im Bild dargestellten Gefäßabschnitts gewählt (bei allen 3 Verletzungsmethoden) oder die Fläche des verletzten Endothels, was jedoch nur bei den ligaturbasierten Modellen möglich war.

Auch diese Methode der Auswertung war nicht ohne Schwierigkeiten. Sie funktionierte sehr gut bei geringer Thrombusbildung, wenn noch keine starke Fluoreszenz auftrat, war dann jedoch aufgrund der Anzahl und der geringen Größe der Thrombozytenaggregate an der Gefäßwand sehr arbeitsaufwändig und häufig ungenau, da die genaue Markierung einer sehr kleinen fluoreszierenden Fläche nicht detailliert genug möglich war. Im Betriebsprogramm des Intravitalmikroskops war eine entsprechende Funktion eingebaut, die automatisch alle Flächen markierte, deren Signalstärke oberhalb eines selbstgewählten Grenzwertes lag. Da in den Bildern jedoch struktur- und artefaktbedingt häufig Flächen höherer Signalstärke auftraten, die in keinem Zusammenhang mit den Thromben standen und diese dann zu falsch positiven Ergebnissen führten, konnte bei der Auswertung auf diese Funktion leider nicht zurückgegriffen werden. Bei stärkerer Thrombusbildung, wie sie vor allem im FeCl_3 -Verletzungsmodell auftrat, strahlte der Thrombus so hell, dass die wahren Begrenzungen des Thrombus nicht sichtbar waren und nur abgeschätzt werden konnten und außerdem kleinere, weniger helle Thromben häufig überstrahlt wurden. Auch die Gefäßwand war oft nicht mehr ausreichend gut sichtbar. Letzteres wurde besonders relevant, wenn vor der Erzeugung der Standbilder die Helligkeit des Bildmaterials soweit reduziert wurde, dass die Begrenzung des Thrombus sichtbar wurde. Dabei spielt die Einstellung der LUT (*Lookup-Tabelle*) für jedes einzelne Bild eine große Rolle. Diese sollte innerhalb eines Versuchs für alle untersuchten Tiere gleich gewählt werden, um eine Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Messungen zu gewährleisten.

Da auch diese Auswertemethode nicht den gesamten Verlauf der Thrombusbildung widerspiegelte, sondern nur mit Momentaufnahmen arbeitete, trat hier zudem das gleiche Problem bezüglich des Maximums auf, welches für die Auswertung über die Intensität bereits beschrieben wurde. Häufig lag das Maximum der Thrombusbildung bei den ligaturbasierten Verletzungsmodellen zwischen zwei Momentaufnahmen und es wurden daher Werte gemessen, die fälschlicherweise niedriger waren, als es aus dem wahren

Verlauf zu erwarten gewesen wäre. Abhilfe könnte hier eine Auswertung von zusätzlichen Messzeitpunkten schaffen, welche jedoch Gruppenvergleiche sehr viel komplexer gestalten würde und letztlich ähnliche Probleme aufwerfen würde wie der Vergleich der kontinuierlichen Intensitätskurven, da das Maximum nicht bei jeder Messung zum gleichen Zeitpunkt erreicht wird.

Während bei der Auswertung über die Intensität die dreidimensionale Ausdehnung der untersuchten Thromben durch eine Zunahme der Fluoreszenzintensität noch in gewissem Maße in die Auswertung einfluss, konnte dies bei der Auswertung über die Thrombusfläche nicht erzielt werden.

Trotz aller Schwierigkeiten, die mit der Verwendung der Thrombusfläche über die Zeit einhergingen, erwies sich diese letztlich jedoch als die zuverlässigste und objektivste Methode, da sie weniger fehlerbehaftet war, weniger von äußeren Umständen und Geräteeinstellungen abhängig war und eine bessere Vergleichbarkeit der einzelnen Messungen einer Versuchsgruppe ermöglichte.

Versuche, den gesamten Verlauf der Thrombusbildung in eine Auswertung einfließen zu lassen waren wenig erfolgreich. Unter anderem wurde versucht, die Fläche unter der Intensitätskurve (Fluoreszenzintensität über die Zeit) in einem festen Zeitfenster als Maß zu nehmen, um das Problem der Intensitätsmaxima zu unterschiedlichen Zeitpunkten zu umgehen. Hier war jedoch auffällig, dass die Basisintensität, die im Wesentlichen von der Eigenfluoreszenz des Blutgefäßes verursacht wurde, bei Abwesenheit von Thromben zwischen den Messungen starke Unterschiede aufwies und die Fluoreszenz über die Zeit durch Ausbleichung abnahm. Versuche, die Basisintensität von der Gesamtintensität abzuziehen gelangen nicht gut genug, um die Auswertung über die Fläche unter der Kurve erfolgreich verwenden zu können. Die Arbeit daran lieferte jedoch zumindest eine Möglichkeit, die Ergebnisse der Auswertung über die Fluoreszenzintensität zu bestimmten Zeitpunkten zu verbessern. Es wurden dafür bei späteren Versuchen mit der Gefäßverletzung durch Ligatur zwei Intensitätskurven berechnet, die innerhalb zweier gleichgroßer ROIs (*Regions of Interest*) derselben Aufnahme gemessen wurden. Eine ROI wurde dabei auf den Bereich der Gefäßverletzung gelegt, die andere auf einen Bereich, der keine Verletzung erfuhr. Nach Subtraktion der zweiten Intensitätskurve von der ersten, konnte eine Kurve erhalten werden, die weit weniger Basisintensität enthielt und nur noch

wenig vom Phänomen der Ausbleichung betroffen war. Eine Möglichkeit, die Hintergrundfluoreszenz komplett so zu eliminieren, dass nur noch die von Thromben erzeugte Fluoreszenz zurückblieb, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht gefunden. Auch war die Subtraktionsmethode zwar für Versuche mit dem herkömmlichen Ligatur-Verletzungsmodell gut geeignet, die Ergebnisse zu verbessern, war jedoch für die FeCl₃-Methode und das neu entwickelte Stenose-Verletzungsmodell nicht brauchbar. Bei der FeCl₃-Verletzung wuchs die Ausdehnung des Thrombus im Verlauf der Messung immer weiter an, so dass keine zwei gleich großen ROIs im Bildbereich definiert werden konnten und bei der Stenose unterschied sich die Form des Blutgefäßes durch die fadenbedingte Einschnürung im verletzten Bereich deutlich von der desselben Blutgefäßes in einem Randbereich des dargestellten Gefäßabschnitts.

Die Erkenntnisse, die im Rahmen dieser Arbeit über die Auswertung solcher Messungen gewonnen werden konnten, können möglicherweise als Grundlage für eine Weiterentwicklung einer Lösung für diese Fragestellung dienen. Generell sollte nach Möglichkeiten der Auswertung gesucht werden, die die Thrombusstabilität stärker mit einbeziehen, als es bisherige Auswertemethoden erlauben, die sich vorwiegend der Aufbaugeschwindigkeit und –stärke bedienen.

Für alle Messungen im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Trockenobjektiv mit 10-facher Vergrößerung gewählt, um die volle Breite des aufgenommenen Gefäßes im Bild darzustellen. Es ist jedoch auch möglich, eine höhere Vergrößerung zu wählen und damit nur einen Ausschnitt der verletzten Gefäßwandfläche zu beobachten. Auf diese Weise kann das Verhalten von einzelnen Thrombozyten bei ihrer Interaktion mit der Gefäßwand besser untersucht werden, wie zuvor von Massberg *et al.* beschrieben (Massberg *et al.* 2003, Massberg *et al.* 2004). Mögliche Parameter, die erhoben werden können, wären dann die Anzahl anhaftender Thrombozyten zu bestimmten Zeitpunkten oder die mittlere Zeit, die ein einzelner Thrombozyt an der verletzten Gefäßwandfläche haftet, bevor er wieder abschwimmt. Auch die Anzahl rollender Thrombozyten pro Fläche und Zeit wäre ein möglicher zu erhebender Parameter. Solche Messungen wurden in der Vergangenheit schon von anderen Wissenschaftlern unserer Abteilung durchgeführt (Schönberger *et al.* 2008, Walker *et al.* 2015), wobei hierfür nach Verletzung mit der Fadenligatur der Zeitraum zur Messung verwendet wurde, nachdem die initial gebildeten Thromben schon wieder

abgeschwommen waren. Auch danach finden noch Interaktionen von Thrombozyten mit der verletzten Fläche statt, die für Gruppenvergleiche genutzt werden können.

Zu dem im Rahmen dieser Arbeit beobachteten, schnellen und mitunter starken, Aufbau von instabilen Thrombozytenaggregaten im Modell der Carotis-Ligatur wurde keine Literatur gefunden. Diese zeitlich relativ kurze Thrombusbildung wurde jedoch als geeigneter Parameter für Gruppenvergleiche in diesem Modell identifiziert und daher für die Auswertung der hier durchgeführten Versuche verwendet. Damit wurde eine wertvolle zusätzliche Alternative zur bisher beschriebenen Auswertung über das Verhalten einzelner Thrombozyten im verletzten Gefäßbereich gefunden.

Welches Modell für welche Fragestellung?

Zur Untersuchung der Thrombusbildung *in vivo* wurden über die Jahre viele verschiedene Modelle entwickelt. Einige dieser Modelle wurden und werden an venösen Gefäßen durchgeführt, andere an arteriellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei verschiedene Modelle an der *A. carotis communis* angewandt, um die Thrombusbildung mit unterschiedlichen Messverfahren zu beobachten und auszuwerten.

Da sich die Art der Schädigung der Gefäßwand bei den ligaturbasierten Methoden stark von der bei der FeCl₃-Methode unterscheidet, ist auch der Vorgang der Thrombusbildung und damit die Form und Stabilität der entstehenden Thromben unterschiedlich. Diese Tatsache bietet die Möglichkeit, unterschiedliche Aspekte und Vorgänge bei der Thrombusbildung näher zu untersuchen. Je nach Fragestellung kann eine der Methoden geeigneter sein als die andere oder auch beide Methoden in Kombination angewandt werden, um ein vollständigeres Bild von den Vorgängen, Zellinteraktionen und Abhängigkeiten von verschiedenen Chemokinen und Stoffen zu erhalten.

Nach Verletzung eines arteriellen Blutgefäßes durch FeCl₃ findet ein Thrombusaufbau nicht nur an der verletzten Gefäßwand statt, sondern wird zusätzlich unterstützt durch Präzipitationskeime im Lumen, an welche sich ebenfalls rasch Thrombozyten anlagern können (Eckly *et al.* 2011, Li *et al.* 2013). Der entstehende Thrombus reicht daher weit ins Lumen hinein und ist in der Lage, dieses im Laufe des Experiments komplett auszufüllen. Als

Parameter für einen Gruppenvergleich kommen daher sowohl die Aufbaugeschwindigkeit, die Stabilität des entstehenden Thrombus, die Ausdehnung und das Volumen des Thrombus in Frage. Ebenso könnte eine mögliche Auflösung des Thrombus im weiteren Verlauf zur Auswertung herangezogen werden, welche bei diesem Verletzungsmodell im Rahmen dieser Arbeit jedoch meist nur bei Experimenten zu beobachten war, die nicht zu einem kompletten Verschluss des Gefäßes führten. Die Haftung direkt an der verletzten Gefäßwand spielt zu Beginn der durch FeCl_3 ausgelösten Thrombusbildung eine große Rolle, je weiter jedoch der Thrombusaufbau voranschreitet, desto mehr tritt die Stabilität des Thrombus selbst in den Vordergrund. Dieser Parameter ist charakteristisch für das Modell und kann für Gruppenvergleiche verwendet werden. Sowohl dem Blut zugefügte Substanzen bei identischer Versuchstierlinie, wie auch genetische Unterschiede von zwei oder mehr transgenen Linien können verglichen werden. Es kann dabei untersucht werden, ob die Abwesenheit körpereigener Rezeptoren, Liganden oder Zellen einen Einfluss auf die Thrombusbildung, die Stabilität und Auflösung des Thrombus hat und ebenfalls können von Natur aus bei der verwendeten Spezies nicht vorhandene humane Gene in das Genom des Versuchstiers eingefügt werden und deren Rolle bei der Thrombusbildung untersucht werden.

Ein Nachteil des FeCl_3 -Verletzungsmodells ist jedoch die Unmöglichkeit, Vorgänge detailgenau zu beobachten. Zu schnell bilden sich größere zusammenhängende Thrombozytenaggregate, die in der Folge zu makroskopisch sichtbaren Komplexen anwachsen. Zell-Wand-Interaktionen sowie Zell-Zell-Interaktionen sind daher, wenn überhaupt, nur ganz im Anfangsstadium des Thrombusaufbaus zu beobachten. Sollen daher Untersuchungen auf Zellebene stattfinden und vor allem die Interaktion von Thrombozyten mit der verletzten Gefäßwand näher beobachtet werden, ist es ratsam, andere Methoden der Wandverletzung zu wählen, bzw. zusätzlich durchzuführen. Bei der Fadenligatur als rein mechanische Methode scheinen freiwerdende Chemokine nur in unmittelbarer Wandnähe wirksam zu werden und führen daher zur Anlagerung von Thrombozyten an die verletzte Matrix und zu einer Bildung von Thrombozytenaggregaten, die ebenfalls nur an den verletzten Wandbereichen lokalisiert sind und nicht weit ins Gefäßlumen hervorragen. Hier können bei Gruppenvergleichen die Geschwindigkeit und Stärke des Aufbaus solcher Aggregate ausgewertet werden und die Haftung der Aggregate

an der freiliegenden Matrix direkt untersucht werden, da über einige Minuten ein Gleichgewicht zwischen sich aufbauenden Thromben und sich von der Wand ablösenden und mit dem Blut abschwimmenden Thromben beobachtet werden kann.

Bei den Versuchen zu den oben aufgeführten Projekten war im Thrombosemodell der Carotis-Ligatur oftmals keine starke Thrombusbildung zu beobachten. Wenn die Wirkung von Substanzen getestet werden soll, für die aus *in vitro* Versuchen keine sehr großen Effekte zu erwarten sind, ist ein Modell notwendig, bei dem auch feinere Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen sicher erkannt werden können. Die Verwendung des FeCl₃-Modells als ausschließliches Modell für diesen Zweck schränkt den Erkenntnisgewinn ein, da die Wirkmechanismen bei den verschiedenen Thrombosemodellen etwas unterschiedlich sind.

Es wurde daher ein Modell gesucht, das zwar auf den Prinzipien des Ligaturmodells basiert, jedoch eine Verstärkung der Thrombusbildung und damit eine bessere Verdeutlichung von Gruppenunterschieden ermöglicht. Außerdem sollte das zu entwickelnde Modell die im realen Krankheitsgeschehen der Atherosklerose herrschenden Bedingungen besser widerspiegeln als das bisher verwendete Ligaturmodell.

Als zusätzlichen Faktor zur Verletzung des Endothels wurde daher eine postläsionale Stenose erzeugt, welche die Strömungseigenschaften des Blutes dergestalt veränderte, dass sie den im Krankheitsgeschehen der Atherosklerose herrschenden ähnlicher wurden. An einer Engstelle steigt die Flussgeschwindigkeit des Bluts an, wobei der Druck distal der Engstelle im Vergleich zu proximal der Engstelle absinkt. Zusätzlich bilden sich distal der Engstelle Wirbel, die Strömung wird turbulent (Herman 2007).

Um eine Stenose zu erzeugen, die deutliche strömungsdynamische Veränderungen des Blutstroms verursachte und trotzdem eine Auswertung der entstehenden Thromben an der Verletzungsstelle erlaubte, wurden als Platzhalter Fadenstücke mit unterschiedlichem Durchmesser verwendet. Zu dicke Fäden erzeugten beim Entfernen eine zu geringe Lumeneinengung und veränderten den Blutstrom nur unwesentlich. Im IVM-Bild waren dabei sowohl die grün fluoreszierenden Thrombozyten, wie auch einige rot fluoreszierende kernhaltige Blutzellen zu erkennen und vermittelten eine Vorstellung von den Strömungsverhältnissen im Gefäßlumen. Poststenotische Turbulenzen traten nach

Verwendung eines Fadens der Stärke 4-0 auf, wobei der Effekt mit einem Faden der Stärke 5-0 noch etwas deutlicher wurde. Die resultierende darstellbare Fläche war mit dieser Stenose gerade noch für eine Aufnahme und Auswertung geeignet. Dünnere Fäden als Platzhalter wurden nicht getestet, da mit dem Faden der Stärke 5-0 die darstellbare Fläche der Gefäßwand im Stenosebereich schon sehr klein wurde und eine weitere Verringerung dieser Fläche voraussichtlich keine gute Auswertung der Thrombusbildung mehr erlaubt hätte.

Es wurde erwartet, dass der im Versuch am mikroskopischen Bild messbare Stenosedurchmesser weitestgehend exakt dem Durchmesser des als Platzhalter verwendeten Fadens entsprach, was jedoch nicht bestätigt werden konnte. Aufgrund der geringen Anzahl der bisher durchgeführten Versuche mit diesem Modell kann diese Aussage jedoch nicht statistisch gestützt werden. Eine Ursache für die beobachtete Varianz der gemessenen Durchmesser könnte das Vorliegen nicht exakt kreisförmiger Gefäßquerschnitte während der Messung sein. Durch die ausschließlich zweidimensionale Darstellungsmethode der Intravitalmikroskopie ist es möglich, dass ein Gefäß im Strahlengang nicht immer exakt zylinderförmig ist, die dargestellte Breite des Blutgefäßes also nicht immer dem Durchmesser des Gefäßes entspricht. Je nach Verformungsrichtung kann das Gefäß daher einen leicht hochovalen Querschnitt aufweisen (längere Achse parallel zum Strahlengang, gemessener kleiner als realer Gefäßdurchmesser), oder aber sich queroval darstellen (längere Achse orthogonal zum Strahlengang, gemessener größer als realer Gefäßdurchmesser), oder auch jede Ausrichtung zwischen diesen beiden Extremen einnehmen. In diesen Fällen wird der am mikroskopischen Bild gemessene Gefäßdurchmesser deutliche Unterschiede aufweisen, auch wenn sich die Querschnittsfläche eventuell nicht signifikant unterscheidet. Die Querschnittsfläche ist am größten, wenn sie kreisförmig ist. Je stärker sich die beiden Achsen bei einer ovalen Fläche unterscheiden, desto geringer wird die Fläche. Bei der Verwendung von Fäden zur Ligatur und anschließenden Aufrechterhaltung der Stenose wird eine exakte Kreisform des Gefäßquerschnitts nicht in jedem Fall zu erreichen sein. Wird eine solche Form angestrebt, muss nach anderen Möglichkeiten für die Einengung des Blutgefäßes gesucht werden. Denkbar wäre dabei die Verwendung verschiedener Manschetten, wie sie in Kapitel 2.4 kurz beschrieben wurden. Da die in der Literatur beschriebenen und für diesen Zweck

verwendeten Manschetten jedoch nicht transparent genug sind, um einen weitestgehend ungehinderten Blick durch die Manschette auf das Geschehen im Inneren des Blutgefäßes zu erlauben, ist zum momentanen Zeitpunkt die Verwendung von dünnen transparenten Fäden der erfolgversprechendste Ansatz.

Bei den bisherigen Untersuchungen mit diesem neuen Verletzungsmodell bestätigte sich die Machbarkeit und es war tatsächlich eine leicht verstärkte Thrombusbildung zu beobachten. Es fiel auf, dass sich vor allem die Dauer, bis ein Abbau der bestehenden Thromben über einen Neuaufbau überwog, deutlich verlängerte. Eine Intensitätskurve über die Zeit wies daher ein höheres Maximum auf und ein gestreckteres Profil im Vergleich zu der einer üblichen Messung im Ligaturmodell.

Ein möglicher Nachteil des Stenosemodells gegenüber dem bisherigen Ligaturmodell könnte die geringere Detailgenauigkeit bei der Beobachtung von einzelnen Thrombozyten sein. Im Stenosebereich lagen häufig Falten in der Gefäßwand vor, welche durch ihre Duplikatur eine erhöhte Eigenfluoreszenz aufwiesen gegenüber der glatten Gefäßwand; und außerdem überdeckte der Ligaturfaden Teile des auszuwertenden Bereichs und verzerrte durch seine runde Form trotz seiner Transparenz das aufgenommene Bild. Sehr kleine Strukturen, die sich direkt unterhalb des Ligaturfadens befanden, erschienen durch den Lupeneffekt geringfügig vergrößert. Trotz dieser Nachteile waren die erhaltenen Aufnahmen auswertbar.

Es könnte aus diesen Gründen jedoch nützlich sein, eine Fragestellung an beiden Modellen und zusätzlich im FeCl_3 -Modell zu untersuchen, um alle Aspekte der (patho-) physiologischen Vorgänge bei der Thrombusbildung ausreichend abzubilden und ein tieferes Verständnis von der Signalübertragung und Ligand-Rezeptor-Interaktionen zu erhalten.

Dieses Verletzungsmodell wurde im Rahmen dieser Arbeit erst entwickelt und noch in keinem realen Versuchsaufbau verifiziert. Die beschriebenen Beobachtungen konnten bisher nur an den wenigen Tieren gemacht werden, die während der Etablierung und Verfeinerung des Modells verwendet wurden. Die hier gewonnenen Erkenntnisse sollten daher in späteren Projekten überprüft und validiert werden.

Das neue Modell scheint zum jetzigen Zeitpunkt jedoch durchaus geeignet, für Fragestellungen eingesetzt zu werden, in denen die Mechanismen des Ligaturmodells zum Einsatz kommen sollen, bei denen die zu untersuchenden Substanzen oder genetischen Mutationen jedoch voraussichtlich nur einen gering ausgeprägten Effekt auf die Thrombusbildung haben werden und damit die Gruppenunterschiede eher klein sein werden. Hier kann das Ligaturmodell mit Reststenose zu einer Steigerung der Effektgröße und damit des Gruppenunterschieds führen. Dann können mit großer Wahrscheinlichkeit signifikante Ergebnisse schon mit geringerer Gruppengröße erzielt werden. In diesem Fall ist die Entwicklung dieses neuen Modells ein „*Refinement*“ im Sinne der 3R welches in der Folge, durch die Senkung der benötigten Tierzahl, zu einer „*Reduction*“ im Sinne der 3R führen kann.

Ob eine Fragestellung mit dem FeCl₃-Modell oder mit einem der ligaturbasierten Modelle bearbeitet wird, oder ob beide Modelle zum Einsatz kommen müssen, hängt im Wesentlichen davon ab, in welchen Schritt der Thrombusbildung die zu untersuchende Substanz oder die zu untersuchende Rezeptor-Ligand-Bindung eingreift. Spielt hier in erster Linie die Interaktion von Thrombozyten mit der freiliegenden Gefäßwandmatrix und wandnahen Gerinnungsfaktoren eine Rolle, wird man sich eher für ein ligaturbasiertes Modell entscheiden. Ist vor allem die Bindung von Thrombozyten untereinander und damit der Aufbau eines stabilen Thrombus von Interesse, wobei im Blut gelöste Gerinnungsfaktoren eine wesentliche Rolle spielen, ist sicherlich eher die Verletzung der Gefäßwand mit FeCl₃ das Modell der Wahl.

Hier die richtige Auswahl zu treffen und damit Versuche zu vermeiden, die unzureichende Informationen liefern werden, ist ein wichtiger Bestandteil einer guten Versuchsplanung, welche letztlich Zeit und Geld spart und unnötiges Tierleid vermeiden kann. Eine sorgfältige Versuchsplanung kann daher auch ein „*Refinement*“ sein, welches zu einer „*Reduktion*“ der zur Klärung der Fragestellung notwendigen Versuche führen kann.

Laser Doppler *Imaging* als Alternative zur Intravitalmikroskopie

Zusätzlich zur weit verbreiteten Methode der Intravitalmikroskopie für Untersuchungen des Thrombusaufbaus wurden im Rahmen dieser Arbeit auch einige Experimente mit der Laser-

Doppler-Flussmessung durchgeführt. Es sollte geprüft werden, ob diese Methode Vorteile gegenüber der Messung mit dem Intravitalmikroskop besitzt.

Es handelt sich hier um eine nicht invasive Methode, die für die Untersuchung des Blutflusses an oder dicht unter der Hautoberfläche konzipiert wurde. Sie wurde hier zur Messung des Blutflusses in einem frei gelegten Blutgefäß verwendet.

Mit dem eingesetzten Gerät Moor LD12 war es möglich, den Gesamtfluss durch die Arterie zu ermitteln, höher auflösende Bilder konnten jedoch nicht aufgezeichnet werden. Das Gerät lieferte demnach keine Information über die Lokalisation und Größe des Thrombus innerhalb des Blutgefäßes. Auch die zeitliche Auflösung war bei diesem Verfahren gering. Das Gerät brauchte etwa 30 Sekunden, um ein Bild des gewählten Gefäßabschnitts aufzunehmen und sich danach zur Aufnahme des nächsten Bildes wieder bereit zu machen. Kurzfristige Änderungen des Flusses konnten also nicht oder nur ungenügend genau wahrgenommen werden. Mit der Definition von kleineren ROIs und damit der Abbildung von nur einem kurzen Abschnitt des sichtbaren Blutgefäßes könnte die Bildfrequenz jedoch möglicherweise noch etwas erhöht werden. Verwendet wurde das Moor LD12 für Experimente im FeCl₃-Modell. Während des Thrombusaufbaus änderte sich hierbei der Fluss nicht signifikant, erst kurz vor dem Verschluss der Arterie stieg er kurzfristig an um dann auf einen niedrigen Wert abzufallen. Dieser Zeitpunkt war mit Hilfe der Laser-Doppler-Flussmessung gut zu ermitteln, wobei er aufgrund der zeitlichen Auflösung nur auf ± 30 Sekunden genau angegeben werden konnte. Zur Ermittlung der Verschlusszeit im FeCl₃-Modell ist die Flussmessung mit dem Moor LD12 daher gut geeignet und eine wertvolle Alternative zur Intravitalmikroskopie, da es mit dieser oft schwierig sein kann, den Moment des Verschlusses anhand der Videoaufnahme genau zu ermitteln.

Außer der Verschlusszeit konnte aus den Diagrammen der Messwerte über der Zeit als weitere Größe die Anzahl der Verschlüsse in einem gewissen Zeitintervall abgelesen werden. Sie kann als Maß für die Stabilität des entstandenen Thrombus verwendet werden. Ist der Thrombus sehr instabil, verschließt sich das Blutgefäß nur sehr kurz (< 1 min), öffnet sich anschließend wieder und verschließt sich häufig erneut. Eine solche Dynamik ist bei der Intravitalmikroskopie zwar zu auch zu sehen, aber es ist hier wesentlich schwieriger, die jeweiligen Zeitpunkte zweifelsfrei zu bestimmen, wann der Fluss sistiert.

Eine versuchsweise Messung des Flusses für das Ligaturmodell zeigte keine signifikante Änderung des Flusses im Versuchsverlauf. Das lag einerseits daran, dass die kleinen wandständigen Thromben keine deutliche Änderung des Flusses hervorriefen und andererseits auch an der geringen zeitlichen Auflösung des Messverfahrens. Die thrombusbildenden Vorgänge bei diesem Modell laufen im Wesentlichen in den ersten beiden Minuten nach Beginn der Messung ab. Mit der Flussmessung ließen sich jedoch in dieser Zeit maximal 4 Bilder aufnehmen, was für eine detaillierte Wahrnehmung einer Änderung des Flusses nicht ausreichend zu sein scheint.

Bei der Entwicklung der modifizierten Ligaturmethode mit Reststenose wurde bisher noch keine Laser-Doppler-Flussmessung durchgeführt. Es wurde erwartet, dass das Ergebnis dieser Messung in etwa dem der Ligaturmethode ohne Reststenose entsprechen würde. Durch den nur moderat veränderten Gefäßquerschnitt war eine weitestgehend ungehinderte Bewegung des Blutstroms möglich und die nicht sehr stark ausgeprägten poststenotischen Turbulenzen, die bei diesem Modell auftraten, hätten vermutlich aufgrund der geringen räumlichen und zeitlichen Auflösung des Gerätes nicht nachgewiesen werden können. Dennoch wäre es sinnvoll, zu einem späteren Zeitpunkt zu überprüfen, ob diese Annahme korrekt ist, oder ob die Laser-Doppler-Flussmessung für das Stenose-Modell doch eine wertvolle Alternative zur Intravitalmikroskopie darstellen könnte.

Die Untersuchung mittels Flussmessung mit dem Moor LD12 stellte sich als sehr geeignet für das Verletzungsmodell mit FeCl_3 heraus, wohin gegen eine Untersuchung mit dieser Methode für die Ligaturmodelle nicht sinnvoll erschien.

Für Versuche im FeCl_3 -Modell bot die Flussmessung daher einige Vorteile. Ist der Wissenschaftler nur an einer möglichst objektiven Bestimmung der Verschlusszeit und gegebenenfalls Anzahl und Dauer der Verschlüsse interessiert, ist sie eine interessante Alternative zur Intravitalmikroskopie und kann durch das Ermöglichen einer objektiveren Auswertung durchaus als „*Refinement*“ im Sinne der 3R gesehen werden. Den Nachteil der geringen zeitlichen und räumlichen Auflösung werden vermutlich zukünftige Generationen dieser Technik nicht mehr im gleichen Maße besitzen. Jedoch muss bei dieser Messmethode auf Zusatzinformationen verzichtet werden, die die direkte Beobachtung der Thrombusbildung in der Intravitalmikroskopie möglicherweise liefern kann.

Als weitere Alternative, eine Thrombusbildung in der *A. carotis communis* nachzuweisen und sichtbar zu machen, könnte zukünftig auch die hochauflösende Doppler-Sonographie in Frage kommen. Für ultrasonographische Untersuchungen an Mäusen und anderen kleinen Labortieren sind inzwischen Geräte kommerziell verfügbar, die mit kleinen Schallköpfen und Frequenzen von 10 MHz bis zu 70 MHz arbeiten und sich unter anderem für die Echokardiographie bewährt haben. Es sollte überprüft werden, in wie weit eine Thrombusbildung innerhalb eines frei gelegten Blutgefäßes erkannt werden kann, der Verlauf sichtbar wird und mit der Doppler-Funktion auch Änderungen des Blutflusses nachgewiesen werden können. Eventuell könnte die Doppler-Sonographie einige der Vorteile der Intravitalmikroskopie und des Laser-Doppler-*Imaging* vereinen und somit eine wertvolle Alternative zu beiden Methoden darstellen.

5 Zusammenfassung

Ein tiefes Verständnis der Blutgerinnung und Thrombusbildung ist von großer Bedeutung für die Wissenschaft, da eine Störung der physiologischen Blutgerinnung zu einer erhöhten Blutungsneigung führen kann. Eine überschießende Blutgerinnung oder eine Thrombusbildung, die nicht notwendig ist, um eine Blutung zu verhindern, kann jedoch ebenfalls Probleme verursachen, welche in der Folge zu lebensbedrohlichen Zuständen führen können. Genaue Kenntnisse über die Abläufe bei diesen Prozessen helfen bei der Entwicklung von Wirkstoffen, die in die ein oder andere Richtung dabei helfen können, den physiologischen Zustand wiederherzustellen, oder die auch präventiv bei Risikopatienten eingesetzt werden können. Untersuchungen zu diesem Thema werden seit vielen Jahren durchgeführt, aber noch sind nicht alle Zusammenhänge restlos verstanden.

Um die Mechanismen bei der Bildung von Thromben in venösen und arteriellen Blutgefäßen zu untersuchen, kommen verschiedenste Methoden zum Einsatz. Jede dieser Methoden ist in der Lage, einen Teil der physiologisch ablaufenden Prozesse nachzustellen und kann damit zur Klärung von Fragestellungen in diesem Bereich beitragen. *In vitro* können einige Fragestellungen zur Rolle von an der Blutgerinnung beteiligten Zellen, ihren Rezeptoren und deren Liganden beantwortet werden, viele Vorgänge sind jedoch so komplex, dass sie nur im lebenden Organismus ausreichend gut untersucht werden können. Auch hierfür stehen mehrere unterschiedliche Modelle zur Verfügung, bei denen die Art des Blutgefäßes, die Art der Auslösung der Thrombusbildung, die Methode, diese messbar zu machen und die Messung und Auswertung selbst variiert werden.

Es ist dabei notwendig, Methoden zu wählen, die gute, reproduzierbare und signifikante Ergebnisse liefern, beim Einsatz von möglichst geringen Tierzahlen. Eine Senkung der Tierzahlen im Sinne der 3R (*Replace – Reduce – Refine*) ist daher ein wichtiges Ziel bei der Entwicklung neuer Versuchsmethoden und bestehende Methoden sollten immer wieder im Hinblick auf ihre Sinnhaftigkeit und ihren Nutzen hinterfragt werden. Dabei ist es notwendig, den Einsatz bestimmter Methoden auf spezifische Fragestellungen anzupassen, um möglichst aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche, bereits bewährte Methoden verglichen, die eine Thrombusbildung in der *A. carotis communis* auslösen. Außerdem wurde eine dieser Methoden noch weiterentwickelt, um eine ausgeprägtere Thrombusbildung auch bei geringem Stimulus zu erreichen, größere Gruppenunterschiede zu erhalten und damit langfristig zu einer Senkung der benötigten Tierzahl beizutragen. Auf diese Weise entstand ein weiteres Modell zur Untersuchung der Thrombusbildung. Die Datenerhebung und Auswertung wurden ebenfalls mit verschiedenen Methoden durchgeführt. Ziel der Untersuchungen war es unter anderem auch, die Stärken und Schwächen der verwendeten Methoden zu beleuchten und es damit zu ermöglichen, passende Einsatzgebiete zu identifizieren.

Konkret kamen als Verletzungsmethoden zu einer Induktion der Thrombusbildung in der *A. carotis communis* einerseits eine chemische Verletzung der Gefäßwand durch FeCl_3 zum Einsatz und andererseits die temporäre straffe Ligatur der Arterie mit einem Faden. Die durch diese Methoden erzeugten Endothelverletzungen waren unterschiedlicher Natur und hatten daher eine deutlich unterschiedliche Thrombusbildung an der verletzten Gefäßwand zur Folge. Nach einer Verletzung mit FeCl_3 bildeten sich bei ansonsten physiologischen Verhältnissen weitestgehend stabile Thromben, die in der Lage waren, das Blutgefäß nach einigen Minuten komplett zu verschließen. Ein Verschluss des Gefäßes wurde nach einer Verletzung durch Fadenligatur nicht beobachtet. Vielmehr bildeten sich hier einzelne kleinere Thromben an der verletzten Gefäßwand, die das Lumen des Blutgefäßes nicht wesentlich verringerten. Diese Thromben rissen oft ab und wurden an gleicher Stelle durch neue Thromben ersetzt, bis nach einigen Minuten der Abbau überwog und zum Ende der Messung keine Thromben mehr nachweisbar waren.

Als Weiterentwicklung der Ligaturmethode wurde ein Modell entwickelt, das nach dem Öffnen der Ligatur eine Stenose an der verletzten Stelle des Blutgefäßes simulierte. Dazu wurde die *A. carotis communis* gemeinsam mit einem Platzhalter ligiert und später der Platzhalter zum Wiederherstellen des Blutflusses entfernt. Der Ligaturfaden verblieb am Gefäß und engte das Lumen auf eine feste Querschnittsfläche ein, die geringer war als die ursprüngliche Querschnittsfläche der Arterie. Durch diese Stenose entstanden Turbulenzen im Blutstrom und Bereiche unterschiedlicher Flussgeschwindigkeiten, wodurch der Aufbau

und das Abschwimmen der sich bildenden Thromben beeinflusst wurden. Dies führte zu einer leicht verstärkten Thrombusbildung, einem langsameren Abbau und dadurch zu einer längeren Nachweisbarkeit von Thromben am verletzten Gefäßwandabschnitt.

Als Messmethoden wurden die Intravitalmikroskopie und die Laser-Doppler-Flussmessung verglichen, wobei letztere nur bei der FeCl₃-Methode ein gutes Ergebnis lieferte, da bei der Ligaturmethode keine messbaren Flussunterschiede vorlagen. Das Stenose-Modell wurde im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich mit Intravitalmikroskopie untersucht, welche sich für alle Verletzungsmethoden gut eignete, um die Vorgänge sichtbar zu machen. Als Nachteil dieser Messmethode stellte sich jedoch die hohe Fehleranfälligkeit und die oft sehr subjektive Auswertung der Daten heraus. Für die FeCl₃-Methode erwies sich daher die Flussmessung in Bezug auf die Objektivität als der Intravitalmikroskopie überlegen.

Außerdem wurden für jedes Verletzungsmodell und jede Messmethode Möglichkeiten der Auswertung der erhobenen Daten diskutiert, wobei jede Vorgehensweise Vor- und Nachteile hatte und vor allem für die Kombination Fadenligatur/IVM eine objektive Auswertung schwierig war.

Durch die Entwicklung des Stenose-Modells im Rahmen dieser Arbeit steht in Zukunft ein Modell zur Verfügung, das möglicherweise als *Refinement* des Ligaturmodells gesehen werden kann und helfen kann, unter bestimmten Versuchsbedingungen Tierzahlen einzusparen („*Reduce*“ im Sinne der 3R).

Auch über die Auswahl des korrekten Modells für eine bestimmte Fragestellung kann schon während einer Versuchsplanung ein *Refinement* erzielt werden. Es wurden daher mit Hilfe der Charakteristika der verschiedenen Verletzungsmodelle Anhaltspunkte gefunden, die eine solche Auswahl erleichtern können.

6 Summary

A deep understanding of blood clotting and thrombus formation is of great importance for science, as a disorder of physiological blood clotting can lead to an increased risk for bleeding. Excessive blood clotting or a thrombus formation that is not intended to prevent bleeding, can also cause problems leading to life-threatening conditions. Deep knowledge about those processes is useful for the development of active substances that can help to prevent or enhance thrombus formation in order to restore the physiological state or that can also be used preventively in high-risk patients. Studies on this topic have been carried out for many years, but not all influencing factors are fully understood yet.

Various methods are used to investigate the processes involved in the formation of thrombi in venous and arterial blood vessels. Each of these methods is able to reproduce a part of the physiological processes and can thus contribute to the clarification of questions in this field. *In vitro*, several questions on the role of cells involved in blood coagulation, their receptors and their ligands can be answered, but many processes are so complex that they can only be investigated sufficiently well in living organisms. Several different models are available to do this, in which the type of blood vessel, the type of triggering the thrombus formation, the method of making the thrombus formation measurable and the measurement and evaluation itself can be varied.

It is necessary to choose methods that provide good, reproducible and significant results using the lowest possible number of animals. A reduction of animal numbers in the sense of the 3R (Replace - Reduce - Refine) is therefore an important goal in the development of new experimental methods and existing methods should be questioned regularly with regard to their usefulness. It is necessary to adapt the use of certain methods to specific questions in order to obtain meaningful results.

In the present study two different, well established methods were compared, which cause thrombus formation in the carotid artery. In addition, one of these methods was further developed in order to achieve a reliable thrombus formation even with low stimulus, to obtain larger group differences and thus contribute to a reduction of the required number of

animals in the long term. This resulted in an additional model for the investigation of thrombus formation. Data collection and evaluation were also carried out using various methods. Among other things, the aim of the study was to shed light on the strengths and weaknesses of the methods used and thus make it possible to identify suitable areas of application.

Specifically, the injury methods used to induce thrombus formation in the common carotid artery were, on the one hand, a chemical injury of the vessel wall by FeCl_3 and, on the other hand, the temporary tight ligation of the artery with a suture thread. The endothelial injuries caused by these methods were of different nature and therefore resulted in significantly different thrombus formation on the injured vessel wall. After an injury with FeCl_3 , stable thrombi were formed under otherwise physiological conditions, which were able to completely occlude the blood vessel after a few minutes. Occlusion of the vessel was not observed after an injury by thread ligation. Instead of this, more isolated smaller thrombi formed on the injured vessel wall, which did not significantly reduce the lumen of the blood vessel. These thrombi often tore off and were replaced by new thrombi at the same site, until after a few minutes the degradation prevailed and no more thrombi were detectable at the end of the measurement.

As a further development of the ligation method, a model was developed that simulated a stenosis at the injured site of the blood vessel after opening the ligation. For this purpose, the carotid artery was ligated together with a placeholder and the placeholder was removed later on to restore the bloodflow. The ligation thread remained on the vessel and narrowed the lumen to a fixed cross-sectional area that was smaller than the original cross-sectional area of the artery. This stenosis caused turbulences in the bloodstream and areas of varying flow velocities, affecting the build-up and degradation of the thrombus. This led to a slightly increased thrombus formation, a slower degradation and thus to a longer detectability of thrombus at the injured vessel wall section.

Intravital microscopy and Laser Doppler flow measurement were compared as measurement methods, with the latter providing a good result only for the FeCl_3 method, since there were no measurable flow differences in the ligation method. The stenosis model was examined in this work exclusively with intravital microscopy, which is suitable for all injury methods to

make the processes visible. However, the disadvantage of this measuring method was the high susceptibility to errors and the often very subjective evaluation of the data. Therefore, for the FeCl₃ method, flow measurement proved to be superior to intravital microscopy in terms of objectivity.

In addition, for each injury model and each measurement method, possibilities for evaluating the collected data were discussed, whereby each procedure had advantages and disadvantages and objective evaluation was difficult especially for the thread ligation in combination with IVM.

With the development of the stenosis model within this project, a model will be available in the future that may possibly be seen as a refinement of the ligation model and may help to reduce the number of animals under certain experimental conditions ("reduction" in the sense of the 3Rs).

Refinement can also be achieved by selecting the correct model for a particular problem during the experimental design phase. Therefore, the characteristics of the different injury models were used to find indications that can facilitate such a selection.

7 Literaturverzeichnis

- Abdulmahdi, W., M. M. Rabadi, E. Jules, Y. Marghani, N. Marji, J. Leung, F. F. Zhang, A. Siani, T. Siskind, K. Vedovino, N. Chowdhury, M. Sekulic und B. B. Ratliff (2018). "Kidney dysfunction in the low birth weight murine adult: implications of oxidative stress." Am J Physiol Renal Physiol.
- Aslan, J. E., A. Itakura, J. M. Gertz und O. J. McCarty (2012). "Platelet shape change and spreading." Methods Mol Biol **788**: 91-100.
- Atherton, A. und G. V. Born (1972). "Quantitative investigations of the adhesiveness of circulating polymorphonuclear leucocytes to blood vessel walls." J Physiol **222** (2): 447-474.
- Aurich, K., M. C. Spoerl, B. Furll, R. Sietmann, A. Greinacher, N. Hosten und W. Weitschies (2012). "Development of a method for magnetic labeling of platelets." Nanomedicine **8** (5): 537-544.
- Baaten, C. C. F. M. J., M. Meacham, S. M. de Witt, M. A. H. Feijge, D. J. Adams, J.-W. N. Akkerman, J. M. E. M. Cosemans, L. Grassi, S. Jupe, M. Kostadima, N. J. A. Mattheij, M. H. Prins, R. Ramirez-Solis, O. Soehnlein, F. Swieringa, C. Weber, J. K. White, W. H. Ouwehand und J. W. M. Heemskerk (2018). "A synthesis approach of mouse studies to identify genes and proteins in arterial thrombosis and bleeding." Blood **132** (24): e32-e46.
- Baker, G. R., P. M. Sullam und J. Levin (1997). "A simple, fluorescent method to internally label platelets suitable for physiological measurements." Am J Hematol **56** (1): 17-25.
- Barthels, M. (2008). "Gerinnungsdiagnostik." Hämostaseologie **28**: 320-334.
- Bonnard, T. und C. E. Hagemeyer (2015). "Ferric Chloride-induced Thrombosis Mouse Model on Carotid Artery and Mesentery Vessel." J Vis Exp (100): e52838.
- Brill, A., T. A. Fuchs, A. K. Chauhan, J. J. Yang, S. F. De Meyer, M. Kollnberger, T. W. Wakefield, B. Lammle, S. Massberg und D. D. Wagner (2011). "von Willebrand factor-mediated platelet adhesion is critical for deep vein thrombosis in mouse models." Blood **117** (4): 1400-1407.
- Buddecke, E. (2007). Pathobiochemie der Arterienwand. Handbuch der Angiologie. Arterien-, Venen- und Lymphgefäßerkrankungen in Klinik und Praxis. M. Marshall, F. X. Breu, Ecomed II - 1.2.2.
- Burns, E. R. und C. Lawrence (1989). "Bleeding time. A guide to its diagnostic and clinical utility." Arch Pathol Lab Med **113** (11): 1219-1224.
- Chatterjee, M. und M. Gawaz (2017). Platelet Chemokines in New Modes of Action. Platelets, Haemostasis and Inflammation. A. Zirlik, C. Bode und M. Gawaz, Springer: 153-180.
- Cooley, B. C. (2011). "In vivo fluorescence imaging of large-vessel thrombosis in mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **31** (6): 1351-1356.

- Cooley, B. C. (2015). "Murine arterial thrombus induction mechanism influences subsequent thrombodynamics." Thromb Res **135** (5): 939-943.
- Da, Q., P. J. Derry, F. W. Lam und R. E. Rumbaut (2018). "Fluorescent labeling of endogenous platelets for intravital microscopy: Effects on platelet function." Microcirculation: e12457.
- Denis, C. V. und D. D. Wagner (2007). "Platelet adhesion receptors and their ligands in mouse models of thrombosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27** (4): 728-739.
- Eckly, A., B. Hechler, M. Freund, M. Zerr, J. P. Cazenave, F. Lanza, P. H. Mangin und C. Gachet (2011). "Mechanisms underlying FeCl₃-induced arterial thrombosis." J Thromb Haemost **9** (4): 779-789.
- Falati, S., P. Gross, G. Merrill-Skoloff, B. C. Furie und B. Furie (2002). "Real-time in vivo imaging of platelets, tissue factor and fibrin during arterial thrombus formation in the mouse." Nat Med **8** (10): 1175-1181.
- Falati, S., P. L. Gross, G. Merrill-Skoloff, D. Sim, R. Flaumenhaft, A. Celi, B. C. Furie und B. Furie (2004). "In vivo models of platelet function and thrombosis: study of real-time thrombus formation." Methods Mol Biol **272**: 187-197.
- Fujii, T., T. Shimomura, T. T. Fujimoto, A. Kimura und K. Fujimura (2000). "A new approach to detect reticulated platelets stained with thiazole orange in thrombocytopenic patients." Thromb Res **97**(6): 431-440.
- Gabella, G. (1995). Cardiovascular system. Gray's anatomy: The anatomical basis of medicine and surgery. P. L. Williams, Churchill Livingstone: 1451-1626.
- Gaertner, F. und S. Massberg (2016). "Blood coagulation in immunothrombosis - At the frontline of intravascular immunity." Seminars in Immunology **28** (6): 561-569.
- Gargiulo, S., M. Gramanzini, R. Liuzzi, A. Greco, A. Brunetti und G. Vesce (2013). "Effects of some anesthetic agents on skin microcirculation evaluated by laser Doppler perfusion imaging in mice." BMC Vet Res **9**: 255.
- Geddings, J., M. M. Aleman, A. Wolberg, M. L. von Bruhl, S. Massberg und N. Mackman (2014). "Strengths and weaknesses of a new mouse model of thrombosis induced by inferior vena cava stenosis: communication from the SSC of the ISTH." J Thromb Haemost **12** (4): 571-573.
- Haj-Hosseini, N., J. C. O. Richter, P. Milos, M. Hallbeck und K. Wardell (2018). "5-ALA fluorescence and laser Doppler flowmetry for guidance in a stereotactic brain tumor biopsy." Biomed Opt Express **9** (5): 2284-2296.
- Hartley, P. S., J. Savill und S. B. Brown (2006). "The death of human platelets during incubation in citrated plasma involves shedding of CD42b and aggregation of dead platelets." Thromb Haemost **95** (1): 100-106.

- Hattori, Y., J. Enmi, S. Iguchi, S. Saito, Y. Yamamoto, M. Tsuji, K. Nagatsuka, R. N. Kalaria, H. Iida und M. Ihara (2016). "Gradual Carotid Artery Stenosis in Mice Closely Replicates Hypoperfusive Vascular Dementia in Humans." J Am Heart Assoc **5** (2).
- Hattori, Y., J. Enmi, A. Kitamura, Y. Yamamoto, S. Saito, Y. Takahashi, S. Iguchi, M. Tsuji, K. Yamahara, K. Nagatsuka, H. Iida und M. Ihara (2015). "A novel mouse model of subcortical infarcts with dementia." J Neurosci **35** (9): 3915-3928.
- Heger, M., Salles, II, W. van Vuure, H. Deckmyn und J. F. Beek (2009). "Fluorescent labeling of platelets with polyanionic fluorescein derivatives." Anal Quant Cytol Histol **31** (4): 227-232.
- Heinle, H. (2007). Physiologie und Pathophysiologie der Arterien. Handbuch der Angiologie. Arterien-, Venen- und Lymphgefäßerkrankungen in Klinik und Praxis. M. Marshall, F. X. Breu, Ecomed II - 1.2.
- Herman, I. P. (2007). Cardiovascular System. Physics of the Human Body. I. P. Herman, Springer: 445-524.
- Herr, N., M. Mauler, C. Bode und D. Duerschmied (2015). "Intravital Microscopy of Leukocyte-endothelial and Platelet-leukocyte Interactions in Mesenterial Veins in Mice." J Vis Exp (102): e53077.
- Hoff, E. I., M. G. oude Egbrink, V. V. Heijnen, H. W. Steinbusch und R. J. van Oostenbrugge (2005). "In vivo visualization of vascular leakage in photochemically induced cortical infarction." J Neurosci Methods **141** (1): 135-141.
- Hofmann, J., U. Till, B. Hofmann, E. Michel und M. Quiess (1979). "The use of acridine orange for testing blood platelet integrity." Acta Biol Med Ger **38** (8): 1149-1157.
- Hop, M. J., J. Hiddingh, C. Stekelenburg, H. C. Kuipers, E. Middelkoop, M. K. Nieuwenhuis, S. Polinder, M. E. van Baar und L. D. I. s. group (2013). "Cost-effectiveness of laser Doppler imaging in burn care in the Netherlands." BMC Surg **13**: 2.
- Hourdille, P., P. Fialon, F. Belloc, M. R. Boisseau und J. M. Andrieu (1982). "Mepacrine labelling test and uranaffin cytochemical reaction in human megakaryocytes." Thromb Haemost **47** (3): 232-235.
- Ingberg, E., H. Dock, E. Theodorsson, A. Theodorsson und J. O. Strom (2018). "Effect of laser Doppler flowmetry and occlusion time on outcome variability and mortality in rat middle cerebral artery occlusion: inconclusive results." BMC Neurosci **19** (1): 24.
- Jelkmann, W. (2019). Allgemeine Eigenschaften des Blutes. Physiologie des Menschen. R. Brandes, F. Lang, R. F. Schmidt, Springer: 285-305.
- Jenne, C. N., C. H. Wong, B. Petri und P. Kubes (2011). "The use of spinning-disk confocal microscopy for the intravital analysis of platelet dynamics in response to systemic and local inflammation." PLoS One **6** (9): e25109.

- Jing, Y., F. Bai, H. Chen und H. Dong (2018). "Using Laser Doppler Imaging and Monitoring to Analyze Spinal Cord Microcirculation in Rat." J Vis Exp (135).
- Jy, W., Y. S. Ahn, N. Shanbaky, L. F. Fernandez, W. J. Harrington und D. H. Haynes (1987). "Abnormal calcium handling by platelets in thrombotic disorders." Circ Res **60** (3): 346-355.
- Jy, W. und D. H. Haynes (1987). "Thrombin-induced calcium movements in platelet activation." Biochim Biophys Acta **929** (1): 88-102.
- Kaariainen, M., E. Halme und J. Laranne (2018). "Modern postoperative monitoring of free flaps." Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.
- Kaspers, B. und T. Göbel (2005). Blutstillung und Blutgerinnung. Physiologie der Haustiere. W. B. von Engelhardt, G. Breves, Enke Verlag: 212-219.
- Kernick, D. P. und A. C. Shore (2000). "Characteristics of laser Doppler perfusion imaging in vitro and in vivo." Physiol Meas **21** (2): 333-340.
- Klaverkamp, J. und K. P. Volkl (1984). "Maintenance of platelet viability after platelet-labeling with fluorescein isothiocyanate." Haemostasis **14** (4): 337-346.
- Koltai, K., G. Kesmarky, G. Feher, A. Tibold und K. Toth (2017). "Platelet Aggregometry Testing: Molecular Mechanisms, Techniques and Clinical Implications." Int J Mol Sci **18** (8).
- Kuijpers, M. J. und J. W. Heemskerk (2012). "Intravital imaging of thrombus formation in small and large mouse arteries: experimentally induced vascular damage and plaque rupture in vivo." Methods Mol Biol **788**: 3-19.
- Kulikov, D., A. Glazkov, A. Dreval, Y. Kovaleva, D. Rogatkin, A. Kulikov und A. Molochkov (2018). "Approaches to improve the predictive value of laser Doppler flowmetry in detection of microcirculation disorders in diabetes mellitus." Clin Hemorheol Microcirc.
- Kumar, A. und V. Lindner (1997). "Remodeling with neointima formation in the mouse carotid artery after cessation of blood flow." Arterioscler Thromb Vasc Biol **17** (10): 2238-2244.
- Kummer, W., U. Welsch (2018). Organe des Kreislaufs und Lymphgefäße. Histologie. Das Lehrbuch. U. Welsch, W. Kummer, T. Deller, Elsevier: 245-272.
- Kurz, K. D., B. W. Main und G. E. Sandusky (1990). "Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride." Thromb Res **60** (4): 269-280.
- Lee, D., K. P. Fong, M. R. King, L. F. Brass und D. A. Hammer (2012). "Differential dynamics of platelet contact and spreading." Biophys J **102** (3): 472-482.
- Li, W., T. M. McIntyre und R. L. Silverstein (2013). "Ferric chloride-induced murine carotid arterial injury: A model of redox pathology." Redox Biol **1**: 50-55.
- Liu, Y., N. L. Jennings, A. M. Dart und X. J. Du (2012). "Standardizing a simpler, more sensitive and accurate tail bleeding assay in mice." World J Exp Med **2** (2): 30-36.

- Llovera, G., S. Roth, N. Plesnila, R. Veltkamp, A. Liesz (2014). "Modeling stroke in mice: permanent coagulation of the distal middle cerebral artery." J Vis Exp (89).
- Lukowski, R., S. Weber, P. Weinmeister, S. Feil, R. Feil (2005). "Cre/loxP-vermittelte konditionale Mutagenese des cGMP-Signalwegs in der Maus." Biospektrum 3/05.
- Makarov, M. S., E. N. Kobzeva, I. V. Vysochin, N. V. Borovkova und V. T. Khvatov (2014). "Morphofunctional analysis of human platelets by vital staining." Bull Exp Biol Med **156** (3): 409-412.
- Masedunskas, A., O. Milberg, N. Porat-Shliom, M. Sramkova, T. Wigand, P. Amornphimoltham und R. Weigert (2012). "Intravital microscopy: a practical guide on imaging intracellular structures in live animals." Bioarchitecture **2** (5): 143-157.
- Masedunskas, A., N. Porat-Shliom, M. Tora, O. Milberg und R. Weigert (2013). "Intravital microscopy for imaging subcellular structures in live mice expressing fluorescent proteins." J Vis Exp (79).
- Massberg, S., M. Gawaz, S. Gruner, V. Schulte, I. Konrad, D. Zohlnhofer, U. Heinzmann und B. Nieswandt (2003). "A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo." J Exp Med **197** (1): 41-49.
- Massberg, S., I. Konrad, A. Bultmann, C. Schulz, G. Munch, M. Peluso, M. Lorenz, S. Schneider, F. Besta, I. Muller, B. Hu, H. Langer, E. Kremmer, M. Rudelius, U. Heinzmann, M. Ungerer und M. Gawaz (2004). "Soluble glycoprotein VI dimer inhibits platelet adhesion and aggregation to the injured vessel wall in vivo." FASEB J **18** (2): 397-399.
- Mizuno, M., A. Tomizawa, K. Ohno, J. A. Jakubowski und A. Sugidachi (2016). "A Novel Model of Intravital Platelet Imaging Using CD41-ZsGreen1 Transgenic Rats." PLoS One **11** (4): e0154661.
- Muthuramu, I., M. Lox, F. Jacobs, B. De Geest (2014). "Permanent ligation of the left anterior descending coronary artery in mice: a model of post-myocardial infarction remodelling and heart failure." J Vis Exp (94).
- Muzumdar, M. D., B. Tasic, K. Miyamichi, L. Li und L. Luo (2007). "A global double-fluorescent Cre reporter mouse." Genesis **45** (9): 593-605.
- Nawroth, P. P. (1997). Plasmatisches Gerinnungssystem und Fibrinolyse. Hämatologie, Onkologie. P. C. Ostendorf, S. Seeber, Urban & Schwarzenberg: 65-74.
- Niazi, Z. B., T. J. Essex, R. Papini, D. Scott, N. R. McLean und M. J. Black (1993). "New laser Doppler scanner, a valuable adjunct in burn depth assessment." Burns **19** (6): 485-489.
- Niesen, T. W. (2011). Validierung eines Flusskammer-Systems zur Messung der Plättchenadhäsion an thrombogenen Oberflächen in Abhängigkeit variabler Scherkräfte. Dr. med, Heinrich-Heine Universität.
- Niiyama, H., N. F. Huang, M. D. Rollins und J. P. Cooke (2009). "Murine model of hindlimb ischemia." J Vis Exp (23).

- Nishimura, S., I. Manabe, M. Nagasaki, K. Seo, H. Yamashita, Y. Hosoya, M. Ohsugi, K. Tobe, T. Kadowaki, R. Nagai und S. Sugiura (2008). "In vivo imaging in mice reveals local cell dynamics and inflammation in obese adipose tissue." J Clin Invest **118** (2): 710-721.
- Nosaka, M., Y. Ishida, A. Kimura, T. Kawaguchi, H. Yamamoto, Y. Kuninaka, T. Kondo (2017). "Immunohistochemical detection of intrathrombotic fibrocytes and its application to thrombus age estimation in murine deep vein thrombosis model." Int J Legal Med **131** (1): 179-183.
- Owens, A. P., 3rd, Y. Lu, H. C. Whinna, C. Gachet, W. P. Fay und N. Mackman (2011). "Towards a standardization of the murine ferric chloride-induced carotid arterial thrombosis model." J Thromb Haemost **9** (9): 1862-1863.
- Parikh, P. P., R. M. Lassance-Soares, H. Shao, M. M. Regueiro, Y. Li, Z. J. Liu und O. C. Velazquez (2018). "Intramuscular E-selectin/adeno-associated virus gene therapy promotes wound healing in an ischemic mouse model." J Surg Res **228**: 68-76.
- Petersen, L. J. (2013). "Direct comparison of laser Doppler flowmetry and laser Doppler imaging for assessment of experimentally-induced inflammation in human skin." Inflamm Res **62** (12): 1073-1078.
- Picker, S. M. (2011). "In-vitro assessment of platelet function." Transfus Apher Sci **44** (3):305-319.
- Poon, S., X. Lu, R. A. A. Smith, P. Ho, K. Bhakoo, V. Nurcombe und S. M. Cool (2018). "Improved recovery from limb ischaemia by delivery of an affinity-isolated heparan sulphate." Angiogenesis.
- Popov, E. G., Z. A. Gabbasov, I. Gavrillov, E. Pozin und A. G. Mejlumian (1987). "Accumulation and release of acridine derivatives by intact platelets." Thromb Res **47** (6): 639-645.
- Popov, E. G., A. G. Mejlumian, I. Gavrillov, Z. A. Gabbasov und E. Pozin (1988). "Evaluation of the ability of intact platelets to accumulate acridine orange." Experientia **44** (7): 616-618.
- Rand, M. L., R. Leung und M. A. Packham (2003). "Platelet function assays." Transfus Apher Sci **28** (3): 307-317.
- Renne, T., B. Nieswandt und D. Gailani (2006). "The intrinsic pathway of coagulation is essential for thrombus stability in mice." Blood Cells Mol Dis **36** (2): 148-151.
- Rhodin, J. A. G. (1980). Architecture of the vessel wall. Handbook of Physiology. The Cardiovascular System. Vascular Smooth Muscle. D. F. Bohr, A. P. Somlyo, H. V. Sparks Jr., American Physiological Society **2** (II): 1-31.
- Robinson, M., S. MacHin, I. Mackie und P. Harrison (2000). "In vivo biotinylation studies: specificity of labelling of reticulated platelets by thiazole orange and mepacrine." Br J Haematol **108** (4): 859-864.

- Roest, M., A. Reininger, J. J. Zwaginga, M. R. King, J. W. Heemskerk und S. S. C. o. t. I. Biorheology Subcommittee of the (2011). "Flow chamber-based assays to measure thrombus formation in vitro: requirements for standardization." J Thromb Haemost **9** (11): 2322-2324.
- Romagnani, P., Y. Rinkevich und B. Dekel (2015). "The use of lineage tracing to study kidney injury and regeneration." Nat Rev Nephrol **11** (7): 420-431.
- Rumbaut, R. E., D. W. Slaff und A. R. Burns (2005). "Microvascular thrombosis models in venules and arterioles in vivo." Microcirculation **12** (3): 259-274.
- Russell, W. M. S. und Burch, R. L. (1959). "The Principles of Humane Experimental Technique." London: Methuen.
- Saboor, M., Q. Ayub, S. Ilyas und Moinuddin (2013). "Platelet receptors; an instrumental of platelet physiology." Pak J Med Sci **29** (3): 891-896.
- Saboor, M., M. Moinuddin und S. Ilyas (2013). "New horizons in platelets flow cytometry." Malays J Med Sci **20** (2): 62-66.
- Sachs, U. J. und B. Nieswandt (2007). "In vivo thrombus formation in murine models." Circ Res **100** (7): 979-991.
- Sasaki, T., M. Kuzuya, X. W. Cheng, K. Nakamura, N. Tamaya-Mori, K. Maeda, S. Kanda, T. Koike, K. Sato und A. Iguchi (2004). "A novel model of occlusive thrombus formation in mice." Lab Invest **84** (11): 1526-1532.
- Sauter, R. J., M. Sauter, E. S. Reis, F. N. Emschermann, H. Nording, S. Ebenhöch, P. Kraft, P. Münzer, M. Mauler, J. Rheinländer, J. Madlung, F. Edlich, T. E. Schäffer, S. G. Meuth, D. Dürschmied, T. Geisler, O. Borst, M. Gawaz, C. Kleinschnitz, J. D. Lambris, H. F. Langer (2018). „Functional Relevance of the Anaphylatoxin Receptor C3aR for Platelet Function and Arterial Thrombus Formation Marks an Intersection Point Between Innate Immunity and Thrombosis.“ Circulation **138** (16): 1720-1735.
- Scharf, R. E. (1997). Thrombozytäres System. Hämatologie Onkologie. P. C. Ostendorf, S. Seeber, Urban & Schwarzenberg: 49-64.
- Schleicher, R. I., F. Reichenbach, P. Kraft, A. Kumar, M. Lescan, F. Todt, K. Göbel, I. Hilgendorf, T. Geisler, A. Bauer, M. Olbrich, M. Schaller, S. Wesselborg, L. O'Reilly, S. G. Meuth, K. Schulze-Osthoff, M. Gawaz, X. Li, C. Kleinschnitz, F. Edlich, H. F. Langer (2015). "Platelets induce apoptosis via membrane-bound FasL." Blood **126** (12): 1483-1493.
- Schmid-Schonbein, G. W., R. Skalak, S. Usami und S. Chien (1980). "Cell distribution in capillary networks." Microvasc Res **19** (1): 18-44.
- Schmid-Schonbein, G. W., S. Usami, R. Skalak und S. Chien (1980). "The interaction of leukocytes and erythrocytes in capillary and postcapillary vessels." Microvasc Res **19** (1): 45-70.

- Schoeman, R. M., M. Lehmann und K. B. Neeves (2017). "Flow chamber and microfluidic approaches for measuring thrombus formation in genetic bleeding disorders." Platelets **28** (5): 463-471.
- Schoeman, R. M., K. Rana, N. Danes, M. Lehmann, J. A. Di Paola, A. L. Fogelson, K. Leiderman und K. B. Neeves (2017). "A microfluidic model of hemostasis sensitive to platelet function and coagulation." Cell Mol Bioeng **10** (1): 3-15.
- Schönberger, T., D. Siegel-Axel, R. Bußl, S. Richter, M. S. Judenhofer, R. Haubner, G. Reischl, K. Klingel, G. Münch, P. Seizer, B. J. Pichler, M. Gawaz (2008). "The immunoadhesin glycoprotein VI-Fc regulates arterial remodelling after mechanical injury in ApoE^{-/-} mice." Cardiovascular Research **80** (1):131–137.
- Schönberger, T., T. Jürgens, J. Müller, N. Armbruster, C. Niermann, S. Gorressen, J. Sommer, H. Tian, G. di Paolo, J. Scheller, J. W. Fischer, M. Gawaz und M. Elvers (2014). "Pivotal role of phospholipase D1 in tumor necrosis factor- α -mediated inflammation and scar formation after myocardial ischemia and reperfusion in mice." Am J Pathol **184** (9): 2450-2464.
- Secomb, T. W. (2016). "Hemodynamics" Comprehensive Physiology **6** (2):975-1003.
- Seifalian, A. M., G. Stansby, A. Jackson, K. Howell und G. Hamilton (1994). "Comparison of laser Doppler perfusion imaging, laser Doppler flowmetry, and thermographic imaging for assessment of blood flow in human skin." Eur J Vasc Surg **8** (1): 65-69.
- Shibata, M., N. Yamasaki, T. Miyakawa, R. N. Kalaria, Y. Fujita, R. Ohtani, M. Ihara, R. Takahashi und H. Tomimoto (2007). "Selective impairment of working memory in a mouse model of chronic cerebral hypoperfusion." Stroke **38** (10): 2826-2832.
- Silverthorn, D. U. (2009). Das Blut. Physiologie. D. U. Silverthorn, Pearson Studium: 759-792.
- Singh, I., K. G. Burnand, M. Collins, A. Luttun, D. Collen, B. Boelhouwer und A. Smith (2003). "Failure of thrombus to resolve in urokinase-type plasminogen activator gene-knockout mice: rescue by normal bone marrow-derived cells." Circulation **107** (6): 869-875.
- Sperandio, M., R. Brandes (2019). Mikrozirkulation. Physiologie des Menschen. R. Brandes, F. Lang, R. F. Schmidt, Springer: 241-256.
- Srivastava, S. C. (1992). The Antibody Approach of Labeling Blood Cells. International Symposium on Radiolabeled Blood Elements. Barcelona, Spain, Medical Department, Brookhaven National Laboratory, Upton, New York 11973, USA.
- Surin, W. R., P. Prakash, M. K. Barthwal und M. Dikshit (2010). "Optimization of ferric chloride induced thrombosis model in rats: effect of anti-platelet and anti-coagulant drugs." J Pharmacol Toxicol Methods **61** (3): 287-291.
- Svedman, C., G. W. Cherry, E. Strigini und T. J. Ryan (1998). "Laser Doppler imaging of skin microcirculation." Acta Derm Venereol **78** (2): 114-118.
- Tangelder, G. J., D. W. Slaaf und R. S. Reneman (1982). "Fluorescent labeling of blood platelets in vivo." Thromb Res **28** (6): 803-820.

- Taqueti, V. R. und F. A. Jaffer (2013). "High-resolution molecular imaging via intravital microscopy: illuminating vascular biology in vivo." Integr Biol (Camb) **5** (2): 278-290.
- Tiedt, R., T. Schomber, H. Hao-Shen und R. C. Skoda (2007). "Pf4-Cre transgenic mice allow the generation of lineage-restricted gene knockouts for studying megakaryocyte and platelet function in vivo." Blood **109** (4): 1503-1506.
- Tovar-Lopez, F. J., G. Rosengarten, K. Khoshmanesh, E. Westein, S. P. Jackson, W. S. Nesbitt und A. Mitchell (2011). "Structural and hydrodynamic simulation of an acute stenosis-dependent thrombosis model in mice." J Biomech **44** (6): 1031-1039.
- Vacaru, A. M., J. Vitale, J. Nieves und M. H. Baron (2014). "Generation of transgenic mouse fluorescent reporter lines for studying hematopoietic development." Methods Mol Biol **1194**: 289-312.
- van der Meer, P. F., B. Tomson und A. Brand (2010). "In vivo tracking of transfused platelets for recovery and survival studies: an appraisal of labeling methods." Transfus Apher Sci **42** (1): 53-61.
- VanderLaan, P. A., C. A. Reardon und G. S. Getz (2004). "Site specificity of atherosclerosis: site-selective responses to atherosclerotic modulators." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24** (1): 12-22.
- Varga-Szabo, D., I. Pleines und B. Nieswandt (2008). "Cell adhesion mechanisms in platelets." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28** (3): 403-412.
- Venclauskiene, A., A. Basevicius, E. Zacharevskij, V. Vaicekauskas, R. Rimdeika und S. Lukosevicius (2014). "Laser Doppler imaging as a tool in the burn wound treatment protocol." Wideochir Inne Tech Maloinwazyjne **9** (1): 24-30.
- von Bruhl, M. L., K. Stark, A. Steinhart, S. Chandraratne, I. Konrad, M. Lorenz, A. Khandoga, A. Tirniceriu, R. Coletti, M. Kollnberger, R. A. Byrne, I. Laitinen, A. Walch, A. Brill, S. Pfeiler, D. Manukyan, S. Braun, P. Lange, J. Riegger, J. Ware, A. Eckart, S. Haidari, M. Rudelius, C. Schulz, K. Echtler, V. Brinkmann, M. Schwaiger, K. T. Preissner, D. D. Wagner, N. Mackman, B. Engelmann und S. Massberg (2012). "Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo." J Exp Med **209** (4): 819-835.
- Wada, Y., H. Kashida, S. E. Kudo, M. Misawa, N. Ikehara und S. Hamatani (2010). "Diagnostic accuracy of pit pattern and vascular pattern analyses in colorectal lesions." Dig Endosc **22** (3): 192-199.
- Waldner, M., J. Hutter, E. Uhl, A. Baethmann und J. Lehmberg (2007). "Modified labeling technique for in vivo visualization of platelets in the cerebral microcirculation of Mongolian gerbils." J Cereb Blood Flow Metab **27** (2): 327-333.
- Walker, B., E. Schmid, A. Russo, E. M. Schmidt, O. Burk, P. Münzer, A. Velic, B. Macek, M. Schaller, M. Schwab, M. C. Seabra, M. Gawaz, F. Lang, O. Borst (2015). "Impact of the serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 on platelet dense granule biogenesis and secretion." J Thromb Haemost **13**: 1325-1334.

Wang, X., Q. Cheng, L. Xu, G. Z. Feuerstein, M. Y. Hsu, P. L. Smith, D. A. Seiffert, W. A. Schumacher, M. L. Ogletree und D. Gailani (2005). "Effects of factor IX or factor XI deficiency on ferric chloride-induced carotid artery occlusion in mice." J Thromb Haemost **3** (4): 695-702.

Wang, X. und L. Xu (2005). "An optimized murine model of ferric chloride-induced arterial thrombosis for thrombosis research." Thromb Res **115** (1-2): 95-100.

Wårdell, K. (1992). Laser Doppler Perfusion Imaging, Linköping University.

Wardell, K., A. Jakobsson und G. E. Nilsson (1993). "Laser Doppler perfusion imaging by dynamic light scattering." IEEE Trans Biomed Eng **40** (4): 309-316.

Weibrich, G., T. Hansen, W. Kleis, R. Buch und W. E. Hitzler (2004). "Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration." Bone **34** (4): 665-671.

Westrick, R. J., M. E. Winn und D. T. Eitzman (2007). "Murine models of vascular thrombosis (Eitzman series)." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27** (10): 2079-2093.

Yu, S., S. C. Hu, H. S. Yu, Y. Y. Chin, Y. C. Cheng und C. H. Lee (2018). "Early sign of microangiopathy in systemic sclerosis: The significance of cold stress test in dynamic laser Doppler flowmetry." Clin Hemorheol Microcirc.

Zhang, J., F. Varas, M. Stadtfeld, S. Heck, N. Faust und T. Graf (2007). "CD41-YFP mice allow in vivo labeling of megakaryocytic cells and reveal a subset of platelets hyperreactive to thrombin stimulation." Exp Hematol **35** (3): 490-499.

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Benötigte Instrumente und Materialien für die Durchführung der Gefäßverletzung in den unterschiedlichen Thrombosemodellen	39
Tabelle 2: Vergleich der wesentlichen Ergebnisse bei Durchführung der drei unterschiedlichen Thrombosemodelle	77
Tabelle 3: Etablierung eines Ligaturmodells mit Reststenose. Zusammenfassung der Beobachtungen bei der Entwicklung des Modells	88
Tabelle 4: FeCl ₃ -Modell. Thrombusfläche in Prozent anteilig an der Gesamtfläche einer festgelegten ROI zu diskreten Zeitpunkten (Abbildung 20)	137
Tabelle 5: Ligaturmodell. Thrombusfläche in Prozent anteilig an der Gesamtfläche einer festgelegten ROI zu diskreten Zeitpunkten (Abbildung 28)	138
Tabelle 6: Ligaturmodell mit Reststenose. Thrombusfläche anteilig an der Gesamtfläche einer festgelegten ROI zu diskreten Zeitpunkten (Abbildung 35, Abbildung 44)	139
Tabelle 7: Einfluss von JamA auf die Thrombusbildung. Verschlusszeiten in Sekunden nach der Applikation von FeCl ₃ (Abbildung 38)	139
Tabelle 8: Einfluss von JamA auf die Thrombusbildung. Daten für die Flächenauswertung der Thrombusfläche in Prozent in Bezug zur Gesamtfläche des dargestellten Gefäßabschnitts (Abbildung 39)	140
Tabelle 9: Einfluss einer anti-thrombotischen Testsubstanz auf die Thrombusbildung. Daten für die Flächenauswertung der Thrombusfläche in Prozent in Bezug zur Gesamtfläche des dargestellten Gefäßabschnitts (Abbildung 41)	141
Tabelle 10: Einfluss einer anti-thrombotischen Testsubstanz auf die Thrombusbildung. Daten für die Flächenauswertung der Thrombusfläche in Prozent in Bezug zur Gesamtfläche des verletzten Gefäßbereichs (Abbildung 42)	142

Tabelle 11: Ligaturmodell mit Reststenose. Durchmesser der Stenose bei Verwendung eines Prolene® 5-0 Fadens als Platzhalter, gemessen am intravitalmikroskopischen Bild (Abbildung 43)..... 143

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Wandbaus einer dickwandigen Arterie ähnlich der <i>A. carotis communis</i> (eigene Grafik in Anlehnung an Gabella 1995 und Kummer und Welsch 2018).....	6
Abbildung 2: Thrombozyten-Adhäsion an die subendotheliale Matrix und untereinander im Bereich einer Endothel-Verletzung (eigene Grafik in Anlehnung an Sachs und Nieswandt 2007 und Varga-Szabo <i>et al.</i> 2008)	10
Abbildung 3: Kreuzungsschema von PF4Cre-Mäusen mit "Rosa"-Mäusen zu einer Linie, die eine plättchenspezifische Expression von eGFP aufweist.	35
Abbildung 4: Beispiel eines vorbereiteten Arbeitsplatzes für die Durchführung von Gefäßverletzungen im Ligatur- und FeCl ₃ -Modell. Nummerierung der einzelnen Gegenstände wie in Tabelle 1.....	38
Abbildung 5: Legen eines Schwanzvenenkatheters zur intravenösen Applikation von Substanzen in den Blutkreislauf der Maus.....	40
Abbildung 6: Vorbereitung der Maus für alle drei Modelle: (A) Auftragen von Enthaarungscreme. (B) Lagerung der enthaarten Maus für den Versuch.....	41
Abbildung 7: Links: Operationssitus nach Hautschnitt. In der Mitte der Inzision sind die Speicheldrüsen erkennbar. Rechts: Nach stumpfem Trennen der Speicheldrüsen wurde neben der Trachea in der Tiefe die <i>A. carotis communis</i> sichtbar.....	42
Abbildung 8: Verletzung durch FeCl ₃ . Ein Filterpapier getränkt mit 10% FeCl ₃ Lösung wurde auf das rechte Blutgefäß aufgelegt und an den Seiten etwas angeformt	44
Abbildung 9: Verletzung im Ligaturmodell. Die linke <i>A. carotis communis</i> wurde mit einem monofilen Faden (Prolene® 7-0) ligiert. Eine Schlaufe wurde belassen, um die Ligatur später leicht wieder öffnen zu können	45

Abbildung 10: Verletzung im Ligaturmodell mit Reststenose. Die linke <i>A. carotis communis</i> wurde mit einem monofilen Faden (8-0) ligiert. Ein Faden der Stärke 5-0 wurde als Platzhalter mit in die Ligatur einbezogen	46
Abbildung 11: Links: Aufbau der Apparatur für die intravitalmikroskopische Untersuchung. Rechts: Lagerung der Maus unter dem Intravitalmikroskop. Hier vor Beginn der Untersuchung im Ligaturmodell.....	48
Abbildung 12: Schematische Darstellung des Dopplereffektes. Die rote Schallquelle bewegt sich im Bild nach rechts, was zu einer Verkürzung der Wellenlänge des emittierten Tons in Bewegungsrichtung führt.....	49
Abbildung 13: Schematische Darstellung der Funktion der Laser-Doppler-Flussmessung. Einfallendes Licht einer bestimmten Frequenz wird von sich im Blutstrom bewegenden Zellen reflektiert und vom Detektor wahrgenommen. Dabei werden höhere Frequenzen gemessen, wenn sich die Zellen auf den Detektor zu bewegen und niedrigere Frequenzen, wenn sich die Zellen vom Detektor wegbewegen	50
Abbildung 14: Aufbau der Apparatur für die Laser-Doppler-Flussmessung.....	50
Abbildung 15: Verifikation der genetischen Expression von EGFP auf der Zelloberfläche der Thrombozyten von Mäusen des Genotyps „PF4Cre x Rosa“. (A) Ergebnisse der FACS-Untersuchung. (B) Sichtbare Thrombenentwicklung über die Zeit in der <i>A. carotis communis</i> im Ligaturmodell. (Zeit nach Öffnen der Ligatur: a: 0 min; b: 1 min; c: 2 min; d: 10 min)	55
Abbildung 16: FeCl ₃ -Modell. Schematische Darstellung. Oben: Die Längsansicht entspricht der Darstellung im mikroskopischen Bild. Unten: Querschnittsdarstellung zur besseren Veranschaulichung der dreidimensionalen Thrombusausdehnung. In Gelb ist das mit FeCl ₃ getränkte Filterpapier dargestellt	57
Abbildung 17: FeCl ₃ -Modell. Zustand des Blutgefäßes vor dem Versuch (A) und nach Beendigung des Versuchs (B). Unten im Bild: proximal, oben im Bild: distal. Die Verletzung durch FeCl ₃ wurde mittig am freipräparierten Arterienabschnitt vorgenommen	58

Abbildung 18: FeCl ₃ -Modell. Mittlere Intensität des Fluoreszenzlichts in einer festgelegten ROI über die Zeit.....	58
Abbildung 19: FeCl ₃ -Modell. Beispiel einer Auswertung über die Thrombusfläche in Relation zur Gesamtfläche des dargestellten Gefäßabschnitts	60
Abbildung 20: FeCl ₃ -Modell. Thrombusfläche anteilig an der Gesamtfläche einer festgelegten ROI zu diskreten Zeitpunkten. N=10, Dunnett-Test, *: p<0,05, **: p<0,01.....	60
Abbildung 21: FeCl ₃ -Modell (Laser Doppler Flussmessung). Falschfarbendarstellung. A: Farblegende; B: Flussbild vor Verschluss bei t = 0 s; C: Flussbild nach Verschluss bei t = 16 min; D: Beispielfoto einer vorbereiteten Arterie zur Flussmessung.....	61
Abbildung 22: FeCl ₃ -Modell (Laser Doppler Flussmessung). Blutfluss in der Arterie über die Zeit. Ein Verschluss im Messzeitraum	62
Abbildung 23: FeCl ₃ -Modell (Laser Doppler Flussmessung). Blutfluss in der Arterie über die Zeit. Zwei Verschlüsse im Messzeitraum. Bei den blau/violetten Flächen seitlich neben der Arterie handelt es sich um Artefakte durch die 0,9 %ige NaCl-Lösung, die verwendet wurde, um das Gewebe während der Messung vor dem Austrocknen zu schützen. Für die Auswertung wurde eine rechteckige <i>Region of Interest</i> (ROI) definiert, welche möglichst genau den von der Arterie erzeugten Signalbereich markierte	63
Abbildung 24: Ligaturmodell. Schematische Darstellung. Oben: Die Längsansicht entspricht der Darstellung im mikroskopischen Bild. Unten: Querschnittsdarstellung zur besseren Veranschaulichung der dreidimensionalen Thrombusausdehnung	64
Abbildung 25: Ligaturmodell. Zustand des Blutgefäßes vor dem Versuch (A) und nach Beendigung des Versuchs (B). Unten im Bild: proximal, oben im Bild: distal.....	65
Abbildung 26: Ligaturmodell. Mittlere Intensität des Fluoreszenzlichts in einer festgelegten ROI über die Zeit.....	66
Abbildung 27: Ligaturmodell. Auswertung eines Versuchs über die Thrombusfläche in Relation zur Gesamtfläche des dargestellten Gefäßabschnitts (A) und in Relation zur verletzten Fläche (B).....	67

Abbildung 28: Ligaturmodell. Thrombusfläche anteilig an der Gesamtfläche einer festgelegten ROI zu diskreten Zeitpunkten. N=11, Dunnett-Test, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$	67
Abbildung 29: Ligaturmodell. Beispiel eines Fluoreszenzbildes zum Zeitpunkt 20 min nach dem Öffnen der Ligatur. Fluoreszierende Verletzungsfläche nach Abbau der Thromben.....	68
Abbildung 30: Ligaturmodell (Laser Doppler Flussmessung). Blutfluss in der Arterie über die Zeit.....	69
Abbildung 31: Ligaturmodell mit Reststenose. Schematische Darstellung. Oben: Die Längsansicht entspricht der Darstellung im mikroskopischen Bild. Unten: Querschnittsdarstellung zur besseren Veranschaulichung der dreidimensionalen Thrombusausdehnung. In blau ist der als Platzhalter verwendete Faden dargestellt	70
Abbildung 32: Ligaturmodell mit Reststenose. Zustand des Blutgefäßes vor dem Versuch (A) und nach Beendigung des Versuchs (B). Unten im Bild: proximal, oben im Bild: distal. Der die Stenose erzeugende Ligaturfaden verblieb bis nach Beendigung des Versuchs am Blutgefäß	71
Abbildung 33: Ligaturmodell mit Reststenose. Mittlere Intensität des Fluoreszenzlichts in einer festgelegten ROI über die Zeit	72
Abbildung 34: Ligaturmodell mit Reststenose. Auswertung eines Versuchs über die Thrombusfläche in Relation zur verletzten Fläche.....	73
Abbildung 35: Ligaturmodell mit Reststenose. Thrombusfläche anteilig an der Gesamtfläche einer festgelegten ROI zu diskreten Zeitpunkten	73
Abbildung 36: Vergleich der intravitalmikroskopischen Ergebnisse der drei unterschiedlichen Thrombosemodelle	75
Abbildung 37: Einfluss von JamA auf die Thrombusbildung. Vergleich der aus den Filmen extrahierten Bilder zu bestimmten Zeitpunkten	80
Abbildung 38: Einfluss von JamA auf die Thrombusbildung. Vergleich der Verschlusszeiten im $FeCl_3$ -Modell. N=6, Fisher-Pitman-Test, n.s: $p \geq 0,05$	81

Abbildung 39: Einfluss von JamA auf die Thrombusbildung. Auswertung der Experimente über die mit Thromben bedeckten Flächen. N=6, Fisher-Pitman-Test, *: $p=0,04$	82
Abbildung 40: Einfluss einer anti-thrombotischen Testsubstanz auf die Thrombusbildung. Vergleich der aus den Filmen extrahierten Bilder zu bestimmten Zeitpunkten.....	83
Abbildung 41: Einfluss einer anti-thrombotischen Testsubstanz auf die Thrombusbildung. Anteil der Thrombusfläche an der Gesamtfläche des dargestellten Gefäßabschnittes. N=6, Fisher-Pitman-Test, *: $p<0,05$; **: $p<0,01$	84
Abbildung 42: Einfluss einer anti-thrombotischen Testsubstanz auf die Thrombusbildung. Anteil der Thrombusfläche an der verletzten Gesamtfläche. N=6, Fisher-Pitman-Test, *: $p<0,05$; **: $p<0,01$	85
Abbildung 43: Etablierung eines Ligaturmodells mit Reststenose. Thrombusbildung im Verlauf des Experiments bei drei Mäusen	89
Abbildung 44: Etablierung eines Ligaturmodells mit Reststenose. Thrombusfläche anteilig an der Gesamtfläche einer festgelegten ROI zu diskreten Zeitpunkten. N=3, Tabelle 6.....	90

10 Abkürzungsverzeichnis

ACT	<i>Activated Clotting Time</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
AT	Antithrombin
B6	<i>Black 6 (C57BL/6J)</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
CFDA-SE	Carboxyfluoreszein Diacetat Succinimidyl Ester
CMFDA	Diacetat
Cre	<i>cyclization recombination</i>
DIC	differentieller Interferenzkontrast
EGFP	<i>enhanced GFP</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EYFP	<i>enhanced yellow fluorescent protein</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FeCl ₃	Eisen(III)-chlorid
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GP	Glykoprotein
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
IVM	Intravitalmikroskopie
KGW	Körpergewicht
loxP	<i>locus of X-over P1</i>
LUT	<i>Lookup Table</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PE	Phycoerythrin
PF4	Plättchenfaktor 4
PRP	<i>Platelet Rich Plasma (thrombozytenreiches Plasma)</i>

PS	Phosphatidylserin
REML	<i>Restricted Maximum Likelihood</i>
ROI	<i>Region of Interest</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
TF	<i>Tissue Factor (Gewebefaktor)</i>
TPZ	Thromboplastinzeit
TXA ₂	Thromboxan-A ₂
Vol. %	Volumenprozent
vWF	von Willebrand Faktor

11 Anhang

Tabelle 4: FeCl₃-Modell. Thrombusfläche in Prozent anteilig an der Gesamtfläche einer festgelegten ROI zu diskreten Zeitpunkten (Abbildung 20)

	vor Verletzung	30 s	60 s	120 s	300 s	600 s	1200 s
1	0	0,07	0,04	6,02	39,55	58,79	64,24
2	0		0,14	0,08	34,3	44,44	57,5
3	0	32,73	29,38	44,89	57,8	52,29	
4	0	0,22	0,2	2,06	46,21	65,02	54,54
5	0	0,11	0,07	5,53	44,91	48,35	35,06
6	0	0,25	1,92	6,07	21,93	21,98	25,87
7	0		0,54	57,51	48,74	48,74	49,34
8	0	0,06	0,02	0,01	0,05	14,15	25,98
9	0	17,83	20,52	33,16	38,72	48,99	59,39
10	0	1,13	3,36	13,2	30,88	36,02	50,92
Dunnett- Test p=		0,4728	0,4058	0,1188	0,0003	< 0.0001	< 0,0001

Tabelle 5: Ligaturmodell. Thrombusfläche in Prozent anteilig an der Gesamtfläche einer festgelegten ROI zu diskreten Zeitpunkten (Abbildung 28)

	vor Verletzung	30 s	60 s	120 s	300 s	600 s	1200 s
1	0	24,78	18,43	14,21	9,48	4,73	8,06
2	0	13,70	16,49	13,51	8,82	4,58	2,14
3	0	18,12	15,64	11,14	5,35	0,41	0,17
4	0	32,24	30,80	22,07	27,70	11,30	5,86
5	0	16,22	22,98	5,75	4,52	0,77	0,04
6	0	2,59	1,39	2,72	0,21	0,02	0,06
7	0	0,73	0,61	2,50	0,22	0,02	0
8	0	7,98	6,45	5,84	2,81	1,18	0,16
9	0	1,28	3,77	5,45	2,73	0,50	0,58
10	0	34,36	37,49	12,42	4,65	0,09	0
11	0	20,79	25,77	10,45	1,11	1,02	0,01
Dunnett- Test p=		0,0062	0,0062	0,0014	0,1032	0,2114	0,3262

Tabelle 6: Ligaturmodell mit Reststenose. Thrombusfläche anteilig an der Gesamtfläche einer festgelegten ROI zu diskreten Zeitpunkten (Abbildung 35, Abbildung 44)

	vor Verletzung	30 s	60 s	120 s	300 s	600 s	1200 s
1	0	27,02	6,29	3,20	2,19	2,91	0,35
2	0	12,30	20,27	14,92	15,12	21,71	12,49
3	0	12,87	11,40	2,35	4,27	3,72	1,72

Tabelle 7: Einfluss von JamA auf die Thrombusbildung. Verschlusszeiten in Sekunden nach der Applikation von FeCl₃ (Abbildung 38)

	JamA	Kontrolle (BSA)
1	350	415
2	442,5	920
3	300	380
4	272,5	380
5	450	410
6	510	665
Mittelwert	387,50	528,33
Standardabweichung	94,05	220,42
p=	0,10	

Tabelle 8: Einfluss von JamA auf die Thrombusbildung. Daten für die Flächenauswertung der Thrombusfläche in Prozent in Bezug zur Gesamtfläche des dargestellten Gefäßabschnitts (Abbildung 39)

		30 s	60 s	120 s	300 s	600 s	900 s	1200 s
JamA	1	2,71	2,74	3,53	67,91	67,64	64,17	60,34
	2	9,66	9,93	20,46	65,88	53,12	47,47	57,67
	3	10,21	11,76	31,62	33,81	51,35	55,64	43,47
	4	13,83	17,89	51,68	40,49	49,13	47,22	41,76
	5	0,04	0,12	0,18	17,62	54,53	52,53	55,55
	6	5,73	7,78	11,22	51,03	51,78	53,35	64,52
Kontrolle (BSA)	1	0,07	0,09	3,05	36,92	51,62	55,41	60,87
	2	16,47	14,79	23,48	52,01	58,66	69,13	54,54
	3	0,18	0,99	5,80	33,42	35,17	28,51	30,46
	4	0,06	0,28	28,76	24,40	31,44	39,24	37,66
	5	17,83	20,52	33,16	38,72	48,99	51,61	59,39
	6	1,13	3,36	13,20	30,88	36,02	45,43	50,92
Fisher-Pitman-Test	p=	0,40	0,35	0,43	0,14	0,04	0,22	0,23

Tabelle 9: Einfluss einer anti-thrombotischen Testsubstanz auf die Thrombusbildung. Daten für die Flächenauswertung der Thrombusfläche in Prozent in Bezug zur Gesamtfläche des dargestellten Gefäßabschnitts (Abbildung 41)

		10 s	30 s	60 s	120 s	300 s	600 s	1200 s
Kontrolle (PBS)	1	0,29	3,44	5,08	4,16	2,79	1,97	0,94
	2	1,18	0,97	0,69	2,92	0,26	0,06	0,01
	3	0,39	1,95	1,26	1,67	0,28	0,25	0,11
	4	1,59	1,36	1,38	1,40	0,55	0,23	0,12
	5	1,89	1,24	2,26	5,20	1,49	0,31	0,15
GPVI Antikörper	1	0,03	0,01	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01
	2	0,02	0,01	0,02	0,01	0,01	0,02	0,00
	3	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	4	0,02	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01	0,01
	5	0,21	0,17	0,38	0,09	0,09	0,10	0,09
	6	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00
Fisher-Pitman-Test	p=	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,004	0,009

Tabelle 10: Einfluss einer anti-thrombotischen Testsubstanz auf die Thrombusbildung. Daten für die Flächenauswertung der Thrombusfläche in Prozent in Bezug zur Gesamtfläche des verletzten Gefäßbereichs (Abbildung 42)

		10 s	30 s	60 s	120 s	300 s	600 s	1200 s
Kontrolle (PBS)	1	0,68	6,19	6,25	4,21	1,19	0,32	0,08
	2	2,35	2,30	1,37	5,29	0,62	0,05	0,01
	3	1,19	2,76	4,06	2,76	0,67	0,31	0,29
	4	3,61	2,88	2,80	3,29	0,59	0,15	0,08
	5	4,40	2,94	3,83	9,42	1,48	0,04	0,04
GPVI Antikörper	1	0,23	0,11	0,07	0,10	0,06	0,09	0,09
	2	0,43	0,15	0,14	0,05	0,11	0,15	0,05
	3	0,43	0,07	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
	4	0,02	0,00	0,04	0,01	0,01	0,00	0,00
	5	0,56	0,06	0,07	0,13	0,12	0,09	0,11
	6	0,21	0,03	0,03	0,03	0,06	0,01	0,00
Fisher-Pitman-Test	p=	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,06	0,17

Tabelle 11: Ligaturmodell mit Reststenose. Durchmesser der Stenose bei Verwendung eines Prolene® 5-0 Fadens als Platzhalter, gemessen am intravitalmikroskopischen Bild (Abbildung 43)

	Durchmesser D ₁ vor Ligatur in µm	Durchmesser D ₂ Stenose in µm	Prozent der ursprünglichen Querschnittsfläche
1	446	156	12,2
2	479	151	9,9
3	421	197	21,9
4	446	147	10,9
5	558	216	15,0
Mittelwert	470	173,4	14,0
Standardabw.	53,3	31,12	4,8

Danksagung

Ich danke....

...meinem Doktorvater an der Ludwig-Maximilians-Universität München, Priv.-Doz. Dr. med. vet. Sven Reese, für die hervorragende Betreuung, die unermüdliche Beantwortung meiner vielen Fragen und die fachliche und mentale Unterstützung in der Endphase der Arbeit,

...meinem Mentor am Universitätsklinikum der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Univ.-Prof. Dr. med. Meinrad Gawaz für die Betreuung vor Ort, die motivierenden Gespräche, die interessanten Projekte und das tierschutzrelevante Thema meiner Arbeit,

...Dr. Tatsiana Castor und Dr. Anne-Katrin Rohlfing für die gründliche Durchsicht der Arbeit und die vielen hilfreichen Ratschläge und Ideen,

...dem Universitätsklinikum Tübingen für das Bereitstellen der Ressourcen und Arbeitsmittel,

...meinen Kolleginnen und Kollegen im Labor der Abteilung für Innere Medizin III – Kardiologie und Angiologie für die gute Zusammenarbeit, bei der auch der Spaß nicht zu kurz kam. Besonders danke ich dabei

- Dr. Madhumita Chatterjee für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei wissenschaftlichen Fragen und sonstigen Problemen, die es zu meistern galt, außerdem für das Schreiben der Veröffentlichungen, für die ein Teil der im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse verwendet wurde und noch wird,
- Catharina Wahle und Dr. Britta Walker-Allgaier für die Hilfe bei der Erlernung und Optimierung der Eingriffe und Versuchstechniken,
- Dr. Saskia Freiin von Ungern-Sternberg für die Unterstützung bei der Zucht und Betreuung der Versuchstiere und dass sie immer da war, wenn ich mal wieder ein paar aufbauende Worte gebrauchen konnte,

...meinem Chef Dr. med. vet. Franz Iglauer und allen Kolleginnen und Kollegen der Einrichtung für Tierschutz, tierärztlichen Dienst und Labortierkunde der Eberhard-Karls-Universität Tübingen für ihre Unterstützung bei der Beantragung der Tierversuche und dass sie mir auch sonst jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen und immer noch stehen,

...den vielen Mäusen, die mir im Laufe dieser Arbeit begegnet sind, für deren Geburt und Tod ich verantwortlich war und die hoffentlich dazu beitragen, dass in Zukunft einige Artgenossen weniger für Versuche gebraucht werden oder dass noch bessere Ergebnisse bei zukünftigen Versuchsreihen erzielt werden, welche langfristig dabei helfen, neue Therapien für lebensbedrohliche Erkrankungen zu entwickeln

...und meinen Eltern, meiner Schwester und meinem Partner für jegliche Form von Hilfestellung und dass sie immer für mich da sind.