

Aus dem
Institut für Kardiovaskuläre Physiologie und Pathophysiologie
im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin
Institut der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Christian Wahl-Schott



„Thrombozytenfunktion und Immunthrombose in der fetalen und adulten Maus“

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Christian Pascal David

aus **Landshut**

2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Markus Sperandio

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Anne Krug
Prof. Dr. Andreas Humpe

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. Claudia Nussbaum
Dr. med. Andreas Margraf

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 11.04.2024

Meiner Familie

"Nicht das Kind soll sich der Umgebung anpassen. Sondern wir sollten die Umgebung dem Kind anpassen." (Maria Montessori)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Thrombozyten und Hämostase.....	2
1.2	Thrombopoese.....	7
1.3	Thrombozytenfunktion im Neonaten.....	9
1.4	Immunthrombose.....	12
2	Hypothese und Zielsetzung.....	16
3	Material, Versuchstiere und Methoden.....	17
3.1	Material	17
3.2	Substanzen.....	19
3.3	Versuchstiere.....	21
3.4	Narkose	22
3.5	Fertigung der Mikroinjektionskapillaren für fetale Injektionen	23
3.6	Versuchsablauf.....	23
3.7	Untersuchung adulter Blutproben	31
3.8	Statistik	32
4	Ergebnisse	33
4.1	Thrombozytenfunktion der adulten Maus in Abhängigkeit von IgM	33
4.2	Thrombozytenfunktion in der fetalen Maus nach IgM-Injektion.....	41
5	Diskussion.....	44
5.1	Diskussion der Tiermodelle.....	44
5.2	Diskussion der Ergebnisse.....	47
5.3	Klinische Bedeutung.....	54
5.4	Ausblick	55
6	Zusammenfassung/Schluss	57
7	Literaturverzeichnis	59
8	Abkürzungsverzeichnis.....	65
9	Abbildungsverzeichnis	66
10	Tabellenverzeichnis	67
11	Danksagung.....	68

12	Affidavit.....	70
13	Lebenslauf	71
14	Publikationen.....	72

1 Einleitung

Wird ein Mensch zu früh geboren, das heißt vor Vollendung der 37. Schwangerschaftswoche, kann es sein, dass bestimmte Organe und Funktionen noch nicht vollständig gereift sind. Doch nicht nur die Organe benötigen Zeit zum Reifen, auch das fetale Blut ist noch nicht an die neuen Anforderungen außerhalb des schützenden Uterus angepasst.

Je nach Reifegrad des Neugeborenen kann dies zu schwerwiegenden Komplikationen führen.

Eine dieser Komplikationen ist die intraventrikuläre Hämorrhagie (IVH). Die Ursachen dafür sind vielfältig, die Folgen z.T. schwerwiegend - sie reichen von Krampfanfällen und Paresen bis hin zum Atemstillstand, sodass die IVH eine hohe Mortalität aufweist [1]. Bis heute gibt es keine kausale Therapie für eine IVH, man kann sie lediglich supportiv behandeln und dies auch nur mit unzureichendem Erfolg [2]. Der Fokus liegt daher auf der Prävention einer solchen Blutung; das reicht so weit, dass Frühgeborene möglichst nicht in andere Krankenhäuser verlegt werden, um unnötige Erschütterungen durch die Fahrt dorthin zu vermeiden.

Betrachtet man fetale Thrombozyten, sieht man, dass diese schwer aktivierbar sind und auf Blutungen nicht in dem Maße reagieren, wie es vollständig ausgereifte Thrombozyten tun. Die fetale Hämostase wirkt, was Blutungen nach erfolgter Frühgeburt anbelangt, noch nicht an das Leben außerhalb des Uterus angepasst. So beruht die fetale Hämostase (ebenso wie die erwachsene) auf einem sensiblen Gleichgewicht, welches auf die Bedürfnisse des Feten im Mutterleib fein abgestimmt ist. Thrombozyten müssen eine Blutung zwar schnell stoppen, beziehungsweise verhindern können, auf der anderen Seite darf es jedoch zu keiner Überaktivierung kommen. Dies würde zu einem pathologischen Verschluss von Gefäßen führen und somit zu einer Behinderung des Transports von Sauerstoff, Nährstoffen und Wachstumsfaktoren [3]. Gerade die regelrechte Versorgung des fetalen Gewebes ist für die Entwicklung essenziell. Daher gilt es, thrombotische Ereignisse während der Fetalzeit zu verhindern [4].

Die Funktion fetaler Thrombozyten ist bis heute nicht in dem Maße erforscht wie die der adulten Thrombozyten. Auch sind die Möglichkeiten, die Funktion fetaler Thrombozyten zu unterstützen, sodass Frühgeborene suffizient auf Blutungen reagieren können, begrenzt.

Diese Arbeit soll mithilfe eines neu etablierten Mikroskopiemodells *in-vivo* die Möglichkeit prüfen, die fetale Hämostase durch Immunglobuline (Ig) zu beeinflussen. Die Ergebnisse werden mit *in-vivo* Untersuchung zur adulten Hämostase verglichen.

1.1 Thrombozyten und Hämostase

1.1.1 Morphologie und Funktion von Blutplättchen

Thrombozyten sind kleine, kernlose Zellen, die 7-10 Tage im Blut zirkulieren und bei gesunden Erwachsenen in einer Konzentration von 150.000-350.000/ μ l vorkommen [5]. Nicht nur in der Hämostase spielen sie als schnell reagierende Zellen am Ort eines Gefäßschadens eine bedeutende Rolle, Thrombozyten nehmen auch in vielen anderen biologischen Vorgängen eine Schlüsselrolle ein wie z.B. bei der Inflammation, bei der Atherogenese, bei der antimikrobiellen Abwehr aber auch beim Tumorwachstum und der Metastasenbildung [6]. Thrombozyten werden im Knochenmark gebildet und in den Sinusoiden des Knochenmarks von Megakaryozytenfortsätzen abgeschnürt. Ihre Ruheform ist diskoid-bikonkav. Mit einem Durchmesser von ungefähr 2-5 μ m und einer Dicke von 0,5 μ m gehören sie zu den kleinsten korpuskulären Bestandteilen des Blutes. Gehen die Thrombozyten in ihre aktive Form über, werden sie sphärisch und bilden durch Membranausstülpungen sog. Pseudopodien aus. [5, 6]

Die Oberfläche des Thrombozyten besteht aus einer glatten Plasmamembran, der eine dicke Glykokalix aufliegt. Die Oberfläche ist reich an Glykoproteinen, welche nötig sind, um mit subendothelialen Strukturen zu interagieren, die aber auch für die Aktivierung, Adhäsion und Aggregation des Thrombozyten benötigt werden. Wichtige Rezeptoren sind unter anderem die Glykoproteine Ib (GpIb) und IIb/IIIa (GpIIb/IIIa), welche auf der Plättchenoberfläche mit ungefähr 25.000 (GpIb-IX-V) bzw. 80.000 (GpIIb/IIIa) Molekülen vertreten sind. [5, 6]

Submembranös gelegene Mikrotubuli, welche von einem Geflecht aus Strukturproteinen umgeben sind, sind verantwortlich für die diskoide Form des ruhenden Thrombozyten, sorgen aber auch für die Formänderung zum aktivierten Thrombozyten. Als Organellen bein-

halten Plättchen Mitochondrien, Glykogenspeicher und verschiedene Speichergranula – dichte Granula (*dense bodies*), α -Granula und Lysosomen. Die dichten Granula enthalten niedermolekulare Verbindungen (ADP, ATP, Ca^{2+} und Serotonin) und fördern die Thrombozytenaggregation. Die α -Granula sind zahlenmäßig am stärksten vertreten und enthalten zahlreiche Proteine, welche neben Hämostase und Thrombose noch weitere Prozesse beeinflussen wie z.B. Inflammation, Atherosklerose, Chemotaxis, Angiogenese oder antimikrobielle Abwehr. Die Lysosomen speichern hydrolytische Enzyme. [6, 7]

Die Pseudopodien aktivierter Thrombozyten binden bei Endothelverletzung oder -inflammation an das sich dort anreichernde Fibrinogen. Über Arp2/3-abhängige Migration (Haptotaxis) können die Pseudopodien ihre Position so verändern, dass sie eine möglichst feste Bindung eingehen. Dies geschieht einerseits durch aktives Wandern an den Ort der höchsten Fibrinogenkonzentration, andererseits können im Thrombozyten Integrin-Cluster gebildet werden, um so auf Änderungen der Mikroumgebung zu reagieren. Dabei spielt der Arp 2/3-Komplex des Cytoskeletts eine wichtige Rolle. [8]

1.1.2 Thrombozytäre Oberflächenrezeptoren

Zur Signalübertragung und somit Ausübung ihrer Funktion benötigen Thrombozyten Oberflächenrezeptoren. Die wichtigsten Rezeptoren sind hierbei GpIIb/IIIa (CD41/61), GpVI und der GpIb-IX-V-Komplex. Der GpIb-IX-V-Komplex besteht aus drei Glykoproteinen, dem GpIb (α und β), dem GpIX und dem GpV. Dieser Rezeptorkomplex bindet an den von-Willebrand-Faktor (vWF) aber auch an Thrombin, P-Selektin oder Faktor XI und XII (Abb.1). [6]

GpIIb/IIIa bindet an Fibrinogen, Fibronectin und vWF. Dadurch vermittelt es die Vernetzung der Thrombozyten untereinander und ist somit an der Aggregation beteiligt. Damit es nicht zu ungewollten Thrombosen kommt, ist die Bindung an das GpIIb/IIIa nur nach Aktivierung möglich. Da GpIIb/IIIa zur Familie der Integrine gehört, kann es nach Stimulation von einer niedrigen (*low*) zu einer hohen (*high*) Affinitätskonformation wechseln, was zur Interaktion mit Bindungspartnern führt. Diese Konformationsänderung wird durch *inside-out signaling* induziert. [4, 6]

GpVI ist einer der Hauptrezeptoren für Kollagen, aber es bindet auch an eine Vielzahl anderer Proteine wie Fibrin oder Laminin und vermittelt somit die Thrombozytenadhäsion. GpVI spielt sowohl in der venösen als auch arteriellen Thrombusentstehung eine Rolle.[9, 10]

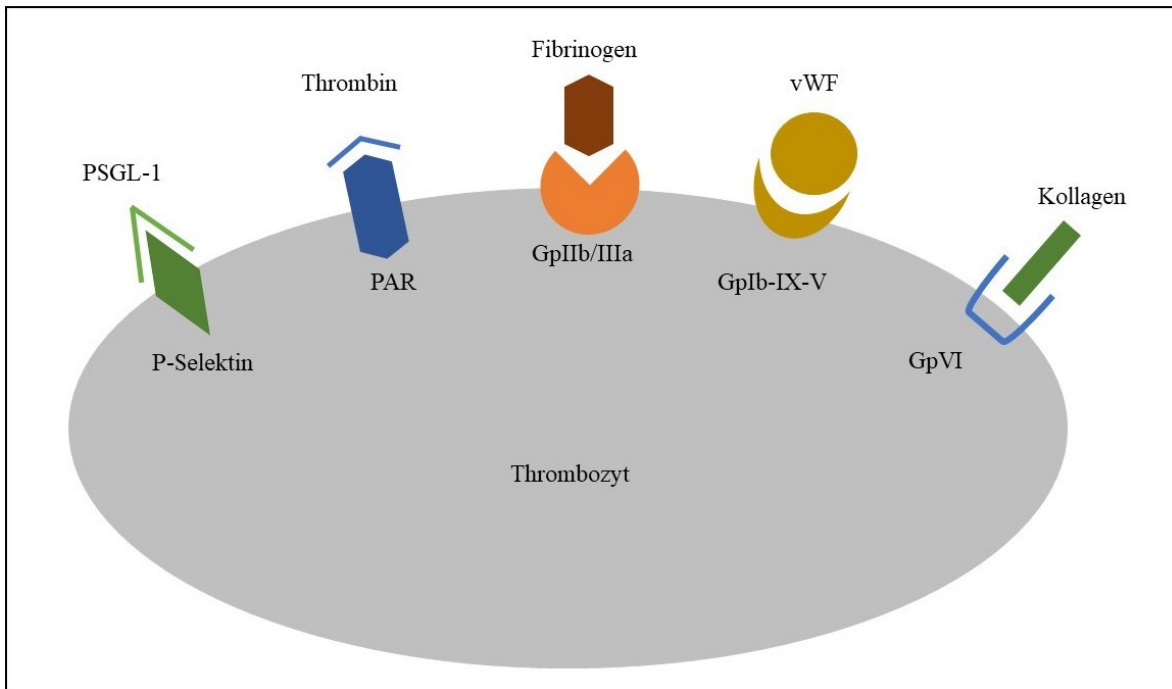


Abbildung 1: Auswahl wichtiger Oberflächenrezeptoren des Thrombozyten. Im aktivierten Thrombozyten bindet P-Selektin im Zuge der Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion an den P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1). Thrombin kann über die Bindung an Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR) den ruhenden Thrombozyten aktivieren. In seiner *high-affinity* Konformation bindet der GpIIb/IIIa z.B. an Fibrinogen und Fibronectin, was eine Bindung an andere Thrombozyten und eine Thrombusstabilisierung bewirkt. Der GpIb-IX-V bindet an den vWF und initiiert so die Adhäsion, GpVI kann unter anderem an Kollagen binden.

Selektine sind Zelladhäsionsmoleküle (*cell adhesion molecules*, CAM) und kommen in Form von E-, L- und P-Selektin vor, wobei nur letzteres im Thrombozyten vorhanden ist. P-Selektin wird im ruhenden Thrombozyten in den α -Granula gespeichert und bei Aktivierung an die Oberfläche mobilisiert. Wird P-Selektin nun an der Oberfläche des aktivierten Thrombozyten exprimiert, kann es an P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1) auf Leukozyten binden und dadurch mit den Entzündungszellen interagieren und diese in den wachsenden Thrombus integrieren. [11]

Eine weitere wichtige Rezeptorgruppe ist die der Protease-aktivierten Rezeptoren (PARs). Die PARs sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren und werden in vier Untergruppen unterteilt (PAR 1-4). Im humanen Thrombozyten werden PAR1 und PAR4 exprimiert, die murinen Thrombozyten weisen hingegen PAR3 und PAR 4 auf. Diese Rezeptoren interagieren direkt mit der Serinprotease Thrombin, welche ein potenter Aktivator von Thrombozyten ist und in der Gerinnungskaskade Fibrinogen in Fibrin spaltet. [4, 12]

1.1.3 Adhäsion an subendotheliale Matrix

Thrombozyten zirkulieren im peripheren Blut. Liegt ein Endothelschaden vor, ist der erste Schritt, Thrombozyten an die Gefäßwand zu rekrutieren. Verantwortlich für diesen Schritt sind u.a. der vWF aus dem Plasma sowie GpVI und GpIb-IX-V des Thrombozyten (Abb. 2) [6].

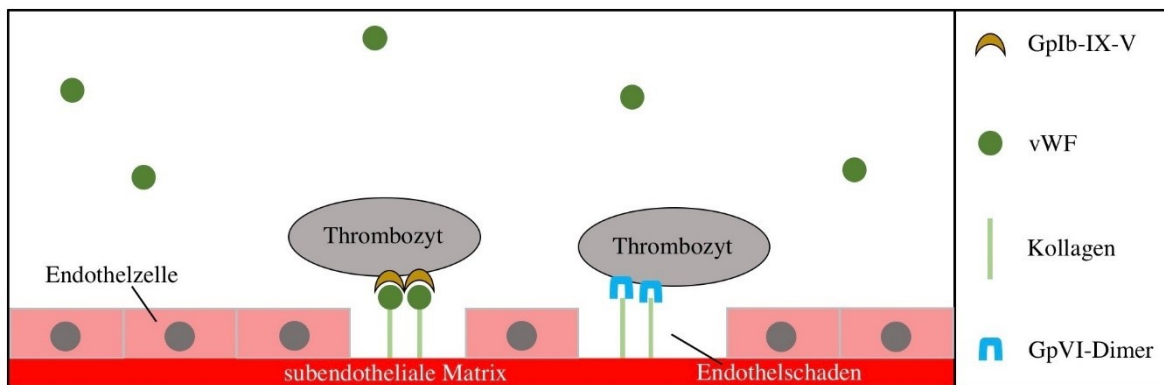


Abbildung 2: Thrombozytenadhäsion nach Endothelschaden. Freiwerdendes Kollagen bindet an GpVI aber auch an vWF und verstärkt somit die Thrombozytenrekrutierung. Zusätzlich wird von den Endothelzellen vWF freigesetzt, an den wiederum Thrombozyten binden können.

Der vWF ist ein Glykoprotein, welches im Plasma vorkommt, an das Endothel angelagert ist und im Falle eines Gefäßschadens an das freiwerdende Kollagen bindet. Durch den Blutfluss entsteht Schubspannung, die globuläres vWF entfaltet und die A1 Domäne, welche die Bindungsstelle für GpIb enthält, freigibt [13]. Das GpIb, das an den vWF bindet, ist selbst mit dem Zytoskelett des Thrombozyten über Filamin verbunden, was eine starke Verankerung des GpIb anzeigt [3]. Durch die Bindung des GpIb an den vWF werden Blutplättchen am Ort der Verletzung verankert. Ist die Bindung zu schwach, bricht sie auf und

der Thrombozyt strömt weiter. Falls der Thrombozyt noch Kontakt zum Subendothel hat, kann er zusätzlich Bindungen aufbauen und somit fest adhärent werden [14]. Ein weiterer wichtiger Mechanismus, welcher zur Thrombozytenadhäsion führt, ist die Bindung vom GpVI an subendotheliales Kollagen. GpVI kann als Dimer eine starke direkte Bindung zu Kollagen aufbauen. Zusätzlich kann GpVI die Thrombusstabilität erhöhen, indem GpVI-Monomere an und Fibrin(ogen) binden und somit das Thrombozyten-*Spreading* induzieren [15]. Die Bindung an Kollagen führt zudem zu einer Aktivierung des Integrins GpIa/IIa ($\alpha 2\beta 1$) auf Thrombozyten, was die Bindung zu Kollagen weiter verstärkt [14]. Es kann auch zu einer Adhäsion von Thrombozyten kommen, ohne dass thrombogene subendotheliale Moleküle präsentiert werden. GpIb interagiert mit dem von aktivierten Endothelzellen exprimierten vWF und P-Selektin. Diese Interaktionen spielen in der phototoxischen Thrombusbildung eine wichtige Rolle [16, 17].

1.1.4 Thrombozytenaktivierung

Thrombozyten können durch eine Vielzahl an Agonisten aktiviert werden. Zu diesen gehören unter anderem Kollagen, vWF, Thrombin, ADP und Thromboxan A₂. Diese Moleküle werden entweder vom umliegenden Gewebe oder von aktivierten Thrombozyten selbst freigesetzt. Durch die Aktivierung werden mehrere Prozesse in Gang gesetzt: Die Thrombozyten bilden, bei ausreichendem Anstieg des freien intrazellulären Kalziums, Pseudopodien aus, was zu einer Vergrößerung der Oberfläche führt. Weiterhin wird über freigesetzte Arachidonsäure Thromboxan A₂ gebildet, das wiederum die Thrombozytenaktivierung verstärkt und zusätzlich vasokonstriktorisch wirkt. [5, 6]

1.1.5 Thrombozytenaggregation

Die Thrombozytenaggregation bezeichnet das Anheften von Blutplättchen an bereits adhärenth Thrombozyten. Wie schon beschrieben, werden die Plättchen während der Adhäsion aktiviert und setzen aus den Granula ihren prokoagulatorischen Inhalt frei, der wiederum weitere frei zirkulierende Thrombozyten aktiviert. Die Aktivierung der Blutplättchen bewirkt eine Konformationsänderung des Integrins GpIIb/IIIa zur *high-affinity*-Konformation,

welche die Thrombozyten befähigt, Fibrinogen zu binden und ein enges Netz zu bilden (Abb. 3) [4, 6]. Faktor XIII-Interaktion sowie Thrombin-induzierte Fibrinbildung stabilisieren und quervernetzen den Thrombus [12, 14]. *Cell-Capturing* sorgt für weiteres Wachstum des Thrombus [18]. Durch das Ausformen der Filo- und Lamellipodien (*spreading*) findet eine Oberflächenvergrößerung und größere Überlappung der Thrombozyten statt [5, 19]. Hierbei sorgen die Lamellipodien für eine unspezifische Anlagerung auf die Wunde, wohingegen die Filopodien zur Thrombozyteninteraktion beitragen [19].

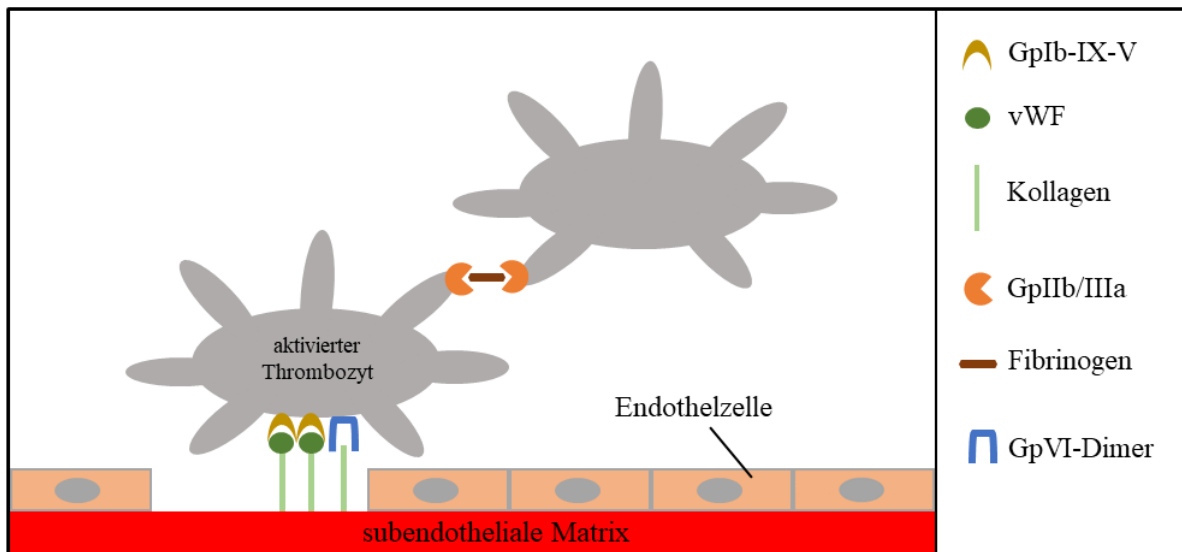


Abbildung 3: Thrombozytenaggregation. Nach Aktivierung des adhärenen Thrombozyten bildet er Filopodien aus und kann mit dem GpIIb/IIIa in seiner hochaffinen Konformation über Fibrinogen weitere Thrombozyten binden.

1.2 Thrombopoese

1.2.1 Adulte vs. fetale Megakaryopoese

Es gibt deutliche Unterschiede zwischen adulten und fetalen Thrombozyten. Angefangen bei der Megakaryopoese, bei der aus Megakaryozyten (MK) Thrombozyten gebildet werden. Fetale MKs sind deutlich kleiner als adulte, zudem besitzen sie eine geringere Ploidität. Beide Parameter nehmen mit zunehmender Reifung des Feten zu. Trotz der geringeren Ploidität weisen fetale MKs eine erhöhte Proliferationsrate auf, verglichen zu adulten MKs. Auch wenn fetale MK einige Zeichen der Unreife aufweisen, so können sie die meisten liniendefinierenden Faktoren hochregulieren. Dies beinhaltet ebenso Oberflächenrezeptoren

wie Granulabestandteile, welche für eine normale Thrombozytenform und -funktion notwendig sind. In fetalen MKs findet man, verglichen zu adulten MKs, ähnliche Level an CD41, CD61 sowie CD42b. Dabei ist zu erwähnen, dass der CD42-Komplex einen Marker einer ausgeprägten Differenzierung darstellt. Der größte Unterschied zwischen fetalen und adulten MKs liegt jedoch bei der Thrombozytenproduktion. Hier weisen die fetalen eine deutlich geringere Effizienz auf, denn trotz des reifen Zytoplasmas kann ein fetaler MK im Schnitt nur ein Drittel der Thrombozyten produzieren, die von adulten MK generiert werden. Dies ist wahrscheinlich auf die geringere Größe und Ploidität der fetalen MKs zurückzuführen. Während der Gestation kommt es zu einer Reifung der MKs. Mit der Zeit nimmt die Fähigkeit, Thrombozyten zu produzieren, durch Hochregulierung bestimmter Transkriptionsfaktoren (z.B. STAT5A, ETS2 oder DLX1) stetig zu. Ein Wechsel hin zum hämostatisch aktiven Phänotyp wurde mit Hochregulierung der Faktoren ITGA6, CXCR4, VWF, *SLC6A4* und MAOB beobachtet. [4, 20-22]

1.2.2 Thrombopoietin

Eine Schlüsselrolle in der Megakaryopoiese und Thrombozytenproduktion spielt das Hormon Thrombopoietin (Tpo). Es wird hauptsächlich in der Leber gebildet, sowohl im Feten als auch im Erwachsenen [23]. Die Hauptaufgaben von Tpo sind die Stimulation von MKs, die Proliferation von MK-Vorläuferzellen, Formation von MK-Kolonien, sowie die Reifung der MKs. Versuche haben gezeigt, dass Tpo allein die Größe, Ploidie und die zelltypspezifischen Marker GpIb und GpIIb/IIIa steigern kann. Megakaryozyten werden durch Tpo auf die Thrombopoiese vorbereitet, wobei die finalen Schritte der Thrombozytenformation Tpo-unabhängig sind. [24-26] Megakaryozyten und Thrombozyten exprimieren mehrere Rezeptoren, die für eine Interaktion mit Tpo benötigt werden, wie beispielsweise den Thrombopoietin-Rezeptor. Supraphysiologische Konzentrationen von Tpo (>100ng/ml) konnten *in-vitro* Plättchenaggregation aktivieren, in physiologischer Konzentration konnte Tpo die Thrombozyten für Stimulation mit anderen Agonisten vorbereiten. Bei niedrigen Konzentrationen von 0,01-1ng/ml vermag Tpo die Adhäsion an vWF und Thrombusbildung unter Blutfluss zu beschleunigen und zu stabilisieren [27-29].

1.2.3 Thrombopoietin im Neonaten

In gesunden Neugeborenen sind die Tpo-Spiegel im Vergleich zum Erwachsenen erhöht [30]. Hinzu kommt, dass neonatale MK-Vorläufer deutlich empfindlicher auf Tpo reagieren, indem sie größere MK-Kolonien bilden als adulte Zellen bei gleicher Tpo-Konzentration [31]. Es wird angenommen, dass die erhöhte Sensibilität darauf beruht, dass der Tpo Signalweg über mTOR (*mechanistic Target of Rapamycin*) im Neonaten hochreguliert ist [32].

1.3 Thrombozytenfunktion im Neonaten

Die Funktion adulter Thrombozyten wurde bereits eingehend erforscht. Im fetalen System gibt es jedoch vergleichsweise wenig Studien und Erkenntnisse. Besonders *in-vivo* Experimente werden aufgrund ihrer schweren Umsetzbarkeit nur selten durchgeführt.

1.3.1 Verminderte Fähigkeit zur Thrombusbildung

Ähnlich wie fetale Megakaryozyten sind auch fetale Thrombozyten in ihrer Funktion eingeschränkt im Vergleich zu adulten Thrombozyten. *In-vitro* Daten zeigen, dass Thrombozyten von Früh- sowie Reifgeborenen in der Aggregometrie deutlich verminderte Aggregation aufweisen, wenn man sie mit physiologischen Agonisten (z.B. ADP, Kollagen, Thromboxan) stimuliert [33, 34]. Dabei ist zu erwähnen, dass diese Hyporeaktivität auf Stimuli mit dem Gestationsalter korreliert. Dem gegenüber steht jedoch eine kürzere Blutungszeit und verstärkte Ristocetin-induzierte Agglutination in reifen Neugeborenen verglichen mit Erwachsenen [34]. Mögliche Erklärungen dafür sind die hohe Plasmakonzentration und -aktivität des vWF, sowie der erhöhte Hämatokrit. Die vWF-Multimere sind zudem deutlich vergrößert, was auf eine verminderte Aktivität der vWF-spaltenden Protease zurückzuführen ist [35].

Neue intravitalmikroskopische Studien in Mausfeten haben gezeigt, dass fetale Thrombozyten deutlich verringerte Thrombosebildung zeigen. Dies korrelierte mit dem Gestationsalter. Je jünger der Fetus, desto seltener sowie später zeigte sich eine Thrombusbildung. Falls es zu einer Thrombusbildung kam, dauerte es bei den jüngeren Feten deutlich länger, bis sich das Gefäß komplett verschloss. Die Stabilität der Thromben war ebenfalls alterskorre-

liert vermindert, was zur vollständigen Wiedereröffnung der mit Thrombose verschlossenen Gefäße führte [36].

1.3.2 Veränderte Expression der Oberflächenmoleküle

Die verminderte Aggregationsfähigkeit lässt sich einerseits durch erniedrigte Thrombozytenkonzentrationen im murinen Fetus erklären. Margraf et al. haben dies im murinen Modell gezeigt [36]. Die Thrombozytenaggregation wird allerdings auch durch die Expression von Adhäsionsmolekülen bestimmt. Auf unstimulierten fetalen Thrombozyten konnte verminderte Oberflächenexpression von GpIb nachgewiesen werden, sowie eine Abnahme des GpIb nach Stimulation mit Thrombin. Zwar weisen die fetalen Thrombozyten, verglichen mit adulten, erhöhte Basalwerte von GpIIb auf, es findet jedoch kaum eine Aktivierung zur hochaffinen Form GpIIb/IIIa statt, wenn man mit Thrombin stimuliert. Ähnliche Ergebnisse konnten auch bei Stimulation mit ADP oder Kalziumionophor erzielt werden. Dieser verminderte Konformationswechsel kann mit einer erniedrigten Expression von Kindlin-3, Talin-1 und Rap1 in fetalen Thrombozyten erklärt werden [36]. P-Selektin, ein Oberflächenprotein, welches als Thrombozytenaktivierungsmarker genutzt wird [37], weist sowohl beim adulten als auch beim fetalen ruhenden Thrombozyten niedrige Basalwerte auf. Nach Aktivierung mit Thrombin oder Kalziumionophor konnte im adulten Thrombozyten eine Hochregulierung beobachtet werden, im Feten blieb diese jedoch fast komplett aus. Dabei muss erwähnt werden, dass die P-Selektin Spiegel auch insgesamt im Feten reduziert waren [36].

1.3.3 Vermindertes Thrombozyten-*Spreading* im Fetus

Bei fetalen Thrombozyten wurden ein erhöhtes mittleres Volumen und eine höhere Verteilungsbreite des Durchmessers beobachtet als bei adulten. Bei Betrachtung des Thrombozyten-*Spreadings* fällt auf, dass junge Feten (Gestationsalter E13.5) nach Stimulation mit Thrombin eine deutlich reduzierte *Spreading*kapazität aufweisen [36]. Die Morphologie unterscheidet sich hierbei ebenfalls. So durchlaufen adulte Thrombozyten die verschiedenen Stufen des *Spreadings* zunächst in spindelähnlicher Form unter Ausbildung von Filopodien. Darauf folgt die Ausweitung der Lamellipodien bevor die Thrombozyten schließ-

lich ihre endgültige Spiegeleiform annehmen [19]. Fetale Thrombozyten (E13.5) hingegen formen größtenteils nur kurze Filopodien und breiten sich kreisförmig durch primäre Ausweitung der Lamellipodien aus [36].

1.3.4 Gesteigerte Aggregation bei Transfusion adulter Thrombozyten in Feten

Bei der Transfusion adulter muriner Thrombozyten in die fetale Blutzirkulation der Maus (Gestationsalter E14.5) wurde in 100% der Fälle unmittelbar spontane Thrombenbildung beobachtet. Im Gegensatz dazu konnte dieser Effekt nur in einem Drittel der Fälle beobachtet werden, wenn altersentsprechende Thrombozyten (E14.5) transfundiert wurden. Bei Transfusion adulter Thrombozyten in den adulten Blutkreislauf kann ebenfalls keine gesteigerte spontane Aggregation beobachtet werden. Dies lässt den Schluss zu, dass die adulten Thrombozyten durch die fetale Umgebung aktiviert werden und somit fetales Plasma als stark prothrombotisch angesehen werden kann.

Obwohl fetale Thrombozyten im Vergleich zu adulten hyporeaktiv sind und eine verminderte Adhäsion aufweisen, zeigen gesunde Reifgeborene im PFA-100 Test (Thrombozytenfunktionstest) eine kürzere Blutungszeit als Erwachsene. Diese Hyporeaktivität, kombiniert mit der Erkenntnis, dass adulte Thrombozyten unmittelbar aktiviert werden, sobald sie mit fetalem Blut in Berührung kommen, führt zu dem Schluss, dass fetales Blutplasma hyperkoagulable Eigenschaften aufweist. So wird im gesunden Feten trotz der „Unreife“ der Thrombozyten eine ausreichende Gerinnung sichergestellt. [36]

1.3.5 Plazentaschranke und fetale Immunglobulinspiegel

Das Blutplasma eines Feten hat eine andere Zusammensetzung als das eines Erwachsenen. Das liegt daran, dass ein ständiger Austausch zwischen maternalem und fetalem Blut über die Plazenta stattfindet. Eine der Hauptfunktionen der Plazenta ist die Versorgung des heranwachsenden Feten mit Nährstoffen und Sauerstoff [38]. Über die Plazentaschranke wird geregelt, welche Stoffe aus dem mütterlichen Kreislauf in den fetalen Kreislauf übergehen und andersherum. So können beispielsweise mütterliche Immunglobuline der Klasse G (IgG) die Plazentaschranke überwinden, während Immunglobuline der Klasse M (IgM) die Plazentaschranke nicht passieren können. IgG werden ab dem zweiten Trimenon über

Transzytose aktiv ins fetale Blut transportiert [39]. Die IgG-Konzentration im Feten erreicht bis zur 33. Schwangerschaftswoche fast die Hälfte der IgG-Konzentration eines Erwachsenen [39, 40]. Ab der zwanzigsten Schwangerschaftswoche sind Feten in der Lage, geringe Mengen an IgM (und IgG) selbst zu bilden, jedoch erreichen die IgM Spiegel nur ein Zehntel der Plasmakonzentration eines Erwachsenen [41].

1.4 Immunthrombose

1.4.1 Die Rolle der Thrombozyten bei Infektion und Inflammation

Wie bereits erwähnt, sind Thrombozyten an der Immunabwehr beteiligt. Sie können sofort reagieren, wenn Bakterien in das Gefäßsystem eindringen. Pathogene besitzen sogenannte pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs), welche von *Pattern-Recognition-Rezeptoren* wie z.B. den *Toll-like* Rezeptoren (TLRs) oder den *nucleotide-binding oligomerization domain* (NOD)-like Rezeptoren erkannt werden können. Thrombozyten exprimieren sowohl TLRs als auch NODs und kürzlich konnte gezeigt werden, dass diese Rezeptoren die Thrombozytenaktivierung über unterschiedliche Signalwege triggern und potenzieren können. Dabei spielen besonders TLR1, TLR2, TLR4, TLR9 und NOD2 eine wichtige Rolle. Dieser Mechanismus der Thrombozytenaktivierung kann als Immunantwort parallel zum angeborenen Immunsystem angesehen werden. [42, 43]

1.4.2 Thrombozyteninteraktion mit Leukozyten

Wenn Thrombozyten einen Thrombus formen, können sie Leukozyten und andere Immunzellen rekrutieren. Sie schütten zahlreiche Mediatoren aus, die die Akkumulierung von Leukozyten und ihre bakterizide Wirkung unterstützen. Solche Mediatoren sind unter anderem CXC-Chemokinrezeptorliganden, CC-Chemokinrezeptorliganden, CD154 und der TREM 1 Ligand (*Ligand for triggering receptor expressed on myeloid cells 1*).

Thrombozyten können auch direkt mit Leukozyten interagieren. Über P-Selektin und den P-Selektinliganden PSGL-1 beeinflussen sie Zellmigration und die leukozytäre Bildung von extrazellulären DNA-Strängen, die Histone und neutrophile antimikrobielle Proteine enthalten. Durch diese sog. NETs (*Neutrophil extracellular traps*) werden Pathogene eingeschlossen und getötet, gleichzeitig wird aber auch ein Feedback an andere Thrombozyten

gesendet, um diese zu rekrutieren, zu aktivieren und eine Thrombose auszulösen. Dies geschieht, indem Histone thrombozytären TLRs präsentiert werden. Zudem könnte die Bindung des vWF an NETs eine Plattform darstellen, welche weitere zirkulierende Thrombozyten und Leukozyten bindet und somit die Thrombusbildung fördert. [44]

Neutrophile Granulozyten können mithilfe von Proteasen die Blutgerinnung einleiten. Diese Proteasen deaktivieren über extrazelluläre Nukleosomen das antikoagulatorisch wirksame TFPI (*tissue factor pathway inhibitor*) und aktivieren somit die *tissue factor* und Faktor XII abhängige Gerinnung. Durch Gefäßthrombosierung können damit pathogene Erreger davon abgehalten werden, sich im Körper auszubreiten. [45]

1.4.3 Thrombozyteninteraktion mit Bakterien

Granula enthalten Immunmodulatoren, wie zum Beispiel den Plättchenfaktor 4 (PF4), welcher von Thrombozyten freigesetzt wird. PF4 kann an Bakterien binden und deren Phagozytose durch Granulozyten fördern [46]. Es werden darüber hinaus immunmodulatorisch wirksame Liganden (z.B. CD154, welcher zusammen mit dem Endothelzellrezeptor CD40 eine Entzündungsreaktion auslösen und aufrechterhalten kann) auf der Thrombozytenoberfläche exprimiert [47, 48]. Weiterhin ist bekannt, dass das Komplementsystem über den Komplementfaktor C3a Thrombozyten aktivieren kann [49]. Umgekehrt vermögen aktivierte Thrombozyten das Komplementsystem zu aktivieren und über P-Selektin den Komplementfaktor C3b zu binden [50]. Es konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten die sich im Blut befindlichen Bakterien (z.B. *Listeria monocytogenes*) mittels des Oberflächenrezeptors GpIb und des Komplementfaktors C3 binden und dann mit CD8-positiven dendritischen Zellen der Milz interagieren. Das Präsentieren der Bakterien durch den Thrombozyten-C3-Komplex führt dabei zu einer effektiveren Immunantwort dieser dendritischen Zellen [51].

Thrombozyten können an Bakterien auch direkt über Plättchenrezeptoren wie GpIIb/IIIa, GpIb α , Fc γ RIIA sowie dem Toll-like Rezeptor oder indirekt über Plasmaproteine (z.B. vWF, Komplementfaktoren, Fibrinogen oder IgG) binden [52].

Die Bindung von Bakterien an Thrombozyten kann in einer Thrombusbildung resultieren. Dabei werden andere Thrombozyten und die Gerinnungskaskade aktiviert, zudem werden die Bakterien dadurch gruppiert. Es entsteht ein Thrombus, der die Bakterien einschließt. Durch Sekretion antimikrobieller Peptide werden die Pathogene dann direkt abgetötet [53-56]. Die Demarkation von Pathogenen durch den Wirt entwickelte sich höchstwahrscheinlich als primärer Abwehrmechanismus, um die Ausbreitung der Bakterien zu begrenzen. Dieser Mechanismus wird jedoch von manchen Erregern (z.B. *Staphylococcus aureus*) untergraben und ausgenutzt [57]. Viele Stämme haben eine Resistenz gegenüber diesen antimikrobiellen Peptiden entwickelt, was dazu führte, dass die Versuche, die Bakterien abzutöten, häufig scheiterten [58, 59]. Daraus folgt, dass sich die Bakterien ungehindert vermehren können, geschützt durch mehrere Schichten von Thrombozyten und Fibrinogen, welche die Pathogene vor Immunzellen schützen [60, 61].

1.4.4 Thrombose durch Immunglobuline

Zur Rolle der Immunglobuline bei der Entstehung der Thrombose ist bisher wenig bekannt. Man geht bisher davon aus, dass Antikörper in der Hämostase nicht mitwirken [62]. Es gibt jedoch klinische Hinweise, die auf eine Beteiligung von Antikörpern in der Thromboseentstehung schließen lassen: Zum einen können Autoantikörper, wie bei dem Antiphospholipidsyndrom, indirekt arterielle und venöse Thromben verursachen [63], zum anderen gibt es Antikörper, welche speziell gegen Thrombozyten gerichtet sind, wie bei der heparin-induzierten Thrombozytopenie (HIT), und dadurch direkt Thrombozyten aktivieren [64]. Weiterhin gibt es Hinweise, dass unspezifische Immunglobuline prothrombogen wirken können, da die Thrombose auch als schwerwiegende Nebenwirkung von intravenösen Immunglobulingaben (IVIG) aufgeführt wird [65].

Stark et al. untersuchten die zugrundeliegenden Mechanismen, welche für die Interaktion zwischen Immunglobulinen und Thrombozyten sorgen. Es konnte gezeigt werden, dass IgM Antikörper, ungeachtet der Antigenspezifität, an den endothelialen Fc μ -Rezeptor (Fc μ R) binden können, was eine vermehrte Expression von vWF und P-Selektin auf der Endotheloberfläche zur Folge hat. Dies führt zu einer gesteigerten Thrombozytenadhäsion an das Endothel über das GpIb und Aktivierung der Thrombozyten. P-Selektin führt zudem zu gesteigertem Leukozytenrollen und -rekrutierung sowie einer Komplementaktivierung

[66, 67]. Darüber hinaus können aktivierte Thrombozyten über Bindung an IgG das Komplementsystem über C1q, C3 und C4 aktivieren, was wiederum die Thrombozytenaggregation und NET-Bildung unterstützt. IgG bindet dabei an Fibrin und Chondroitinsulfat A (CS-A), welches auf der Oberfläche von aktivierten Thrombozyten exprimiert wird. Dies aktiviert die klassische Komplementkaskade und fördert somit die Aktivierung von weiteren Thrombozyten und Granulozyten. Zusammengefasst lässt sich die Rolle der Immunglobuline in zwei Phasen untergliedern, in eine IgM-vermittelte Thrombozytenadhäsion und eine IgG und komplementvermittelte Unterstützung der Aggregation und somit des Thrombuswachstums. (Stark et al., in Revision)

2 Hypothese und Zielsetzung

Die Unterschiede zwischen adulten und fetalen Thrombozyten sind bisher nur unzureichend erforscht und bekannt. Das bereits etablierte Mausmodell der *in-vivo light-dye* induzierten Thrombusbildung im Feten hilft, dieses Problem anzugehen, da es die Möglichkeit bietet, die Thrombusentstehung *in-vivo* zu beobachten und gegebenenfalls zu beeinflussen [36, 68]. Ausgehend von neuen Erkenntnissen gibt es eine direkte Korrelation zwischen der Immunglobulinkonzentration und der tiefen Venenthrombose in der adulten Maus. In antikörperdepletierten Mäusen waren Thrombosen seltener und dauerten auch in der Entstehung länger als in Mäusen mit normalen Immunglobulinspiegeln (Stark et al., in Revision). Betrachtet man das fetale Blutplasma, so findet man ein System, welches kaum Immunglobuline besitzt und eine reduzierte Thrombusbildung zeigt. Überträgt man diese neuen Erkenntnisse nun auf das fetale System, so ergibt sich die Hypothese, dass die fetale Thrombozytenfunktion ebenfalls durch die Immunglobulinkonzentration beeinflusst werden könnte.

In dieser Arbeit soll daher geprüft werden,

1. ob es möglich ist, die Thrombusbildung in der Mikrozirkulation von adulten Wildtypmäusen durch Injektion von IgM-Antikörpern im Modell der *light-dye* induzierten Mikrothrombose zu beschleunigen?
2. ob es einen Unterschied in der Thrombusbildung zwischen HyperIgM-Mäusen, antikörperdepletierten Mäusen und Wildtypmäusen im Modell der mikrovaskulären *light-dye* Schädigung gibt?
3. ob man durch Änderung der IgM-Konzentration die Thrombusbildung im murinen Fetus beeinflussen kann?

3 Material, Versuchstiere und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Gerät	Bezeichnung/Herstellerangaben
Chirurgisches Instrumentarium	F.S.T. Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
DVD-Recorder	Panasonic DVD Video Recorder LQ-MD800; Panasonic Europe GmbH, Wiesbaden, Deutschland
Digital-Multimeter	Voltcraft, Hirschau, Deutschland
Feinwaagen	Scaltec SBC32, Scaltec Instruments, Göttingen, Deutschland
	572-32 Kern, Kern&Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
	CPA225D-0CE Sartorius, Sartorius Lab Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
Heizplatte	Isopad Icon-CHP; Tyco Thermal Controls, Siegen, Deutschland (jetzt: Pentair Thermal Management)
Idexx ProCyt Dx hematology analyzer	Idexx Europe B.V., Hoofddorp, Niederlande
Kapillarschleifer	H. Saur Laborbedarf, Reutlingen, Deutschland
Kauter	Electro-Cautery-Device, Gemini; Braintree Scientific Inc., Braintree, MA, USA
Magnetheizrührer	PeqMIX Plus, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipetten-Puller vertikal	H. Saur Laborbedarf, Reutlingen, Deutschland
Pump 11 Elite Infusion/Withdrawal Programmable Single Syringe	Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA
Videorekorder	Panasonic MD 830; Panasonic Video Cassette Recorder AG-5700; Panasonic Europe GmbH, Wiesbaden, Deutschland
Vortexer	Ms1 Minishaker IKA-Werke GmbH, Staufen
	Vortex-Genie 2; Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA
Wärmebad	Julabo EM; Julabo, Seelbach, Deutschland
Waage	KE876, ADE Germany, Hamburg, Deutschland

Tabelle 1: Geräte

3.1.2 Mikroskope und Zubehör

Typ	Gerät	Hersteller/Eigenschaften
<i>in-vivo</i> Mikroskop	Olympus BX51 WI	Olympus, Hamburg, Deutschland
	Olympus U-RFL-T	
	Olympus BX-UCB	
	Olympus BX51 mercury lamp	
	Olympus U-25 ND6	Intensitätsfilter
	Olympus U-25 ND25	Intensitätsfilter
	Olympus TH4-200	Durchlicht
	Spiegel	M70/100
	Spiegel 2	50%
	SP-20 (Blitz)	Rapp Opto-Electronics, Hamburg
	EXFO Motorized Platform	Gibraltar Burleigh, Thorlabs, Newton, NJ, USA
	Kappa CF8 HS DRELG (Kamera Video)	Kappa optronics GmbH, Gleichen, Deutschland
Objektive <i>in-vivo</i> Mikroskop	LaVision ImagerPro X (Kamera PC)	LaVision Biotec, Bielefeld, Deutschland
	Fast Filter Wheel FW8-0023	
	Objektiv 10x	Olympus UMPlan FI 10x/0.30W $\infty/-$
	Objektiv 20x	Olympus XLUMPlan FI 20x/0.95W $\infty/0$
	Objektiv 40x	Olympus LUMPlan FI/IR 40x/0.8W $\infty/0$
Präpariermikroskop	Objektiv 60x	Olympus LUMPlan FI/IR 60x/0.90W $\infty/0$
	KL1500 LCD	Kaltlicht, Schott AG, Mainz, Deutschland
	Olympus SZX	Olympus, Hamburg, Deutschland
	Olympus DF PLAPO 1x-4	

Tabelle 2: Mikroskope und Zubehör

3.2 Substanzen

3.2.1 Chemikalien

Substanz	Hersteller
CaCl₂	Merck Millipore; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Flow-Count Fluorospheres (Polystyrol-Fluorosphären) nom. Durchmesser 10 µm Exzitation/ Emission (Max): 490nm/520nm	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
FITC-Dextran Exzitation/ Emission (Max): 490nm/525nm	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland (Bezeichnung FD150S-1G)
Heparin-Natrium 25000	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
<i>in-vivo</i> Superfusionspuffer (Klitzman und Duling, 1979)	Bestehend aus: 10% v/v Lösung 1 und 10% v/v Lösung 2 in demineralisiertem Wasser. Begasung mit 95% N ₂ und 5% CO ₂ mittels eines Sprudelsteines; Zusammensetzung Lösung 1: 292,9 g NaCl, 13,3 g KCl, 11,2 g CaCl ₂ , 7,7g MgCl ₂ ; lösen in 3,8 L demineralisiertem Wasser Zusammensetzung Lösung 2: 57,7 g NaHCO ₃ ; lösen in 3,8 L demineralisiertem Wasser)
Isopropanol /2-Propanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
KCl	Merck Millipore; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
MgCl₂	Merck Millipore; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NaCl	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
NaHCO₃	Merck Millipore; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Mouse IgM 1mg/ml	EMD Millipore Corporation, Temecula, USA (Bezeichnung PP50, 2886892)
Dexpanthenol 5% Augensalbe	Bepanthen [®] , Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland

Tabelle 3: Verwendete Substanzen für Injektion und Applikation

3.2.2 Narkosemittel

Substanz	Bezeichnung	Hersteller
Fentanyl	Fentanyl-Janssen®	Janssen-Cilag GmbH
Ketamin	Ketavet® (100mg/ml)	Pharmacia GmbH
Medetomidin	Domitor®/Dorbene®	Orion Corporation/Dr. E. Graeb AG
Midazolam	Dormicum®	F. Hoffmann-La Roche AG
Xylazin	Rompun® 2%	Bayer Health Care

Tabelle 4: Verwendete Narkotika

3.2.3 Verbrauchsmaterial

Gegenstand	Hersteller
Falcon Tubes (5,15,50 ml)	Falcon, Corning/BD
Glaskapillaren	Clark Capillaries, GC150TF-10; Clark Electromedical Instruments, Pangbourne Reading, UK
Kanülen (verschiedene Größen)	BD
Pipettenspitzen (1, 2, 5, 10, 25 ml)	Corning
Spritzen (1, 10 ml)	Braun®
Spritzen (2, 5, 20 ml)	BD
Fine Bore Polyethene Tubing (0.28mm ID, 0.61mm OD)	Portex, Smiths Medical International Ltd.
Polyethylene Tubing (0.030“ ID, 0.048“ OD)	Intramedic®, Clay Adams, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Histoacryl Gewebekleber 0,5ml	Braun®

Tabelle 5: Verbrauchsmaterial

3.2.4 Software

Software	Hersteller
Endnote X9	Thomson Reuter, Toronto, Kanada
Inspector Pro	LaVision Biotech, Bielefeld, Deutschland

ImageJ 1.48	National Institute of Health, Maryland, USA
Microvessel velocity OD-RT	CircuSoft Instrumentation, Hockessin, USA
Microsoft Office 2010	Microsoft, Redmond, USA
VirtualDub 1.10.4	Virtualdub.org

Tabelle 6: Verwendete Software

3.3 Versuchstiere

Die Tierversuche dieser Arbeit wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt (Az 55.2-1-54-2531-122-12 und -229-15). Für die Versuchsreihe mit adulten Tieren wurden C57Bl6 als Wildtyp (WT) Kontrolltiere (Charles River, Sulzfeld, Deutschland; Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) verwendet. Das Alter der Mäuse betrug zwischen 11 und 38 Wochen, das Gewicht lag zwischen 23 und 43 Gramm.

Zusätzlich wurden für die adulte Versuchsreihe am Cremastermodell gentechnisch modifizierte Mäuse verwendet. Zum einen $AID^{-/-}$ und zum anderen $AID^{-/-} \mu s^{-/-}$ (auch genannt sIgM $AID^{-/-}$). Die Mäuse stammen von Prof. Dr. Admar Verschoor, Institut für Systemische Entzündungsforschung, Universität Lübeck, Deutschland. Die *activation-induced cytidine deaminase knock-out* Mäuse ($AID^{-/-}$) besitzen fast ausschließlich IgM-Antikörper, da der Ig-Klassenwechsel von IgM zu IgG durch den Verlust von AID blockiert wird. Die $AID^{-/-} \mu s^{-/-}$ *double knock-out* Mäuse besitzen zwar polyklonale B-Lymphozyten, diese sind jedoch nicht in der Lage, Antikörper zu bilden. [69, 70]. Das Alter der Mäuse betrug zwischen 12 und 41 Wochen, das Gewicht zwischen 24 und 38 Gramm.

Terminierte Verpaarung mit C57Bl6

Für die Versuche an Mausfeten wurden C57/Bl6 Wildtyp (WT) Tiere miteinander terminiert verpaart. Das Alter der Muttertiere war zum Zeitpunkt der Versuche zwischen 10 und 17 Wochen, das Gewicht der schwangeren Mäuse lag in diesem Zeitraum zwischen 31 und 39 Gramm. Zur Verpaarung wurden je zwei Weibchen zu einem Zuchtmännchen für eine Nacht gesetzt. Die Käfige verfügten über einen lichtgeschützten Bereich, in den sich die Tiere zurückziehen konnten. Am Morgen wurde das Männchen aus dem Käfig entfernt. Die Weibchen wurden daraufhin untersucht, ob sich ein vaginaler *Plug* gebildet hat. Der *Plug*

ist ein weißlicher Pfropf, welcher den Eingang der Vagina nach erfolgter Begattung verschließt und aus verfestigtem männlichem Ejakulat besteht [71]. Die Weibchen werden bei Vorhandensein eines *Plugs* in einen separaten Käfig gesetzt, der Tag der *Plug*kontrolle wurde als E0.5 bezeichnet. Es folgte eine regelmäßige Kontrolle des Gewichts und des Bauchumfanges zur Überwachung des Schwangerschaftsverlaufes. Wenn die Feten das erforderliche Alter erreicht hatten, wurden die Muttertiere in den Operationsraum gebracht.

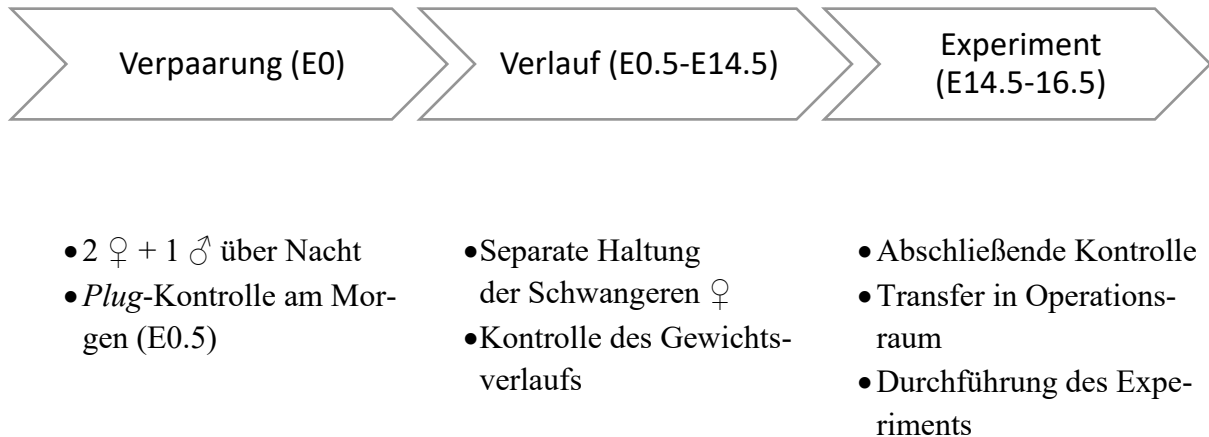


Abbildung 4: Übersicht über terminierte Verpaarung

3.4 Narkose

3.4.1 Adultes Modell

Die Narkose der Mäuse erfolgte mittels intraperitonealer (i.p.) Injektion des Narkosecocktails. Als Narkotikum wurde eine Mischung aus *Ketamin* und *Xylazin* (Initialdosis: 125µg/g KG Ketamin, 25 µg/g KG Xylazin) verwendet. Zur Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte eine wiederholte i.p. Injektion der Narkosemischung (42mg/kg KG Ketamin, 8 mg/kg KG Xylazin).

3.4.2 Fetales Modell

Die Narkose erfolgte mittels intramuskulärer (i.m.) Injektion in den Oberschenkel des Muttertiers. Als Narkotikum wurde eine Mischung aus *Medetomidin* (0,5µg/g Körpergewicht), *Midazolam* (5µg/g KG) und *Fentanyl* (0,05µg/g KG) als Initialdosis verabreicht. Es erfolgte zur Aufrechterhaltung der Narkose eine wiederholte i.m. Injektion der Narkosemischung (Medetomidin 0,2µg/g KG, Midazolam 2µg/g KG, Fentanyl 0,02µg/g KG).

3.5 Fertigung der Mikroinjektionskapillaren für fetale Injektionen

Für die Injektion von Substanzen in den fetalen Blutkreislauf wurden gläserne Mikroinjektionskapillaren hergestellt. Dafür wurden Glaskapillaren mit Außendurchmesser von 1,5mm mithilfe eines vertikalen Pipetten-Pullers und eines Kapillarschleifers auf einen Öffnungsdurchmesser von kleiner als 0,1mm verkleinert und zugespitzt. Der Öffnungsdurchmesser variierte je nach Gefäßdicke und Verlauf. Die Spitze wurde ähnlich einer Kanüle spitz angeschliffen (Abb. 4).

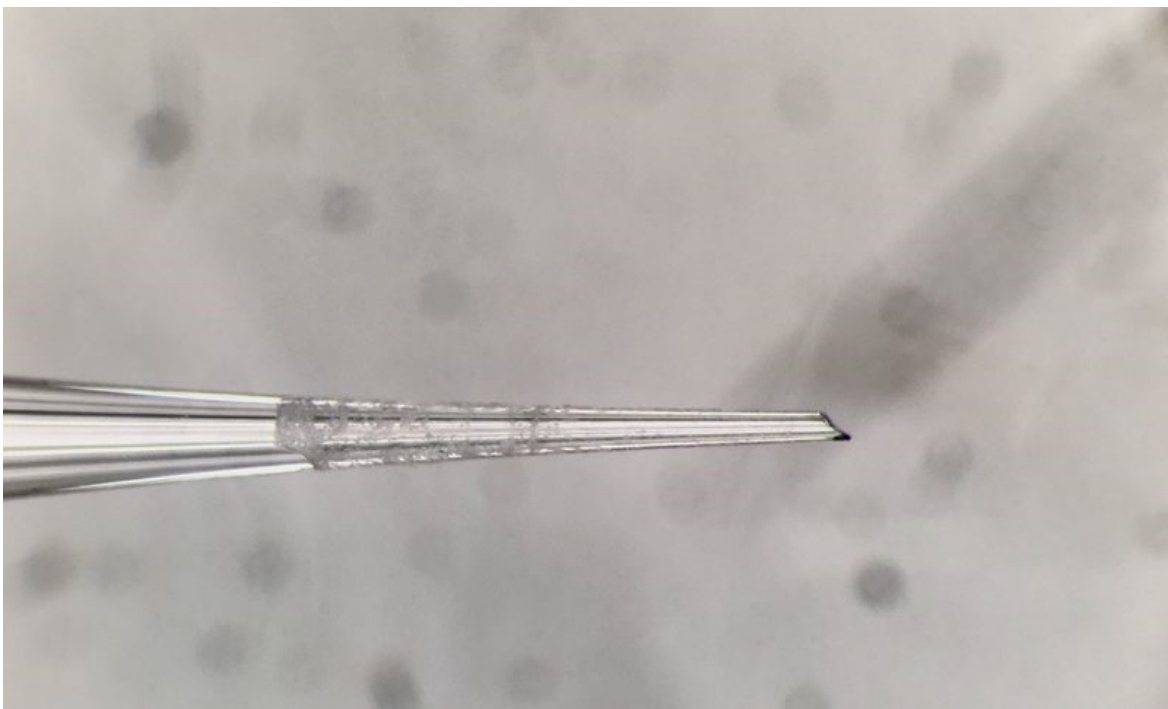


Abbildung 5: Mikroinjektionskapillare. Ansicht unter dem Präparationsmikroskop. Man kann den kanülenartigen Schliff erkennen, der benötigt wird, um das Gefäß zu punktieren. Aufnahme mit 5x Objektiv.

3.6 Versuchsablauf

3.6.1 Adultes Modell

3.6.1.1 Intubation/Tracheotomie

Das narkotisierte Tier wurde rücklings auf eine Heizplatte gelegt, welche eine ständige Körpertemperatur von 37°C gewährleistete. Nachdem durch Schmerzreize die Narkosetiefe

geprüft wurde (Fehlen des Zwischenzehenreflexes), wurden die Tiere an den Beinen mit Tape fixiert. Die Augen wurden mittels Augensalbe bedeckt und der ventrale Hals wurde mit 70%-igem Ethanol desinfiziert. Die Präparation geschah unter einem Präparationsmikroskop (*Olympus SZX7*). Es wurde am ventralen Hals ein 1 cm langer Longitudinalschnitt unterhalb des Schildknorpels vorgenommen. Fettgewebe und Muskeln wurden stumpf gespalten, sodass die Trachea freigelegt werden konnte. Diese wurde zwischen zwei Ringknorpeln eröffnet. Danach wurde ein 3 cm langer Tubus (Intramedic Polyethylene Tubing (0.030“ ID, 0.048“ OD)) einige Millimeter tief eingeschoben und mit Fäden fixiert (Abb. 5A).

3.6.1.2 Anlage des Karotiskatheters

Nach Anlage des Endotrachealtubus präparierte man vorsichtig tiefer, um die A. carotis freizulegen. Nach Lösen des Fettgewebes und des anderen perivasalen Gewebes wurde der Blutfluss mittels einer kleinen Klemme unterbrochen und nach kranial mit einem Faden abgebunden. Es erfolgte eine kleine transversale Inzision der Karotis. Der heparinisierte Karotiskatheter (Fine Bore Polyethene Tubing (0.28mm ID, 0.61mm OD) wurde anschließend unter höchster Vergrößerung des Mikroskops in das Gefäß vorgeschoben und in der Karotis mit Fäden um das Gefäß fixiert. Als Zeichen der korrekten Lage wurde nach Lösen der Klemme ein Einschießen von Blut in den Katheter beobachtet (Abb. 5B).

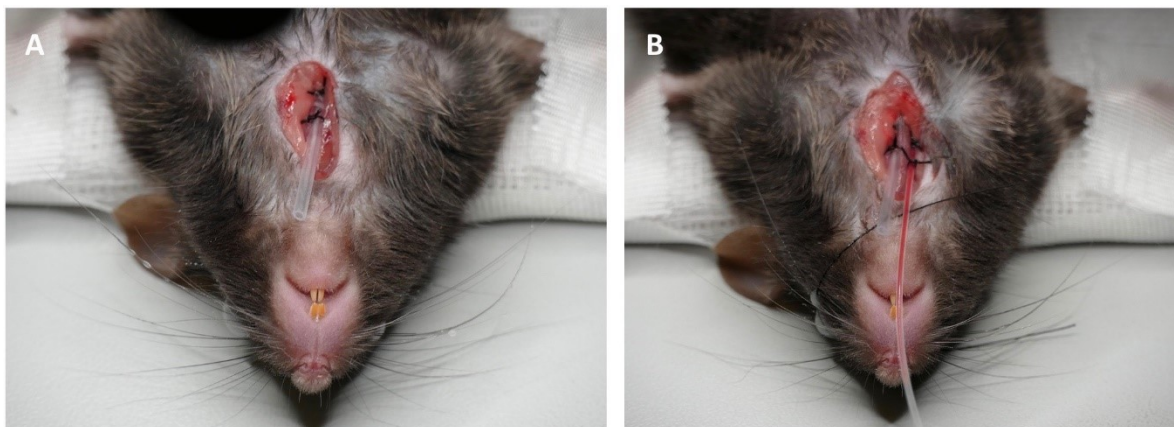


Abbildung 6: Narkotisierte Maus mit eröffnetem Hals (mit freundlicher Genehmigung der AG Sperandio). A: In einem ersten Schritt erfolgte die Anlage eines Tracheostomas. B: Nach Sicherung der Atemwege wurde ein Gefäßzugang über die A. carotis geschaffen.

3.6.1.3 Anlage eines Schwanzvenenkatheters

Als Alternative zur Katheterisierung der Arteria carotis wurde ein Schwanzvenenkatheter angelegt. Als Katheter diente dabei ein dünner, heparinisierter Plastikschauch (Fine Bore Polyethene Tubing (0.28mm ID, 0.61mm OD)), welcher an einer feinen Kanüle (30G) befestigt war. Zunächst wurde der Schwanz der Maus in warmes Wasser getaucht, um eine Dilatation der Venen zu erreichen. Anschließend wurde eine der beiden Schwanzvenen mit der Kanüle punktiert und mit wenigen Mikrolitern physiologischer Kochsalzlösung gespült. Bei ordnungsgemäßer Lage des Katheters wurde dieser mit *Histoacryl* Gewebekleber am Schwanz fixiert.

3.6.1.4 Cremasterpräparation

Die Maus wurde rüklings auf die eigens für Cremasterversuche entwickelte Plexiglasplatte gelegt. Das Skrotum wurde einseitig mit einer Schere eröffnet, der Hoden mitsamt Cremastermuskel aus dem Skrotum gezogen und durch einen Pin an der für den M. cremaster bestimmten Fläche fixiert. Der Cremaster wurde mit 37°C-warmer Superfusionslösung ständig feuchtgehalten. Nach der Entfernung von Fettgewebe erfolgte eine Längsinzision des Muskels, um diesen auf der Platte aufspannen zu können (Abb. 6). Der Hoden wurde vom Cremastermuskel weitgehend mobilisiert und lateral auf der Platte fixiert.

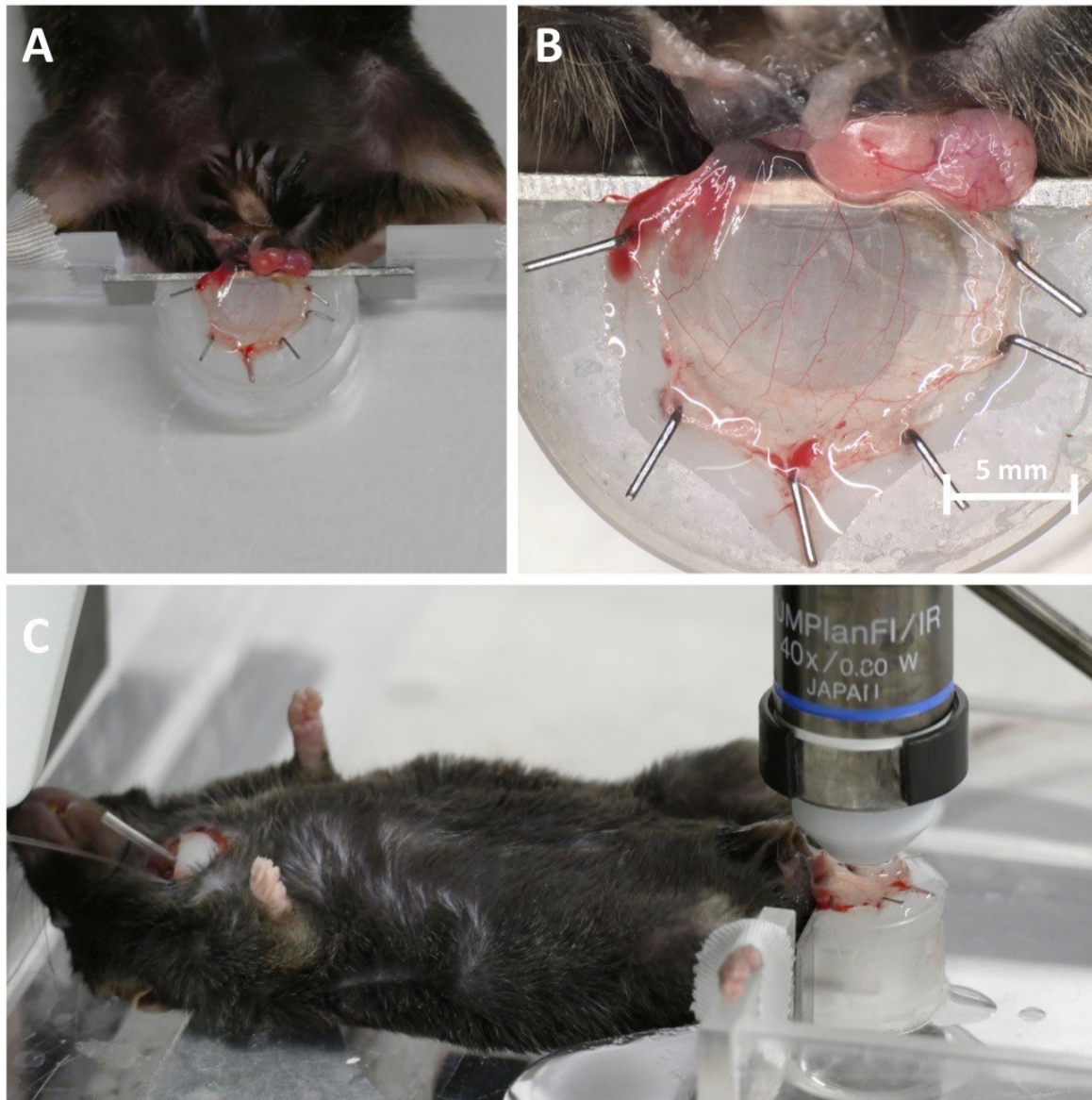


Abbildung 7: Darstellung des M. cremaster (mit freundlicher Genehmigung der AG Sperandio). A: Die Beine der Maus sind mit Tape fixiert, sodass sich die Maus beim Präparieren und Transport zum Mikroskop nicht verschiebt. B: Der Cremastermuskel liegt aufgespannt auf der Plexiglasplatte und ist mit kleinen Nadeln (Pins) fixiert. Hier kann man bereits makroskopisch Blutgefäße erkennen. C: Nach der Präparation wird die Maus für die Intravitalmikroskopie umgelagert.

3.6.1.5 Injektion mittels Perfusor

Vor Beginn der Intravitalmikroskopie fand die Injektion von murinen IgM $10\mu\text{l/gKG}$ (Kontrollgruppe: physiologische Kochsalzlösung) durch einen Perfusor (Pump 11 Elite, Harvard Apparatus) statt, die Injektion ging über ca. 15 Minuten (Injektionsrate $20\mu\text{l/min}$). Die Konzentration der IgM Lösung betrug 1 mg/ml .

3.6.1.6 Intravitalmikroskopie

3.6.1.6.1 Messung der Blutflussgeschwindigkeit

Die Blutflussgeschwindigkeit im Gefäß wurde bei 40-facher Vergrößerung gemessen. Ein optisches Dopplervelocimeter, Microvessel velocity OD-RT (CircuSoft Instrumentation), wurde dabei anstelle eines Okulars eingesetzt und in korrekter Flussrichtung adjustiert. Dabei wird das zu untersuchende Gefäß auf die zwei Photodioden des Dopplervelocimeters projiziert. Passiert ein Erythrozyt die erste Photodiode, wird eine Änderung der Lichtintensität in der ersten Photodiode registriert. Als nächstes wird die gleiche Änderung (Intensitätsprofil) bei der zweiten Photodiode registriert und daraus die Blutflussgeschwindigkeit in Echtzeit berechnet [72].

3.6.1.6.2 Injektion von FITC-Dextran

Nach der Messung der Flussgeschwindigkeit wurde 2,5%-iges FITC-Dextran intravenös in einem Volumen von 1,5µl/g-KG injiziert. Anschließend wurde eine Minute gewartet, bis sich das FITC-Dextran im Körper verteilte.

3.6.1.6.3 Messung der Fluoreszenz über dem Gefäß

Bei 60-facher Vergrößerung wurde nun FITC-Dextran (max. Exzitation 490nm) unter hochenergetischem Licht einer Quecksilberlampe angeregt. Zur Überprüfung der gleichmäßigen Verteilung des FITC-Dextrans wurde eine Messung der Fluoreszenzintensität mit Inspector Pro, einer Software zur quantitativen Datenauswertung mikroskopischer oder spektroskopischer Daten, vorgenommen (Schönle A., 2006. *Inspector Image Acquisition & Analysis Software*, v0.1). Es wurde eine Belichtungszeit von 3ms eingestellt. Als Einschlusskriterium wurden Fluoreszenzen zwischen 1000 und 3000AU (Arbitrary Units) gewählt.

3.6.1.6.4 Videoaufzeichnung des Gefäßes

Die Aufzeichnung des Videos erfolgte mit dem Computerprogramm VirtualDub. Aufgezeichnet wurde ab dem Zeitpunkt, an dem das FITC-Dextran angeregt und die Photointen-

sität entsprechend der Versuchsreihe eingestellt wurden. Gemessen wurden die erste Thrombozytenadhäsion (*Onset*) und die stabile Thrombusbildung (finale Okklusion).

3.6.1.6.5 Messung des Gefäßdurchmessers

Der Gefäßdurchmesser wurde bei der Auswertung des Videos bestimmt. Hierzu wurde das Messprogramm Fiji verwendet [73]. Das Programm wurde vor jeder Auswertung auf das verwendete Objektiv geeicht. Gemessen wurde der Durchmesser an drei Stellen des Gefäßes - proximal, mittig und distal. Der Durchmesser berechnete sich aus dem Mittelwert der gemessenen Größen.

3.6.2 Fetales Modell

Das fetale Thrombosemodell im murinen Dottersack wurde in Anlehnung an das bereits etablierte Modell von *Margraf et al. 2017* [36] durchgeführt.

3.6.2.1 Präparation des Dottersacks

Die narkotisierten Muttertiere wurden während der Versuche rücklings auf eine mit einer Komresse bedeckten Heizplatte gelegt, welche eine konstante Körpertemperatur von 37°C gewährleistete. Nachdem durch Schmerzreize die Narkosetiefe geprüft wurde, wurden die Augen mittels Augensalbe bedeckt und die Präparationsfläche mit 70%-igem Ethanol desinfiziert. Die Präparation geschah unter einem Präparationsmikroskop (*Olympus SZX7*).

Es wurde ein 1cm langer lateraler Abdominalschnitt durchgeführt und die Peritonealhöhle eröffnet. Bei Bedarf erfolgte Blutstillung mittels eines Elektro kauters. Dann wurde das Uterushorn vorsichtig gefasst (Wattestäbchen) und aus der Bauchhöhle gezogen. Unter warmer Superfusionslösung wurde der Uterus an einer Stelle zwischen zwei Feten vorsichtig mit zwei stumpfen gebogenen Pinzetten auseinandergezogen, sodass ein kleiner Riss entstand. Aus diesem Riss entwickelte sich ein Fötus im Dottersack heraus (Abb. 7). Dieser wurde vorsichtig mittels Wattestäbchen auf einer vorbereiteten Präparationsunterlage (beschichtetes und konstant superfundiertes modifiziertes Petri-Gefäß) platziert, ohne die Plazenta abzulösen.

Die intakte Zirkulation des Dottersacks und des Feten wurden dadurch gewährleistet, dass der Dottersack und die Plazenta während des ganzen Versuchs mit der Mutter verbunden blieben.

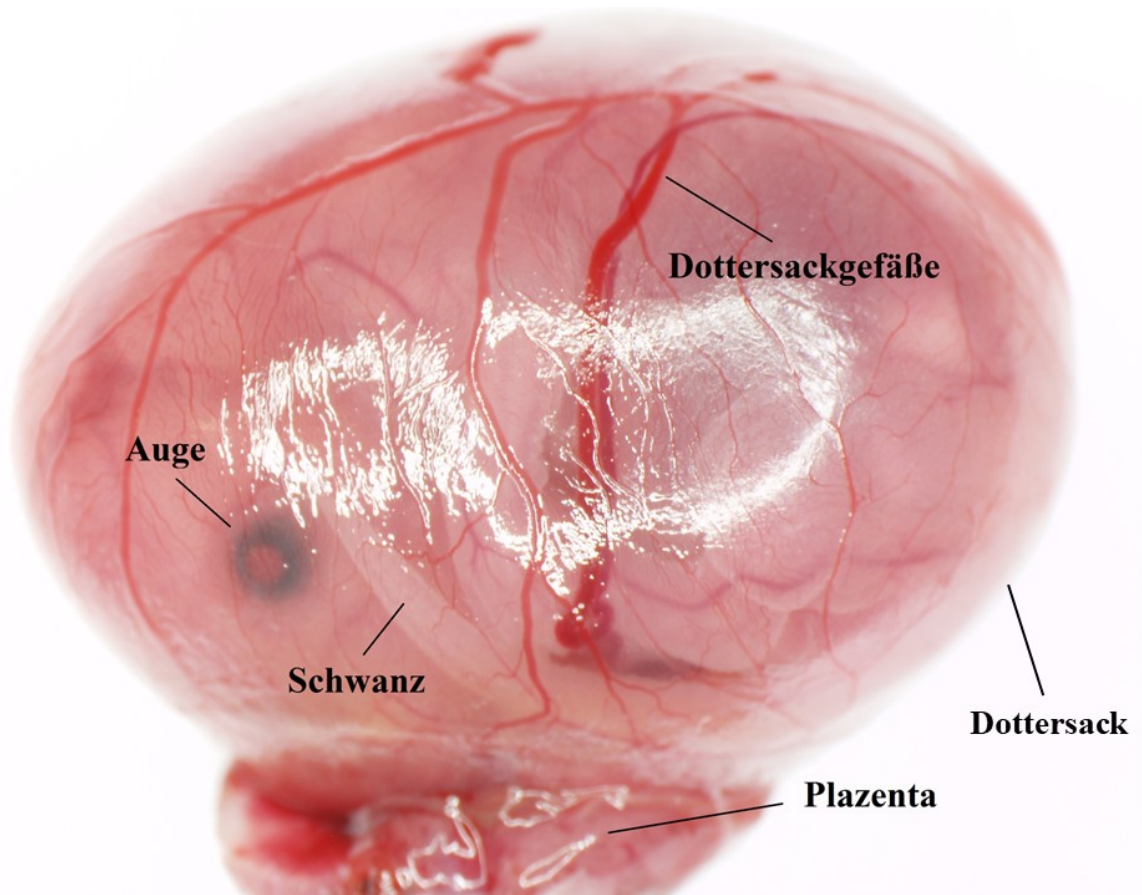


Abbildung 8: Freigelegter Fetus mit Plazenta und Mutter verbunden (mit freundlicher Genehmigung von Dr. med. Andreas Margraf). Nach Eröffnung des Uterus wurde ein Fetus samt Dottersack ausgelagert. Der Fetus war dabei noch über die Plazenta mit dem maternalen Kreislauf verbunden. Zu sehen sind die Dottersackgefäße, von welchen später ein Seitenast für die Mikroinjektion von FITC-Dextran verwendet wurde. Das Alter des Feten betrug E15.5.

3.6.2.2 Mikroinjektion in fetale Dottersackgefäße

Nach Auslagerung des Feten samt Dottersack wurde unter dem Präparationsmikroskop ein geeigneter Venenast in der Dottersackmikrozirkulation gesucht und unter stärkster Vergrößerung die Flussrichtung des Gefäßes bestimmt. Es wurde ein Seitenast gewählt, der in einen zum Feten führenden Hauptast mündete und möglichst gerade verlief. Der Venenast

wurde in Flussrichtung punktiert und die verwendete Injektionslösung durch konstant leichten Druck injiziert. Dabei war zu beachten, dass die Injektion langsam stattzufinden hatte, um eine systemische Kreislaufüberlastung zu vermeiden. Nach Injektion wurde der Gefäßdefekt durch vorsichtigen Einsatz des Elektroauters (Gemini Cautery System) verschlossen, ohne den Dottersack zu verletzen. Die Injektionslösung bestand aus 2µl 25%-igem *FITC-Dextran* (zur Thrombusinduktion), 1µl *fluoreszierende Mikrosphären* (zur späteren Bestimmung der Blutflussgeschwindigkeit) und 8µl 0,1% *IgM Mausantikörper* (bzw. physiologische Kochsalzlösung in der Kontrollgruppe). Die Höchstinjektionsmenge wurde bei 11µl festgesetzt, da höhere Volumengaben als Bolus einen erheblichen Einfluss auf den fetalen Kreislauf haben (Russel et al.1968). Limitiert durch die Konzentration des Antikörpers (1mg/ml), wurde also eine absolute Menge von 8µg gegeben. Das Blutvolumen der Feten des verwendeten Gestationsalters liegt bei ungefähr 16-44µl [74], was zu einer ungefähren IgM-Konzentration von 0,15-0,3mg/ml führt.

3.6.2.3 Intravitalmikroskopie und Thrombusinduktion

Nachdem der Dottersack präpariert und die Lösung injiziert wurde, folgte die Lagerung auf einer speziell gefertigten Mikroskopierplatte aus Plexiglas. Der Fetus wurde in eine kleine mit Vaseline gefüllte Petrischale gelegt, welche zur Mutterseite hin eine Aussparung hatte, damit kein Druck auf Fetus und Uterus ausgeübt wird. Eine Auflagerung und Befestigung mittels Deckglas (*Menzel 24x40mm #1 Deckgläser*) verminderte den Einfluss der Atembewegungen der Mutter und stabilisierte so das Bild, ohne die fetale Zirkulation zu beeinträchtigen. Der Fetus wurde konstant mit warmer Superfusionslösung umspült, welche eine Auskühlung und Austrocknung des Feten verhinderte.

3.6.2.3.1 Messung der Blutflussgeschwindigkeit

Die Blutflussgeschwindigkeit wurde in der fetalen Zirkulation mit Hilfe sogenannter fluoreszierender Mikrosphären (*Flow-Count Fluorospheres*, Beckman Coulter) gemessen. Hierzu wurde 1µl dieser 10µm großen Partikel zusammen mit den anderen Bestandteilen der Versuchslösung injiziert (siehe 3.6.2.2). Diese Partikel wurden dann entsprechend ihres Exzitationsmaximums bei 488 nm zum Leuchten angeregt. Eine kurze Videosequenz wurde

aufgezeichnet, um später mit Hilfe des Messprogramms *Fiji* ermitteln zu können, welchen Weg die Partikel pro Zeit zurücklegten.

3.6.2.3.2 Messung der Fluoreszenz über dem Gefäß

Bei 60-facher Vergrößerung wurde nun das FITC-Dextran mit dem dazugehörigen Lichtfilter unter dem hochenergetischen Licht einer Quecksilberlampe angeregt. Dies führte zu einem Endothelschaden, was die Initiierung der Thrombose bedeutete. Zur Überprüfung der gleichmäßigen Verteilung des FITC-Dextrans wurde eine Messung der Fluoreszenzintensität vorgenommen. Als Programm diente die Inspector Pro Software.

3.6.2.3.3 Videoaufzeichnung und Bestimmung des Gefäßdurchmessers

Die Messung erfolgte analog zu 3.6.1.6.4. und 3.6.1.6.5

3.6.2.4 Gewichtsbestimmung der Feten

Um das Gewicht der Feten zu bestimmen, wurden die verwendeten Feten eines Muttertieres nach Beenden der Versuche vorsichtig aus dem Dottersack entfernt und in einer Petrischale gesammelt und einzeln gewogen. Es wurde für jedes Muttertier auch ein Durchschnittsgewicht ihrer Feten bestimmt.

3.7 Untersuchung adulter Blutproben

3.7.1 Gewinnung der Blutproben

Vor und nach den *in-vivo* Versuchen wurde den männlichen Mäusen Blut abgenommen. Die Blutproben wurden durch Entnahme über den Karotis-Katheter gewonnen.

3.7.2 Analyse der Blutproben

Die Analyse der Blutproben erfolgte mithilfe des *Idexx Hematology Analyzer*. Gemessen wurden alle Zellen des Blutes, Erythrozyten, Thrombozyten sowie Leukozyten, wobei letztere in ihre Untergruppen differenziert werden. In der vorliegenden Arbeit werden nur die genannten Zellen ausgewertet, zudem die Hämoglobinkonzentration, das mittlere Thrombozytenvolumen, die Thrombozytenverteilungsbreite und die neutrophilen Granulozyten.

3.8 Statistik

Die erhobenen Daten wurden in Excel 2016 dokumentiert. Für die statistische Auswertung wurde Graphpad Prism (Version 7.04, 2017) verwendet. Die fetalen und adulten Versuche mit zwei Gruppen wurden durch den *two-tailed* Mann Whitney U Test ausgewertet, für die Versuche mit drei Gruppen verwendeten wir die Varianzanalyse nach Kruskal-Wallis (ANOVA on ranks) zur Gesamtanalyse und für die Einzelanalyse zwischen den Gruppen den *uncorrected* Dunns Test. Zur Auswertung der Verschluss/Adhäsionsraten verwendeten wir den χ^2 -Test und den *exakten Test nach Fischer*.

4 Ergebnisse

4.1 Thrombozytenfunktion der adulten Maus in Abhängigkeit von IgM

Um zu zeigen, wie sich die Thrombozytenfunktion in Abhängigkeit von der Immunglobulinkonzentration im Plasma verhält, untersuchten wir die Thrombusbildung in der Mikrozirkulation der adulten Maus im Cremastermuskelmodell. Zuerst führte ich Vorversuche mit Wildtypmäusen und IgM-Injektion durch, nachfolgend wurden die Versuchsbedingungen entsprechend angepasst und Knock-out Mäuse mit einbezogen.

4.1.1 Injektion von IgM bei hoher Photointensität

In diesem Vorversuch wurden 0,1%-ige *Mouse IgM* Immunglobuline (bzw. 0,9%-iges NaCl) in einer Dosis von 10 μ l/g Körpergewicht langsam mittels Perfusor in Wildtypmäuse injiziert. Bei einem Blutvolumen von 60-75ml/kg KG wurden der Maus also 6-7% ihres Blutvolumens langsam injiziert [75]. Im Anschluss injizierte ich 2,5%iges FITC-Dextran 1,5 μ l/gKG langsam aus der Hand. Schließlich wurde, nach Aufsuchen eines geeigneten Gefäßes (Abb. 8A), der Quecksilberstrahler aktiviert, um über phototoxische Gefäßverletzung eine Thrombusbildung im Gefäß zu provozieren (Abb. 8B).

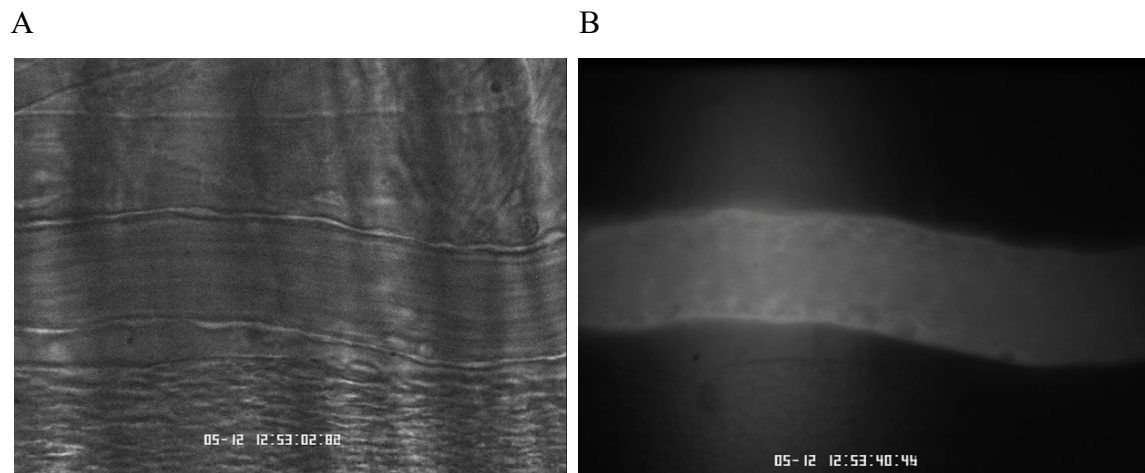


Abbildung 9: Intravitalmikroskopie. A: Es wurde ein geeignetes Gefäß unter Durchlicht aufgefunden. B: Danach erfolgte die Injektion des Fluoreszenzfarbstoffes sowie die Anregung dieses Farbstoffes mittels Photonenenergie.

4.1.1.1 Thrombozytenadhäsion – „Onset“

Die Bindung der Thrombozyten an die durch Phototoxizität geschädigte Gefäßwand wurde als *Onset* bezeichnet (Abb. 9A). Dies stellte den Beginn der Thrombusbildung dar. Der genaue Ablauf und beteiligte Rezeptoren wurden unter 1.1.5 eingeführt. Untersucht wurde die Zeit bis sich die Thrombozyten – nach Provokation eines Endothelschadens mittels Photoenergie – an die Gefäßwand anhefteten und somit die Thrombusbildung einleiteten. Bei allen untersuchten Tieren zeigte sich für das Auftreten eines *Onsets* (*Onset rate* Kontrolle vs. IgM: 100% vs. 100%, $p > 0,05$) kein Unterschied zwischen den Gruppen. Die Zeit bis zum *Onset* war in beiden Gruppen ähnlich (*Onset time* Kontrolle vs. IgM: 3,8min $\pm$ 1,4min vs. 4,4min $\pm$ 1,4min; Mittelwert $\pm$ SEM, $p > 0,05$) (Abb. 9B).

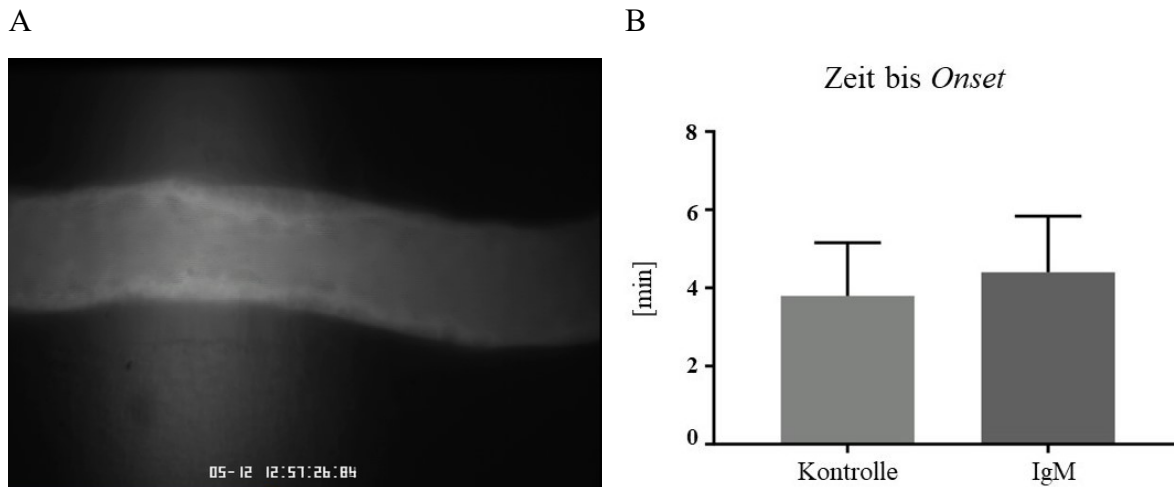


Abbildung 10: Beginn der Thrombusbildung, „Onset“. A: Der *Onset* wird als Beginn der Thrombusbildung bezeichnet, am Oberrand und Unterrand des abgebildeten Gefäßes ist eine Adhäsion der Thrombozyten und beginnender Thrombus zu sehen. B: Gemessen wurde die Zeit zwischen Beginn der Aufzeichnung und sichtbarem Beginn der Thrombusbildung. Es zeigte sich kein Unterschied im *Onset* zwischen den beiden Gruppen ($n(\text{Kontrolle}) = 5$, $n(\text{IgM}) = 5$; $p > 0,05$; *two-tailed* Mann-Whitney U Test). Ein *Onset* zeigte sich in jedem untersuchten Gefäß.

4.1.1.2 Vollständiger Gefäßverschluss – „Occlusion“

Die konstante Anregung der Thrombozyten durch FITC-Dextran führte zur Rekrutierung weiterer Thrombozyten und Bildung eines Thrombus, welcher das gesamte Gefäß verschloss (*Occlusion*). Gemessen wurde die Zeit von Beginn des Versuchs bis zur *Occlusion* des Gefäßes.

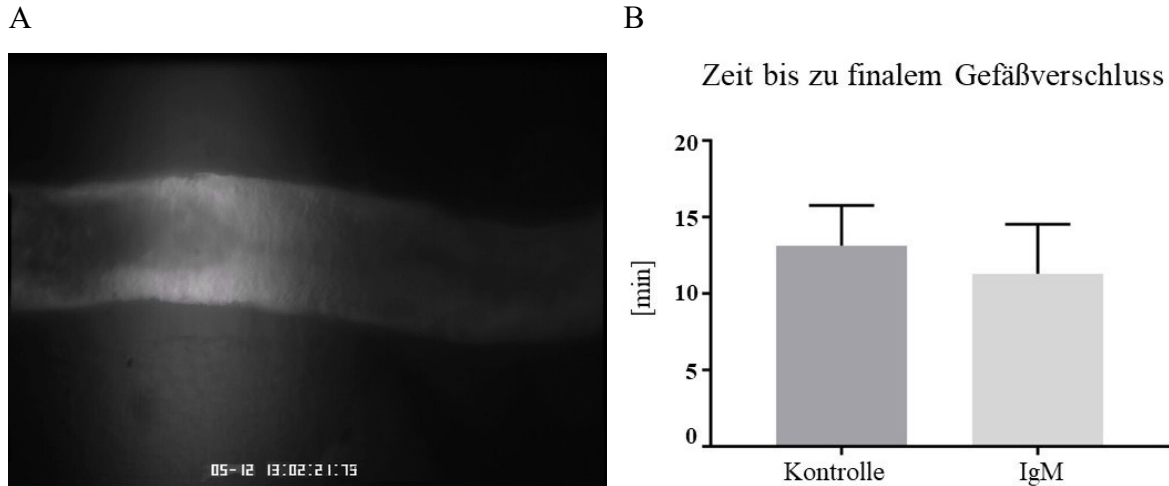


Abbildung 11: Vollständiger Gefäßverschluss, „Occlusion“. A: Vollständige Thrombosierung des Gefäßes durch permanente Thrombozytenaktivierung und -rekrutierung. B: Es wurde die Zeit gemessen, bis der Blutfluss durch die Okklusion komplett zum Stehen kam (*Occlusion*). In beiden Gruppen zeigte sich ein rascher Gefäßverschluss in jedem der untersuchten Gefäße. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zeigten sich nicht ($n(\text{Kontrolle}) = 5$, $n(\text{IgM}) = 5$; $p > 0,05$; *two-tailed* Mann-Whitney U Test).

Die genauen Mechanismen wurden in der Einleitung unter 1.1.6 erläutert. Alle untersuchten Gefäße zeigten eine vollständige *Occlusion* (Abb. 10A). Die Zeit, die verging, bis das Gefäß komplett verschlossen war, unterschied sich zwischen den beiden Gruppen nicht wesentlich (*Occlusion time* Kontrolle vs. IgM: $13,1\text{min} \pm 2,6\text{min}$ vs. $11,3\text{min} \pm 3,2\text{min}$; Mittelwert $\pm$ SEM; $p > 0,05$) (Abb. 10B).

4.1.1.3 Mikrovaskuläre Parameter

Als Kontrollparameter wurden der Gefäßdurchmesser, die Blutflussgeschwindigkeit und die Fluoreszenzintensität herangezogen (Tab. 7). Diese Parameter können die Thrombosebildung beeinflussen, daher wurde darauf geachtet, dass sie zwischen den Gruppen ähnlich waren, um sie als Störgrößen ausschließen zu können.

	Gefäßdurchmesser (μm)	Flussgeschwindigkeit (mm/s)	Fluoreszenzintensität (AU)
Kontrolle	$30,2 \pm 3,3$	$2,6 \pm 0,1$	1880 ± 296
IgM	$28,6 \pm 1,8$	$2,4 \pm 0,1$	1480 ± 171
	n.s.	n.s.	n.s.

Tabelle 7: Mikrovaskuläre Parameter der intravitalmikroskopischen Versuche. Es zeigten sich in der Analyse keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf Gefäßdurchmesser, Blutflussgeschwindigkeit sowie Fluoreszenzintensität. (Gefäßdurchmesser, Blutflussgeschwindigkeit und Fluoreszenzintensität werden als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben; $n(\text{Kontrolle}) = 5$, $n(\text{IgM}) = 5$; $p > 0,05$; *two-tailed* Mann-Whitney U Test)

4.1.1.4 Sonstige Parameter

Die Analyse des Gewichts und des Alters sind in Tabelle 8 dargestellt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

	Gewicht (g)	Alter (Wochen)
Kontrolle	$31,8 \pm 3,0$	$19,8 \pm 4,9$ (11 - 38)
IgM	$26,8 \pm 1,4$	$16 \pm 1,9$ (11 - 19)
	n.s.	n.s.

Tabelle 8: Sonstige Parameter der Mausgruppen. Analysiert wurden das Gewicht und das Alter der Mäuse. Hinsichtlich des Gewichts und Alters zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (Mittelwert $\pm$ SEM; Gewicht: $n(\text{Kontrolle}) = 5$, $n(\text{IgM}) = 5$; Alter: $n(\text{Kontrolle}) = 5$, $n(\text{IgM}) = 4$; $p > 0,05$; *two-tailed* Mann-Whitney U Test).

4.1.2 AID^{-/-}-vs. sIgM AID^{-/-} bei niedriger Photointensität

Nachdem die Vorversuche mit Wildtypmäusen (C57Bl6) bei hoher Photointensität keinen Unterschied in der Thrombusbildung ergaben, wurden die Versuche im Cremastermodell erneut durchgeführt. Diesmal wurden statt Wildtypmäusen (C57Bl6) Knock-out Mäuse verwendet. Diese Knock-out Mäuse besaßen entweder nur IgM Immunglobuline (AID^{-/-}) oder keine Immunglobuline (sIgM AID^{-/-}). Es wurde außerdem die Lichtintensität auf ca. ein Achtel der ursprünglich gewählten Intensität herabgesetzt, damit sich mögliche Effekte deutlicher ausbilden konnten.

4.1.2.1 Beginn der Thrombusbildung – „Onset“

Im Auftreten eines *Onsets* zeigte sich kein Unterschied zwischen den antikörperdepletierten Mäusen (sIgM AID^{-/-}) im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen (*Onset rate* AID^{-/-} vs. C57Bl6 vs. sIgM AID^{-/-}: 100% vs. 100% vs. 67%; $p > 0,05$) (Abb. 11A). Die Zeit bis zum *Onset* (*Onset time*) war bei den antikörperdepletierten Mäusen jedoch signifikant verlängert

(AID^{-/-} vs. C57Bl6 vs. sIgM AID^{-/-}: 11,3min ± 2,0min vs. 18,5min ± 6,0min vs. 44,8min ± 9,2min; Mittelwert ± SEM; $p \leq 0,05$) (Abb. 11B). Wenn ein Gefäß nach 60 Minuten keinen *Onset* zeigte, so wurde als *Onsetzeit* 70 Minuten eingetragen.

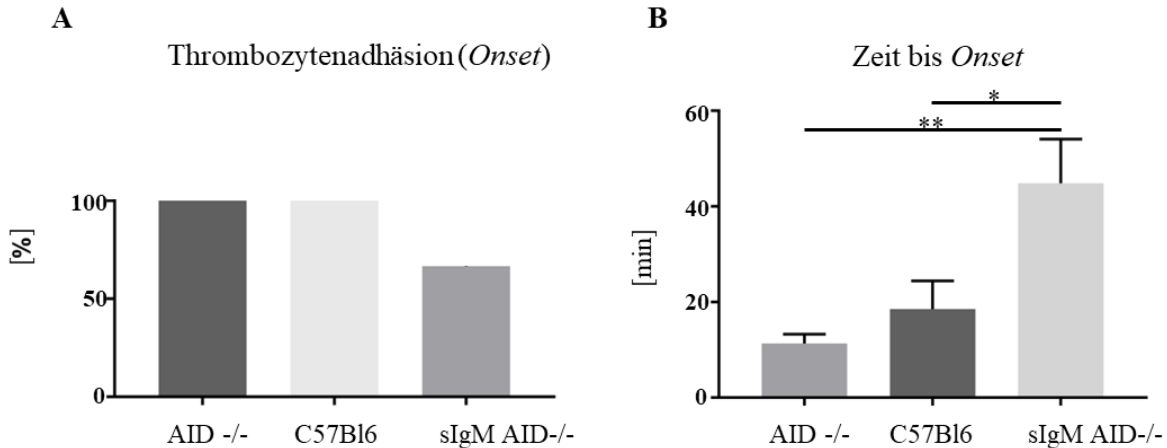


Abbildung 12: Thrombusbildung (*Onset*). A: Es wurde die Zeit gemessen vom Beginn der Aufzeichnung bis zum Beginn der Thrombusbildung. Es kam zur gleichen *Onsetrate* zwischen den Gruppen ($n(\text{AID}^{-/-}) = 6$, $n(\text{C57Bl6}) = 6$, $n(\text{sIgM AID}^{-/-}) = 6$; $p > 0,05$; Chi² Test). B: Die Zeit bis zum *Onset* war bei den antikörperdepletierten Mäusen signifikant verlängert. Die HyperIgM-Mäuse und die Wildtyp-Mäuse zeigten keine Unterschiede untereinander. ($n(\text{AID}^{-/-}) = 6$, $n(\text{C57Bl6}) = 6$, $n(\text{sIgM AID}^{-/-}) = 6$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; ANOVA on ranks)

4.1.2.2 Vollständiger Gefäßverschluss – „Occlusion“

Es zeigte sich bereits bei der Gefäßverschlussrate der antikörperdepletierten Mäuse eine signifikant niedrigere Rate (Abb. 12A), es kam in dieser Gruppe nach 60 Minuten zu keiner einzigen *Occlusion* (AID^{-/-} vs. C57Bl6 vs. sIgM AID^{-/-}: 83% vs. 67% vs. 0%; $p \leq 0,01$). Betrachtete man die Verschlusszeiten, so sah man einen signifikanten Unterschied der sIgM AID^{-/-} Mäuse zu den Mäusen mit Antikörpern, egal ob Wildtyp (C57Bl6) oder HyperIgM-Typ (AID^{-/-}), wobei der Unterschied zwischen AID^{-/-} und sIgM AID^{-/-} am größten war (AID^{-/-} vs. C57Bl6 vs. sIgM AID^{-/-}: 33,7 ± 7,7min vs. 51,3 ± 6,7min vs. >60,0min; Mittelwert ± SEM; $p \leq 0,01$). Die AID^{-/-} Mäuse zeigten in diesem Modell die schnellste *Occlusion* (Abb. 12B), wobei der Unterschied zur Wildtyp Kontrolle nicht signifikant war.

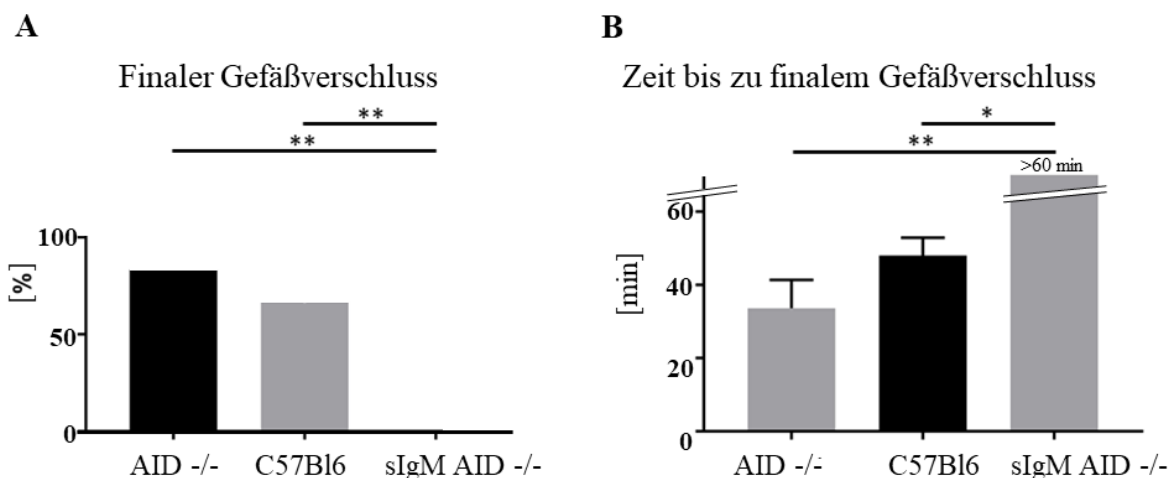


Abbildung 13: Vollständiger Gefäßverschluss, „Occlusion“. A: Es wurde die Zeit gemessen, bis das Gefäß vollständig thrombosiert war. Falls es nach 60 Minuten keine Thrombose gab, wurde der Versuch beendet. Es konnte in der Gruppe der sIgM AID^{-/-} Mäuse kein vollständiger Gefäßverschluss beobachtet werden (n(AID^{-/-}) = 6, n(C57Bl6) = 6, n(sIgM AID^{-/-}) = 6; **p ≤ 0,01; Chi² Test). In den anderen beiden Gruppen unterschied sich die Rate der Gefäßverschlüsse nicht voneinander. B: Bei der Zeit bis zum finalen Gefäßverschluss zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der sIgM AID^{-/-} Gruppe und den anderen beiden Gruppen. Die C57Bl6 und AID^{-/-} Gruppe unterschieden sich nicht voneinander (n(AID^{-/-}) = 6, n(C57Bl6) = 6, n(sIgM AID^{-/-}) = 6; *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ANOVA on ranks).

4.1.2.3 Mikrovaskuläre Parameter

Um Effekte der mikrovaskulären Parameter auf die Ergebnisse in Abb. 12 auszuschließen, wurden diese zwischen den Gruppen verglichen. Hierbei zeigten sich konstante Werte sowohl für den Durchmesser des Gefäßes als auch für die Blutflussgeschwindigkeiten und die Fluoreszenzintensitäten in allen drei Gruppen. Es kann daher angenommen werden, dass diese Parameter die Ergebnisse nicht beeinflussen.

	Gefäßdurchmesser (µm)	Flussgeschwindigkeit (mm/s)	Fluoreszenzintensität (AU)
AID ^{-/-} (n = 6)	32,6 ± 0,8	2,4 ± 0,1	1550 ± 138
C57Bl6 (n = 6)	35,2 ± 2,0	2,6 ± 0,2	1533 ± 233
sIgM AID ^{-/-} (n = 6)	33,8 ± 1,9	2,5 ± 0,1	1717 ± 178
	n.s.	n.s.	n.s.

Tabelle 9: Mikrovaskuläre Parameter der intravitalmikroskopischen Versuche. Zum Anfang des Versuchs wurden die mikrovaskulären Parameter bestimmt. Es zeigten sich in der Analyse keine signifikanten Unterschiede innerhalb der drei Gruppen in Bezug auf Gefäßdurchmesser, Blut-

flussgeschwindigkeit sowie Fluoreszenzintensität. (Mittelwert $\pm$ SEM; $n(\text{AID}^{-/-}) = 6$, $n(\text{C57Bl6}) = 6$, $n(\text{sIgM AID}^{-/-}) = 6$; $p > 0,05$; Kruskal-Wallis Test).

4.1.2.4 Sonstige Parameter

Aufgeführt sind das Gewicht und das Alter. Es zeigte sich hinsichtlich des Gewichts innerhalb der Gruppen kein signifikanter Unterschied. Das Alter der Tiere lag zwischen 12 und 41 Wochen.

	Gewicht (g)	Alter (Wochen)
AID^{-/-} (n = 6)	31 $\pm$ 2	12 – 33
C57Bl6 (n = 6)	28 $\pm$ 1	12 – 19
sIgM AID^{-/-} (n = 6)	28 $\pm$ 1	19 – 41
	n.s.	

Tabelle 10: Sonstige Parameter der Mausgruppen. Analysiert wurden Gewicht und Alter der Mäuse. Hinsichtlich des Gewichts zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. (Mittelwert $\pm$ SEM; $n(\text{AID}^{-/-}) = 6$, $n(\text{C57Bl6}) = 6$, $n(\text{sIgM AID}^{-/-}) = 6$; $p > 0,05$; Kruskal-Wallis Test). Das Alter lag in den angegebenen Bereichen. $n(\text{AID}^{-/-}) = 6$, $n(\text{C57Bl6}) = 6$, $n(\text{sIgM AID}^{-/-}) = 6$; $p < 0,05$, unkorrigierter Dunns Test).

4.1.3 Blutwerte

Nach den *in-vivo* Versuchen folgte eine Blutanalyse der jeweiligen Mäuse mithilfe des IDEXX ProCyte Dx Hematology Analyzers. Hierbei wurden Thrombozytenzahl, MPV (*Mean Platelet Volume*), PDW (*Platelet Distribution Width*), Erythrozytenzahl, Hämoglobingehalt, Leukozyten- und Neutrophilenzahl bestimmt. Die Thrombozytenzahl sollte ausschließen, dass mögliche Unterschiede in der Thrombusbildung aufgrund unterschiedlicher Thrombozytenzahlen im Blut entstanden. Die Thrombozytenzahl zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, ebenso wenig das mittlere Thrombozytenvolumen (MPV) und die Thrombozytenverteilungsbreite (PDW) (Tab. 11).

	Thrombozyten (K/ μ l)	MPV (fl)	PDW (fl)
AID^{-/-} (n = 2*)	799 $\pm$ 71	6,0 $\pm$ 0,1	7,2 $\pm$ 0,1
C57Bl6 (n = 4*)	635 $\pm$ 207	7,2 $\pm$ 0,5	8,5 $\pm$ 1,1 (n = 3)
sIgM AID^{-/-} (n = 5)	650 $\pm$ 145	6,2 $\pm$ 0,2	7,3 $\pm$ 0,2
	n.s.	n.s.	n.s.

Tabelle 11: Thrombozytenzahl, MPV, PDW. Es wurden die Thrombozyten nach Durchführung der Versuche untersucht. Hier variierte die Probenanzahl zwischen den Gruppen, da nicht für jedes Tier Blut gewonnen werden konnte. Es zeigte sich insgesamt kein Unterschied zwischen den Gruppen. (Mittelwert $\pm$ SEM; $n(\text{AID}^{-/-}) = 2$, $n(\text{C57Bl6}) = 4$, $n(\text{sIgM AID}^{-/-}) = 5$; $p > 0,05$; ANOVA on ranks). *Daten nur für $n = 2$ bzw. $n = 4$ verfügbar.

Die Erythrozytenzahl war in allen Gruppen ähnlich, das Hämoglobin (Hb) bei den sIgM $\text{AID}^{-/-}$ Mäusen war etwas niedriger als bei den Wildtypmäusen (Tab. 12).

	Erythrozyten (M/ μl)	Hämoglobin (g/dl)
$\text{AID}^{-/-}$ ($n = 2^*$)	$10,2 \pm 0,9$	$14,7 \pm 1,3$
C57Bl6 ($n = 4^*$)	$10,8 \pm 0,2$	$15,5 \pm 0,3$
sIgM $\text{AID}^{-/-}$ ($n = 5$)	$9,3 \pm 0,5$	$13,5 \pm 0,7$
	n.s.	$p < 0,05$

Tabelle 12: Erythrozytenzahl und Hb-Wert. Die rote Zellreihe wurde auf den Hämoglobingehalt und die Erythrozytenzahl untersucht. Hierbei zeigte sich der Hb der sIgM $\text{AID}^{-/-}$ Mäuse vermindert, die Erythrozytenzahlen unterschieden sich nicht wesentlich. (Mittelwert $\pm$ SEM; $n(\text{AID}^{-/-}) = 2$, $n(\text{C57Bl6}) = 4$, $n(\text{sIgM AID}^{-/-}) = 5$; $p > 0,05$; ANOVA on ranks). *Daten nur für $n = 2$ bzw. $n = 4$ verfügbar.

In der weißen Zellreihe fiel auf, dass die sIgM $\text{AID}^{-/-}$ Mäuse zwar keine verminderten Leukozyten jedoch signifikant weniger neutrophile Granulozyten im peripheren Blut als die Wildtypmäuse aufwiesen (Tab. 13). Die Literatur liefert bisher keine Hinweise darauf, dass niedrige Neutrophilenzahlen typisch für diese Knockout-Mäuse sind.

	Leukozyten (K/ μl)	Neutrophile Granulozyten (K/ μl)
$\text{AID}^{-/-}$ ($n = 2^*$)	$6,1 \pm 0,1$	$3,1 \pm 0,1$
C57Bl6 ($n = 4^*$)	$7,2 \pm 0,7$	$4,1 \pm 0,8$
sIgM $\text{AID}^{-/-}$ ($n = 5$)	$4,5 \pm 1,0$	$1,8 \pm 0,3$
	n.s.	$p < 0,05$

Tabelle 13: Leukozyten- und Neutrophilenzahl. Die Leukozytenzahlen unterschieden sich nicht ($p > 0,05$; ANOVA on ranks), es zeigte sich jedoch eine verminderte Anzahl an neutrophilen Granulozyten in der sIgM $\text{AID}^{-/-}$ Gruppe verglichen mit der Gruppe der Wildtypmäuse. (Mittelwert $\pm$ SEM; $n(\text{AID}^{-/-}) = 2$, $n(\text{C57Bl6}) = 4$, $n(\text{sIgM AID}^{-/-}) = 5$; $p < 0,05$; ANOVA on ranks). *Daten nur für $n = 2$ bzw. $n = 4$ verfügbar.

4.2 Thrombozytenfunktion in der fetalen Maus nach IgM-Injektion

Nachdem in den Versuchen mit adulten Knock-out Mäusen ein Effekt von Antikörpern auf die Thrombusbildung gezeigt werden konnte, sollte dies im fetalen Modell der Dottersack-mikrozirkulation geprüft werden. Die Antikörperspiegel im Feten gleichen am ehesten denen der sIgM AID^{-/-} Maus, sodass anzunehmen wäre, dass eine Erhöhung der IgM-Spiegel durch Injektion eine Verbesserung der Thrombozytenfunktion bewirken kann. Dies wurde im Folgenden untersucht.

4.2.1 Beginn der Thrombusbildung in IgM-behandelten Feten

Nach Injektion des Fluoreszenzfarbstoffes und Bestimmung der mikrovaskulären Parameter wurde der Versuch durch die dauerhafte Bestrahlung des Gefäßes gestartet. Es wurden die Zeit bis zum Beginn der Thrombusbildung und die Anzahl der Gefäße, bei denen die Thrombusbildung beobachtet wurde, analysiert. Es zeigte sich hier kein signifikanter Unterschied, weder bei der Verschlussrate (*Onset rate* Kontrolle vs. IgM: 80% vs. 40%; $p > 0,05$) noch bei der Zeit bis zum Beginn der Thrombusbildung (*Onsetzeit* Kontrolle vs. IgM: $26,2\text{min} \pm 11,7\text{min}$ vs. $52,8\text{min} \pm 10,8\text{min}$; Mittelwert $\pm$ SEM; $p > 0,05$; Mann-Whitney U Test; $n(\text{Kontrolle}) = 5$; $n(\text{IgM}) = 5$). (Abb. 13). Wenn nach 60 Minuten kein *Onset* stattgefunden hatte, wurde als *Onsetzeit* 70 Minuten gewählt.

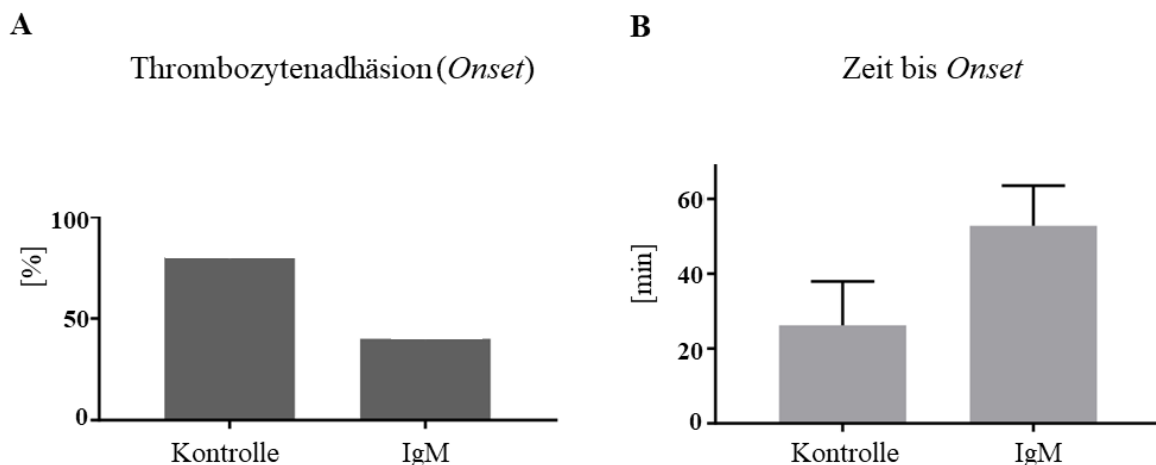


Abbildung 14: Beginn der Thrombusbildung (*Onset*). A: Bei der *in-vivo light-dye* Schädigung fetaler Dottersackgefäße zeigte sich kein signifikanter Unterschied bei der Rate der Thrombusbildung (Kontrolle vs. IgM: 80% vs. 40%; $n(\text{IgM}) = 5$; $p > 0,05$; Exakter Test nach Fischer). B: Die Zeit bis zum Beginn der Thrombusbildung (*Onset*) war ebenfalls in beiden Gruppen ähnlich (Kon-

trolle vs. IgM: $26,2\text{min} \pm 11,7\text{min}$ vs. $52,8\text{min} \pm 10,8\text{min}$; Mittelwert $\pm$ SEM; $n(\text{Kontrolle}) = 5$; $n(\text{IgM}) = 5$; $p > 0,05$; *two-tailed* Mann-Whitney U Test).

4.2.2 Gefäßokklusion bei IgM-behandelten Mausfeten

Wie bereits im adulten Modell beschrieben, führt die konstante Aktivierung der Thrombozyten letztendlich zum Gefäßverschluss. Dieser trat bei der Kontrollgruppe (NaCl) in 4/5 Gefäßen ein, nach IgM-Injektion in 2/5 Gefäßen (*Occlusion rate* Kontrolle vs. IgM: 80% vs. 40%; $p > 0,05$; Exakter Test nach Fischer; $n(\text{Kontrolle}) = 5$; $n(\text{IgM}) = 5$). Die Zeit, die verging, bis die Thrombozyten das Gefäß komplett verschlossen hatten (*Occlusion time*), unterschied sich zwischen beiden Gruppen nicht signifikant (*Occlusion time* Kontrolle vs. IgM: $31,4\text{min} \pm 10,4\text{min}$ vs. $57,6\text{min} \pm 8,6\text{min}$; Mittelwert $\pm$ SEM; $p > 0,05$; Mann Whitney U Test; $n = 5$).

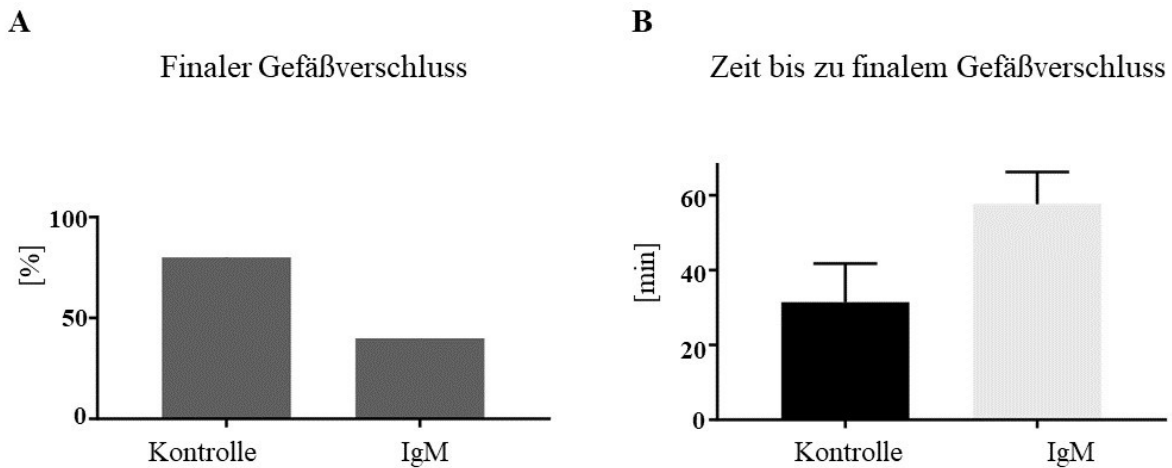


Abbildung 15: Vollständiger Gefäßverschluss (*Occlusion*). A: Bei der Anzahl an Gefäßen mit finalem Verschluss konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Kontrolle vs. IgM: 80% vs. 40%; $n(\text{IgM}) = 5$; $p > 0,05$; Exakter Test nach Fischer). B: Die Zeit bis zum vollständigen Verschluss des Gefäßes war in beiden Gruppen ebenfalls ähnlich ($31,4 \pm 10,4\text{min}$ vs. $57,6 \pm 8,6\text{min}$; Mittelwert $\pm$ SEM; $n(\text{Kontrolle}) = 5$; $n(\text{IgM}) = 5$; $p > 0,05$; *two-tailed* Mann-Whitney U Test).

4.2.3 Mikrovaskuläre Parameter

Um die beobachteten Effekte in Relation setzen zu können, wurden die mikrovaskulären Parameter betrachtet. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ($p > 0,05$), sodass davon auszugehen ist, dass die Versuchsbedingungen für beide Gruppen gleich waren.

	Feten (n)	Gestations- alter (d)	Gefäßdurch- messer (μm)	Blutflussgeschwin- digkeit (mm/s)	Fluoreszenzin- tensität (AU)
Kontrolle	5	$15,9 \pm 0,2$	$36,8 \pm 1,0$	$0,32 \pm 0,06$	10200 ± 1240
IgM	5	$15,5 \pm 0,3$	$40,0 \pm 2,7$	$0,56 \pm 0,10$	11400 ± 1288
		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tabelle 14: Mikrovaskuläre Parameter der fetalen intravitalmikroskopischen Versuche. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf Gestationsalter, Gefäßdurchmesser, Blutflussgeschwindigkeit und Fluoreszenzintensität. (Mittelwert $\pm$ SEM; $n(\text{Kontrolle}) = 5$; $n(\text{IgM}) = 5$; $p > 0,05$; *two-tailed* Mann-Whitney U Test).

4.2.4 Sonstige Parameter

Die Feten wurden nach Beenden des Versuchs gewogen. Das durchschnittliche Gewicht der Feten war in beiden Gruppen etwa gleich. Die Muttertiere hatten zwischen einem und 11 Feten, durchschnittlich 6 bzw. 7 Feten.

	Gewicht Fetus (g)	Anzahl Feten pro Muttertier
Kontrolle (n = 4*)	$0,57 \pm 0,14$	6 ± 2
IgM (n = 4*)	$0,57 \pm 0,18$	7 ± 1
	n.s.	n.s.

Tabelle 15: Gewicht und Anzahl der Feten. Das Gewicht und die Anzahl der Feten war über beide Gruppen hinweg insgesamt konstant ($n(\text{Kontrolle}) = 4$; $n(\text{IgM}) = 4$; $p > 0,05$; *two-tailed* Mann-Whitney U Test). *Daten nur für $n = 4$ verfügbar.

5 Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Immunglobuline, auch wenn sie bisher nicht mit der Thrombozytenfunktion in Zusammenhang gebracht wurden, in der adulten Hämostase eine Rolle spielen. In den initialen Versuchen mit Wildtypmäusen im Cremastermodell konnten wir keine Unterschiede in der Thrombusbildung bei höheren IgM-Spiegeln sehen. Nach Modifikation der Versuchsbedingungen konnten wir bei Ig-defizienten Mäusen einen signifikanten Effekt auf die Thrombusbildung im Vergleich zu Wildtypmäusen beobachten. So kam es in den Mäusen ohne jegliche Antikörper zu einer deutlich verminderten Thrombusbildung verglichen mit Mäusen, welche ausschließlich IgM oder normale Immunglobulinspiegel besaßen. Dieser Effekt konnte für die Thrombusbildung in der fetalen Mikrozirkulation nicht beobachtet werden. Hier kam es nach Anheben der IgM-Spiegel zu keiner schnelleren Thrombusbildung.

5.1 Diskussion der Tiermodelle

5.1.1 Ethische Aspekte

Tierversuche werden in der Allgemeinbevölkerung stark diskutiert und häufig in Frage gestellt [76], besonders jene Versuche, die mit dem Tod der Tiere enden. Noch kritischer als Tierversuche an erwachsenen Tieren (in diesem Fall Mäuse) sind Versuche an fetalen Tieren zu sehen, da es sich hierbei um ungeborenes Leben handelt. Weil ein Fetus nicht in der Lage ist, sich selbst zu versorgen, geschweige denn zu schützen, ist er auf den Schutz und die Fürsorge von außen angewiesen. Derartige Versuche werden nicht leichtfertig durchgeführt und stellen eine moralische Belastung für den Durchführenden dar. Der Experimentator befindet sich bei allen Tierversuchen in einem ethischen Spannungsfeld. Einerseits hat er die Pflicht durch sein Wissen und seine Fähigkeiten menschliches und tierisches Leid zu mindern, andererseits soll er selbst anderen Lebewesen kein vermeidbares Leid zufügen ("Tierversuche in der Forschung", Deutsche Forschungsgemeinschaft, 2016). Für *in-vivo* Versuche der Mikrozirkulation haben sich als Versuchstiere Mäuse als besonders geeignet gezeigt. Damit die Tiere während des Eingriffs keine Schmerzen erleiden, werden die Experimente, sowie die anschließende Tötung der Tiere in der vorliegenden Arbeit, nur in Narkose durchgeführt.

Alle hier erwähnten Tierversuche wurden erst nach Prüfung weniger invasiver Alternativen begonnen und durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

Letztlich sind Tierversuche aktuell leider unabdingbar und notwendig, um den lebenden Organismus studieren und begreifen zu können, da komplexe physiologische Vorgänge, wie die fetale Hämostase, *in-vitro* nur begrenzt untersucht werden können. Diese Erkenntnisse kommen der Patientenversorgung zugute und helfen, neue therapeutische Ansätze zu finden. Solche Ansätze, wie auch in dieser Arbeit untersucht, bedürfen einer vorausgehenden Untersuchung am lebenden Organismus, andernfalls ist eine Anwendung am Menschen moralisch nicht vertretbar.

5.1.2 Technische Schwierigkeiten im adulten Cremastermodell

Die Versuchsmethoden an der adulten Maus waren bereits etabliert und stellten kaum technische Schwierigkeiten dar. Bei der Anlage eines Gefäßzugangs kam es bei der zweiten Testreihe (AID^{-/-} vs. C57Bl6 vs. sIgM AID^{-/-}) vereinzelt vor, dass die *A. carotis* nicht kateterisiert werden konnte. In diesen Fällen wurde auf die Anlage eines Schwanzvenenkatheters ausgewichen. Der Schwanzvenenkatheter ist ein intravenöser Gefäßzugang, welcher eingebrachte Substanzen nach Passieren des Lungenkreislaufs in das arterielle System verteilt. Die Lunge kann in diesem Fall als Filter für diese Substanzen agieren. In der besagten Testreihe wurde als einzig relevante Substanz FITC-Dextran verwendet. Die Fluoreszenzintensitäten waren bei Injektion über die Schwanzvene gegenüber der Injektion mittels Karotiskatheter ähnlich, wie Messungen der Fluoreszenzintensität belegen. Somit entstanden offensichtlich keine relevanten Veränderungen der Versuchsbedingungen durch die beiden Applikationsarten.

5.1.3 Technische Schwierigkeiten im fetalen Dottersackmodell

Das fetale Dottersackmodell wurde bereits etabliert [36, 68] und ist ausgereift, dennoch bestehen bei diesem Modell einige Schwierigkeiten, die zu benennen sind. Bei der Präparation des Dottersacks wurde dieser aus dem Mutterleib auf eine Petrischale ausgelagert. Dadurch fiel die Körperwärme der Mutter weg und der Dottersack war der Raumluft ausgesetzt. Damit der Dottersack warm blieb und nicht austrocknete, wurde er mit warmer Su-

perfusionslösung in einem pH-gepufferten Milieu konstant warm und feucht gehalten. Insofern wurde dadurch ein relativ konstantes Milieu während des Versuchs aufrechterhalten. Die Injektion von Flüssigkeit in den fetalen Kreislauf stellte eine akute Volumenbelastung für den fetalen Kreislauf dar. Es wurde bei der Injektion daher darauf geachtet, langsam und stetig das Volumen in das Gefäß einzubringen, ohne zu großen Druck auszuüben. Anfangs wurden Tests mit verschiedenen Volumina durchgeführt und somit ein noch sicher verabreichbares Volumen (maximal 15µl) bestimmt.

Bei der Mikroinjektion wurde das Gefäß mit einer feinen Injektionskapillare punktiert und somit ein Trauma gesetzt. Die darauffolgende Kauterisierung stellte ebenfalls ein Trauma für das Gefäß und den Dottersack dar. Um das Trauma möglichst gering zu halten, wurde ein kleiner Seitenast eines Gefäßes gewählt, der entfernt vom zu beobachtenden Gefäß lag. So waren die Folgen der Gefäßverödung gering.

Bei den *in-vivo* Aufnahmen sorgten die Atembewegungen und Uteruskontraktionen der Mutter für Bewegungsartefakte bei der Videoanalyse. Damit sich das Bild nicht zu stark bewegte und das Gefäß nicht aus dem Fokus rückte, wurde eine Haltevorrichtung eingesetzt, die über ein Deckglas Druck auf den Fetus ausübt. Durch diesen Druck auf den Dottersack wurden auch Dottersackgefäße unter Umständen komprimiert, was den Blutfluss beeinträchtigen konnte. Eine möglich verminderte Blutflussgeschwindigkeit würde eine vermehrte Thrombozyten-Endothelinteraktion begünstigen. Da jedoch die gleichen Blutflussbedingungen für alle Tiere beobachtet wurden, konnten die Ergebnisse dennoch miteinander verglichen werden.

Die Messung des Blutflusses erfolgte nach dem Experiment in der Analyse der Aufzeichnung, indem die zurückgelegte Strecke der fluoreszierenden Mikrosphären in einem definierten Zeitraum gemessen wurde. Dies stellte jedoch nur eine Momentaufnahme dar, spätere physiologische Änderungen des Blutflusses konnten nicht erfasst werden.

Sollte jedoch während des Versuchs eine unphysiologische Veränderung des Blutflusses – z.B. pulsatil-stockend – auftreten, so konnte dies dank der *in-vivo* Mikroskopie ad hoc festgestellt und das Gefäß aus der Analyse ausgeschlossen werden.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Immunglobuline werden in der Literatur und in der klinischen Praxis immer wieder mit thrombotischen Komplikationen in Zusammenhang gebracht, so wird die Thrombose als schwerwiegende Komplikation der intravenösen Immunglobulingabe sogar als Warnhinweis auf der Verpackung genannt [65]. Bisher waren die genauen Mechanismen unbekannt. Stark et al. konnten jedoch zeigen, dass IgM-Antikörper an den endothelialen Fc μ -Rezeptor binden und im *deep vein thrombosis* Modell (DVT-Modell) eine Thrombose initiieren können (Stark et al., in Revision). Während die Entschlüsselung einiger Mechanismen der antikörpervermittelten Thrombose für neue Ansätze der Thromboseprophylaxe genutzt werden können, bleibt offen, wie sich Antikörper auf die fetale Thrombozytenfunktion bzw. Thrombogenese auswirken und ob sich daraus Ansätze zur Prävention oder Therapie einer intraventrikulären Blutung bei Frühgeborenen ergeben können.

Margraf et. al beschrieben die Ontogenese der Thrombozytenfunktion und zeigten dort, dass sie sich entsprechend ihrer Anforderungen und ihres Umfelds anpasst. So exprimieren fetale Thrombozyten deutlich weniger Oberflächenrezeptoren, wie z.B. GpIb, GpVI oder GpIIb/IIIa, reagieren schwächer auf Stimulierung durch z.B. Thrombin, Kollagen oder Thromboxan A2 und weisen vermindertes *spreading*, als Zeichen der Aktivierung, auf. Konnte bei *in-vivo* Versuchen eine Thrombose in der Mikrozirkulation provoziert werden, so war die Thrombusstabilität in jüngeren Feten vermindert, verglichen zu älteren. Diese eingeschränkte Thrombusbildung fetaler Thrombozyten steht im Gegensatz zu einem hyperkoagulablen Blutplasma, welches *ultra-large* vWF Multimere enthält und eine hohe Viskosität aufweist. So findet man eine balancierte Homöostase vor, welche eine überschießende Thrombose verhindert und gleichzeitig auf Blutung reagieren kann, solange sich der Fetus in der schützenden Umgebung des Mutterleibs befindet. [4] Zu einer Blutung kommt es vor allem, wenn der Fetus den Mutterleib verlässt und die Hämostase noch nicht an die neuen extrauterinen Anforderungen angepasst ist.

Um den Effekt von IgM auf fetale Thrombozyten zu prüfen, wählten wir das in 3.6.2 beschriebene intravitalmikroskopische *light-dye injury* Modell, welches für die Provokation von Thromben in der Mikrozirkulation bereits etabliert wurde. Da es in diesem Modell für die antikörpervermittelte Thrombose bisher keine Erfahrungen gibt, sollte erst geprüft werden, ob man hier bei adulten Tieren einen ähnlichen Effekt beobachten kann, bevor fetale

Versuche angestellt wurden. Die Versuchsergebnisse in der Mikrozirkulation des Cremastermuskels der adulten Maus bestätigen teilweise die neuen Erkenntnisse von Stark et al., die in der Makrovaskulatur erhoben wurden. Zwar konnte bei den Versuchen mit Wildtypmäusen nach Anhebung der IgM-Plasmaspiegel durch intravenöse IgM-Injektion kein Effekt beobachtet werden, dafür zeigte sich eine signifikant schnellere und zuverlässigere Thrombose bei den AID^{-/-} Mäusen verglichen zu den sIgM AID^{-/-} Mäusen. Die Injektion von IgM-Antikörpern hatte auf das fetale System keine prothrombogene Wirkung.

5.2.1 Thrombusbildung in der adulten Wildtypmaus nach IgM-Injektion bei hoher Photointensität

Die *in-vivo* Untersuchung der Thrombozytenfunktion in Abhängigkeit von einem erhöhten IgM-Plasmaspiegel (durch Injektion) wurde mit einem Verfahren zur phototoxischen Induktion eines Endothelschadens und darauffolgender Thrombozytenaktivierung vorgenommen (*light-dye injury model*). Bei einer Serumkonzentration von 0,22 mg/ml in der normalen Wildtyp-Maus wird durch die IgM-Injektion diese Konzentration ungefähr verdoppelt. Trotz der Steigerung des IgM-Plasmaspiegels konnte bei den Versuchen kein Effekt gegenüber den Kontrollmäusen beobachtet werden, weder bei der initialen Thrombusbildung noch bei der Gefäßokklusion. Dies kann mehrere Ursachen haben:

Einerseits wurde zwar die IgM-Konzentration deutlich gesteigert, andererseits wurde die gesamte Ig-Konzentration nur minimal erhöht. Möglicherweise reicht dieser Unterschied nicht aus, um einen signifikanten Effekt beobachten zu können. Eine weitere mögliche Ursache war die gewählte Photointensität. Diese war möglicherweise zu hoch, als dass sich ein Effekt bemerkbar machen konnte, da die Thrombozyten so stark angeregt wurden, dass eine IgM-Konzentrationssteigerung bei einer sich rapiden entwickelnden Thrombose (Okklusion im Schnitt innerhalb von 13 Minuten) keinen Benefit brachte. Thrombosen werden gemäß der Virchow'schen Trias durch drei Faktoren begünstigt; durch die Blutzusammensetzung (Hyperkoagulabilität), Endothelschaden und verminderte Blutflussgeschwindigkeit (Stase) [77]. Das oben genannte DVT-Modell von Stark et al. beruhte auf einer Verminderung der Blutflussgeschwindigkeit in der Vena cava inferior (Makrovaskulatur) und wurde über 48 Stunden durchgeführt. Aufgrund des ausbleibenden Effekts in unserem Modell war eine Modifikation der Versuchsbedingungen für weitere Versuche

erforderlich, bei der die möglicherweise ursächlichen Größen (Photointensität und IgM-Plasmaspiegel) verändert wurden.

5.2.2 Thrombusbildung in der adulten Knock-out Maus bei niedriger Photointensität

Betrachtet man die Mechanismen der antikörpervermittelten Thrombose, so kann man diese laut Stark et al. in zwei Phasen aufteilen: Die IgM-vermittelte Adhäsion und Thrombozytenaktivierung und die IgG vermittelte Aggregation. IgM bindet dabei an den endothelialen Fc μ Rezeptor, was dazu führt, dass das Endothel dort vermehrt P-Selektin und vWF auf seiner Oberfläche exprimiert. An diese können Thrombozyten dann über GpIb adhären [78]. Sind Thrombozyten bereits aktiviert, so kann sich IgG über exponiertes Fibrin oder Chondroitinsulfat A (CS-A) direkt an Thrombozyten anlagern und über Komplementaktivierung (C1q und C3) weitere Thrombozyten rekrutieren und aktivieren. Beide Antikörperklassen interagieren somit indirekt mit Thrombozyten (Stark et al., in Revision). Interessanterweise gibt es auf humanen Thrombozyten auch den Fc γ RIIA, welcher direkt an die Fc-Region von IgG-Immunkomplexen bindet. Dies führt u.a. zur GpIIb/IIIa Aktivierung, Aggregation und einer erhöhten Sensitivität für Thrombozytenagonisten und spielt vor allem in der Infektabwehr eine Rolle [79].

Das Anheben der IgM-Plasmaspiegel bei adulten Wildtypmäusen hatte in unseren vorangegangenen Versuchen (vgl. 4.1.1) keinen Effekt auf die Thrombusbildung in der Cremastermikrozirkulation. Deshalb wurden die Versuchsbedingungen verändert. Wir reduzierten dabei die Photointensität auf ein Achtel der ursprünglichen Intensität. Zusätzlich verwendeten wir adulte Knock-out Mäuse, AID^{-/-} und sIgM AID^{-/-}, für welche bereits in Starks DVT-Modell ein Effekt der IgM-Antikörper gezeigt werden konnte (Stark et. al, in Revision), um eine größere Differenz zwischen den IgM-Spiegeln zu erzielen. Es zeigte sich bei Abwesenheit von IgM-Antikörpern (sIgM AID^{-/-}) eine deutlich verzögerte Thrombusbildung und ein gänzlich ausbleibender Gefäßverschluss. Mäuse mit Antikörpern (AID^{-/-} und Wildtyp) hingegen wiesen eine normale Thrombozytenfunktion auf, sowohl bei der initialen Thrombusbildung als auch bei der finalen Gefäßokklusion. Die HyperIgM-Mäuse zeigten gegenüber den Wildtyp-Mäusen jedoch keinen signifikanten Unterschied in der Thrombusbil-

dung und Gefäßokklusion. Daraus lässt sich ableiten, dass die Abwesenheit von Antikörpern im Blut im *light-dye injury model* einen negativen Effekt auf die Thrombozytenfunktion hat, während es keine Rolle spielt, welche Antikörperklassen sich im Blut befinden, solange die Menge ausreichend ist. In antikörperdepletierten Mäusen haben wir in 67% eine Adhäsion beobachten können, diese war stark verzögert, verglichen mit den übrigen Gruppen, jedoch nicht vollständig unterdrückt. Es ist davon auszugehen, dass IgM bei der Thrombozytenadhäsion eine unterstützende Rolle einnimmt und hierbei nicht ausschließlich dafür verantwortlich ist. Die sIgM AID^{-/-} besitzen zudem keine IgG Antikörper, folglich ist eine IgG-vermittelte Aggregation und Komplementunterstützung nicht möglich. Dies ist passend zu unseren Ergebnissen, bei denen wir keinen Gefäßverschluss bei diesen Mäusen beobachten konnten.

Es ist zu erwähnen, dass die Neutrophilenzahlen und das Hämoglobin in den sIgM AID^{-/-} Mäusen verglichen zu den Wildtypmäusen erniedrigt waren, wenn auch beide Parameter innerhalb des Referenzbereichs von Wildtypmäusen liegen [80]. Da neutrophile Granulozyten ebenfalls an der Thrombose beteiligt sind, könnte dies eine Verzerrung des Effekts herbeigeführt haben; so werden Neutrophile für das Bilden von NETs benötigt, welche ein zentraler Bestandteil der Immunthrombose sind. Es gibt in der Literatur Hinweise auf eine verminderte Thrombusbildung bei Neutropenie. Dies macht sich durch ein geringeres Thrombusgewicht bemerkbar, jedoch schützt Neutropenie nicht gänzlich vor einem Gefäßverschluss [81]. Für NET-Bildung im Rahmen der antikörpervermittelten Thrombose sind laut Stark et al. die Komplementfaktoren C1, C3 und C4 notwendig, welche erst durch IgG aktiviert werden. In Abwesenheit von IgG ist also davon auszugehen, dass grundsätzlich eine verminderte NET-Bildung erfolgt und die niedrigen Neutrophilenzahlen nicht ursächlich für den beobachteten Effekt sind, zumal da die Neutrophilen, bezogen auf die Referenzwerte, nicht vermindert waren [80]. (Stark et al., in Revision)

5.2.3 Thrombusbildung im murinen Fetus und neonatale Immunthrombose

Die fetale Thrombozytenfunktion wurde im verwendeten Tiermodell bereits von Margraf et al. [36] *in-vivo* untersucht. Dort konnte gezeigt werden, dass die Fähigkeit der Thrombusbildung mit dem Gestationsalter stetig zunimmt. Dies kommt, neben einem Anstieg der

Thrombozytenzahl, durch eine gesteigerte Expression von relevanten Oberflächenrezeptoren und die Reifung der intrazellulären Signalwege zustande [4]. Reife Neugeborene haben im Vollblut sogar eine verkürzte Blutungszeit im PFA-100 System, verglichen zu Erwachsenen. Dies wird mit den bereits gereiften Thrombozyten und den prokoagulatorischen Eigenschaften des neonatalen Plasmas begründet. Diese Eigenschaften kommen u.a. durch einen höheren Hämatokrit, erhöhte vWF-Spiegel sowie dem hauptsächlichen Vorkommen von *ultra-large* vWF zustande [33].

Im fetalen Thrombosemodell wurde versucht, die Thrombozytenfunktion zu beeinflussen, indem die Plasmazusammensetzung verändert wurde. Dafür wurden unspezifische IgM-Immunglobuline intravenös verabreicht, um die IgM-Plasmaspiegel im Feten zu heben.

Die Kontrollgruppe, welcher physiologische Kochsalzlösung statt IgM injiziert wurde, zeigte ein ähnliches Thrombozytenverhalten, wie bereits Margraf et al. für Feten des Alters E14.5-E16.5 gesehen haben [36]. Es wurde eine Gruppengröße von jeweils $n = 5$ gewählt.

Anders als im adulten Modell konnte in der Gruppe der IgM-behandelten Feten keine gesteigerte Thrombosebildung beobachtet werden. Im Gegenteil, es zeigte sich sogar eine tendenziell (unsignifikant) schlechtere Thrombozytenfunktion, sowohl in Bezug auf die Thrombusbildung als auch die Okklusion. Dies wirft einerseits die Frage auf, wieso die IgM-Antikörper keinen prothrombotischen Effekt auf die fetale Hämostase ausüben; andererseits, weshalb sich hier ein nicht signifikanter Trend abzeichnet, welcher vorgibt, IgM-Injektion würde die Thrombozytenfunktion im Feten inhibieren.

Stark et. al zeigte, dass IgM-Antikörper an den endothelialen Fc μ R binden. Dies führt dazu, dass die Oberflächenexpression von vWF und P-Selektin aus den Weibel-Palade-Körpern gesteigert wird, was die Adhäsion von Thrombozyten über GpIb an das Endothel begünstigt. Zudem konnte gezeigt werden, dass Mäuse ohne Fc μ R eine deutlich verminderte Thromboseneigung haben, ähnlich wie antikörperdepletierte Mäuse (Stark et al., in Revision). Fetale Thrombozyten haben bekanntermaßen sehr niedrige GpIb Expressionslevel, selbst wenn man diese mit Thrombin stimuliert [36]. Es ist anzunehmen, dass dieser Mechanismus der vWF-vermittelten Thrombozytenaktivierung aufgrund der niedrigen GpIb Expression nicht den erwarteten Effekt bringt. Zusätzlich stellt das fetale Plasma von Grund auf eine hyperkoagulable Umgebung für Thrombozyten dar, sodass eine weitere Stimulation durch vWF wenig Wirkung brächte. Es ist außerdem nicht bekannt, in welchem Maße der Fc μ R überhaupt auf fetalen Endothelzellen exprimiert ist, dies müsste in weiteren

Schritten erforscht werden. Da IgM erst spät in der Gestation gebildet werden, könnte man annehmen, dass bis dahin auch keine Fc μ R exprimiert werden und eine plötzliche Zugabe von IgM keinen Effekt erzielen kann. Da IgM offensichtlich in der fetalen Hämostase keine unterstützende Rolle einnimmt, muss davon ausgegangen werden, dass eine Injektion lediglich dazu führt, dass das an sich schon hyperkoagulable Blutplasma durch die IgM-Injektionslösung diluiert wird und somit die relative Konzentration des vWF abnimmt.

Betrachtet man nun die Blutflussgeschwindigkeit, welche laut Virchow neben der Blutzusammensetzung und der Endothelstruktur eine Schlüsselrolle bei der Thromboseentstehung spielt, so kann man feststellen, dass sich hier ein reziproker Trend abzeichnet. Die Blutflussgeschwindigkeiten waren in der IgM-Gruppe nicht signifikant verändert zur Kontrollgruppe, sodass nicht davon auszugehen ist, dass Veränderungen der Blutströmung die durch Ig hervorgerufene Thromboseneigung erklären könnte.

Stark et. al zeigten für IgG eine wichtige Rolle in der Thromboseentstehung. IgG vermitteln über Komplementaktivierung (C1q und C3) weitere Thrombozytenaktivierung und -aggregation. Dabei bindet IgG über Fibrin und CS-A an aktivierte Thrombozyten. GpIIb/IIIa spielt für die Fibrin(ogen)bindung eine wichtige Rolle. Margraf et al. konnte jedoch zeigen, dass im Feten die Konformationsänderung hin zur *high-affinity* Konformation gestört ist [4]. Betrachtet man die Komplementlevel im reifgeborenen Neonaten so findet man hier verminderte Spiegel von C1q, C3 und C4. Die Bildung der Komplementfaktoren ist gestationsabhängig. Selbst bei Geburt findet man ein noch immatures Komplementsystem vor [82, 83].

Es ist daher anzunehmen, dass die wechselseitige Beziehung zwischen IgG und dem Komplementsystem in der fetalen Thromboseentstehung untergeordnet ist. Im Gegensatz zu IgM befindet sich IgG der Mutter aufgrund der Plazentagängigkeit im fetalen Plasma, wenn auch in verminderter Konzentration [39]. Bezogen auf unsere Ergebnisse ist zumindest zu erwähnen, dass in allen Gefäßen, in denen eine Adhäsion von Thrombozyten (*onset*) stattgefunden hat, nach gewisser Zeit auch ein vollständiger Gefäßverschluss vorlag. Dies steht zumindest nicht im Widerspruch zu der Erkenntnis, dass IgG und Komplementfaktoren die Aggregation und das Thrombuswachstum unterstützen. Inwiefern IgG und Komplementfaktoren bei der fetalen Thrombusbildung wirklich eine Rolle gespielt haben, war nicht Teil der Fragestellung und kann daher nur spekuliert werden.

Betrachtet man die weiteren Mechanismen der Immunthrombose, so stellt sich die Frage, wie sich diese in der fetalen Hämostase einordnen lassen. Ein wichtiger Treiber der Immunthrombose ist Gewebsthromboplastin TF, welcher den Startpunkt der extrinsischen Gerinnung darstellt, indem er einen Komplex mit FVIIa eingeht. Der TF findet sich auf aktivierten Monozyten, Neutrophilen, Thrombozyten und Eosinophilen, wo er sich vorwiegend in inaktivierter Form findet. Aktiviert werden kann er durch Protein-Disulfid-Isomerasen (PDI) [42]. In gesunden Reifgeborenen finden sich hohe Monozytenzahlen, welche auf Stimulierung eine ähnliche TF-Expression wie beim Erwachsenen zeigen. Dies wird als eine mögliche Erklärung für die verkürzte *clotting time* bei Neugeborenen angesehen [84]. Bezogen auf die extrinsische Gerinnung, welche durch TF aktiviert wird, finden sich verminderte Serumspiegel Vitamin K-abhängiger Gerinnungsfaktoren im reifen Neugeborenen. Diese steigen im Laufe der ersten Lebensmonate deutlich an [85], was trotz erhöhter TF-Expression für eine verminderte Potenz der extrinsischen Gerinnung spricht.

Ein weiterer wichtiger Effektor der Immunthrombose sind sogenannte NETs (siehe auch 1.4.2). Die Bildung von NETs wird NADPH-abhängig oder -unabhängig, z.B. durch Thrombozyten, getriggert [86, 87]. Nach *in-vitro* Stimulation mit plättchenaktivierendem Faktor (PAF), Lipopolysacchariden (LPS), Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), *E. coli* sowie *Staphylococcus aureus* konnte in früh- und reifgeborenen Neonaten nach einer Stunde keine NET-Bildung festgestellt werden [88], jedoch zeigte sich bei längerer Inkubation nach 2-3 Stunden eine NET-Bildung, ähnlich wie bei Erwachsenen [89]. Da die Neugeborenenensepsis häufig einen foudroyanten Verlauf nimmt, ist die verzögerte NET-Bildung als mitbeteiligt anzusehen. Nach Stimulation von Neutrophilen reifgeborener Neonaten mit β -Glucan und *Candida albicans* Hyphen bildeten sich NETs in weniger als einer Stunde [90]. Wichtiger thrombozytärer Trigger der NET-Bildung ist P-Selektin, welches an PSGL-1 auf Neutrophilen bindet, zusätzlich ist das *high mobility box group box 1* (HMGB1) der Thrombozyten an der NET-Bildung beteiligt [91, 92]. Beim murinen Feten sind die P-Selektin Expression in Thrombozyten deutlich und die PSGL-1 Expression in Neutrophilen leicht vermindert [4]. Für porcine, keimfrei gehaltene Frühgeborene konnten keine verminderten HMGB1-Level gemessen werden, der HMGB1-Rezeptor RAGE (*receptor for advanced glycation endproducts*) war jedoch in diesen Tieren vermindert [93]. In humanen Frühgeborenen konnten erhöhte (lösliche) RAGE Spiegel im Blut nachgewiesen werden

[94]. Im Gegenzug können die Histone in den NETs weitere Thrombozyten über TLR2 und TLR4 aktivieren. Es gibt keine Daten zur Expression der TLR in neonatalen Thrombozyten. In neonatalen Neutrophilen ist die Expression von TLR2 ähnlich wie im Erwachsenen, die TLR4 Expression ist vermindert, jedoch zeigten beide TLRs eine beeinträchtigte Signalkaskade nach Stimulierung [95].

Die Rolle der NETs – im Erwachsenen wie im Neonaten – in der Sepsis ist umstritten, da eine überschießende NET-Bildung Thrombosen, Ischämie und Gewebeschaden verursachen kann [49], was die Organentwicklung des heranwachsenden Feten immens beeinflussen würde und sogar zu einer erhöhten Mortalität führen könnte. So konnten de Araujo et al. im zökalen Ligations- und Punktions- (CLP) Sepsismodell durch die Verhinderung der NET-Bildung im Neonaten mit dem neonatalen *NET inhibitory factor* (nNIF) ähnliches 6-Tage Überleben wie mit der Gabe von Meropenem (73% vs. 80%) erzielen, wohingegen die Kontrollgruppe, welche weder nNIF noch Meropenem erhielt, ein 6-Tage Überleben von 0% hatte [96].

Es ist anzunehmen, dass die fetale Hämostase nicht vollständig ausgerüstet ist, eine Immunthrombose zu bilden. Da das Konzept der Immunthrombose neu und die Rolle der Antikörper in dieser Art der Thrombose noch nicht vollständig geklärt sind, lassen sich hier nur Vermutungen anstellen, weshalb es im fetalen Kreislauf nicht zu einer Immunthrombose kommt. Sicherlich tragen hierzu sowohl die eingeschränkte Funktion von Plättchen und von Neutrophilen bei [4, 97].

5.3 Klinische Bedeutung

Die venöse Thrombose ist mit jährlich geschätzt fast 690.000 neuen Fällen in Europa eine weit verbreitete Krankheit, welche sich an jedem Ort der venösen Zirkulation manifestieren kann [98]. Besonders gefürchtet ist die tiefe Beinvenenthrombose mit der Komplikation der Lungenembolie [99]. Auch wenn die Risikofaktoren hierfür schon weitgehend erforscht sind und stetig neue prophylaktische Medikamente entwickelt werden, steigt die Inzidenz der venösen thrombotischen Ereignisse [100]. Obwohl auch das Immunsystem in der Entstehung der Thrombose bekanntermaßen eine Rolle spielt, sei es durch NETs oder andere Neutrophilenfunktionen, wurden Antikörper hierbei bisher nicht beachtet [62]. In dieser

Arbeit wurde aufgezeigt, dass das Vorhandensein von Antikörpern, beziehungsweise die Abwesenheit dieser, eine signifikante Wirkung auf die Entstehung der Thrombose in der adulten Mikrozirkulation der Maus hat. Aus dieser Erkenntnis ergeben sich möglicherweise Hinweise, welche für neue Ansätze zur Thromboseprophylaxe im Menschen genutzt werden können. Dabei ist es wichtig, die genauen Mechanismen herauszuarbeiten, um gezielt auf beteiligte Rezeptoren einwirken zu können.

Bezogen auf die fetale Hämostase konnte in den *in-vivo* Experimenten kein Zusammenhang zwischen Immunglobulinen und Thrombose hergestellt werden. Im Hinblick auf hämorrhagische Ereignisse des Neonaten, insbesondere die intraventrikuläre Hämorrhagie, konnten die *in-vivo* Versuche keine Hinweise für neue Therapiemöglichkeiten liefern. Bei fehlenden Therapieoptionen steht weiterhin die Prävention durch die strikte Reduktion vermeidbarer Risikofaktoren im Vordergrund.

5.4 Ausblick

Wir konnten in dieser Arbeit zeigen, dass Immunglobuline in der adulten Hämostase eine prothrombotische Rolle spielen, jedoch ohne die genauen Mechanismen zu kennen. Die Arbeitsgruppe von Prof. Konstantin Stark widmete sich parallel dieser Fragestellung und konnte zeigen, dass der endotheliale Fc μ R bei der IgM-abhängigen Thromboseneigung eine wichtige Rolle spielt. Mit dem Wissen, dass Immunglobuline eine thrombogene Wirkung haben, kann die bei der intravenösen Immunglobulintherapie (IVIG) häufig beobachtete Thrombose als keine zufällige Nebenwirkung angesehen werden und wird zurecht mittels Warnhinweis auf entsprechenden Produkten vermerkt [65]. Wir konnten keinen positiven Effekt von Ig auf *fetale* Thrombozyten aufdecken, zumindest nicht im verwendeten fetalen Tiermodell, was dafür spricht, dass die Immunthrombose aufgrund der eingeschränkten Funktion von Thrombozyten und Neutrophilen in der fetalen Hämostase der Maus keine Rolle spielt [4, 101]. Es müssen weitere Untersuchungen angestellt werden hinsichtlich der Fc μ R-Expression im Fetus sowie der Interaktion von IgM mit dem fetalen Endothel. Zusätzlich müssen andere Ansätze verfolgt werden, mit dem Ziel, die fetale Thrombusbildung zu unterstützen, sodass Blutungen, wie die IVH, besser begrenzt werden können. Knapfer et al. versuchten dies beispielsweise durch Gabe des aktivierten Faktors VII (aFVII) [102].

Dabei muss in jedem Fall das delicate Gleichgewicht aus anti- und prothrombotischen Faktoren bei der fetalen Hämostase beachtet werden. Denn eine überschießende Hämostase, wie sie beispielsweise bei Transfusion adulter Thrombozyten beobachtet werden kann, bringt sehr wahrscheinlich mehr Schaden als Nutzen [4].

6 Zusammenfassung/Schluss

Die fetale Hämostase steht in einem sensiblen Gleichgewicht, bestehend aus hyporeaktiven Thrombozyten und hyperkoagulablem Plasma. Dieses Gleichgewicht ist notwendig für die Entwicklung des Feten, damit es weder zu Blutungen noch zur überschießenden Hämostase kommt. Auch wenn adulte Thrombozyten bereits eingehend erforscht sind, ist die Regulation fetaler Thrombozyten weiterhin nicht gut verstanden. Besonders *in-vivo* gibt es nur wenige Erkenntnisse. So ist die intraventrikuläre Blutung als Komplikation einer unreifen Hämostase und eines fragilen Gefäßsystems zu sehen.

Eine konsequente Prävention durch Reduktion vermeidbarer Risikofaktoren, wie z.B. postnataler Transport, nicht abgeschlossene Steroidprophylaxe beim Frühgeborenen, Blutdruckunregelmäßigkeiten, Hypokapnie, Hypothermie oder Infektion, ist weiterhin die erfolgreichste Maßnahme zur Reduktion der IVH-Inzidenz [103].

Die Therapie der IVH spielt dabei eine untergeordnete Rolle. Insbesondere die Transfusion adulter Thrombozyten stellt keine gute Lösung dar, da diese häufig mit einem schlechten *outcome* assoziiert ist und überschießende Thrombozytenaktivierung hervorruft, wie tierexperimentell gezeigt wurde [4]. Die IVH weist - bei fehlenden guten Präventionsmöglichkeiten - bis heute eine hohe Morbidität und Mortalität auf [33]. Nachdem es Hinweise auf eine thrombogene Wirkung von Antikörpern im adulten Blut gibt, untersuchten wir nun *in-vivo* die Funktion adulter und fetaler Thrombozyten in Abhängigkeit von der IgM-Konzentration im Blut.

In Vorversuchen mit dem *light-dye injury* Modell konnte bei adulten Wildtypmäusen nach IgM-Injektion keine veränderte Thrombozytenfunktion in einem Thrombosemodell in der Mikrozirkulation des Cremastermuskels nachgewiesen werden. Bei Versuchen mit adulten Knock-out Mäusen im gleichen Modell konnte bei niedrigerer Photointensität gezeigt werden, dass die IgM-Konzentration die Thrombozytenfunktion beeinflusst. So korrelierte die Thrombusbildung direkt mit der Konzentration von IgM.

Für die fetalen Versuche mit Wildtypfeten wurde ein bereits etabliertes fetales Thrombosemodell in Mikrogefäßen des Dottersacks *in-vivo* (ebenfalls ein *light-dye injury* Modell)

gewählt. Interessanterweise ließ sich hierbei der im adulten Modell beschriebene Effekt nicht beobachten. So war die Thrombusbildung nach IgM-Injektion nicht verbessert.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit ein Einfluss von IgM-Antikörpern auf die Thrombozytenfunktion adulter Mäuse im Cremastermodell gezeigt werden. Eine ähnliche Korrelation konnte für fetale Thrombozyten hingegen nicht hergestellt werden. Dies soll Ansporn für weitere Forschung sein, die fetale Hämostase zu beeinflussen und andere Therapieansätze zu prüfen.

7 Literaturverzeichnis

1. Piccolo, B., M. Marchignoli, and F. Pisani, *Intraventricular hemorrhage in preterm newborn: Predictors of mortality*. Acta Biomed, 2022. **93**(2): p. e2022041.
2. Garton, T., et al., *Challenges for intraventricular hemorrhage research and emerging therapeutic targets*. Expert Opin Ther Targets, 2017. **21**(12): p. 1111-1122.
3. Michelson, A.D., *Platelets*. Vol. 3. 2013, London; Waltham, MA: Elsevier/Academic Press. 1353.
4. Margraf, A., C. Nussbaum, and M. Sperandio, *Ontogeny of platelet function*. Blood Adv, 2019. **3**(4): p. 692-703.
5. Boilard, E. and P.A. Nigrovic, *Chapter 16 - Platelets*, in *Kelley and Firestein's Textbook of Rheumatology (Tenth Edition)*, G.S. Firestein, et al., Editors. 2017, Elsevier. p. 264-273.e3.
6. Gremmel, T., A.L. Frelinger, 3rd, and A.D. Michelson, *Platelet Physiology*. Semin Thromb Hemost, 2016. **42**(3): p. 191-204.
7. Scherlinger, M., et al., *The role of platelets in immune-mediated inflammatory diseases*. Nat Rev Immunol, 2023. **23**(8): p. 495-510.
8. Nicolai, L., et al., *Vascular surveillance by haptotactic blood platelets in inflammation and infection*. Nature Communications, 2020. **11**(1): p. 5778.
9. Nuytens, B.P., et al., *Platelet adhesion to collagen*. Thromb Res, 2011. **127 Suppl 2**: p. S26-9.
10. Perrella, G., et al., *Platelet GPVI (Glycoprotein VI) and Thrombotic Complications in the Venous System*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2021. **41**(11): p. 2681-2692.
11. Purdy, M., et al., *P- and E- selectin in venous thrombosis and non-venous pathologies*. J Thromb Haemost, 2022. **20**(5): p. 1056-1066.
12. Kattula, S., J.R. Byrnes, and A.S. Wolberg, *Fibrinogen and Fibrin in Hemostasis and Thrombosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2017. **37**(3): p. e13-e21.
13. Savage, B., E. Saldivar, and Z.M. Ruggeri, *Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor*. Cell, 1996. **84**(2): p. 289-97.
14. Sang, Y., et al., *Interplay between platelets and coagulation*. Blood Rev, 2021. **46**: p. 100733.
15. Rayes, J., S.P. Watson, and B. Nieswandt, *Functional significance of the platelet immune receptors GPVI and CLEC-2*. J Clin Invest, 2019. **129**(1): p. 12-23.
16. Andre, P., et al., *Platelets adhere to and translocate on von Willebrand factor presented by endothelium in stimulated veins*. Blood, 2000. **96**(10): p. 3322-8.
17. Bray, M.A., et al., *Microvascular thrombosis: experimental and clinical implications*. Transl Res, 2020. **225**: p. 105-130.
18. Aleman, M.M., et al., *Factor XIII activity mediates red blood cell retention in venous thrombi*. J Clin Invest, 2014. **124**(8): p. 3590-600.
19. Sandmann, R. and S. Koster, *Topographic Cues Reveal Two Distinct Spreading Mechanisms in Blood Platelets*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 22357.
20. Elagib, K.E., A.T. Brock, and A.N. Goldfarb, *Megakaryocyte ontogeny: Clinical and molecular significance*. Exp Hematol, 2018. **61**: p. 1-9.

21. Davenport, P., Z.J. Liu, and M. Sola-Visner, *Changes in megakaryopoiesis over ontogeny and their implications in health and disease*. Platelets, 2020. **31**(6): p. 692-699.
22. Bluteau, O., et al., *Developmental changes in human megakaryopoiesis*. J Thromb Haemost, 2013. **11**(9): p. 1730-41.
23. Wolber, E.M., et al., *Expression of the thrombopoietin gene in human fetal and neonatal tissues*. Blood, 1999. **94**(1): p. 97-105.
24. Kaushansky, K., et al., *Thrombopoietin, the Mpl ligand, is essential for full megakaryocyte development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(8): p. 3234-8.
25. Kaushansky, K., et al., *Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin*. Nature, 1994. **369**(6481): p. 568-71.
26. Zeigler, F.C., et al., *In vitro megakaryocytopoietic and thrombopoietic activity of c-mpl ligand (TPO) on purified murine hematopoietic stem cells*. Blood, 1994. **84**(12): p. 4045-52.
27. Akkerman, J.W., *Thrombopoietin and platelet function*. Semin Thromb Hemost, 2006. **32**(3): p. 295-304.
28. van Willigen, G., G. Gorter, and J.W. Akkerman, *Thrombopoietin increases platelet sensitivity to alpha-thrombin via activation of the ERK2-cPLA2 pathway*. Thromb Haemost, 2000. **83**(4): p. 610-6.
29. Van Os, E., et al., *Thrombopoietin increases platelet adhesion under flow and decreases rolling*. Br J Haematol, 2003. **121**(3): p. 482-90.
30. Walka, M.M., et al., *Thrombopoietin concentration in umbilical cord blood of healthy term newborns is higher than in adult controls*. Biol Neonate, 1999. **75**(1): p. 54-8.
31. Nishihira, H., et al., *Growth of macroscopic human megakaryocyte colonies from cord blood in culture with recombinant human thrombopoietin (c-mpl ligand) and the effects of gestational age on frequency of colonies*. Br J Haematol, 1996. **92**(1): p. 23-8.
32. Liu, Z.J. and M. Sola-Visner, *Neonatal and adult megakaryopoiesis*. Curr Opin Hematol, 2011. **18**(5): p. 330-7.
33. Davenport, P. and M. Sola-Visner, *Hemostatic Challenges in Neonates*. Front Pediatr, 2021. **9**: p. 627715.
34. Israels, S.J., M.L. Rand, and A.D. Michelson, *Neonatal platelet function*. Semin Thromb Hemost, 2003. **29**(4): p. 363-72.
35. Weinstein, M.J., et al., *Fetal and neonatal von Willebrand factor (vWF) is unusually large and similar to the vWF in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura*. Br J Haematol, 1989. **72**(1): p. 68-72.
36. Margraf, A., et al., *Maturation of Platelet Function During Murine Fetal Development In Vivo*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2017. **37**(6): p. 1076-1086.
37. Stenberg, P.E., et al., *A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation*. J Cell Biol, 1985. **101**(3): p. 880-6.
38. Gruber, M., et al., *Plazentafunktion – Nährstofftransport – Gasaustausch*, in *Die Plazenta: Grundlagen und klinische Bedeutung*, B. Huppertz and E. Schleußner, Editors. 2018, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 75-88.

39. Palmeira, P., et al., *IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies*. Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 985646.
40. Butterworth, M., B. McClellan, and M. Allansmith, *Influence of sex in immunoglobulin levels*. Nature, 1967. **214**(5094): p. 1224-5.
41. van Furth, R., H.R. Schuit, and W. Hijmans, *The immunological development of the human fetus*. J Exp Med, 1965. **122**(6): p. 1173-88.
42. Engelmann, B. and S. Massberg, *Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(1): p. 34-45.
43. Estevez, B. and X. Du, *New Concepts and Mechanisms of Platelet Activation Signaling*. Physiology (Bethesda), 2017. **32**(2): p. 162-177.
44. Gaertner, F. and S. Massberg, *Blood coagulation in immunothrombosis-At the frontline of intravascular immunity*. Semin Immunol, 2016. **28**(6): p. 561-569.
45. Massberg, S., et al., *Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases*. Nat Med, 2010. **16**(8): p. 887-96.
46. Palankar, R., et al., *Platelets kill bacteria by bridging innate and adaptive immunity via platelet factor 4 and FcγRIIA*. J Thromb Haemost, 2018. **16**(6): p. 1187-1197.
47. Henn, V., et al., *CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells*. Nature, 1998. **391**(6667): p. 591-4.
48. Langer, F., et al., *The role of CD40 in CD40L- and antibody-mediated platelet activation*. Thromb Haemost, 2005. **93**(6): p. 1137-46.
49. Stark, K. and S. Massberg, *Interplay between inflammation and thrombosis in cardiovascular pathology*. Nat Rev Cardiol, 2021. **18**(9): p. 666-682.
50. Del Conde, I., et al., *Platelet activation leads to activation and propagation of the complement system*. J Exp Med, 2005. **201**(6): p. 871-9.
51. Verschoor, A., et al., *A platelet-mediated system for shuttling blood-borne bacteria to CD8α⁺ dendritic cells depends on glycoprotein GPIb and complement C3*. Nat Immunol, 2011. **12**(12): p. 1194-201.
52. Cox, D., S.W. Kerrigan, and S.P. Watson, *Platelets and the innate immune system: mechanisms of bacterial-induced platelet activation*. J Thromb Haemost, 2011. **9**(6): p. 1097-107.
53. Kastrop, C.J., et al., *Spatial localization of bacteria controls coagulation of human blood by 'quorum acting'*. Nat Chem Biol, 2008. **4**(12): p. 742-50.
54. Kraemer, B.F., et al., *Novel anti-bacterial activities of beta-defensin 1 in human platelets: suppression of pathogen growth and signaling of neutrophil extracellular trap formation*. PLoS Pathog, 2011. **7**(11): p. e1002355.
55. Tapper, H. and H. Herwald, *Modulation of hemostatic mechanisms in bacterial infectious diseases*. Blood, 2000. **96**(7): p. 2329-37.
56. Yeaman, M.R., *Platelets: at the nexus of antimicrobial defence*. Nat Rev Microbiol, 2014. **12**(6): p. 426-37.
57. Thammavongsa, V., et al., *Staphylococcal manipulation of host immune responses*. Nat Rev Microbiol, 2015. **13**(9): p. 529-43.
58. Wu, T., M.R. Yeaman, and A.S. Bayer, *In vitro resistance to platelet microbicidal protein correlates with endocarditis source among bacteremic staphylococcal and streptococcal isolates*. Antimicrob Agents Chemother, 1994. **38**(4): p. 729-32.
59. Peschel, A., et al., *Staphylococcus aureus resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with l-lysine*. J Exp Med, 2001. **193**(9): p. 1067-76.

-
60. Cheng, A.G., et al., *Contribution of coagulases towards Staphylococcus aureus disease and protective immunity*. PLoS Pathog, 2010. **6**(8): p. e1001036.
 61. Guggenberger, C., et al., *Two distinct coagulase-dependent barriers protect Staphylococcus aureus from neutrophils in a three dimensional in vitro infection model*. PLoS Pathog, 2012. **8**(1): p. e1002434.
 62. Ehrenstein, M.R. and C.A. Notley, *The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(11): p. 778-86.
 63. Sammaritano, L.R., *Antiphospholipid syndrome*. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2019: p. 101463.
 64. Lovecchio, F., *Heparin-induced thrombocytopenia*. Clin Toxicol (Phila), 2014. **52**(6): p. 579-83.
 65. Ammann, E.M., et al., *Intravenous immune globulin and thromboembolic adverse events in patients with hematologic malignancy*. Blood, 2016. **127**(2): p. 200-7.
 66. Peerschke, E.I., W. Yin, and B. Ghebrehiwet, *Complement activation on platelets: implications for vascular inflammation and thrombosis*. Mol Immunol, 2010. **47**(13): p. 2170-5.
 67. Abdulla, A., et al., *Platelets regulate P-selectin expression and leukocyte rolling in inflamed venules of the pancreas*. Eur J Pharmacol, 2012. **682**(1-3): p. 153-60.
 68. Sperandio, M., et al., *Ontogenetic regulation of leukocyte recruitment in mouse yolk sac vessels*. Blood, 2013. **121**(21): p. e118-28.
 69. Kumazaki, K., et al., *AID^{-/-}mus^{-/-} mice are agammaglobulinemic and fail to maintain B220-CD138⁺ plasma cells*. J Immunol, 2007. **178**(4): p. 2192-203.
 70. Dahlberg, C.I., et al., *A novel mouse model for the hyper-IgM syndrome: a spontaneous activation-induced cytidine deaminase mutation leading to complete loss of Ig class switching and reduced somatic hypermutation*. J Immunol, 2014. **193**(9): p. 4732-8.
 71. Sutter, A. and A.K. Lindholm, *The copulatory plug delays ejaculation by rival males and affects sperm competition outcome in house mice*. J Evol Biol, 2016. **29**(8): p. 1617-30.
 72. Jonathan M. Gibbins, M.P.M.-S., *Platelets and Megakaryocytes*. Methods in Molecular Biology. Vol. 1: Functional Assays. 2004: Humana Press. XIX, 385.
 73. Schindelin, J., et al., *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*. Nature Methods, 2012. **9**(7): p. 676-682.
 74. Satoh, H., *Residual blood volumes in organs of pregnant mice and fetuses*. Tohoku J Exp Med, 1979. **129**(1): p. 41-4.
 75. Wolfensohn, S. and M. Lloyd, *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare*. 2003: Wiley.
 76. Ferdowsian, H.R. and N. Beck, *Ethical and scientific considerations regarding animal testing and research*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e24059.
 77. Bagot, C.N. and R. Arya, *Virchow and his triad: a question of attribution*. Br J Haematol, 2008. **143**(2): p. 180-90.
 78. Li, R. and J. Emsley, *The organizing principle of the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex*. J Thromb Haemost, 2013. **11**(4): p. 605-14.
 79. Patel, P., et al., *Platelet FcγRIIA in immunity and thrombosis: Adaptive immunothrombosis*. J Thromb Haemost, 2021. **19**(5): p. 1149-1160.

-
80. C57BL/6 Mice Datasheet | Charles River. 2019; Available from: https://www.criver.com/sites/default/files/resources/doc_a/C57BL6MouseModelInformationSheet.pdf.
81. von Bruhl, M.L., et al., *Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo*. J Exp Med, 2012. **209**(4): p. 819-35.
82. Grumach, A.S., et al., *Complement profile in neonates of different gestational ages*. Scand J Immunol, 2014. **79**(4): p. 276-81.
83. Ueda, H., A. Nakanishi, and M. Ichijo, *Immunochemical quantitation of serum complement components in SFD and AFD infants*. Tohoku J Exp Med, 1980. **132**(1): p. 111-6.
84. Cvirn, G., et al., *High availability of intravascular tissue factor in neonates*. J Pediatr Hematol Oncol, 2007. **29**(5): p. 279-83.
85. Andrew, M., et al., *Development of the human coagulation system in the full-term infant*. Blood, 1987. **70**(1): p. 165-72.
86. Ravindran, M., M.A. Khan, and N. Palaniyar, *Neutrophil Extracellular Trap Formation: Physiology, Pathology, and Pharmacology*. Biomolecules, 2019. **9**(8).
87. Brinkmann, V., et al., *Neutrophil extracellular traps kill bacteria*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1532-5.
88. Yost, C.C., et al., *Impaired neutrophil extracellular trap (NET) formation: a novel innate immune deficiency of human neonates*. Blood, 2009. **113**(25): p. 6419-27.
89. Marcos, V., et al., *Delayed but functional neutrophil extracellular trap formation in neonates*. Blood, 2009. **114**(23): p. 4908-11; author reply 4911-2.
90. Byrd, A.S., et al., *NETosis in Neonates: Evidence of a Reactive Oxygen Species-Independent Pathway in Response to Fungal Challenge*. J Infect Dis, 2016. **213**(4): p. 634-9.
91. Maugeri, N., et al., *Activated platelets present high mobility group box 1 to neutrophils, inducing autophagy and promoting the extrusion of neutrophil extracellular traps*. J Thromb Haemost, 2014. **12**(12): p. 2074-88.
92. Etulain, J., et al., *P-selectin promotes neutrophil extracellular trap formation in mice*. Blood, 2015. **126**(2): p. 242-6.
93. Splichalova, A., et al., *Preterm Life in Sterile Conditions: A Study on Preterm, Germ-Free Piglets*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 220.
94. Buschmann, K., et al., *RAGE controls leukocyte adhesion in preterm and term infants*. BMC Immunol, 2014. **15**: p. 53.
95. Melvan, J.N., et al., *Neonatal sepsis and neutrophil insufficiencies*. Int Rev Immunol, 2010. **29**(3): p. 315-48.
96. de Araujo, C.V., et al., *Neonatal NET-Inhibitory Factor improves survival in the cecal ligation and puncture model of polymicrobial by inhibiting neutrophil extracellular traps*. Front Immunol, 2022. **13**: p. 1046574.
97. Rohwedder, I., et al., *A20 and the noncanonical NF- κ B pathway are key regulators of neutrophil recruitment during fetal ontogeny*. JCI Insight, 2023. **8**(4).
98. Cohen, A.T., et al., *Venous thromboembolism (VTE) in Europe. The number of VTE events and associated morbidity and mortality*. Thromb Haemost, 2007. **98**(4): p. 756-64.
99. Giordano, N.J., et al., *Epidemiology, Pathophysiology, Stratification, and Natural History of Pulmonary Embolism*. Tech Vasc Interv Radiol, 2017. **20**(3): p. 135-140.

100. Heit, J.A., *Epidemiology of venous thromboembolism*. Nat Rev Cardiol, 2015. **12**(8): p. 464-74.
101. Nussbaum, C., et al., *Neutrophil and endothelial adhesive function during human fetal ontogeny*. J Leukoc Biol, 2013. **93**(2): p. 175-84.
102. Knupfer, M., et al., *IVH in VLBW Preterm Babies - Therapy with Recombinant Activated F VII?* Klin Padiatr, 2017. **229**(6): p. 335-341.
103. Ballabh, P., *Intraventricular hemorrhage in premature infants: mechanism of disease*. Pediatr Res, 2010. **67**(1): p. 1-8.

8 Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria (lat.)
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CD	Cluster of differentiation
dl	Deziliter
DVT	deep vein thrombosis
Fa.	Firma
Fc μ R1IA	IgG Fc Rezeptor IIA
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fl	Femtoliter
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
Gp	Glykoprotein
Ig	Immunglobulin(e)
IVH	intraventricular hemorrhage
K	Kilo
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
μ	Mikro
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
M.	Musculus
M	Million
m	Meter
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
nm	Nanometer
n	Anzahl
NET	Neutrophil extracellular traps
NOD	nucleotide-binding oligomerization domain
PAR	Protease-aktivierte Rezeptoren
PFA-100	Platelet Function Assay 100
PSGL-1	P-Selektin Glykoprotein Ligand-1
Stabw	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TLR	Toll-like Rezeptor
vWF	von Willebrand Faktor
z.B.	zum Beispiel

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Auswahl wichtiger Oberflächenrezeptoren des Thrombozyten..	4
Abbildung 2: Thrombozytenadhäsion nach Endothelschaden..	5
Abbildung 3: Thrombozytenaggregation.....	7
Abbildung 4: Übersicht über terminierte Verpaarung.....	22
Abbildung 5: Mikroinjektionskapillare.	23
Abbildung 6: Narkotisierte Maus mit eröffnetem Hals	24
Abbildung 7: Darstellung des M. cremaster	26
Abbildung 8: Freigelegter Fetus mit Plazenta und Mutter verbunden	29
Abbildung 9: Intravitalmikroskopie..	33
Abbildung 10: Beginn der Thrombusbildung, „Onset“.....	34
Abbildung 11: Vollständiger Gefäßverschluss, „Occlusion“ ..	35
Abbildung 12: Thrombusbildung (<i>Onset</i>).	37
Abbildung 13: Vollständiger Gefäßverschluss, „Occlusion“ ..	38
Abbildung 14: Beginn der Thrombusbildung (<i>Onset</i>).....	41
Abbildung 15: Vollständiger Gefäßverschluss (<i>Occlusion</i>).....	42

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte	17
Tabelle 2: Mikroskope und Zubehör	18
Tabelle 3: Verwendete Substanzen für Injektion und Applikation	19
Tabelle 4: Verwendete Narkotika	20
Tabelle 5: Verbrauchsmaterial.....	20
Tabelle 6: Verwendete Software	21
Tabelle 7: Mikrovaskuläre Parameter der intravitalmikroskopischen Versuche.....	36
Tabelle 8: Sonstige Parameter der Mausgruppen.....	36
Tabelle 9: Mikrovaskuläre Parameter der intravitalmikroskopischen Versuche.....	38
Tabelle 10: Sonstige Parameter der Mausgruppen.....	39
Tabelle 11: Thrombozytenzahl, MPV, PDW.	40
Tabelle 12: Erythrozytenzahl und Hb-Wert.	40
Tabelle 13: Leukozyten- und Neutrophilenzahl.	40
Tabelle 14: Mikrovaskuläre Parameter der fetalen intravitalmikroskopischen Versuche....	43
Tabelle 15: Gewicht und Anzahl der Feten.....	43

11 Danksagung

Mein tiefster Dank gilt allen, die mich während meines Studiums und besonders meiner Dissertation unterstützt haben.

Allen voran danke ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Markus Sperandio, der mich für dieses Projekt begeistert hat und mir dadurch den Zugang zur Wissenschaft ermöglicht hat. Die enge Anbindung und gute Betreuung waren ausschlaggebend dafür, dass meine Motivation für die Experimente nie nachließ und ich auf diese Dissertation mit positiven Gefühlen zurückblicke. Ebenfalls möchte ich mich bedanken für die Unterstützung und Ratschläge, die ich auch außerhalb des Labors erhalten habe.

Ebenfalls möchte ich meinen beiden Betreuern, Frau PD Dr. Claudia Nussbaum und Dr. med. Andreas Margraf danken. Die beiden haben mich in die Welt der fetalen Mikrozirkulation eingeführt und mir die schwierige Methodik geduldig beigebracht. Frau PD Dr. Nussbaum half mir bei Problemen mit ihrer klaren und strukturierten Denkweise und brachte so das Projekt maßgeblich voran. Dr. Margraf, welcher mit seiner eigenen Dissertation die Grundlage für mein Projekt geschaffen hat, löste aufkommende Probleme bei der Methodik und konnte dadurch die Qualität der Durchführung verbessern.

Auch gilt mein Dank meiner Arbeitsgruppe und den Kooperationspartnern, vor allem Prof. Dr. Konstantin Stark für das Bereitstellen der Knock-out Mäuse und die Aufnahme meiner Daten in sein Paper. Herrn Dr. Roland Immler danke ich dafür, dass er stets zur Stelle war, falls sich ein Problem mit der Methodik oder der Technik auftat. Frau Susanne Bierschenk und Frau Nadine Schmidt möchte ich danken für die Unterstützung bei allen Tierhaltungsfragen und der terminierten Verpaarung. Weiterhin danke ich Frau Bierschenk insbesondere für Hilfe bei technischen Problemen sowie für das Anlernen der Karotiskatheteranlage. Auch dem Rest der Arbeitsgruppe möchte ich für kritische Fragen und Anmerkungen bei der regelmäßigen Besprechung danken.

Mein Dank gilt ebenfalls allen Mitarbeitern des SFB 914, mit denen ich auf Studientagen angeregte Gespräche und wissenschaftlichen Austausch hielt. Herrn Gerhard Adams danke

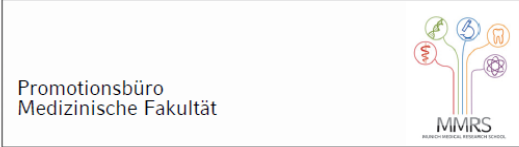
ich für die Fahrdienste vom BMC zum Walter-Brendel-Zentrum. Die kollegiale und freundschaftliche Stimmung am BMC machte das Arbeiten dort zu einer Freude.

Dem IRTG-Programm des SFB 914 möchte ich für die finanzielle und wissenschaftliche Unterstützung danken, besonders die Kurse brachten eine große Erweiterung meiner wissenschaftlichen Fähigkeiten. Dabei bedanke ich mich insbesondere bei Frau Dr. Verena Kochan für ihre fabelhafte Organisation und Unterstützung bei organisatorischen Fragen.

Ganz besonders danken möchte ich meiner Familie, die mich zu jederzeit sowohl moralisch als auch mit guten Ratschlägen unterstützt hat und die mir Halt gab. Großer Dank meinen Eltern Dr. med. Cornelia und Dr. med. Edgar David für ihr geduldiges Abwarten der Fertigstellung dieser Dissertationsschrift. Der übrigen Verwandtschaft danke ich für ihr Interesse an meiner Arbeit und Ausbildung und die guten Zusprüche in Zeiten der Zweifel.

Zuletzt danke ich meiner Frau und besten Freundin, Boryana. Sie gab mir erst den Anstoß, eine anspruchsvolle Dissertation dieser Art zu beginnen und war immerwährend verständnisvoll und aufbauend. Ihr verdanke ich viel mehr als sie weiß.

12 Affidavit

			
Eidesstattliche Versicherung			

David, Christian

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

„Thrombozytenfunktion und Immunthrombose in der fetalen und adulten Maus“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Planegg, 15.04.2024

Ort, Datum

C. David

Unterschrift Doktorand

13 Lebenslauf

14 Publikationen

David C, Kuhlen M, Frühwald MC. Was hinter den Trommelschlegelfingern steckte. Pädiatrie. 2021;33(6):44–5. German. doi: 10.1007/s15014-021-3890-3. Epub 2021 Dec 13. PMCID: PMC8666184.