



**Thrombozytenfunktionsanalyse als potenzielles Instrument zur
Früherkennung von Sepsis**

**Platelet function analysis as a potential tool for early sepsis
diagnosis**

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades

der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,

Klasse: Biomedizin

Vorgelegt von

Mathis Leonard Weigel

aus

Dillingen a. d. Donau

Würzburg 2023

Eingereicht am:

Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzende/r: Prof. Dr. rer. nat. Christoph Otto

1. Betreuer: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Harald Schulze

2. Betreuer: Univ.-Prof. Dr. Dr. med. univ. Andreas Beilhack

3. Betreuer: Prof. Dr. med. Markus Kredel

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

~ Für Charlotte und Lukas ~

Vorbemerkung: In dieser Arbeit wurde aus Gründen der Inklusion weitestgehend geschlechtergerechte Sprache verwendet. Englischsprachige Begriffe wurden kursiv gefasst.

ZUSAMMENFASSUNG

Sepsis ist ein häufiges und akut lebensbedrohliches Syndrom, das eine Organfunktionsstörung in Folge einer dysregulierten Immunantwort auf eine Infektion beschreibt. Eine frühzeitige Diagnosestellung und Therapieeinleitung sind von zentraler Bedeutung für das Überleben der Patient:innen. In einer Pilotstudie konnte unsere Forschungsgruppe mittels Durchflusszytometrie eine ausgeprägte Hyporeaktivität der Thrombozyten bei Sepsis nachweisen, die einen potenziell neuen Biomarker zur Sepsis-Früherkennung darstellt. Zur Evaluation des Ausmaßes und Entstehungszeitpunktes der detektierten Thrombozytenfunktionsstörung wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit zusätzlich zu Patient:innen mit Sepsis (SOFA-Score ≥ 2 ; n=13) auch hospitalisierte Patient:innen mit einer Infektion ohne Sepsis (SOFA-Score < 2 ; n=12) rekrutiert. Beide Kohorten wurden zu zwei Zeitpunkten (t_1 : $<24h$; t_2 : Tag 5-7) im Krankheitsverlauf mittels Durchflusszytometrie und PFA-200 untersucht und mit einer gesunden Kontrollgruppe (n=28) verglichen.

Phänotypische Auffälligkeiten der Thrombozyten bei Sepsis umfassten: (i) eine veränderte Expression verschiedener Untereinheiten des GPIb-IX-V-Rezeptorkomplexes, die auf ein verstärktes Rezeptor-*Shedding* hindeutet; (ii) ein ausgeprägtes Mepacrin-Beladungsdefizit, das auf eine zunehmend reduzierte Anzahl von δ -Granula entlang des Infektion-Sepsis Kontinuums hinweist; (iii) eine Reduktion endständig gebundener Sialinsäure im Sinne einer verstärkten Desialylierung. Die funktionelle Analyse der Thrombozyten bei Sepsis ergab bei durchflusszytometrischer Messung der Integrin $\alpha IIb\beta 3$ -Aktivierung (PAC-1-Bindung) eine ausgeprägte generalisierte Hyporeaktivität gegenüber multiplen Agonisten, die abgeschwächt bereits bei Infektion nachweisbar war und gemäß ROC-Analysen gut zwischen Infektion und Sepsis diskriminierte (AUC >0.80 für alle Agonisten). Im Gegensatz dazu zeigten Thrombozyten bei Sepsis und Analyse mittels PFA-200 unter Einfluss physiologischer Scherkräfte eine normale bis gar beschleunigte Aggregation.

Die Reaktivitätsmessung von Thrombozyten mittels Durchflusszytometrie stellt weiterhin einen vielversprechenden Biomarker für die Sepsis-Früherkennung dar. Für weitere Schlussfolgerungen ist jedoch eine größere Kohorte erforderlich. In nachfolgenden Untersuchungen sollten zudem mechanistische Ursachen der beschriebenen phänotypischen und funktionellen Auffälligkeiten von Thrombozyten bei Infektion und Sepsis z.B. mittels Koinkubationsexperimenten untersucht werden.

SUMMARY

Sepsis is a frequent and life-threatening condition that describes organ dysfunction resulting from a dysregulated host immune response to infection. Early diagnosis and treatment are essential to improve patient survival. In a previous pilot study with sepsis patients, our research identified a severe platelet hyporeactivity using flow cytometry which could become a potential new biomarker for early sepsis diagnosis. To evaluate onset and extend of the detected platelet dysfunction in this study, we extended our patient cohort in addition to sepsis (SOFA-score ≥ 2 ; n=13) also to hospitalized patients with infection without sepsis (SOFA-score < 2 ; n=12). Both cohorts were assessed at two time points during the disease (t_1 : < 24 h; t_2 : day 5-7) by flow cytometry and PFA-200 and compared with a healthy control group (n=28).

Platelet phenotypic abnormalities during sepsis included: (i) altered expression of subunits of the GPIb-IX-V receptor complex, pointing to increased receptor shedding; (ii) a severe mepacrine loading deficit, indicating an increasingly reduced number of δ -granules along the infection-sepsis continuum; (iii) a reduction of terminally bound sialic acid, suggesting increased desialylation. Functional analysis of platelets in sepsis revealed a marked and generalized hyporeactivity toward multiple agonists when integrin $\alpha IIb\beta 3$ activation (PAC-1 binding) was measured by flow cytometry, which was already to a lesser extent present in patients with infection and discriminated well between infection and sepsis according to ROC analysis (AUC > 0.80 for all agonists). In contrast, platelets from septic patients showed normal to even accelerated aggregation when measured under flow condition and physiological shear forces by PFA-200.

Analysis of platelet reactivity by flow cytometry remains a promising biomarker for early sepsis detection, but a larger cohort is needed for further conclusions. In subsequent studies, mechanistic causes of the described alterations in platelet phenotype and function during infection and sepsis should be investigated, e.g. by means of co-incubation experiments.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Sepsis	1
1.1.1	Definition der Sepsis – eine fortwährende Herausforderung	1
1.1.2	Epidemiologie – Sepsis ist häufig, letal und ökonomisch relevant	3
1.1.3	Ätiologie und Pathophysiologie der Sepsis	4
1.1.3.1	Inflammation	4
1.1.3.2	Endotheliale Dysfunktion & Septische Koagulopathie	5
1.1.4	Symptome, Diagnostik und Therapie der Sepsis	5
1.2	Thrombozyten	7
1.2.1	Histologie	7
1.2.2	Lebenszyklus der Thrombozyten	10
1.2.3	Thrombozytenfunktionen	12
1.2.3.1	Hämostase	12
1.2.3.2	Immunantwort	13
1.2.3.3	Aufrechterhaltung der vaskulären Integrität	14
1.2.4	Thrombozytenreaktivität bei Sepsis	14
1.3	Zielsetzung der Arbeit	16
2	MATERIAL & METHODEN	17
2.1	Material	17
2.1.1	Reagenzien	17
2.1.2	Geräte und Zubehör	19
2.2	Methoden	19
2.2.1	Kohortenrekrutierung	19
2.2.2	Klinische Daten, Laborwerte und mikrobiologische Befunde	21
2.2.3	Sysmex-Hämatologieanalysator	21
2.2.4	Immunfluoreszenzfärbung und durchflusszytometrische Analyse	22
2.2.4.1	Expression membranständiger Proteine	22
2.2.4.2	Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate (PLAs)	23
2.2.4.3	Lektin-Assay	24
2.2.4.4	Analyse der δ -Granula mittels Mepacrin-Assay	25
2.2.4.5	Thrombozytenreaktivität nach Agonistenzugabe	26
2.2.5	Herstellung von Vollblutproben mit reduzierter Thrombozytenzahl	27
2.2.6	INNOVANCE® PFA-200	28
2.2.7	Statistische Analyse	29
3	ERGEBNISSE	30
3.1	Charakterisierung der Studienkohorten	30
3.1.1	Epidemiologie und Klinik	30
3.1.2	Blutbild, Laborchemie & SOFA-Score	32

3.2	Analyse des Thrombozytenphänotyps.....	34
3.2.1	Verringerte Thrombozytenzahlen und erhöhtes MPV bei Sepsis.....	34
3.2.2	Hinweise auf erhöhtes Rezeptoren- <i>Shedding</i> bei Sepsis.....	36
3.2.3	Analyse der Desialylierung von Thrombozyten.....	38
3.2.3.1	Etablierung des Lektin-Assays.....	38
3.2.3.2	Thrombozyten sind bei Sepsis vermehrt desialyliert	41
3.3	Analyse der Thrombozytenfunktion unter statischen Bedingungen	43
3.3.1	Thrombozyten entwickeln δ -Granula-Defekt bei Infektion und Sepsis.....	43
3.3.2	Bei Infektion und Sepsis aktivierte Thrombozyten zirkulieren nicht frei.....	45
3.3.3	Die Thrombozytenreaktivität (TR) ist bei Sepsis stärker beeinträchtigt als bei Infektion	46
3.3.3.1	Die TR als vielversprechender Biomarker zur Sepsis-Früherkennung.....	48
3.3.3.2	Die TR korreliert deutlich mit SOFA-Score, Mepacrin-Abgabe & CRP	50
3.4	Analyse der Thrombozytenfunktion unter Flussbedingungen	51
3.4.1	Thrombozytopenien führen zu verlängerter Verschlusszeit	52
3.4.2	Die Thrombozytenaggregation unter arteriellen Flussbedingungen ist bei Infektion und Sepsis normal bis beschleunigt.....	54
4	DISKUSSION.....	56
4.1	Sind Thrombozyten bei Sepsis nun hypo-, normo-, oder hyperreaktiv?	56
4.1.1	Durchflusszytometrie	56
4.1.2	Aggregometrie	57
4.1.3	PFA-200.....	58
4.1.4	Schlussfolgerung	59
4.2	Eignet sich die Messung der Thrombozytenreaktivität als Biomarker für Sepsis?	61
4.3	Sepsis-bedingte phänotypische Veränderungen der Thrombozyten	63
4.3.1	δ -Granula-Defekt.....	63
4.3.2	Rezeptor- <i>Shedding</i>	65
4.3.3	Desialylierung	65
4.4	Stärken und Limitationen der Arbeit	67
4.5	Ausblick & abschließende Bemerkungen	69
5	LITERATURVERZEICHNIS	72
6	APPENDIX.....	84
6.1	Tabelle 14: Mikrobiologische Erregernachweise und Antibiotikatherapien.....	84
6.2	Abbildung 21: Thrombozytenzahlen im Krankheitsverlauf	86
6.3	Abkürzungsverzeichnis	87
6.4	Abbildungsverzeichnis	90
6.5	Tabellenverzeichnis	90
6.6	Publikationsliste	91
6.7	Danksagungen	92
6.8	Lebenslauf.....	93
6.9	Eidesstattliche Erklärung / Affidavit	94

1 EINLEITUNG

Im Rahmen der vorliegenden Forschungsarbeit wurden Thrombozytenfunktion und -phänotyp bei Patient:innen mit Sepsis und Patient:innen mit Infektionserkrankung (aber keiner Sepsis) untersucht. Einleitend wird ein theoretischer Hintergrund zum Krankheitsbild Sepsis und zur Thrombozytenbiologie vermittelt, der auf die Forschungsfragestellungen und durchgeführten Untersuchungen hinleitet.

1.1 Sepsis

1.1.1 Definition der Sepsis – eine fortwährende Herausforderung

Die Sepsis ist eine schwere Komplikation von Infektionserkrankungen und ein medizinischer Notfall. Sie entsteht, wenn ein primär lokales Infektionsgeschehen lebensbedrohliche systemische Auswirkungen auf den Organismus hat. Dabei liegt die diagnostische Schwierigkeit in der präzisen und frühzeitigen Abgrenzung einer unkomplizierten Infektionserkrankung von einer Infektion mit septischem Verlauf. Dieser Schwierigkeit wurde in den vergangenen Jahrzehnten durch die Implementierung von Konsensdefinitionen durch internationale Expert:innenkommissionen begegnet, die auf Grundlage neuer epidemiologischer und pathobiologischer Erkenntnisse immer präzisere klinische Parameter ausfindig machen konnten, um eine Sepsis möglichst frühzeitig zu erkennen.

Die aktuelle Sepsis-3 Konsensdefinition für Erwachsene wurde 2016 publiziert und ist die zweite Revision der Sepsis-Kriterien. Nach dieser ist der Begriff Sepsis definiert als eine akut lebensbedrohliche Organfunktionsstörung, die Folge einer dysregulierten Immunantwort auf eine (mutmaßliche) Infektion ist [1]. Erstmals liegt damit der diagnostische Fokus bei der Sepsis auf Anzeichen einer Organfunktionsstörung und nicht mehr, wie zuvor, auf Zeichen einer systemischen Inflammationsreaktion (SIRS, *Systemic Inflammatory Response Syndrom*) [2, 3]. Ferner entfiel mit der Einführung der Sepsis-3-Kriterien die alte Definition der „Schweren Sepsis“, die durch die Erfüllung zweier SIRS-Kriterien und zusätzlich eines Kriteriums der Organfunktionsstörung definite war [3]. Auch der mikrobiologische Erregernachweis ist nach den aktuellen Sepsis-3-Kriterien für die Diagnosestellung nicht mehr zwingend erforderlich und bereits der klinische Verdacht einer vorliegenden Infektion ausreichend.

Die diagnoseentscheidende Organdysfunktion soll mittels des *Sequential Organ Failure Assessment* (SOFA)-Scores (Tabelle 1) bestimmt werden [1]. Der SOFA-Score ist ein etabliertes Instrument, das mit seinen klinischen und laborchemischen Parametern den Funktionszustand wichtiger Organsysteme abbildet und eine hohe prognostische Validität für

einen schweren Krankheitsverlauf mit erhöhter Mortalität besitzt [4]. Zur Berechnung des SOFA-Scores wird für jedes der sechs abgebildeten Organsysteme ein Score-Wert von 0 bis 4 Punkten ermittelt und diese sechs Werte anschließend addiert. Ein Anstieg des SOFA-Scores von mindestens 2 Punkten wird als positiv gewertet und die Diagnose Sepsis gestellt. Sind für einzelne Parameter keine Vorwerte bekannt, wird für die Berechnung dieser Parameter als Ausgangswert ein Score von 0 angenommen.

Tabelle 1: Sequential Organ Failure Assessment (SOFA)-Score.

FiO₂, Inspiratorische Sauerstoff-Fraktion; MAP, *mean arterial pressure*; PaO₂, Sauerstoff-Partialdruck.

SOFA (Sequential Organ Failure Assessment)-Score						
Organsystem	Parameter	Score				
		0	1	2	3	4
Atmung	PaO ₂ /FiO ₂	≥400	<400	<300	<200 +Beatmung	<100 +Beatmung
Koagulation	Thrombozytenzahl [nl]	>150	<150	<100	<50	<20
Leber	Bilirubin [mg/dl]	<1,2	1,2-1,9	2,0-5,9	6,0-11,9	>12
Herz-Kreislauf	Mittlerer arterieller Druck [mmHg] / Katecholamintherapie [µg/kg/min]	MAP >70	MAP <70	Dopamin <5	Dopamin 5-15 / (Nor)adrenalin ≤0,1	Dopamin >15 / (Nor)adrenalin >0,1
Zentrales Nervensystem	Glasgow-Coma-Scale	15	13-14	10-12	6-9	<6
Niere	Kreatinin [mg/dl]	<1,2	1,2-1,9	2,0-3,4	3,5-4,9	>5

Die Maximalvariante einer Sepsis ist der Septische Schock. Dieser ist definiert als das gleichzeitige Vorliegen einer erforderlichen Katecholamintherapie bei Hypotonie zur Aufrechterhaltung eines mittleren arteriellen Blutdrucks von ≥65mmHg trotz adäquater Volumentherapie und eines Serum-Laktats ≥2 mmol/L als Zeichen einer Gewebe-Hypoperfusion und resultierender metabolischer Dysfunktion.

Die Suche der Expert:innenkommission nach passenden klinischen und laborchemischen Parametern für die Sepsis-3-Definition erfolgte mittels systematischer Literaturdurchsicht [5] und retrospektiver empirischer Datenanalyse [6]. Bei Letzterer fokussierten sich die Expert:innen bei der Analyse großer klinischer Datensätze darauf, Konstellationen klinischer Parameter zu finden, die mit einem deutlich schlechteren klinischen Outcome von Infektionspatient:innen assoziiert waren, als primär zu erwarten gewesen wäre. Der SOFA-Score erwies sich dabei mit einer AUROC (*area under the receiver operating characteristic*) von 0.74 gegenüber den SIRS-Kriterien der Sepsis-2-Definition (AUROC 0.66) als überlegen

zur Vorhersage schwerer Krankheitsverläufe von Patient:innen mit Infektionserkrankungen mit erhöhter Mortalität. Singer et al. weisen dennoch explizit darauf hin, dass auch die aktuellen Diagnosekriterien zur Abgrenzung einer Sepsis von einer Infektion noch keinen diagnostischen Goldstandard darstellen und in künftigen Studien insbesondere nach neuen Biomarkern für eine frühzeitige und eindeutige Sepsis-Diagnosestellung gesucht werden sollte.

Neuere Publikationen aus den letzten Jahren versuchen, das heterogene Syndrom Sepsis durch die Bestimmung von Sepsis-Subtypen differenzierter zu betrachten. Dabei konnten z.B. Seymour et al. im Rahmen retrospektiver Analysen klinischer Daten unter Zuhilfenahme Maschinellen Lernens vier Sepsis-Phänotypen (α , β , γ und δ) identifizieren und validieren [7]. Diese zeichnen sich u.a. durch distinkte Muster pathologischer Parameter und unterschiedliche Mortalitätsraten aus und könnten zukünftig ein passgenaueres therapeutisches Vorgehen ermöglichen.

1.1.2 Epidemiologie – Sepsis ist häufig, letal und ökonomisch relevant

Sepsis ist ein häufiges Krankheitsbild. Nach Schätzungen der *Global-Burden-of-Disease-Study* erkrankten weltweit jährlich circa 49 Millionen Menschen an einer Sepsis, wovon etwa 11 Millionen Menschen an deren Folgen versterben [8]. Dies entspricht circa 20% aller globalen Todesfälle. Obwohl die Inzidenz von Sepsis zwischen den Jahren 1990 und 2017 um knapp 20% gesunken ist, bleibt die Sepsis damit weltweit eine der führenden Todesursachen.

Einer Metastudie aus dem Jahr 2021 nach betrug die 30-Tages-Mortalität in Deutschland für Sepsis 26,5% und für Septischen Schock 30,5% [9]. Für Nordamerika und das restliche Europa zeigten sich etwas niedrigere Mortalitätsraten. Konträr zum globalen Trend sinkender Sepsis-Fallzahlen steigt die Inzidenz von Sepsis in den Vereinigten Staaten weiter an [10, 11]. Mögliche Ursachen hierfür sind die alternde Population und eine zunehmende Anzahl an Komorbiditäten. Das mittlere Lebensalter der in Deutschland an einer Sepsis verstorbenen Patient:innen lag bei 76 Jahren. Etwa 41% davon waren weiblich. Der häufigste Infektionsfokus von an Sepsis Verstorbenen waren die Atemwege (52,5%), gefolgt vom Urogenitalsystem (24,3%) [12]. Wichtige Risikofaktoren für das Entwickeln einer Sepsis im Erwachsenenalter sind ein hohes Lebensalter, männliches Geschlecht und das Vorliegen einer Immundefizienz [13].

Die Behandlung des Krankheitsbilds Sepsis hat weitreichende gesundheitsökonomische Relevanz, da es in den Industrienationen das Krankheitsbild mit den höchsten verursachten Krankenhauskosten ist. Allein im Jahr 2017 ließen sich mit knapp 40 Milliarden Dollar 8,8% der aggregierten US-Krankenhauskosten auf Sepsis-assoziierte Behandlungen zurückverfolgen [14]. Wichtige Gründe hierfür sind überdurchschnittlich lange Klinikaufhalte

und die häufige Notwendigkeit einer intensivmedizinischen Behandlung. Mit einem Anteil von 11% aller Einweisungen auf eine Intensivstation ist Sepsis der meistdokumentierte Grund für eine intensivmedizinische Behandlung in einkommensstarken Ländern [15].

1.1.3 Ätiologie und Pathophysiologie der Sepsis

Der häufigste Auslöser einer Sepsis ist eine bakterielle Infektion, wobei die geläufigsten Bakterienstämme *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas spp.* und *Escherichia coli* sind [16, 17]. Aber auch Viren und in seltenen Fällen Pilze und Parasiten können eine Sepsis verursachen. Die Sepsis ist ein klinisch und biochemisch komplexes Syndrom mit noch unvollständig geklärter Pathophysiologie. Nach dem aktuellen Stand der Forschung werden drei Hauptsäulen in der Pathophysiologie der Sepsis unterschieden: Inflammation, endotheliale Dysfunktion und septische Koagulopathie. Daraus resultieren Störungen der Mikro- und Makrozirkulation, die zu einer potenziell reversiblen Organdysfunktion führen [18].

1.1.3.1 Inflammation

Invasive Mikroorganismen und ihre Zellbestandteile stellen sog. *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs) dar, die von Mustererkennungsrezeptoren (*Pattern Recognition Receptors*; PRRs) wie z.B. Toll-like-Rezeptoren (TLR) auf immunkompetenten Zellen als fremd erkannt werden und eine Entzündungsreaktion auslösen [19]. Im Rahmen des Infektionsgeschehens freigesetzte intrazelluläre Bestandteile geschädigter Wirtszellen, sog. *Damage-Associated Molecular Patterns* (DAMPs), werden ebenfalls von PRRs erkannt [20, 21]. PRRs aktivieren Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B [22], wodurch die Transkription von Genen induziert oder supprimiert wird und in der Folge Entzündungsmediatoren wie Interleukin (IL)-1 oder Tumornekrosefaktor- α von Immunzellen freigesetzt werden. Diese locken weitere zirkulierende Immunzellen wie Monozyten und Neutrophile zum Infektionsgeschehen [23] und führen u.a. zur Produktion von Akute-Phase-Proteinen wie C-reaktives Protein (CRP) und Fibrinogen in der Leber [24].

Die Entzündungsreaktion wird durch ein Nebeneinander von pro-inflammatorischen und anti-inflammatorischen Mediatoren gesteuert, mit dem Ziel, eine Reaktion auszulösen, die stark genug ist, um Krankheitserreger zu eliminieren und gleichzeitig örtlich begrenzt bleibt, um kollaterale Gewebeschäden zu minimieren [23]. Tendenziell gehen Patient:innen von einem anfänglich überwiegend pro-inflammatorischen Zustand im Krankheitsverlauf in einen entzündungshemmenden immunsuppressiven Zustand über [25, 26]. Gelingt dem Organismus die Aufrechterhaltung dieser Balance zwischen pro- und anti-inflammatorischen Mediatoren, bleibt es bei einer funktionalen, temporären und lokal begrenzten Entzündungsreaktion. Aus noch unzureichend verstandenen Gründen kommt es bei der

Sepsis zu einer Dysregulation und systemischen Ausbreitung proinflammatorischer Mechanismen. Mögliche Ursachen sind der Abfluss von Zytokinen und anderen Mediatoren, sowie Bakterien oder anderen Erregern vom Infektionsherd über Blut und Lymphe hin zu den Kapillaren zuvor nicht betroffener Organe [27]. Maßgeblich verantwortlich für die klinische Symptomatik der Sepsis ist die körpereigene Immunreaktion auf die Mikroorganismen und nicht die Erreger selbst.

1.1.3.2 Endotheliale Dysfunktion & Septische Koagulopathie

Auch das Endothel wird durch zirkulierende Entzündungsmediatoren aktiviert, was zu einer vermehrten Exposition von Adhäsionsmolekülen für Immunzellen führt und eine Erweiterung der *Gap Junctions* zwischen den Endothelzellen zur Folge hat [28]. Als wichtiger Mediator dieses Prozesses wurde die Aktivierung von endotheliale PAR1 (*Protease-activated receptor 1*) durch Thrombin identifiziert [29]. Plasma und Leukozyten gelangen dadurch vermehrt aus dem Gefäßsystem ins Gewebe. Eine mögliche Folge der systemischen Endothelaktivierung und -schädigung ist das *capillary leak syndrom*. Dabei kommt es durch den übermäßigen Austritt von Blutplasma ins Gewebe zur arteriellen Hypotonie, generalisierten Ödemen und mikrovaskulärer Hypoperfusion [30].

Die Endothelaktivierung am Ort der Inflammation führt außerdem zur vermehrten Freisetzung thrombozytenaktivierender Mediatoren wie des von-Willebrand-Faktors und Thromboxanen. Durch eine Endothelschädigung im Rahmen der Entzündungsreaktion wird zusätzlich *tissue factor* freigesetzt und folglich die Aggregation von Thrombozyten, sowie die Gerinnungskaskade initiiert [27]. Es kommt zum Prozess der sog. Immunothrombose, bei dem es durch ein komplexes Zusammenspiel u.a. von Neutrophilen, Thrombozyten, Gerinnungskaskade, Komplementsystem und Zytokinen zur Bildung mikrovaskulärer Thromben kommt, die eine systemische Ausbreitung des Erregers über den Blutstrom verhindern können [31]. Während die Immunothrombose bei lokalen Entzündungsgeschehen den Organismus schützt, tragen die zugrunde liegenden Mechanismen bei Sepsis potenziell zu einer disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC), einer erhöhten Inzidenz von Thrombembolien [32], Gewebeischämie und letztlich Multiorganversagen bei. Durch den massiven Verbrauch von Thrombozyten und Gerinnungsfaktoren kann es simultan zum thrombotischen Geschehen auch zu schweren Blutungen kommen.

1.1.4 Symptome, Diagnostik und Therapie der Sepsis

Die Sepsis hat kein pathognomonisches Leitsymptom und auch laborchemisch steht bislang kein diagnostischer Goldstandard zur Verfügung. Entscheidend für die Erkennung einer Sepsis ist deshalb die Zusammenschau klinischer und gegebenenfalls laborchemischer,

mikrobiologischer und radiologischer Befunde. Die klinische Präsentation ist sehr variabel und richtet sich vor allem initial stark nach dem Ort des Infektionsgeschehens. Begleitend können unspezifische Symptome wie Tachykardie, arterielle Hypotonie, verändertes Bewusstsein, verminderter Allgemeinzustand, Hyper-/Hypothermie, generalisierte Ödeme und Oligurie auftreten [33].

Seit Einführung der Sepsis-3-Definition ist das zentrale Diagnosekriterium der Sepsis ein positiver SOFA-Score (Tabelle 1) als Zeichen einer Organdysfunktion bei gleichzeitig bestehendem Verdacht einer Infektion. Die diagnostischen Maßnahmen bei Verdacht auf Sepsis beruhen außerdem auf folgenden drei Bereichen: (1) Zur mikrobiologischen Diagnostik sollte vor Beginn einer Antibiotikatherapie adäquates Probenmaterial wie z.B. Blutkulturen gesichert werden. Bei erfolgreicher Erregerbestimmung kann die Antibiotikatherapie im Behandlungsverlauf angepasst werden. (2) Zur Identifizierung des Infektionsfokus kommen zusätzlich zur körperlichen Untersuchung und Anamnese auch bildgebende Verfahren zur Anwendung. (3) Mit Hilfe der Labordiagnostik können im Blut Entzündungsmarker wie CRP und Procalcitonin (PCT), das Serum-Laktat und Labormarker zur Beurteilung wichtiger Organfunktionen bestimmt werden [34].

Bereits der Verdacht auf das Vorliegen einer Sepsis stellt immer einen medizinischen Notfall dar [33]. Parallel zur Diagnostik sollten deshalb unverzüglich therapeutische Maßnahmen eingeleitet werden. Bis heute existiert keine spezifische Therapie für Sepsis. Deren leitliniengerechte Behandlung beruht auf folgenden drei gleichermaßen wichtigen Bereichen: (i) Zur Kontrolle des Infektionsgeschehens sollte innerhalb der ersten Stunde nach Verdacht auf Sepsis eine kalkulierte Breitspektrum-Antibiotikatherapie gestartet werden [35], sowie ggf. eine zeitnahe interventionelle Fokussanierung (z.B. bei Abszessen) durchgeführt werden. Seymour et al. konnten im Rahmen einer Multicenter-Studie zeigen, dass die verstrichene Zeit bis zum Beginn einer Antibiotikatherapie essenzieller Prädiktor für das Überleben bei Sepsis ist. Patient:innen, die Antibiotika frühestens 3 Stunden und weniger als 12 Stunden nach Stellung der Verdachtsdiagnose Sepsis erhielten, wiesen im Vergleich zu Patient:innen, die Antibiotika innerhalb von 3 Stunden verabreicht bekamen, eine um 14% erhöhte Mortalität auf [36]. (ii) Zur hämodynamischen Stabilisierung wird bei Zeichen einer Hypoperfusion eine initiale Volumentherapie mit Kristalloiden empfohlen. Bei persistierender hämodynamischer Instabilität kommen vasoaktive Medikamente zur Anwendung, wobei Noradrenalin die erste Wahl darstellt [35]. (iii) Die bedarfsgerechte supportive Therapie umfasst u.a. Beatmungs- und Sauerstofftherapie, Blutzucker-Management, Thrombose- und Stressulkusprophylaxe, Ernährungstherapie und Nierenersatzverfahren [33, 34].

1.2 Thrombozyten

Thrombozyten sind die Schlüsselzellen der primären Hämostase. Zunehmend werden sie außerdem als wichtige Akteure bei der Inflammation und antimikrobielle Wirtsabwehr [37], sowie der Aufrechterhaltung der vaskulären Integrität erkannt [38]. Damit sind sie von zentraler Bedeutung für das pathophysiologische Verständnis der Sepsis. Im Folgenden werden relevante Informationen zur Biologie der Thrombozyten erläutert und die Studienlage zur Untersuchung der Thrombozytenreaktivität bei Sepsis vorgestellt.

1.2.1 Histologie

Thrombozyten (engl. *platelets*) sind mit einem Durchmesser von 1-4 μm und einer Dicke von 0,5 μm die kleinsten Zellen im menschlichen Blut [39, 40]. Sie haben im Ruhezustand eine bikonvexe Form und bilden nach Aktivierung Pseudopodien aus (Abbildung 1A/B). Thrombozyten besitzen keinen Zellkern und sind folglich nur noch in begrenztem Maße zur Proteinbiosynthese fähig. Physiologisch liegt die Thrombozytenzahl beim Menschen zwischen 150 und 400 Thrombozyten pro Nanoliter Vollblut. Liegt die Thrombozytenzahl im Blut unter 150 nl^{-1} , ist dies definiert als Thrombozytopenie. Übersteigt die Thrombozytenzahl im Blut 400 nl^{-1} , spricht man von einer Thrombozytose.

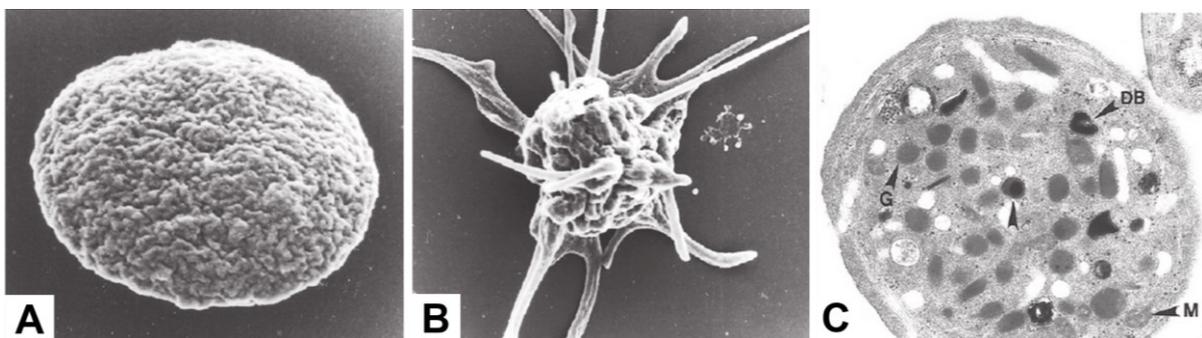


Abbildung 1: Thrombozytenmorphologie im Ruhezustand und nach Aktivierung.

(A) Ruhender Thrombozyt in bikonvexer Form; 30.000-fache Vergrößerung. (B) Aktivierter Thrombozyt nach Ausbildung von Pseudopodien; 13.000-fache Vergrößerung. (A,B) Rasterelektronenmikroskopie. (C) Wichtige histologische Strukturen von Thrombozyten sind α -Granula (G), δ -Granula (DB) und Mitochondrien (M); 25.000-fache Vergrößerung; Transmissionselektronenmikroskopie. Quelle der Abbildungen (modifiziert): Thomas, SG. (2019), *Platelets* (4th Edition), S. 48/58 [41].

Die Plasmamembran der Thrombozyten besitzt im Vergleich zu anderen Blutzellen eine besonders dicke Glykosylierung der membranständigen Proteine [42]. Diese Glykoproteine sind essenziell für die Thrombozytenaktivierung, -adhäsion und -aggregation. Die beiden am zahlreichsten exprimierten Oberflächenstrukturen sind der Rezeptorkomplex Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ mit circa 83.000 Kopien pro Thrombozyt [43] und der von Willebrand Faktor (vWF)-Rezeptorkomplex GPIb-IX-V mit circa 25.000 Kopien [44]. Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ ist der wichtigste Fibrinogenrezeptor auf Thrombozyten und erkennt neben Fibrinogen auch vWF, Fibronektin

und Vitronektin [45]. Der GPIb-IX-V-Komplex bindet über das Adapterprotein vWF, das vom Endothel und aktivierten Thrombozyten sezerniert wird, indirekt Kollagen. Der Hauptteil des Rezeptors ist ein Heterodimer, bestehend aus zwei Polypeptidketten - einer Alpha-Kette (GPIb α) und einer Beta-Kette (GPIb β) - die durch Disulfidbindungen kovalent miteinander verbunden sind. Die GPIb α -Untereinheit stellt die vWF-Bindungsstelle bereit und die GPIb β -Untereinheit ist durch die Phosphorylierung seiner intrazellulären Domäne an der transmembranen Signalübertragung beteiligt [46]. GPVI ist mit circa 9.600 Kopien pro Thrombozyt ebenfalls in großer Anzahl auf der Zelloberfläche aufzufinden, stellt den wichtigsten Kollagenrezeptor auf Thrombozyten dar und gehört zur Immunoglobulin-Superfamilie der Rezeptoren. GPVI liegt in einem Komplex mit der FcR- γ -Kette vor, der auf Thrombozyten in monomerer und dimerer Form exprimiert wird. Während die monomere Form vor allem auf nicht aktivierten Thrombozyten zu finden ist und ihre Affinität für Kollagen in physiologischen Konzentrationen gering ist, zeigt die auf aktivierten Thrombozyten dominante dimere Form eine hohe Affinität zu den Kollagenen Typ I und III [47]. Tabelle 2 gibt einen Überblick über wichtige Oberflächenrezeptoren von Thrombozyten.

Teile der Thrombozyten-Plasmamembran stülpen sich in tubulärer Form ins Zellinnere ein und bilden das Offene Kanalikuläre System (*open canalicular system*; OCS). Bei der Aktivierung von Thrombozyten fungiert dieses als Weg für die Freisetzung der löslichen Granulainhalte [48], sowie als Plasmamembranreserve, da sich die Thrombozytenoberfläche bei der Ausbildung von Pseudopodien mehr als vervierfacht [49, 50]. Der submembrane Bereich der Thrombozyten enthält ein ausgeprägtes Netzwerk von Aktinfilamenten, welches das kontraktile Zytoskelett der Plasmamembran darstellt und im Zusammenspiel mit Myosin aktivierten Thrombozyten die Fähigkeit zur Kontraktilität und Ausbildung von Pseudopodien verleiht. Wichtige Zellorganellen für die speziellen Funktionen von Thrombozyten sind α -Granula und δ -Granula (Abbildung 1C). Darüber hinaus enthalten Thrombozyten Lysosomen, Mitochondrien und Glykosome [51]. α -Granula sind die größten und mit bis zu 80 Granula pro Thrombozyt die am häufigsten vertretenen Zellorganellen [52]. Sie enthalten sowohl membranständige Proteine wie Integrin α IIb β 3 und P-Selektin [53], als auch über 300 unterschiedliche lösliche Proteine wie Adhäsionsproteine (z.B. vWF, Fibrinogen), Koagulanzen und Antikoagulanzen (z.B. Gerinnungsfaktoren, Antithrombin, Protein S), Chemokine (z.B. Plättchenfaktor 4, Interleukin-8), Wachstumsfaktoren, mikrobizide Proteine und Immunmediatoren [54]. Die meisten der Granulamembran-gebundenen Proteine sind bereits auf der Oberfläche ruhender Thrombozyten vorhanden, P-Selektin jedoch wird ausschließlich nach Aktivierung und Exozytose von α -Granula auf der Oberfläche von Thrombozyten exprimiert.

Tabelle 2: Wichtige Thrombozytenrezeptore

Die Tabelle zeigt für eine Auswahl funktional wichtiger Oberflächenrezeptor(komplex)en Untereinheiten, Anzahl der Kopien pro Thrombozyt, wichtige Liganden und eine vereinfachte Darstellung ihrer Funktion. Die Auflistung ist inhaltlich angelehnt an Giannini et al. [55]. GP, Glykoprotein; CLEC-2, *C-type lectin-2*; PAR, *Protease-activated receptor*; TXA2-R, Thromboxan A2-Rezeptor; CD, *cluster of differentiation*; vWF, von-Willebrand-Faktor; PSGL-1, *P-selectin glycoprotein ligand-1*; ADP, Adenosindiphosphat.

Wichtige Thrombozytenrezeptoren					
Rezeptor (komplex)	Bestandteil	Synonyme	Kopien pro Thrombozyt	Liganden	Funktion
GPIb-IX-V	GPIbA	CD42b	~25.000 [43]	vWF	Adhäsion, Aktivierung
	GPIbB	CD42c			
	GPIX	CD42a			
	GPV	CD42d			
GPIIb/IIIa	GPIIb	CD41; Integrin α IIb	~83.000 [56]	Fibrinogen (vWF, Vitronectin, Fibronectin)	Adhäsion, Aggregation
	GPIIIa	CD61; Integrin β 3			
GPVI	GPVI	-	~9.600 [56]	Kollagen Typ I & III (Laminin, Fibrinogen, Fibrin)	Adhäsion, Aktivierung
GPIa/IIa	GPIa	CD49; Integrin α 2	4.600 [56]	Kollagen	Adhäsion
	GPIIa	CD29; Integrin β -1			
P-Selektin	-	CD62P	~8.900 [56]	PSGL-1	Adhäsion
CLEC-2	-	-	~3.700 [56]	Podoplanin	Aktivierung
PAR1	-	-	550 – 2000 [57]	Thrombin	Aktivierung
PAR4	-	-	~540 [58]		
P2Y ₁	-	-	~135 [59]	ADP	Aktivierung
P2Y ₁₂	-	-	~425 [60]		
TXA2-R	-	-	n/v	Thromboxan A2	Aktivierung

δ -Granula sind mit 3 bis 9 Granula pro Thrombozyt in geringerer Anzahl vertreten als α -Granula und werden aufgrund ihrer elektronendichten Darstellung auch synonym als dichte Granula bezeichnet [61]. Ursächlich dafür ist die in δ -Granula enthaltene hohe Konzentrationen von Calcium. Weitere δ -Granulainhalte sind Adenosindiphosphat (ADP), Adenosintriphosphat (ATP) und Polyphosphate, sowie 90% des im Körper - außerhalb des ZNS - vorhanden Serotonins [54, 62]. Auch membrangebundenes CD63 findet sich in δ -Granula [63].

1.2.2 Lebenszyklus der Thrombozyten

Bei einer durchschnittlichen Zirkulationsdauer von 5-12 Tagen müssen täglich etwa 100 Milliarden gealterte Thrombozyten von unserem Organismus abgebaut und zur Erhaltung der Homöostase durch neue ersetzt werden [64]. Zur Vermeidung spontaner Blutungsereignisse bei Thrombozytopenie oder Thrombusformation bei Thrombozytose müssen Thrombozytenproduktion und -abbau aufeinander abgestimmt werden. Die Steuerung der Thrombozytenzahl im Blut unterliegt dabei komplexen und noch nicht vollständig verstandenen Mechanismen.

Thrombozyten entstehen durch Abschnürung von Ausläufern der Megakaryozyten im Knochenmark nach Stimulation durch den Wachstumsfaktors Thrombopoietin (TPO) [65]. Neu gebildete Thrombozyten haben typischerweise ein größeres MPV als ältere Thrombozyten [66]. Mit zunehmender Zirkulationsdauer wird im Rahmen der physiologischen Zellalterung auf der Thrombozytenoberfläche an Glykane gebundene endständige Sialinsäure abgebaut. Als Glykane werden in diesem Kontext der Kohlenhydratanteil von Glykoproteinen, Glykolipiden oder Proteoglykanen bezeichnet. Der Abbau von Sialinsäure geschieht physiologisch überwiegend mittels Hochregulation der endogener Neuraminidasen Neu1 und Neu3, die u.a. auf der Plasmamembran der Thrombozyten exprimiert werden [67], oder pathophysiologisch z.B. durch das Einwirken bakterieller Neuraminidasen. GPIb ist das am stärksten glykosylierte Oberflächenantigen auf Thrombozyten [68] und trägt bis zu 80% der auf Thrombozyten gebundenen Sialinsäure [69].

Durch den Abbau von Sialinsäure wird zunehmend darunterliegende Galaktose auf der Thrombozytenoberfläche exponiert. Gealterte Thrombozyten werden anschließend durch den auf Hepatozyten und Kupffer-Zellen lokalisierten Ashwell-Morell Rezeptor [70, 71] über freiliegende endständige Galaktose oder N-Acetylglucosamin gebunden [72] und anschließen phagozytiert (Abbildung 2). Der AMR ist ein transmembranöser Glykoproteinkomplex, der zur Gruppe der C-Typ Lektine (CLEC) zählt. Durch die Bindung desialylierter Thrombozyten kommt es zur Auslösung der JAK2-STAT3-Signalkaskade und konsekutiv zur Produktion und Sekretion von TPO, das mittels Mpl-Rezeptorbindung auf Megakaryozyten [71] und Hämatopoetischen Stammzellen [73] im Knochenmark die Thrombopoese induziert und den Feedback-Kreislauf schließt. Interessanterweise konnten Wang et al. zeigen, dass die Injektion bakterieller Neuraminidasen von *Arthrobacter ureafaciens* und *Streptococcus pneumoniae* in Mäusen zur Entfernung der Sialinsäure von O-Glykanen auf GPIb α führt. Dies bewirkt die Entfaltung der mechanosensorischen Domäne (MSD) von GPIb α , was die GPIb-IX-Signalübertragung aktivierte und darüber die Oberflächenexpression der endogenen Neuraminidase Neu1 induzierte. Neu1 schließlich verursacht die Freilegung von β -Galaktose auf N-Glykanen, die u.a. vom AMR erkannt wurden [74].

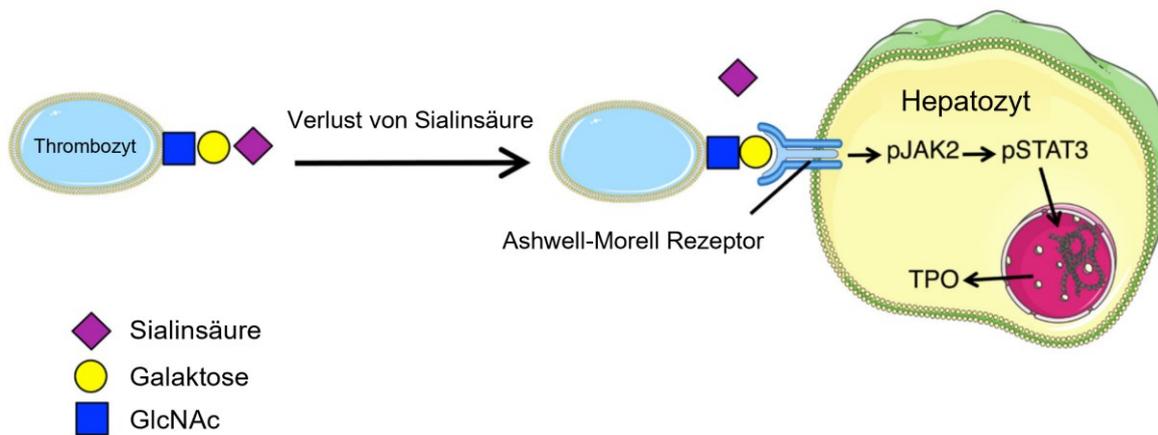


Abbildung 2: Thrombozytenglykom und seine Rolle bei der Steuerung der Thrombozytenzahl. Gealterte Thrombozyten verlieren zunehmend endständige Sialinsäure. Der hepatische Ashwell-Morell Rezeptor erkennt und bindet desialylierte Thrombozyten über freiliegende Galaktose oder N-Acetylglucosamin. Die Bindung über Galaktose führt in Hepatozyten mittels Aktivierung der Tyrosinkinase JAK2 und Rekrutierung des Transkriptionsfaktors STAT3 zu TPO mRNA-Produktion und folglich zur Synthese und Sekretion von TPO. GlcNAc, N-Acetylglucosamin. Quelle der Abbildung (modifiziert): Li et al. (2016), Seite 13 [69].

Studienergebnisse deuteten darauf hin, dass neben dem AMR weitere Rezeptoren an der Bindung und Entfernung desialylierter Thrombozyten beteiligt sind [72, 75]. Mit Hilfe der intravitalen *Spinning-Disk*-Mikroskopie beobachteten Deppermann et al. bei gesunden Mäusen eine rasche Anhäufung desialylierter Thrombozyten fast ausschließlich auf Kupferzellen [76]. Kupfer-Zellen sind die größte Population von Makrophagen des Organismus und befinden sich im Gefäßraum der Leber fest mit den Sinusoiden verbunden [77]. Als vermittelnden Rezeptor zwischen Kupfer-Zellen und Thrombozyten konnten sie das *macrophage galactose-type lectin* (MGL) identifizieren, ein C-Typ-Lektin, das wie der AMR an Glykoproteine bindet, die terminale N-Acetylglucosamin- oder Galaktosereste exprimieren. Die experimentelle Entfernung der Kupfer-Zellen führte zu einer drastischen Erhöhung der Anzahl zirkulierender desialylierter Thrombozyten. Die Kombination von AMR-Mangel und Blockierung von MGL führte zu einer fast vollständigen Aufhebung der Adhäsion von desialylierten Thrombozyten an Kupfer-Zellen und durch die Anhäufung gealterter dysfunktionaler Thrombozyten zu einer verstärkten Blutungsneigung [76].

Unter inflammatorischen Bedingungen kommt es zum Prozess der reaktiven Thrombopoese. Dabei stimuliert freigesetztes IL-6 die hepatische Produktion und Sekretion von TPO, das wiederum die Thrombopoese im Knochenmark erhöht [78]. Die Bindung von IL-6 an seinen hepatischen Rezeptor setzt dabei über die Phosphorylierung von STAT3 eine ähnliche Signalkaskade in Gang, wie die Bindung desialylierter Thrombozyten an den AMR [64]. Akute Infektionen können daher mit einer sich rasch entwickelnden Thrombozytose einhergehen. Klinisch zeigt sich allerdings gerade bei Sepsis häufig eine Thrombozytopenie. Etwa 50 % aller Thrombozytopenien auf Intensivstationen sind auf eine Sepsis zurückzuführen [79].

1.2.3 Thrombozytenfunktionen

Thrombozyten sind funktionell maßgeblich an der Hämostase, angeborenen Immunantwort und Aufrechterhaltung der vaskulären Integrität beteiligt.

1.2.3.1 Hämostase

Die Endothelzellen der Blutgefäße wirken unter physiologischen Flussbedingungen über Mechanismen wie die Freisetzung von Prostaglandin I₂ und Stickstoffmonoxid kontinuierlich inhibierend auf die Thrombozytenaktivierung [80]. Kommt es zu einer Endothelverletzung, werden Kollagene und *Tissue Factor* als Komponenten der subendothelialen extrazellulären Matrix (EZM) exponiert. vWF wird an freiliegenden Kollagenfasern immobilisiert und dient als Adapterprotein, an das Thrombozyten über den Rezeptorkomplex GPIb-IX-V binden können [81]. Die entstehenden Bindungen sind zu schwach für eine dauerhafte Adhäsion oder vollständige Thrombozytenaktivierung, führen aber zu einem verlangsamten Rollen der Thrombozyten entlang der EZM und ermöglichen dadurch die bei hohen Scherraten unwahrscheinliche Bindung von Integrin $\alpha 2\beta 1$ und GPVI an Kollagenfasern. GPVI ist der dominante Kollagenrezeptor auf Thrombozyten. Seine Bindung führt zu einer stabilen Adhäsion und induziert außerdem die Thrombozytenaktivierung über eine Signalkaskade, die u.a. in einem Anstieg des zytosolischen Ca²⁺-Spiegels und der Aktivierung der Phospholipase Cy2 gipfelt [82, 83]. Die Thrombozytenaktivierung kann außerdem über CLEC-2 und zahlreiche G-Protein-gekoppelte Rezeptoren erfolgen (Tabelle 2).

Mit der Thrombozytenaktivierung werden simultan zahlreiche Prozesse initiiert: (i) α - und δ -Granula sammeln sich überwiegend im Zellzentrum und fusionieren infolge des intrazellulären Ca²⁺-Anstiegs mit dem OCS und der äußeren Plasmamembran. Membranständige Granula-Proteine wie Integrin $\alpha 11\beta 3$, GPIb-IX-V, GPVI und P-Selektin werden dadurch auf die Thrombozytenoberfläche verlagert und lösliche Substanzen wie ADP und Serotonin nach extrazellulär freigesetzt [84]. (ii) Der Thrombozytenagonist Thromboxan A2 (TxA2) wird Cyclooxygenase-1-abhängig aus Arachidonsäure synthetisiert und freigesetzt. (iii) Integrin $\alpha 11\beta 3$ durchläuft eine Konformationsänderung, die die Bindungsstelle für Fibrinogen, vWF, Fibronectin und Vitronectin freilegt, und damit den wichtigsten Fibrinogen-Rezeptor von einem niedrig-affinen Zustand in einen Zustand hoher Affinität für genannte Liganden versetzt [82]. Dadurch wird über das Brückenprotein Fibrinogen eine stabile Vernetzung zwischen Thrombozyten, sowie zwischen diesen und freiliegender EZM ermöglicht. Dieser Prozess ist essenziell für die Aggregation [45]. Gebundenes Integrin $\alpha 11\beta 3$ wiederum führt zur *Outside-In*-Signalübertragung, was beispielweise zu Umlagerungen des Zytoskeletts führt [85]. (iv) Mit der Thrombozytenaktivierung kommt es zur Reorganisation des Zytoskeletts und zur Ausbildung von Pseudopodien. Dies führt zu einer ausgeprägten Vergrößerung der Oberflächenausdehnung.

Parallel zu den beschriebenen Prozessen aktiviert der bei der Gefäßverletzung freigesetzte *Tissue Factor* den extrinsischen Weg der Gerinnungskaskade und führt so zur Bildung von Thrombin. Thrombin, ADP, TxA₂, sowie weitere freigesetzte Mediatoren binden an ihre spezifische Thrombozytenrezeptoren (Tabelle 2) und verstärken als autokrin und parakrin wirkende Agonisten die Thrombozytenrekrutierung [86, 87]. Thrombin ist außerdem durch die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin entscheidend an der Thrombuskonsolidierung beteiligt [88]. Das Ergebnis ist die Bildung eines Gefäßpfropfs an der Stelle der Endothelverletzung, der die Gefäßintegrität wiederherstellt.

1.2.3.2 Immunantwort

Thrombozyten spielen im Rahmen der Immunreaktion bei Infektionen und Sepsis eine wichtige Rolle. Erste Beschreibungen, dass Thrombozyten mit Bakterien interagieren und Aggregate um *Vibrio cholerae* bilden, gehen bereits auf das Jahr 1901 zurück [89]. Heute wissen wir, dass Thrombozyten über Oberflächenrezeptoren wie TLRs, GPIb, GPVI und Integrin α IIb β 3 Krankheitserreger aus allen wichtigen Klassen von Mikroorganismen erkennen und binden können [90-93]. Derartige Interaktionen zwischen Thrombozyten und Bakterien führen zur Aktivierung der Thrombozyten, Granulafreisetzung und in der Folge zur Sezernierung einer breiten Palette von Peptiden wie Zytokinen, Entzündungsmediatoren und antimikrobielle Peptide [94], sowie zur Oberflächenexposition von Liganden [95]. Dadurch sind Thrombozyten an der Initiation, Ausbreitung und Eingrenzung der Entzündungsreaktion durch die direkte Eliminierung von Erregern [96], Rekrutierung von Leukozyten [97] und die Auslösung der Akute-Phase-Reaktion beteiligt [98]. Sie können daher als Teil des angeborenen Immunsystems verstanden werden.

Exponiertes P-Selektin ermöglicht es aktivierten Thrombozyten über P-Selektin-Glykoprotein-Liganden-1 (PSGL1) an aktiviertes Endothel und Leukozyten zu binden und unterstützt damit die Rekrutierung zirkulierender Monozyten und Neutrophilen am Ort der Inflammation [99]. Über den gleichen Mechanismus kommt es zur Bildung zirkulierender Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate (*platelet-leukocyte-aggregats*; PLAs) [100]. Thrombozyten sind außerdem durch die Bindung von PAMPs an ihren TLR4-Rezeptor und die nachfolgende Aktivierung von Neutrophilen an der Bildung von neutrophilen extrazellulären Fallen (*neutrophile extracellular traps*; NETs) beteiligt [101]. NETs sind extrazelluläre Fasernetze, bestehend aus großen Mengen ausgestoßenen Chromatins und sezernierten Proteinen wie z.B. Myeloperoxidase, die zur Immobilisierung und Abtötung von Bakterien im Rahmen einer Sepsis führen [102], aber auch zum pathologischen Verschluss von Gefäßen führen können [103].

1.2.3.3 Aufrechterhaltung der vaskulären Integrität

Thrombozyten sind insbesondere während eines inflammatorischen Geschehens entscheidend an der Aufrechterhaltung der vaskulären Integrität beteiligt. Dies geschieht durch einen Prozess, der sich von der klassischen primären Hämostase unterscheidet und organspezifisch ablaufen scheint [38, 104]. Experimentell zeigte sich, dass eine lokal induzierte Entzündung z.B. in der Haut oder Lunge von Mäusen mit ausgeprägter Thrombozytopenie zu massiven Blutungen am Ort der Inflammation führte, nicht aber bei Mäusen mit physiologischen Thrombozytenzahlen [105]. Mechanistisch ursächlich für die Destabilisierung der Endothelbarriere am Ort der Inflammation scheint die Eröffnung endothelialer Verbindungen durch die Dephosphorylierung von VE-Cadherin im Rahmen der neutrophilen Diapedese zu sein [70]. Dabei freigelegtes Kollagen wird GPVI-abhängig von Thrombozyten gebunden und der Endotheldefekt repariert [106]. Experimentell konnte gezeigt werden, dass CLEC-2 in Abwesenheit von GPVI durch die Bindung an Podoplanin-exprimierende Zellen ebenfalls zur Begrenzung von Blutungen in der entzündeten Haut führt [107, 108] und erst die simultane Abwesenheit von GPVI und CLEC-2 Blutungsereignissen hervorruft. Dem liegt zugrunde, dass der CLEC-2-Ligand Podoplanin auf Makrophagen und anderen extravaskulären Zellen während einer Hautentzündung hochreguliert wird. Diese Ergebnisse unterstreichen die essenzielle Bedeutung von GPVI und CLEC-2, sowie deren Signalkaskade, für die Aufrechterhaltung der Gefäßintegrität unter inflammatorischen Bedingungen [109].

1.2.4 Thrombozytenreaktivität bei Sepsis

Um ein besseres pathophysiologisches Verständnis der Rolle von Thrombozyten bei der Entstehung der Organfunktionsstörung im Rahmen der Sepsis zu entwickeln, wurde in Studien das Aktivierungslevel und die Reaktivität zirkulierender Thrombozyten von Sepsis-Patient:innen mit unterschiedlichen Methoden untersucht. Die Mehrzahl der Studien, die die Funktion zirkulierender Thrombozyten von Sepsis-Patient:innen mittels Aggregometrie analysierten, berichten eine reduzierte Aggregation nach Agonistenzugabe im Sinne einer Hyporeaktivität der Thrombozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe [110-113]. Einige der Autoren führen die reduzierte Aggregation allerdings auf die deutlich niedrigeren Thrombozytenzahlen in Sepsis-Blutproben zurück [110, 111, 113], wohingegen Yaguchi et al. berichten, dass die Hyporeaktivität auch unter Berücksichtigung geringerer Thrombozytenzahlen besteht und das beobachtete Aggregationsdefizit zusätzlich positiv mit dem Schweregrad der Sepsis korrelierte [112]. Die Verfasser der *PRESS Study* hingegen beobachteten die signifikant stärkste Thrombozytenaggregation bei Patient:innen mit Sepsis

oder septischem Schock, gefolgt von Patient:innen mit einer Infektionserkrankung (aber keiner Sepsis) und die schwächste Aggregation bei Gesundspender:innen [114].

Auch die wenigen Studien, die die Funktion zirkulierender Thrombozyten von Sepsis-Patient:innen mittels Durchflusszytometrie untersuchten, lieferten unterschiedliche Ergebnisse. Während Tunjungputri et al. eine Hyperreaktivität der Thrombozyten von Sepsispatient:innen mit grampositiven Blutkulturen beobachtete [115], berichten Yaguchi et al. und Lundahl et al. von einer verringerten Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Aktivierung nach Agonistenzugabe auf Thrombozyten von Sepsis-Patient:innen [112, 116]. Und Gawaz et al. berichten in drei frühen Studien über eine erhöhte Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Aktivierung auf zirkulierenden Thrombozyten von Sepsis-Patient:innen mit Multiorganversagen, sowie einer erhöhten Anzahl zirkulierender PLAs [117-119]. Eine erhöhte Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Aktivierung und ADP-induzierte Aggregation konnten auch bei Thrombozyten von Gesundspender:innen durch die Inkubation mit Sepsis-Plasma ausgelöst werden [117]. Aus diesen Beobachtungen schlussfolgern die Autoren, dass Thrombozyten bei Sepsis hyperreaktiv und präaktiviert werden und folglich zu Zirkulationsstörungen und Organversagen beitragen.

In der Zusammenschau lässt sich feststellen, dass publizierte Studien zur Thrombozytenreaktivität bei Sepsis nur in geringer Anzahl vorliegen, diese aufgrund der sich über die Jahre veränderten Sepsis-Diagnosekriterien Kohorten mit unterschiedlichen Einschlusskriterien untersuchten und die Ergebnisse insgesamt inhomogene bis widersprüchliche sind. Aus diesem Grund führte unsere Arbeitsgruppe eine prospektive Pilotstudie durch, die eine umfassende und leitlinienkonforme Thrombozytenfunktionsdiagnostik von 15 Sepsis-Patient:innen zu drei Messzeitpunkten einschloss [120]. Dabei konnte durchflusszytometrisch eine hochgradige Hyporeaktivität der Sepsis-Thrombozyten festgestellt werden, die bei Stimulation mittels GPVI-Agonisten CRP-X_L am deutlichsten ausgeprägt war, molekularbiologisch auf einen proximalen GPVI-Signaldefekt zurückzuführen war und die der Abnahme der Thrombozytenzahl im Durchschnitt um 1,6 Tage vorausging. Zusätzlich konnten Hinweise auf einen Beladungsdefekt der Sepsis-Thrombozyten mit δ -Granula beobachtet werden.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Sepsis ist ein häufiges und akut lebensbedrohliches Syndrom, das sich als Komplikation einer Infektionserkrankung entwickeln kann. Von größter Wichtigkeit für das Überleben der Patient:innen ist die unmittelbare Einleitung einer adäquaten Therapie [36, 121]. Zentrale Herausforderung für das klinische Personal ist dabei die sichere und frühzeitige Erkennung der Sepsis, die u.a. mangels der Verfügbarkeit verlässlicher diagnostischer Biomarker erschwert ist.

Im Rahmen einer Pilotstudie identifizierte unsere Arbeitsgruppe mittels Durchflusszytometrie eine hochgradig ausgeprägte Hyporeaktivität der Thrombozyten bei Sepsis, die bereits zum Aufnahmezeitpunkt der Patient:innen auf Intensivstation voll ausgeprägt war und einem Abfall der Thrombozytenzahl im Mittel um 1,6 Tage voraus ging [120]. Diese Charakteristika ließen uns vermuten, einen potenziellen Kandidaten für einen Biomarker zur Sepsis-Früherkennung identifiziert zu haben. Zielsetzung der vorliegenden Dissertationsarbeit ist durch den zusätzlichen Einschluss einer Kohorte hospitalisierter Patient:innen mit Infektionserkrankung (SOFA-Score <2) die Bearbeitung folgender Anschlussfragestellungen:

- (I) Wann entwickelt sich die Hyporeaktivität der Thrombozyten über das Infektion-Sepsis-Kontinuum hinweg?
- (II) Eignet sich die beschriebene Hyporeaktivität, bzw. GPVI-Dysfunktion, der Thrombozyten potenziell als diagnostischer Biomarker zur Sepsis-Früherkennung?
- (III) Zeigt sich die unter statischen Bedingungen gemessene Hyporeaktivität der Sepsis-Thrombozyten auch unter dynamischen Messbedingungen unter der Einwirkung physiologischer Scherkräfte?
- (IV) In welchem Ausmaß weisen bereits Infektionspatient:innen den bei Sepsispatient:innen festgestellten Hinweis auf einen δ -Granula-Beladungsdefekt auf?
- (V) Lassen Thrombozyten über das Infektion-Sepsis-Kontinuum hinweg eine Veränderung der Oberflächenrezeptoren erkennen?

Zusätzlich sollte im Rahmen einer laborinternen Methodenetablierung untersucht werden, ob sich die Abnahme der Thrombozytenzahl bei Sepsis-Patient:innen durch eine vermehrte Desialylierung der Thrombozyten erklären lässt.

2 MATERIAL & METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien

Tabelle 3: Verwendete Reagenzien.

Alle Puffersysteme wurden mit Reinstwasser aus einem Milli-Q® Integral 3 System (Merck-Millipore) angefertigt.

Antikörper	Klon	Hersteller
FITC Mouse Anti-Human CD61	VI-PL2	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)
PerCP Mouse Anti-Human CD42a	Beb1	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)
APC Mouse Anti-Human CD42b	HIP1	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)
FITC Mouse Anti-Human CLEC1B (CLEC2)	AYP1	BioLegend (San Diego, CA, USA)
PE Mouse Anti-Human Platelet GP VI	HY101	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)
APC Mouse Anti-Human CD41a	HIP8	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)
FITC Mouse Anti-Human CD42d	LUM3	Nieswandt-Labor (Würzburg, DE) [122]
PE Mouse Anti-Human Platelet CD29	MAR4	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)
PE-Cy5 Mouse Anti-Human CD41a	HIP8	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)
PE Mouse Anti-Human CD11b/Mac-1	ICRF44	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)
APC Mouse Anti-Human CD45	HI30	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)
FITC Mouse Anti-Human PAC-1	PAC-1	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)
APC Mouse Anti-Human CD62P	AK-4	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)
PE Mouse Anti-Human CD42a	REA209	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, DE)
Lektin	Konjugat	
<i>Sambucus nigra</i> Lektin	Cy5	Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)
<i>Ricinus communis</i> Agglutinin I	FITC	Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)
<i>Erythrina cristagalli</i> Lektin	FITC	Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)
<i>Succinylated wheat germ</i> Agglutinin	FITC	Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)

MATERIAL & METHODEN

Agonist																					
Adenosindiphosphat (ADP)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)																				
Convulxin	Johannes Eble (Münster, DE)																				
<i>Cross-linked Collagen-Related Peptide</i> (CRP-XL)	Cambridge Research Biochemicals (Billingham, GB); kreuzvernetzt durch Nieswandt-Labor (Würzburg, DE)																				
Rhodocytin	Johannes Eble (Münster, DE)																				
<i>Thrombin Receptor Activator Peptide 6</i> (TRAP-6)	Bachem Holding (Bubendorf, CH)																				
U46619	Enzo Life Sciences (Lörrach, DE)																				
Substanz																					
Mepacrin	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)																				
Bovines Serum Albumin (BSA)	Carl Roth (Karlsruhe, DE)																				
Puffersystem	Zusammensetzung																				
HEPES Tyrode's ohne Ca ²⁺	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td>NaCl</td><td style="text-align: right;">137 mM</td></tr> <tr><td>KCl</td><td style="text-align: right;">2,7 mM</td></tr> <tr><td>NaHCO₃</td><td style="text-align: right;">12 mM</td></tr> <tr><td>NaH₂PO₄</td><td style="text-align: right;">0,43 mM</td></tr> <tr><td>MgCl₂</td><td style="text-align: right;">1 mM</td></tr> <tr><td>HEPES</td><td style="text-align: right;">5 mM</td></tr> <tr><td>Albumin Fraktion V (BSA)</td><td style="text-align: right;">0,36 % (w/v)</td></tr> <tr><td>Glukose-Lösung</td><td style="text-align: right;">0,1 % (v/v)</td></tr> <tr><td></td><td style="text-align: right;">//pH 7,34</td></tr> </table>	NaCl	137 mM	KCl	2,7 mM	NaHCO ₃	12 mM	NaH ₂ PO ₄	0,43 mM	MgCl ₂	1 mM	HEPES	5 mM	Albumin Fraktion V (BSA)	0,36 % (w/v)	Glukose-Lösung	0,1 % (v/v)		//pH 7,34		
NaCl	137 mM																				
KCl	2,7 mM																				
NaHCO ₃	12 mM																				
NaH ₂ PO ₄	0,43 mM																				
MgCl ₂	1 mM																				
HEPES	5 mM																				
Albumin Fraktion V (BSA)	0,36 % (w/v)																				
Glukose-Lösung	0,1 % (v/v)																				
	//pH 7,34																				
HEPES Tyrode's mit Ca ²⁺	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td>NaCl</td><td style="text-align: right;">137 mM</td></tr> <tr><td>KCl</td><td style="text-align: right;">2,7 mM</td></tr> <tr><td>NaHCO₃</td><td style="text-align: right;">12 mM</td></tr> <tr><td>NaH₂PO₄</td><td style="text-align: right;">0,43 mM</td></tr> <tr><td>MgCl₂</td><td style="text-align: right;">1 mM</td></tr> <tr><td>CaCl₂</td><td style="text-align: right;">2 mM</td></tr> <tr><td>HEPES</td><td style="text-align: right;">5 mM</td></tr> <tr><td>Albumin Fraktion V (BSA)</td><td style="text-align: right;">0,36 % (w/v)</td></tr> <tr><td>Glukose-Lösung</td><td style="text-align: right;">0,1 % (v/v)</td></tr> <tr><td></td><td style="text-align: right;">//pH 7,34</td></tr> </table>	NaCl	137 mM	KCl	2,7 mM	NaHCO ₃	12 mM	NaH ₂ PO ₄	0,43 mM	MgCl ₂	1 mM	CaCl ₂	2 mM	HEPES	5 mM	Albumin Fraktion V (BSA)	0,36 % (w/v)	Glukose-Lösung	0,1 % (v/v)		//pH 7,34
NaCl	137 mM																				
KCl	2,7 mM																				
NaHCO ₃	12 mM																				
NaH ₂ PO ₄	0,43 mM																				
MgCl ₂	1 mM																				
CaCl ₂	2 mM																				
HEPES	5 mM																				
Albumin Fraktion V (BSA)	0,36 % (w/v)																				
Glukose-Lösung	0,1 % (v/v)																				
	//pH 7,34																				

2.1.2 Geräte und Zubehör

Tabelle 4: Verwendete Geräte und Zubehör.

Gerät	Hersteller
BD FACSCelesta™ Durchflusszytometer	BD Biosciences (Heidelberg, DE)
Heraeus™ Megafuge™ 8R Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Megastar 1.6 Zentrifuge	VWR International (Radnor, PA, USA)
Sysmex Hämatologie-Analysator KX21N	Sysmex Corporation (Köbe, JP)
INNOVANCE® PFA-200	Siemens Healthineers (Erlangen, DE)
Blutentnahmezubehör	
Safety-Multifly®-Kanüle 21G	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
S-Monovette® 4,3 ml, Citrat 3,2%	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
PFA-200 Kartuschen	
Dade® PFA Collagen/ADP Test Cartridge	Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH (Marburg, DE)
Dade® PFA Collagen/EPI Test Cartridge	Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH (Marburg, DE)

2.2 Methoden

2.2.1 Kohortenrekrutierung

Die vorliegende prospektive Kohortenstudie wurde am Universitätsklinikum Würzburg (UKW) im Zeitraum von Oktober 2019 bis Februar 2020 nach positivem Votum der Ethikkommission der Universität Würzburg (Aktenzeichen 94/19) und in Übereinstimmung der Richtlinien der Deklaration von Helsinki und ihren *Amendments* durchgeführt. Es wurden Patient:innen mit Sepsis (SOFA-Score ≥ 2), Patient:innen mit Infektion (SOFA-Score < 2) und gesunde Proband:innen rekrutiert und Blutproben zur Analyse der Thrombozyten abgenommen. An jedem Tag, an dem mindestens eine Patient:in mit Infektion oder Sepsis rekrutiert wurde, wurde als laborinterne Kontrolle ebenfalls eine gesunde Kontrollproband:in rekrutiert. Abbildung 3 illustriert schematisch den Ablauf der Patient:innen- und Proband:innenrekrutierung.

Generelle Ausschlusskriterien bei der Rekrutierung aller Patient:innen und Proband:innen waren neben Minderjährigkeit auch Umstände, die bekanntermaßen mit einer Veränderung der Thrombozytenfunktion einhergehen können und als mögliche Störfaktoren

ausgeschlossen wurden. Dazu gehören eine bestehende Schwangerschaft inklusive Stillzeit, sämtliche hämatonkologischen Grunderkrankungen, sowie eine chemotherapeutische Behandlung mit den Medikamenten Cisplatin, Cyclophosphamid, Carmustein, Melphalan, Vincristin, Daunorubicin, Plicamycin oder Asparaginase [123].

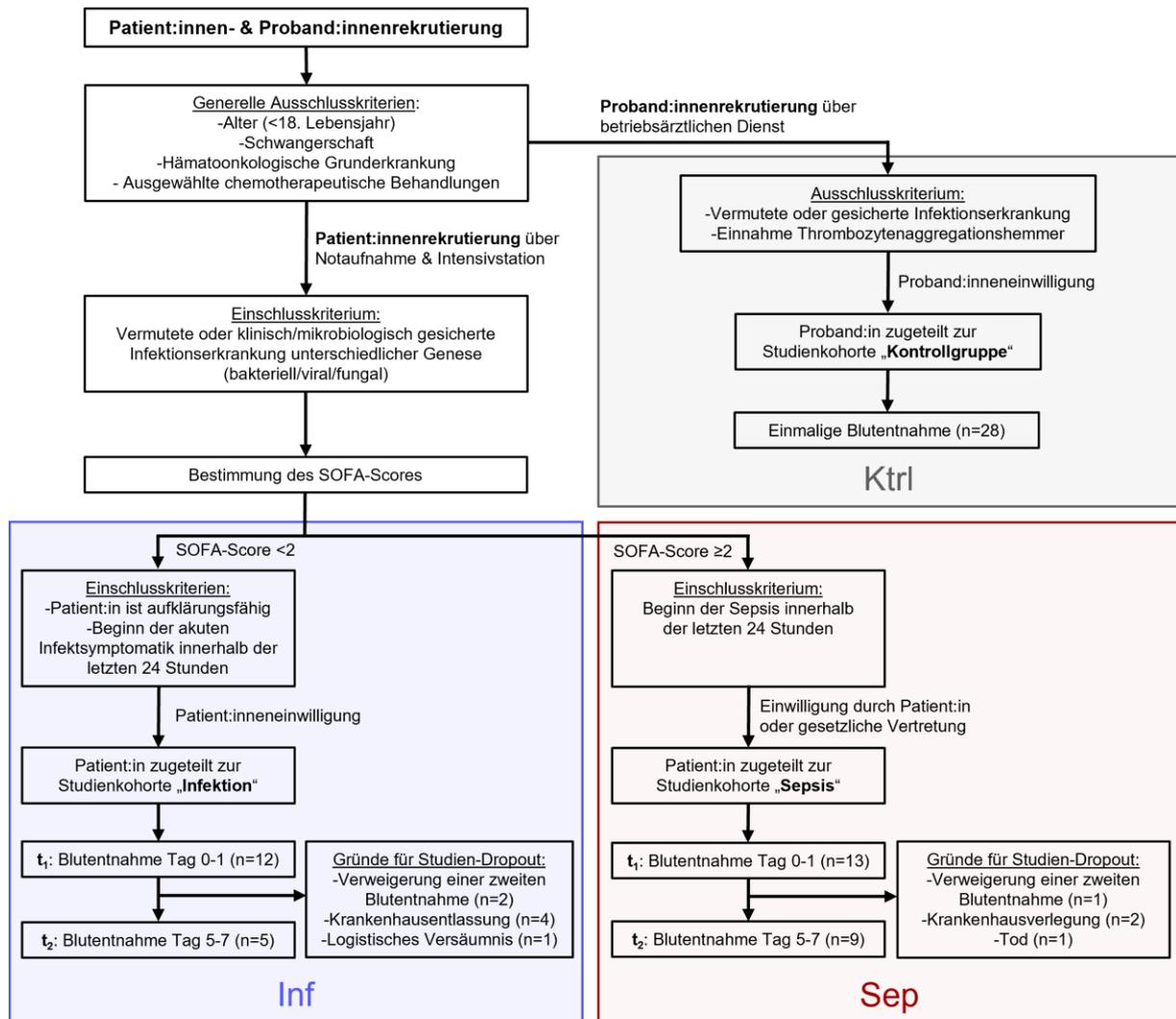


Abbildung 3: Schematischer Ablauf der Kohortenrekrutierung.

Dargestellt sind die Ein- und Ausschlusskriterien der Studienkohorten, sowie die Zeitpunkte der Blutentnahmen, Anzahl eingeschlossener Individuen (n) und Gründe für den Studienabbruch/-ausstieg vor der zweiten Blutentnahme. Ktrl, Kontrollgruppe; Inf, Infektion; Sep, Sepsis; SOFA, *sequential organ failure assessment*.

Die Rekrutierung gesunder Proband:innen für die Studienkohorte „Kontrollgruppe“ (Ktrl) erfolgte über den betriebsärztlichen Dienst des UKW. Proband:innen durften keine vermutete oder gesicherte Infektionserkrankung aufweisen und zusätzlich innerhalb der letzten zehn Tage keine Thrombozytenaggregationshemmer wie z.B. Acetylsalicylsäure (ASS) eingenommen haben. Alle Studienpatient:innen mit einer Infektionserkrankung oder Sepsis wurden über die internistische Notaufnahme oder Intensivstationen des UKW rekrutiert.

Patient:innen mit einem SOFA-Score von ≥ 2 Punkten wurden analog der Sepsis-3-Kriterien [1] für die Studienkohorte „Sepsis“ (Sep) in Erwägung gezogen, Patient:innen mit einem SOFA-Score < 2 Punkten für die Studienkohorte „Infektion“ (Inf). Zusätzlich musste die akute Symptomatik innerhalb der letzten 24 Stunden aufgetreten sein. Bei Erfüllung aller Einschlusskriterien und nach erfolgter schriftlicher Einwilligung wurden allen Studienteilnehmenden am Tag der Rekrutierung und den Studienpatient:innen nach Möglichkeit nochmals nach 5 bis 7 Tagen jeweils 17,2 ml 3,2%-Citrat-Vollblut abgenommen. Die Blutentnahmen bei Studienpatient:innen von Intensivstation wurden nicht-invasiv über bestehende zentralvenöse oder arterielle Verweilkanülen durchgeführt. Bei Patient:innen, die über die Notaufnahme rekrutiert wurden, wurde meist eine periphere Venenpunktion durchgeführt. Dabei wurde zur Sicherstellung einer unbeeinträchtigten Thrombozytenfunktion auf eine kurze Zeitdauer zwischen der Anlage des Stauschlauches und der Venenpunktion geachtet, sowie auf eine treffgenaue Venenpunktion ohne „Nachstechen“, um die Wahrscheinlichkeit einer Präaktivierung der Thrombozyten durch den Kontakt der Punktionsnadel mit extravaskulärem Kollagen zu minimieren.

2.2.2 Klinische Daten, Laborwerte und mikrobiologische Befunde

Sämtliche klinische Daten, Zentrallaboraten und mikrobiologische Befunde der Studienpatient:innen wurden der elektronischen Patient:innenakte des UKW entnommen. Dabei wurden tagesaktuelle Daten, soweit verfügbar, zu den Zeitpunkten t_1 und t_2 gesammelt. Retrospektiv wurden für alle Studienpatient:innen Informationen über eine Verlegung auf Intensivstation/Normalstation, die Krankenhausverweildauer, ein Versterben während des Klinikaufenthaltes und die Entwicklung der Thrombozytenzahlen über zehn Tage nach Studienbeginn ermittelt.

2.2.3 Sysmex-Hämatologieanalysator

Citrat-Vollblut und thrombozytenreiches Plasma (*platelet-rich-plasma*; PRP) aller Studienteilnehmer:innen wurde mit Hilfe des Hämatologieanalysators Sysmex KX-21 analysiert und die in Tabelle 11 angegebenen Parameter dokumentiert. Alle Sysmex-Messungen wurden mit Citrat-Vollblut durchgeführt, weshalb die Ergebnisse des Blutbilds verdünnungsbedingt etwa 10% unterhalb der EDTA-Blutwerte liegen. Sämtliche Sysmex-Messwerte beziehen sich im Gegensatz zu den Zentrallaborwerten auf die identischen Blutproben, mit denen die laborinternen Analysen der Thrombozyten(funktion) durchgeführt wurden.

2.2.4 Immunfluoreszenzfärbung und durchflusszytometrische Analyse

2.2.4.1 Expression membranständiger Proteine

Zur Analyse der Expression ausgewählter membranständiger Proteine auf Thrombozyten wurden pro Durchflusszytometrie-Röhrchen 5 µl Citrat-Vollblut in 45 µl HEPES Tyrodes Puffer (ohne Ca²⁺) aufgenommen. Anschließend wurden die in Tabelle 5 aufgeführten Antikörper hinzugegeben und die Röhrchen 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden pro Röhrchen 1,5 ml FACS-Puffer hinzugefügt und diese bis zur Messung am Durchflusszytometer im Dunkeln auf Eis gelagert.

Tabelle 5: Verwendete Antikörper zur Messung membranständiger Proteine.

APC, Allophycocyanin; FITC, Fluoresceinisothiocyanat; PE, Phycoerythrin; PerCP, Peridinin Chlorophyll Protein. CD, *cluster of differentiation*; CLEC2, *C-type-lectin-2*; GP, Glykoprotein.

Röhrchen	Antikörper	Volumen
1	FITC Mouse Anti-Human CD61	5 µl
	PerCP Mouse Anti-Human CD42a	5 µl
	APC Mouse Anti-Human CD42b	5 µl
2	FITC Mouse Anti-Human CLEC2	2 µl
	PE Mouse Anti-Human Platelet GPVI	2 µl
	APC Mouse Anti-Human CD41a	5 µl
3	FITC Mouse Anti-Human CD42d	5 µl
	PE Mouse Anti-Human Platelet CD29	5 µl
	PE-Cy5 Mouse Anti-Human CD41a	5 µl

Abbildung 4 veranschaulicht und erklärt exemplarisch die gewählte *Gating*-Strategie zur Quantifizierung der Rezeptorexpression auf Thrombozyten.

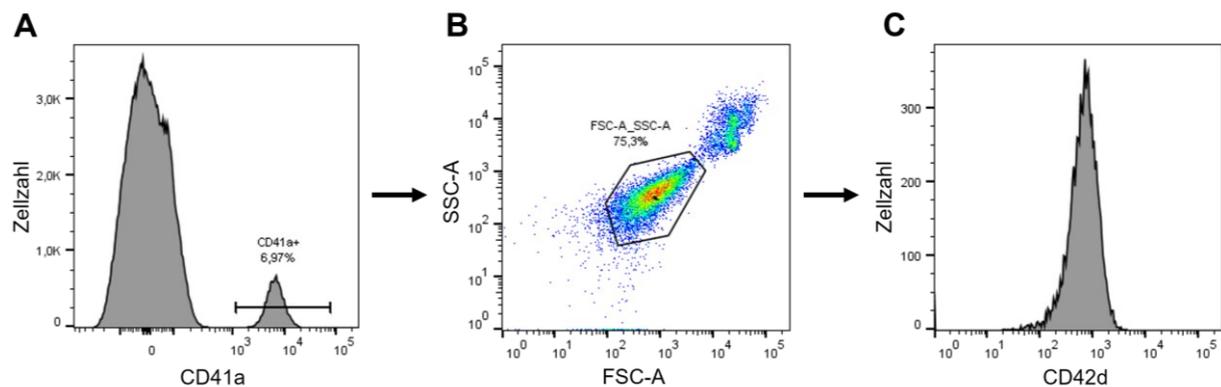


Abbildung 4: *Gating*-Strategie zur Analyse von Thrombozytenrezeptoren.

Dargestellt ist die *Gating*-Strategie am Beispiel der Quantifizierung des Oberflächenmarkers CD42d auf Thrombozyten. (A) Isolation der Thrombozytenpopulation aus Vollblut mittels *Gating* auf den thrombozytenspezifischen Marker CD41a. (B) Isolation der Thrombozyten-*Singlets* von Zellaggregaten mittels *Gating*-Fenster auf FSC-A und SSC-A. (C) Für die resultierende Thrombozytenpopulation wurden geoMFI-Werte des jeweiligen Oberflächenmarkers (in diesem Beispiel CD42d) ausgelesen. CD, *cluster of differentiation*; FSC-A, *forward scatter area*; SSC-A, *side scatter area*.

2.2.4.2 Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate (PLAs)

Die Durchflusszytometrie ist ein Standardverfahren zur Quantifizierung im Blut zirkulierender PLAs [124]. Dazu wurden 5 μ l Citrat-Vollblut in 45 μ l HEPES Tyrodes Puffer (ohne Ca^{2+}) aufgenommen und die Antikörper PE-Cy5 Mouse Anti-Human CD41a (5 μ l) und APC Mouse Anti-Human CD45 (5 μ l) hinzugegeben. Anschließend wurde die Probe 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, mit 1,5 ml FACS-Puffer verdünnt und bis zur Messung am Durchflusszytometer im Dunkeln auf Eis gelagert.

Da CD45 im Vollblut ausschließlich von Leukozyten und CD41a ausschließlich auf Thrombozyten exprimiert wird, wurden CD45⁺/CD41a⁺ Events als PLAs gewertet (Abbildung 5) Die Quantifizierung der PLAs erfolgte als prozentueller Anteil CD41a-positiver Leukozyten an der gesamten Leukozytenpopulation. CD41a-positiv Events wurden definiert als solche mit einer minimalen CD41a-Fluoreszenzintensität, die 99 % der reinen Thrombozytenpopulation desselben Individuums erfasste.

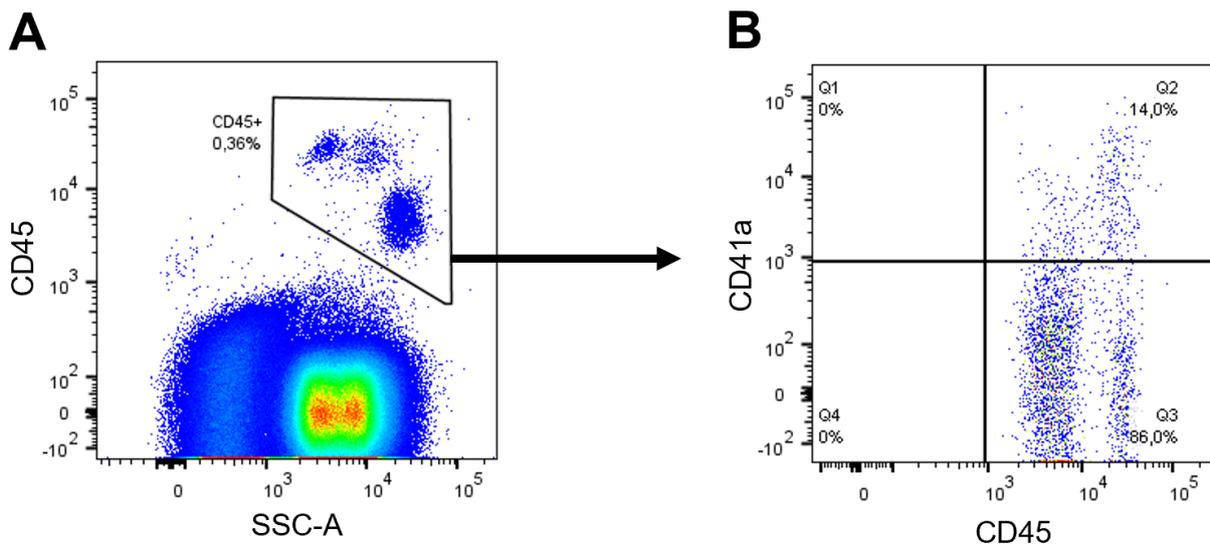


Abbildung 5: Gating-Strategie zur Analyse zirkulierender PLAs in Vollblut.

(A) Die Leukozytenpopulation wurde mittels *Gating* auf CD45-positive Events isoliert. (B) Quantifizierung CD45⁺/CD41a⁺ Events in Prozent aller CD45⁺ Events. CD, *cluster of differentiation*; SSC-A, *side scatter area*.

2.2.4.3 Lektin-Assay

Die Oberflächenexposition endständiger Sialinsäure, Galaktose und N-Acetylglucosamin auf Thrombozyten wurde mittels Bindung spezifischer Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelter Lektine durchflusszytometrisch analysiert. Da die Zugabe von Lektinen zu Vollblutproben zur Koagulation führt, wurden sämtliche Messungen in PRP durchgeführt. Dazu wurde Citrat-Vollblut für 20 min bei 152 g und Raumtemperatur zentrifugiert, der thrombozytenreiche Plasmaüberstand abgenommen und dieser für die weitere Analyse verwendet.

Pro Durchflusszytometrie-Röhrchen wurden 5 µl PRP in 45 µl Hepes Tyrodes Puffer (ohne Ca²⁺) aufgenommen und je Röhrchen Anti-CD41a-AK (5 µl) und eines der folgenden Lektine hinzugefügt: SNA (20 µg/ml; bindet bevorzugt an Sialinsäure, die an endständige Galaktose in α-2,6- oder α-2,3-Verknüpfung gebunden ist), RCA-I (20 µg/ml; bindet bevorzugt Oligosaccharide, die mit Galaktose enden, aber kann auch mit N-Acetylgalaktosamin interagieren), ECA (20 µg/ml; hat eine Spezifität für Galaktosereste und die höchste Bindungsaktivität für Galaktosyl-(β-1,4)-N-Acetylglucosamin), sWGA (5 µg/ml; bindet spezifisch endständiges N-Acetylglucosamin). Anschließend wurden die Röhrchen 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden pro Röhrchen 1,5 ml FACS-Puffer hinzugefügt und diese bis zur Messung am Durchflusszytometer im Dunkeln gelagert. Abbildung 6 erklärt exemplarisch die gewählte *Gating*-Strategie.

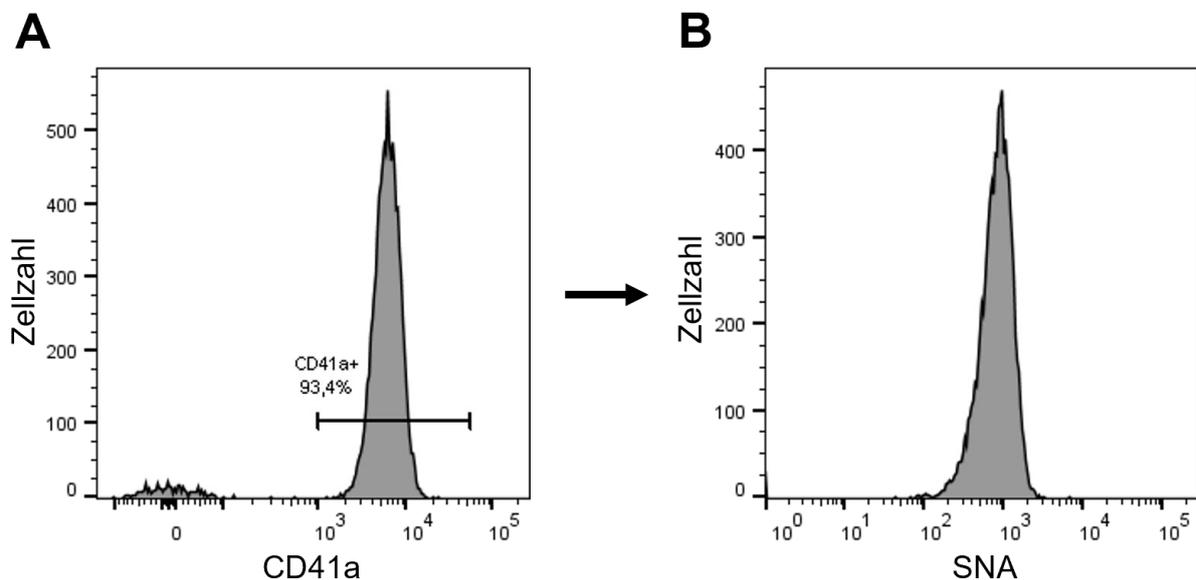


Abbildung 6: *Gating*-Strategie zur Analyse der Lektinbindung in PRP.

Dargestellt ist die *Gating*-Strategie am Beispiel der Quantifizierung der Oberflächenexposition von Sialinsäure auf Thrombozyten mittels des spezifischen Liganden *Sambucus nigra* Lektin (SNA). (A) Die Thrombozytenpopulation wurde mittels *Gating* auf CD41a von residualen Erythrozyten und Leukozyten isoliert. (B) Die Lektinbindung (in diesem Beispiel SNA) der Thrombozyten wurde mittels geoMFI-Werte quantifiziert und ausgelesen. CD, *cluster of differentiation*; geoMFI, *geometric mean fluorescence intensity*.

2.2.4.4 Analyse der δ -Granula mittels Mepacrin-Assay

Die Anwesenheit von δ -Granula in ruhenden Thrombozyten sowie deren Degranulation nach Agonistenzugabe kann durchflusszytometrisch durch eine Surrogat-Färbung mit dem Antiprotozoikum Mepacrin analysiert werden, welches sich selektiv in δ -Granula anreichert. Manukjan et al. konnten zeigen, dass dieser Assay eine sensitive und effiziente Methode zur Detektion vorliegender δ -Granula-Defekte darstellt und durch die Aufzeichnung der Kinetik zuverlässig zwischen Aufnahme-, Freisetzungs- und kombinierten Defekten unterscheiden lässt [125].

Tabelle 6: Verwendete Reagenzien zur Analyse der δ -Granula.

APC, Allophycocyanin; CD, *cluster of differentiation*.

Röhrchen	Reagenz	Volumen / Konzentration
1	APC Mouse Anti-Human CD41a	5 μ l
2	Mepacrin	5 μ M
	APC Mouse Anti-Human CD41a	5 μ l

Zur Durchführung dieses Assays wurden in zwei Durchflusszytometrie-Röhrchen jeweils 5 μ l Citrat-Vollblut in 45 μ l HEPES Tyrodes Puffer (ohne Ca^{2+}) aufgenommen. Anschließend wurden die in Tabelle 6 aufgeführten Reagenzien hinzugegeben und die Röhrchen bei 37°C im Wasserbad für 30 Minuten

inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden pro Röhrchen 1,5 ml HEPES Tyrodes Puffer hinzugefügt und diese bis zur Messung am Durchflusszytometer im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert.

Mepacrin besitzt eine Eigenfluoreszenz, die im FITC-Kanal detektierbar ist. Initial wurde deshalb Röhrchen 1 für 60 Sekunden zur Bestimmung der Basis-Fluoreszenz der Thrombozyten im FITC-Kanal gemessen. Danach wurde Röhrchen 2 für 60 Sekunden zur Bestimmung der Beladung der Thrombozyten mit Mepacrin gemessen. Nach anschließender Zugabe des Agonisten TRAP-6 (5 μ M) zu Röhrchen 2 wurde über 300 Sekunden die Mepacrin-Entladung durch den damit einhergehenden Abfall der Signalstärke im FITC-Kanal quantifiziert. Abbildung 7 veranschaulicht die gewählte *Gating*-Strategie bei der Datenauswertung und zeigt exemplarisch eine Messkurve des Mepacrin-Signals (Abbildung 7C). Die Mepacrin-Beladung wurde definiert als Differenz der geoMFI-Werte zwischen Baseline-Messung und Mepacrin-Signal vor Agonistenzugabe. Die Mepacrin-Entladung wurde definiert als Differenz der geoMFI-Werte zwischen Mepacrin-Beladung vor Agonistenzugabe und Mepacrin-Beladung 180 Sekunden nach Agonistenzugabe. Als Berechnungsgrundlage wurde dafür jeweils der mittlere geoMFI-Wert eines 30-sekündigen Zeitfensters herangezogen.

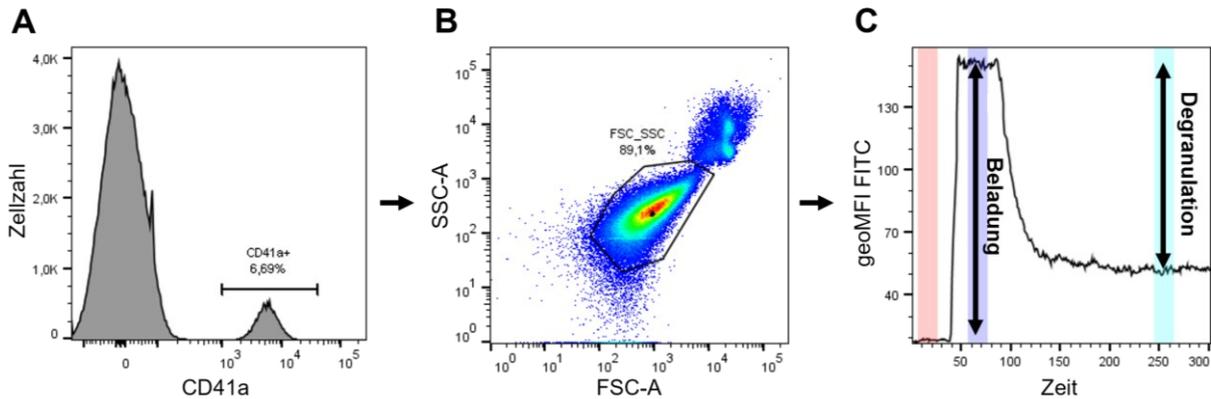


Abbildung 7: Gating-Strategie zur durchflusszytometrischen Analyse der δ -Granula.

(A) Thrombozyten wurden mittels *Gating* auf CD41 von den anderen Zellpopulationen aus Vollblut isoliert. (B) *Gating*-Fenster auf FSC-A und SSC-A zur Isoierung von Thrombozyten-Singlets. (C) Messkurve des Mepacrin-Signals über 7 Minuten. Analysiert wurde die mittlere geoMFI eines jeweils 30-sekündigen Zeitfensters der Baseline-Messung (rot), der Mepacrin-Beladung (violett) und der Restbeladung nach Agonistenzugabe und konsekutiver Degranulation (hellblau). CD, *cluster of differentiation*; FSC-A, *forward scatter area*; SSC-A, *side scatter area*; geoMFI, *geometric mean fluorescence intensity*; FITC, Fluoresceinisothiocyanat.

2.2.4.5 Thrombozytenreaktivität nach Agonistenzugabe

Zur durchflusszytometrischen Analyse der Thrombozytenreaktivität wurden pro Durchflusszytometrie-Röhrchen 5 μ l Citrat-Vollblut in 45 μ l HEPES Tyrodes Puffer (ohne Ca^{2+}) aufgenommen. Nach Agonistenzugabe (Tabelle 7) folgte eine 5-minütige Inkubationszeit. Anschließend wurden zu jedem Röhrchen folgende Antikörper hinzugefügt: Mouse Anti-Human CD41a (5 μ l) oder Mouse Anti-Human CD42a (5 μ l), Mouse Anti-Human PAC-1 (15 μ l) und Mouse Anti-Human CD62P (5 μ l). Der PAC-1-Antikörper bindet ausschließlich die für Fibrinogen hochaffine Form von Integrin α IIb β 3 und CD62P dient als Surrogatmarker für die α -Degranulation durch die Bindung exponierten P-Selektins. Nach weiteren 15 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur im Dunkeln wurden pro Röhrchen 1,5 ml FACS-Puffer hinzugefügt und die Röhrchen bis zur zeitnahen Messung am Durchflusszytometer im Dunkeln auf Eis gelagert. Die *Gating*-Strategie auf PAC-1 und CD62P erfolgte analog Abbildung 4.

Tabelle 7: Verwendete Agonisten zur Messung der Thrombozytenreaktivität.

CRP-X_L, Cross-linked Collagen-Related Peptide; TRAP-6, *Thrombin Receptor Activator Peptide 6*; CLEC-2, *C-type lectin-like receptor 2*; PAR1, Protease-aktivierter Rezeptor 1.

Agonist	Konzentration	Spezifischer Rezeptor
CRP-X _L	0,01 μ g/ml	GPVI (Kollagen-Rezeptor)
Convulxin	0,01 μ g/ml	
Rhodocytin	10nM	CLEC-2 (Podoplanin-Rezeptor)
TRAP-6	5 μ M	PAR1 (Thrombin-Rezeptor)
ADP	5 μ M	P2Y _{1/12} (ADP-Rezeptor)
U46619	2 μ M	TXA ₂ -R (Thromboxan A ₂ -Rezeptor)

Als Qualitätskontrolle des Assays zum Ausschluss defekter Agonisten-Aliquots wurden mit jeder Analyse der Thrombozytenfunktion von Patient:innen auch eine gesunde Proband:in gemessen. Zeigten die Thrombozyten der gesunden Proband:in nach Agonistenzugabe keine adäquate Reaktivität bei der durchflusszytometrischen Messung, wurden ebenfalls entsprechende Patient:innenmessungen des gleichen Agonisten-Aliquots von der Auswertung ausgeschlossen (Tabelle 8).

Tabelle 8: Auflistung von der Datenauswertung ausgeschlossener Messungen.

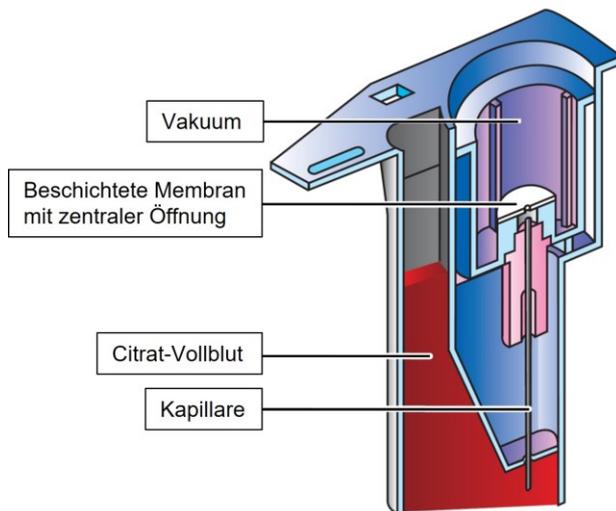
Proben-ID	Agonisten	Ausschlussgrund
Ktrl101 bis Ktrl111, Inf101, Inf102, Sep101 bis Sep104	Alle	Verwendung eines defekten Hepes Tyrode's Puffersystems, das eine regelrechte Aktivierung der Thrombozyten verhinderte
Ktrl121, Ktrl122, Inf108, Inf107_Tag7, Sep105, Sep106	Alle	Kontrollproband:in zeigt auf alle Agonisten nur minimale Reaktivität
Ktrl127, Ktrl128, Inf106, Inf107, Inf111 bis Inf113	CRP-X _L	Kontrollproband:innen zeigten selektiv auf CRP-X _L keine Reaktivität → Verdacht eines fehlerhaften Agonisten-Aliquots
Ktrl128, Inf113	ADP+U46619	Kontrollproband:innen zeigten selektiv auf ADP+U46619 eine stark verringerte Reaktivität → Verdacht eines fehlerhaften Agonisten-Aliquots
Ktrl129, Inf114_Tag5	Rhodocytin	Kontrollproband:innen zeigten selektiv auf Rhodocytin eine stark verringerte Reaktivität → Verdacht eines fehlerhaften Agonisten-Aliquots

2.2.5 Herstellung von Vollblutproben mit reduzierter Thrombozytenzahl

Zur Herstellung von Vollblutproben mit reduzierter Thrombozytenzahl wurde 3,2%iges Citrat-Vollblut von gesunden Proband:innen bei 152 g für 20 Minuten zentrifugiert, das PRP abgenommen und das Sediment aufbewahrt. Anschließend wurde das PRP bei der einen Hälfte der Proben jeder Proband:in nochmals bei 2500 g für 10 Minuten zentrifugiert und der sich gebildete thrombozytenarme Überstand (*platelet-poor-plasma*; PPP) abgenommen. Das PPP wurde mit dem Sediment resuspendiert, wodurch ein „thrombozytenreduziertes“ Vollblut entstand. Die andere Hälfte der Proben jeder Proband:in dienten als Kontrollproben, um den möglichen Störfaktor des Zentrifugierens und Pipettierens auf die Thrombozytenfunktion zu testen. Dazu wurde das PRP, nachdem es zunächst abgenommen wurde, wieder mit dem Rest der Probe resuspendiert, wodurch sich die Thrombozytenzahl in der Blutprobe nicht veränderte.

2.2.6 INNOVANCE® PFA-200

Die Messung der Thrombozytenreaktivität unter Flussbedingungen und Scherstress erfolgte mittels des *point-of-care*-Systems INNOVANCE® PFA-200. Pro Messdurchgang wurden



800µl 3,2%iges Na-Citrat-Vollblut in eine kommerziell erhältliche Messzelle pipettiert. Die verwendeten Messzellen enthielten entweder eine mit den Agonisten Kollagen und Epinephrin (KOL/EPI) oder Kollagen und ADP (KOL/ADP) beschichtete Membran. Die nachfolgende Analyse erfolgte vollautomatisch und standardisiert. Die Citrat-Vollblutprobe wurde dabei zunächst bei 37,9 °C inkubiert und anschließend mittels Vakuums durch eine Kapillare aspiriert, woraufhin das Blut auf eine mit KOL/EPI oder KOL/ADP beschichtete Membran mit zentraler Öffnung

Abbildung 8: Schematischer Aufbau einer Messzelle des INNOVANCE® PFA-200.

Quelle (Beschriftung modifiziert): Benutzermanual des INNOVANCE® PFA-200* Systems (Version 1.0)

(Durchmesser: 150 µm) traf (Abbildung 8). Durch die Agonisten und Scherstress aktivierte Thrombozyten adhärten an der Membran und bildeten an der Membranöffnung ein Thrombozytenaggregat. Das Wachstum dieses Aggregats verringert unter physiologischen Bedingungen zunehmend die Durchflussrate bis sie bei vollständigem Verschluss schließlich sistiert. Das System ermittelte die verstrichene Zeit zwischen dem Start der Aspiration und dem Verschluss der Membranöffnung (= Verschlusszeit). Außerdem wurde die Verschlusskurve (Durchflussrate gegen Zeit) aufgezeichnet. Zur Wahrung der Probenstabilität erfolgten alle Messungen in einem Zeitfenster von frühestens 30 Minuten und spätestens 4 Stunden nach Blutentnahme. Laut Herstellerangaben gilt der Referenzbereich der physiologischen Verschlusszeiten für Citrat-Vollblut, das eine Thrombozytenzahl $>150 \text{ nl}^{-1}$ und einen Hämatokrit $>35\%$ aufweist.

2.2.7 Statistische Analyse

Alle statistischen Analysen wurden mit der Software GraphPad Prism Version 9.3.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) durchgeführt. Unterschiede wurden als signifikant angegeben, wenn $p < 0,05$ (*) und als statistisch hochsignifikant, wenn $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) oder $p < 0,0001$ (****). Sämtliche Signifikanztests wurden zweiseitig berechnet. Da die Verteilung unserer Stichproben aus der Grundgesamtheit nicht bekannt ist, wurden alle Datensätze mittels D'Agostino-Pearson-Test auf Normalverteilung geprüft. Normalverteilte Daten wurde als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) angegeben. Nicht-normalverteilte Daten wurden als Median \pm Interquartilabstand (IQR) angegeben.

Unterschiede zwischen mehr als zwei unabhängigen Datensätzen (z.B. Ktrl, Inf & Sep) wurden bei vorliegender Normalverteilung und Varianzhomogenität mittels einfaktorieller Varianzanalyse berechnet. Unterschiede zwischen den einzelnen Kohorten wurden post-hoc mittels Tukey-Kramer-Test berechnet, welcher für multiples Testen adjustiert. Bei Vorliegen nicht-normalverteilter Daten wurden Unterschiede zwischen mehr als zwei unabhängigen Datensätzen mittels Kruskal-Wallis-Test berechnet. Unterschiede zwischen den einzelnen Kohorten wurden dabei post-hoc mittels Dunn's-Test berechnet. Unterschiede zwischen zwei unabhängigen Datensätzen (z.B. Inf & Sep) wurden bei vorliegender Normalverteilung mittels ungepaartem t-Test berechnet und mittels Mann-Whitney-U-Test, wenn keine Normalverteilung vorlag. Unterschiede zwischen zwei abhängigen Datensätzen (z.B. t_1 und t_2 einer Patient:innenkohorte) wurden bei vorliegender Normalverteilung mittels eines gepaarten t-Tests berechnet und mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, wenn keine Normalverteilung vorlag.

3 ERGEBNISSE

3.1 Charakterisierung der Studienkohorten

Infektionserkrankungen umfassen ein breites Spektrum an Krankheitsbildern und auch die Sepsis selbst ist ein sehr heterogenes Krankheitsbild. Um die Studienkohorten zu charakterisieren, die korrekte Kohortenzuteilung der Studienpatient:innen zu bestätigen und die Vergleichbarkeit der Kohorten zu überprüfen, wurden epidemiologische, klinische und laborchemische Daten analysiert.

3.1.1 Epidemiologie und Klinik

Insgesamt wurden 13 Patient:innen mit Sepsis, 12 Patient:innen mit Infektion und 28 gesunde Proband:innen rekrutiert. Von den 13 Sepsis-Patient:innen konnte bei neun Patient:innen eine weitere Untersuchung an Tag 5-7 (t_2) durchgeführt werden. Bei den 12 Infektions-Patient:innen erfolgten fünf Untersuchungen zum Zeitpunkt t_2 (Abbildung 3). Die mittlere Krankenhausverweildauer war bei Sepsis-Patient:innen länger als bei Infektionspatient:innen (8 Tage vs. 12 Tage; Tabelle 9). Fünf Sepsis-Patient:innen wurden im Krankheitsverlauf auf Normalstation verlegt. Keine Patient:in mit Infektion entwickelte im Beobachtungszeitraum eine Sepsis oder musste aus anderen Gründen auf Intensivstation verlegt werden. Die Krankenhausmortalität bei Sepsis lag oberhalb derer der Infektions-Patient:innen (31% vs. 0%). 77% der Sepsis-Patient:innen befanden sich zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses im Septischen Schock. Das mittlere Lebensalter der Kontrollgruppe unterschied sich signifikant von den Patient:innenkohorten (29 Jahre vs. 69 bzw. 70 Jahre; $p < .001$). Infektion- und Sepsis-Kohorte waren vergleichbar bezüglich des Lebensalters (69 Jahre vs. 70 Jahre; $p > .99$), häufiger Komorbiditäten und des BMIs ($p = .98$). Weibliches und männliches Geschlecht verteilte sich gleichmäßig zwischen den Studienkohorten ($p = .35$). Häufigster Infektionsfokus war in beiden Patient:innenkohorten die Lunge. Während bei der Hälfte der Infektion-Kohorte kein Erregernachweis vorlag und bei 33% der Kohorte eine Gram-negativer Bakterienstamm identifiziert wurde, war das Verhältnis zwischen Gram-positiven und Gram-negativen Erregernachweisen bei der Sepsis-Kohorte mit jeweils 31% ausgeglichen. Die individuellen mikrobiologischen Erregernachweise und verschriebenen Antibiotikatherapien können Tabelle 14 im Appendix entnommen werden. Drei Infektions-Patient:innen und zwei Sepsis-Patient:innen wurden zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses mit dem Thrombozytenaggregationshemmer Acetylsalicylsäure (ASS) behandelt.

In der Zusammenschau waren die Infektion- und Sepsis-Kohorte unter relevanten epidemiologischen und klinischen Aspekten vergleichbar, während sich die Kontroll-Kohorte durch ein signifikant jüngeres Lebensalter von den Patient:innenkohorten unterschied. Die

ERGEBNISSE

Heterogenität von Infektionserkrankungen und Sepsis spiegelte sich in der Diversität der Infektionsfoki, ursächlicher Mikroorganismen und applizierter Antibiotikatherapien wider.

Tabelle 9: Epidemiologische und klinische Charakterisierung der Studienkohorten.
Daten sind aufgeführt als n (%), Mittelwert (\pm SD) oder Median [IQR]. n/v, nicht verfügbar.

Parameter		Kontrolle (n=28)	Infektion (n=12)	Sepsis (n=13)
Lebensalter (Jahre), Median [IQR]		29 [25-33]	69 [62-77]	70 [62-79]
Geschlecht weiblich, n (%)		13 (46%)	5 (42%)	3 (23%)
Body-Mass-Index (BMI; kg/m ²), Median [IQR]		n/v	27 [24-32]	26 [23-36]
Krankenhausverweildauer (Tage), Median [IQR]		n/v	8 [5-13]	12 [10-19]
Verlegung auf Normalstation, n (%)		n/v	n/v	5 (38%)
Verlegung auf Intensivstation, n (%)		n/v	0 (0%)	n/v
Krankenhausmortalität, n (%)		n/v	0 (0%)	4 (31%)
Septischer Schock, n (%)		n/v	n/v	10 (77%)
Komorbiditäten, n (%)	Diabetes mellitus Typ 2	n/v	3 (25%)	4 (31%)
	Herzinsuffizienz	n/v	2 (17%)	2 (15%)
	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD)	n/v	1 (8%)	2 (15%)
	Chronische Niereninsuffizienz	n/v	3 (25%)	2 (15%)
	Nicht-hämatookologische Tumorerkrankung	n/v	5 (42%)	4 (31%)
Infektionsfokus, n (%)	Lunge	n/v	6 (50%)	11 (85%)
	Harnwege	n/v	3 (25%)	1 (8%)
	Gastrointestinaltrakt	n/v	2 (15%)	1 (8%)
	Unbekannt	n/v	1 (8%)	1 (8%)
Mikroorganismus, n (%)	Bakteriell (Gram-positiv)	n/v	0 (0%)	4 (31%)
	Bakteriell (Gram-negativ)	n/v	4 (33%)	4 (31%)
	Bakteriell (andere)	n/v	1 (8%)	1 (8%)
	Viral	n/v	1 (8%)	2 (15%)
	Unbekannt	n/v	6 (50%)	3 (23%)
Organersatz- verfahren, n (%)	Invasive Beatmung	n/v	0 (0%)	5 (38%)
	Kontinuierliche venovenöse Hämodiafiltration (CVVHDF)	n/v	0 (0%)	3 (23%)
Einnahme eines Thrombozytenaggregationshemmers, n (%)		0 (0%)	3 (25%)	2 (15%)

3.1.2 Blutbild, Laborchemie & SOFA-Score

Infektionserkrankungen und Sepsis gehen typischerweise mit Veränderungen des Blutbildes und der Laborchemie wie z.B. dem Anstieg von Entzündungsmarkern einher. Bei der Sepsis zeigen sich häufig zusätzlich laborchemische Zeichen der Organdysfunktion. Die Leukozytenzahlen beider Kohorten lagen zum Zeitpunkt t_1 oberhalb der Referenzwerte und sanken während der stationären Behandlung bis zum Zeitpunkt t_2 wieder ab (Tabelle 10). Auch der Entzündungsmarker CRP lieferte in beiden Patient:innenkohorten zum Zeitpunkt t_1 erhöhte Werte, wobei die Werte der Sepsis-Kohorte oberhalb derer der Infektion-Kohorte lagen (10,2 mg/dl vs. 23,5 mg/dl; $p=.001$). Eine Erhöhung des Biomarkers PCT gilt als Hinweis auf eine systemische bakterielle Infektion. Dieser Marker lag lediglich bei der Sepsis-Kohorte zum Zeitpunkt t_1 oberhalb des Referenzbereichs und war im Vergleich zu den Werten der Infektion-Kohorte erhöht (0,47 ng/ml vs. 4,53 ng/ml; $p=.03$). Infektion- und Sepsis-Kohorte wiesen somit erwartungsgemäß deutlich erhöhte Entzündungswerte auf.

Beide Patient:innenkohorten wiesen mittlere Hämoglobin- und Hämatokritwerte unterhalb des Referenzbereiches auf, sowie ein normwertiges MCV (*mean corpuscular volume*) und MCH (*mean corpuscular hemoglobin*). Verminderte mittlere Hämoglobinwerte weisen auf das vermehrte Vorliegen von Anämien hin. Diese Anämien waren tendenziell in der Sepsis-Kohorte stärker ausgeprägt als in der Infektion-Kohorte (10,4 g/dl vs. 12,1 g/dl; $p=.08$) und sind in Zusammenschau mit den erniedrigten Hämatokrit-Werten und gleichzeitig normwertigen MCV- und MCH-Werten am ehesten auf das Vorliegen von Verdünnungsanämien im Rahmen der Infusionstherapien zurückzuführen.

Der mittlere SOFA-Score der Sepsis-Kohorte lag zum Zeitpunkt t_1 bei 8 und fiel bis zum Zeitpunkt t_2 auf 3 ab. Ein SOFA-Score von 8 spiegelt eine schwere Organdysfunktion über mehrere Organsysteme hinweg wider. Der deutliche Abfall des mittleren SOFA-Scores zum Zeitpunkt t_2 lässt sich einerseits auf die zunehmende Genesung von Sepsispatient:innen und andererseits auf das Versterben einiger schwerstkranker Patient:innen und den damit verbundenen *Drop-out* aus der Studie zurückführen.

Die Ergebnisse der laborinternen Blutbildanalyse der Patient:innenkohorten mittels Sysmex deckten sich mit den Ergebnissen des Zentrallabors unter Berücksichtigung der geringgradigen Verdünnung der Blutproben durch die beigefügte Citratlösung (Tabelle 11). Im Differentialblutbild zeigte sich bei den Studienpatient:innen eine ausgeprägte Neutrophilie, wie sie insbesondere im Rahmen von bakteriellen Infektionserkrankungen zu erwarten ist, und die bei der Sepsis-Kohorte im Vergleich zur Infektion-Kohorte stärker ausgeprägt war. Das Blutbild aller Kontrollproband:innen war normwertig und lieferte keine Hinweise auf das Vorliegen einer Infektionserkrankung. Alle in diesem Kapitel beschriebenen pathologischen Befunde sind

ERGEBNISSE

typische laborchemische Veränderungen im Rahmen von Infektionserkrankungen und Sepsis und bestätigen eine korrekte Rekrutierung der Studienkohorten.

Tabelle 10: Zentrallabordaten und Score-Werte der Patient:innenkohorten.

Laborwerte von Patient:innen mit Infektion (Inf) oder Sepsis (Sep) werden zu dem Zeitpunkt des Studieneinschlusses (t_1) und 5-7 Tage nach Studieneinschluss (t_2) dargestellt. Fettgedruckte Werte liegen außerhalb des Referenzbereichs. Mit einem Asterisk (*) markierte Wertepaare innerhalb einer Zeile indizieren einen statistisch signifikanten Unterschied ($p < .05$) zwischen den Kohorten Sepsis und Infektion zum Zeitpunkt t_1 . Daten werden dargestellt als Mittelwert (\pm SD) oder Median [IQR]. Unterschiede für parametrische Daten wurden mittels t-Test für unverbundene Stichproben berechnet, Unterschiede für nicht-parametrische Daten mittels Mann-Whitney-U Test. INR = *International Normalized Ratio*; MCV, Mittleres korpuskuläres Volumen; MCH, Mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt; MCHC, Mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration; (q)SOFA, (*quick Sequential Organ Failure Assessment*); n/v, nicht verfügbar.

Blutwerte Zentrallabor [Referenzwerte]	Inf t_1 (n=12)	Inf t_2 (n=5)	Sep t_1 (n=13)	Sep t_2 (n=9)
Leukozyten [5-10 nl^{-1}]	16,4 [9,1-20,9]	8,9 [4,6-12,1]	16,1 [7,1-23,9]	10,4 [6,9-14,7]
Hämoglobin [14-18 g/dl]	12,1 (\pm2,4)	10,3 (\pm2,9)	10,4 (\pm2,2)	10,5 (\pm1,8)
Hämatokrit [42-50 %]	36 (\pm6)	31 (\pm8)	32 (\pm5)	32 (\pm4)
MCV [82-94 fl]	88 [83-90]	83 [56-86]	90 [80-93]	91 [84-95]
MCH [27-33 pg]	29,2 (\pm 2,3)	28,7 (\pm 3,8)	30,2 (\pm 2,6)	30,7 (\pm 2,8)
MCHC [32-36 g/l]	33 [32,6-34,7]	33,1 [31,5-64,5]	34 [32,5-35,4]	32,4 [31,7-34,4]
INR [0,85-1,18]	1,1 [1,0-1,5]	1,2 [1,0-1,7]	1,3 [1,1-1,5]	1,0 [0,9-1,2]
Harnstoff [10-50 mg/dl]	48 (\pm 27)*	40 (\pm 25)	85 (\pm37)*	60 (\pm28)
Laktat [0,5-2,2 mmol/l]	1,5 [1,1-1,8]	n/v	1,6 [1,2-2,5]	0,7 [0,6-1,2]
C-reaktives Protein (CRP) [0-0,5 mg/dl]	10,2 (\pm5,9)*	10,6 (\pm9,6)	23,5 (\pm11)*	11,8 (\pm7,2)
Procalcitonin (PCT) [0-0,5 ng/ml]	0,47 [0,15-8,34]*	n/v	4,53 [3,57-39,3]*	n/v
Kreatinin [0-1,17 mg/dl]	1,2 (\pm0,3)*	0,9 (\pm 0,3)	2,0 (\pm0,9)*	1,2 (\pm0,6)
Bilirubin [0,1-1,2 mg/dl]	0,6 (\pm 0,2)	1,0 (\pm 1,3)	0,8 (\pm 0,3)	0,9 (\pm 0,9)
Scores				
SOFA-Score	1 [0-1]	1 [0,5-1]	8 [3,5-9]	3 [1-6,5]
qSOFA-Score	0 [0-1]	n/v	2 [2-3]	n/v

Tabelle 11: Blutbild (Sysmex KX-21).

Blutwerte aus Citrat-Vollblut von Patient:innen mit Infektion (Inf) oder Sepsis (Sep) wurden zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses (t_1) und 5-7 Tage nach Studieneinschluss (t_2) gemessen. Fettgedruckte Werte liegen außerhalb des Referenzbereichs. Daten werden dargestellt als Mittelwert (\pm SD) oder Median [IQR]. Referenzwerte entstammen dem Sysmex KX-21 Operator's Manual.

Blutbild Sysmex [Referenzwerte]	Kontrolle (n=28)	Inf t_1 (n=12)	Inf t_2 (n=5)	Sep t_1 (n=13)	Sep t_2 (n=9)
Leukozyten [2,6-8,8 nl^{-1}]	6,1 [5,5-6,8]	13,7 [6,6-18,0]	7,7 [4,1-10,2]	11,5 [6,9-18,1]	9,0 [5,1-12,9]
Neutrophile [38,3-69 %]	63,6 [59,2-75,5]	86,0 [81,1-92,3]	77,1 [56,4-81]	91,5 [87,7-95,0]	80,3 [77,3-83]
Lymphozyten [17,5-47,9 %]	30,0 [25,8-34,7]	10,9 [6,2-13,6]	21,0 [13,6-33,0]	5,4 [2,1-7,2]	12,4 [10,6-15]
Basophile, Eosinophile, Monozyten [1,9-24,6 %]	6,6 [5,9-7,6]	2,5 [1,7-5,2]	4,4 [2,2-8,4]	3,1 [1,4-5,0]	6,3 [3,5-8,7]
Hämatokrit [32-47 %]	38,9 (\pm 2,8)	31,9 (\pm4,7)	29,6 (\pm7,5)	28,8 (\pm4,5)	30,7 (\pm3,9)

3.2 Analyse des Thrombozytenphänotyps

3.2.1 Verringerte Thrombozytenzahlen und erhöhtes MPV bei Sepsis

Die Thrombozytenzahl ist ein Parameter des SOFA-Scores und damit ein diagnoserelevantes Merkmal, das zur Unterscheidung einer Infektion von einer Sepsis herangezogen wird [1]. Die Thrombozytenzahlen unserer Patient:innenkohorten wurden vom Zentrallabor des UKW aus EDTA-Vollblut bestimmt (Abbildung 9A). Zum Zeitpunkt t_1 waren die mittleren Thrombozytenzahlen der Infektion- und Sepsis-Kohorte vergleichbar (246 nl^{-1} [IQR 174-286] vs. 203 nl^{-1} [IQR 94-260]); $p=.21$). Das Blutbild von zwei Infektions-Patient:innen und fünf Sepsis-Patient:innen wies eine Thrombozytopenie auf, wohingegen zwei Infektions-Patient:innen und eine Sepsis-Patient:in eine Thrombozytose aufwies. Die mittlere Thrombozytenzahl unterschied sich in beiden Kohorten zwischen den beiden Messzeitpunkten t_1 und t_2 nicht (Inf: 246 vs. 169, $p=.64$; Sep: 203 vs. 171, $p=.81$). Ergänzend wurde die individuelle Entwicklung der Thrombozytenzahl jeder Studienpatient:in für die ersten 10 Tage nach Studieneinschluss retrospektiv den Patient:innenakten entnommen und analysiert (Abbildung 21, Appendix). Die Regressionsgeraden beider Patient:innenkohorten deuten auf einen leichten Anstieg der Thrombozytenzahlen im Therapieverlauf hin ($p=.16$; $p=.15$), unterscheiden sich aber untereinander nicht signifikant ($p=.86$).

Eine Erhöhung des Mittleren Thrombozytenvolumens (MPV) kann auf eine gesteigerte Thrombopoese im Knochenmark hindeuten. Zum Zeitpunkt t_1 wies ein Drittel der Sepsis-Kohorte bezogen auf den Referenzbereich ein erhöhtes MPV auf, wohingegen 50% der Infektion-Kohorte ein verringertes MPV aufwiesen (Abbildung 9B). Das mittlere MPV der Sepsis-Kohorte lag höher als das der Infektion-Kohorte (11,4 vs. 9,7 fl; $p=.02$). Diese Ergebnisse deuten auf eine gesteigerte Thrombopoese der Sepsis-Kohorte hin.

Zusammenfassend zeigten Patient:innen mit Sepsis häufiger und ausgeprägtere Thrombozytopenien als Patient:innen mit Infektion, sowie Hinweise auf eine erhöhte Thrombopoese. Gleichzeitig waren die Thrombozytenzahlen der Patient:innenkohorten aufgrund ihrer großen Varianz kein guter Diskriminator zwischen Patient:innen mit Infektion und Sepsis.

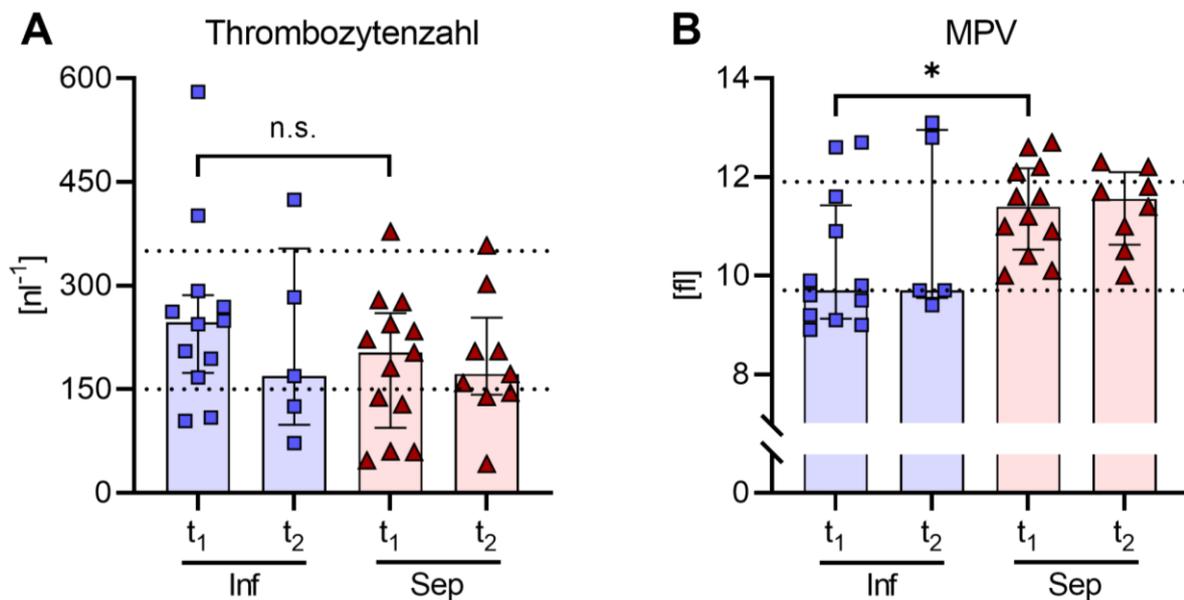


Abbildung 9: Verringerte Thrombozytenzahlen und erhöhtes MPV bei Sepsis.

Die Zentrallaborwerte von Patient:innen mit Infektion (Inf) oder Sepsis (Sep) wurden zu dem Zeitpunkt des Studieneinschlusses (t_1) und 5-7 Tage nach Studieneinschluss (t_2) dokumentiert. (A) Thrombozytenzahl. (B) Mittleres Thrombozytenvolumen (*mean platelet volume*, MPV). (A,B) Gestrichelte Linien kennzeichnen den parameterspezifischen Referenzbereich; Graphen zeigen Median \pm IQR; Unterschiede wurden mittels Mann-Whitney-U-Test analysiert. n.s., nicht signifikant; * $p < .05$; nl, Nanoliter; fl, Femtoliter.

3.2.2 Hinweise auf erhöhtes Rezeptoren-*Shedding* bei Sepsis

Ein ausgeprägtes Defizit oder das komplette Fehlen von Oberflächenrezeptoren auf Thrombozyten kann Auswirkungen auf die Thrombozytenfunktion haben. Außerdem ist von einigen Rezeptoren bekannt, dass ihre Ektodomäne unter bestimmten Umständen mittels *Shedding* z.B. durch die Metalloproteasen ADAM10/17 von der Zelloberfläche abgestoßen werden können [126]. Aus diesem Grund wurde die Rezeptorausstattung der Thrombozyten von Patient:innen aller Kohorten mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Die Kohorten zeigten zum Zeitpunkt t_1 keinen Unterschied in der Exposition von Integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$ ($p=.82$; Abbildung 10A), Integrin β_3 ($p=.71$; Abbildung 10B), Integrin β_1 ($p=.74$; Abbildung 10C) und CLEC-2 ($p=.85$; Abbildung 10H). Bezüglich der Komponenten des vWF-Rezeptorkomplexes GPIb-IX-V wiesen die Sepsis-Kohorte im Vergleich zur Kontrollgruppe eine erhöhte Expression von GPIX ($p=.03$; Abbildung 10F) und verringerte Expression von GPV ($p=.03$; Abbildung 10E) auf. Im Vergleich zur Kontroll-Kohorte war in der Sepsis-Kohorte GPIb α ($p=.19$; Abbildung 10D) und GPVI ($p=.21$; Abbildung 10G) tendenziell verringert. Zwischen den Zeitpunkten t_1 und t_2 waren alle untersuchten Rezeptorexpressionen beider Patient:innen-Kohorten vergleichbar.

Diese Ergebnisse lassen sich im Sinne einer normwertigen Ausstattung der Thrombozyten von Patient:innen aller Kohorten bezüglich des Kollagenrezeptors Integrin β_1 , Podoplaninrezeptors CLEC-2 und Fibrinogenrezeptors Integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$ interpretieren. Die reduzierte Expression von GPV, und tendenziell auch von GPIb α und GPVI, deutet auf ein vermehrtes *Shedding* dieser Rezeptoren bei Sepsis hin. Die erhöhte GPIX-Expression könnte auf ein erhöhtes MPV oder auf einen kompensatorischen Anstieg zurückzuführen sein, da GPIX als einzige der gemessenen Komponenten des vWF-Rezeptorkomplexes keinem *Shedding* unterliegt.

ERGEBNISSE

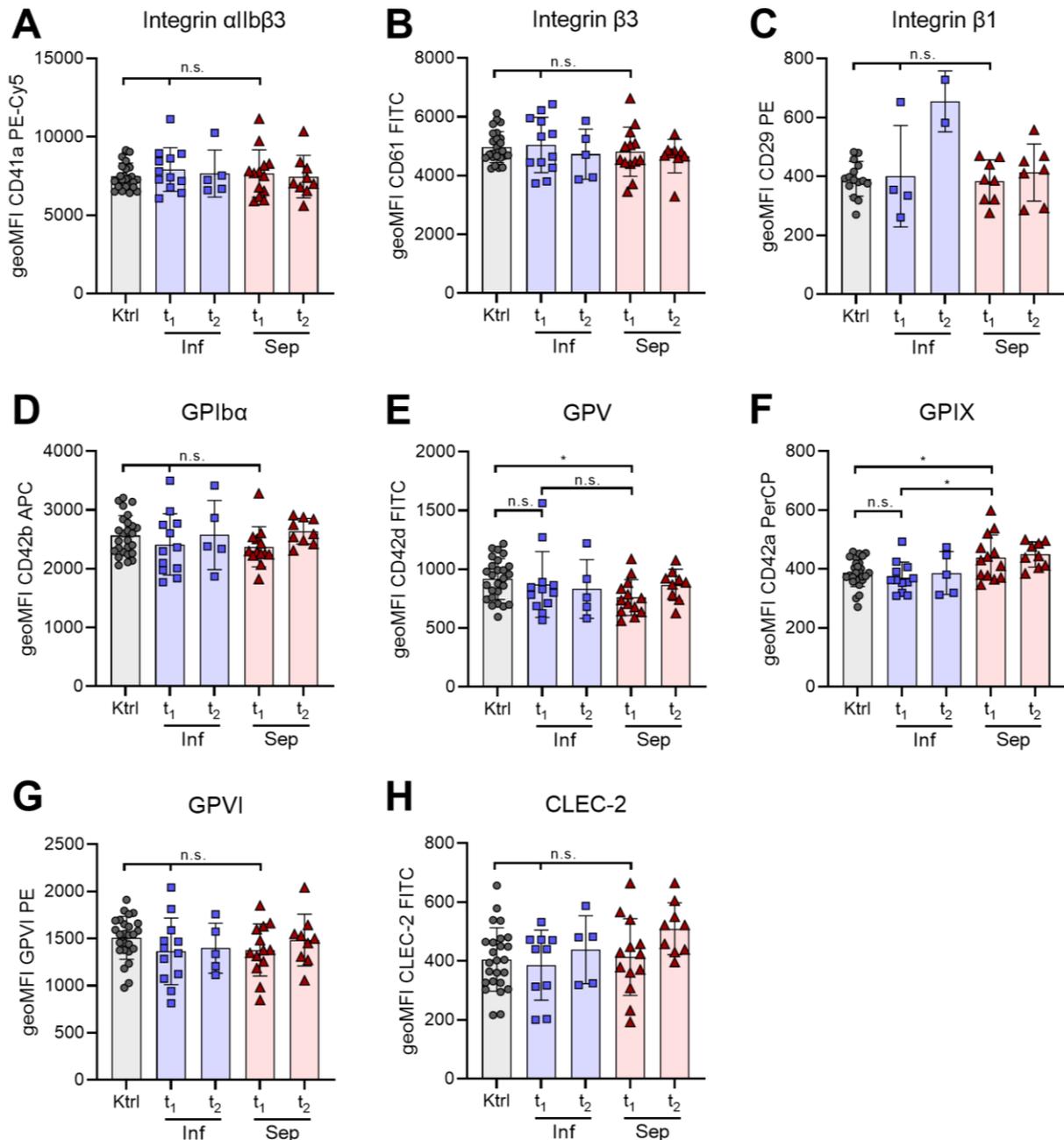


Abbildung 10: Hinweise auf erhöhtes Rezeptoren-Shedding bei Sepsis.

Die Expression wichtiger Thrombozytenrezeptoren wurde mittels Durchflusszytometrie im Citratblut von gesunden Proband:innen (Ktrl), Patient:innen mit Infektion (Inf) oder Sepsis (Sep) zu den Zeitpunkten des Studieneinschlusses (t_1) und 5-7 Tage nach Studieneinschluss (t_2) quantifiziert. (A) Integrin α IIb β 3. (B) Integrin β 3. (C) Integrin β 1. (D) GPIba. (E) GPV. (F) GPIX. (G) GPVI. (H) CLEC-2. (A,C,F) Graphen zeigen Median \pm IQR; Unterschiede wurden mittels Kruskal-Wallis-Test analysiert. (B,D,E,G,H) Graphen zeigen Mittelwert \pm SD; Unterschiede wurden mittels einfacher Varianzanalyse, Tukey's Test und t-Test analysiert. n.s., nicht signifikant. * p <.05. geoMFI, *geometric mean fluorescence intensity*; APC, Allophycocyanin; FITC, Fluoresceinisothiocyanat; PE, Phycoerythrin; PerCP, Peridinin Chlorophyll Protein.

3.2.3 Analyse der Desialylierung von Thrombozyten

3.2.3.1 Etablierung des Lektin-Assays

Zum Zeitpunkt der Studienkonzeption lag für die durchflusszytometrische Untersuchung der Desialylierung humaner Thrombozyten kein laborintern etabliertes Protokoll zur Verfügung. Da die Zugabe von Lektinen zu Vollblutproben zur Koagulation führt, wurden sämtliche Untersuchungen in PRP durchgeführt.

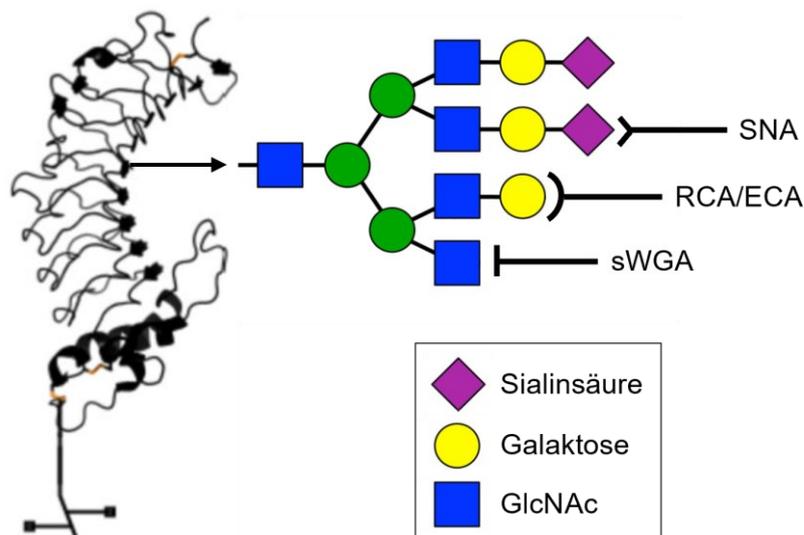


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Lektinbindung.

SNA, *Sambucus nigra* Lektin; RCA-I, *Ricinus communis* Agglutinin I; ECA, *Erythrina cristagalli* Lektin; sWGA, *succinylated wheat germ* Agglutinin; GlcNAc, N-Acetylglucosamin.

Bestimmung der Lektinkonzentrationen

Zur Festlegung der optimalen Konzentrationen der Lektine SNA, RCA-I, ECA und sWGA zur quantitativen Untersuchung endständig gebundener Sialinsäure, Galaktose und N-Acetylglucosamins auf Thrombozyten (Abbildung 11), wurden Messungen mit unterschiedlichen Lektinkonzentrationen an Thrombozyten gesunder Proband:innen durchgeführt. Als Orientierungspunkt dienten die Herstellerangaben, die eine Lektinkonzentration zwischen 5-20 µg/ml empfehlen. Das repräsentative Beispiel der Messwerte von SNA zeigt, dass die Menge auf Thrombozyten gebundener Lektine annähernd linear mit zunehmender Lektinkonzentration anstieg und auch bei achtfacher Dosis der Herstellerempfehlung (160 µg/ml) noch keinen Sättigungsbereich erreichte (Abbildung 12A). Für die Lektine RCA-I, ECA und sWGA ergaben sich vergleichbare Ergebnisse (Daten nicht abgebildet). Damit weisen Lektine ein grundlegend anderes Bindungsverhalten als Antikörper auf. Eine mögliche Ursache dafür, dass ein Sättigungsbereich, in dem alle Lektin-Bindestellen

besetzt sind, nicht bestimmt werden konnte, sind unspezifische Lektinbindungen bei hohen Konzentrationen. Trotz fehlenden Sättigungsbereiches erschienen interindividuelle Messwerte bei identischer Lektinkonzentration vergleichbar. Für das Untersuchungsprotokoll wurden Lektinkonzentrationen im Bereich der Herstellerempfehlungen gewählt. Zur Vermeidung möglicher Messungenauigkeiten bei sehr hohen oder sehr niedrigen geoMFI-Werten, wurden für SNA, RCA-I und ECA 20 µg/ml und für sWGA 5 µg/ml als Standard festgelegt.

Bestimmung der Inkubationszeit

Die Inkubationszeit der Lektine in PRP vor der durchflusszytometrischen Messung wurde durch kinetische Untersuchungen der Lektinbindung festgelegt. Dazu wurde mit CD41a-Antikörpern markiertes PRP eines gesunden Probanden vor Zugabe eines Lektins für zwei Minuten am Durchflusszytometer gemessen (Baseline-Messung), anschließend ein Lektin in Standard-Konzentration hinzugegeben und die durchflusszytometrische Messung unmittelbar für 20 Minuten fortgesetzt. An der Messkurve des Lektins ECA (Abbildung 12B) zeigte sich exemplarisch, dass die Menge gebundenen Lektins direkt nach Zugabe steil anstieg und nach circa 10 Minuten ein Plateau erreichte. Für RCA-I und SNA lag dieser Zeitpunkt der Plateaubildung bei circa 8 Minuten und für sWGA bei circa 5 Minuten. Diesen Ergebnissen folgend wurde die Inkubationszeit für das Untersuchungsprotokoll zur Messung der Lektinbindung aller verwendeten Lektine konservativ auf 15 Minuten festgelegt.

Kontrolle des Störfaktors Thrombozytopenie

Da zahlreiche Sepsis- und Infektionspatient:innen eine Thrombozytopenie aufweisen, wurde untersucht, ob die Thrombozytenkonzentration der zu untersuchenden Blutprobe einen Einfluss auf die gebundene Lektinmenge hat. Dazu wurden zunächst SNA, RCA-I, ECA und sWGA in PRP von gesunden Proband:innen durchflusszytometrisch gemessen (Abbildung 12C; 100% Thrombozytenkonzentration). Zur Reduktion der Thrombozytenkonzentration wurde PRP mit thrombozytenarmem Plasma (*platelet poor plasma*, PPP) des jeweils gleichen Gesunderspenders im Verhältnis 1:1 (Thrombozytenkonzentration 50%) und 1:3 (Thrombozytenkonzentration 25%) verdünnt und die resultierenden Thrombozytenzahlen per Sysmex-Messung kontrolliert. Anschließend wurde die Lektinbindung in den verdünnten PRP-Proben durchflusszytometrisch quantifiziert. Die Menge gebundenen Lektins blieb bei sinkender Thrombozytenkonzentration annähernd konstant und damit unabhängig von der Thrombozytenzahl der zu untersuchenden Blutprobe (Abbildung 12C).

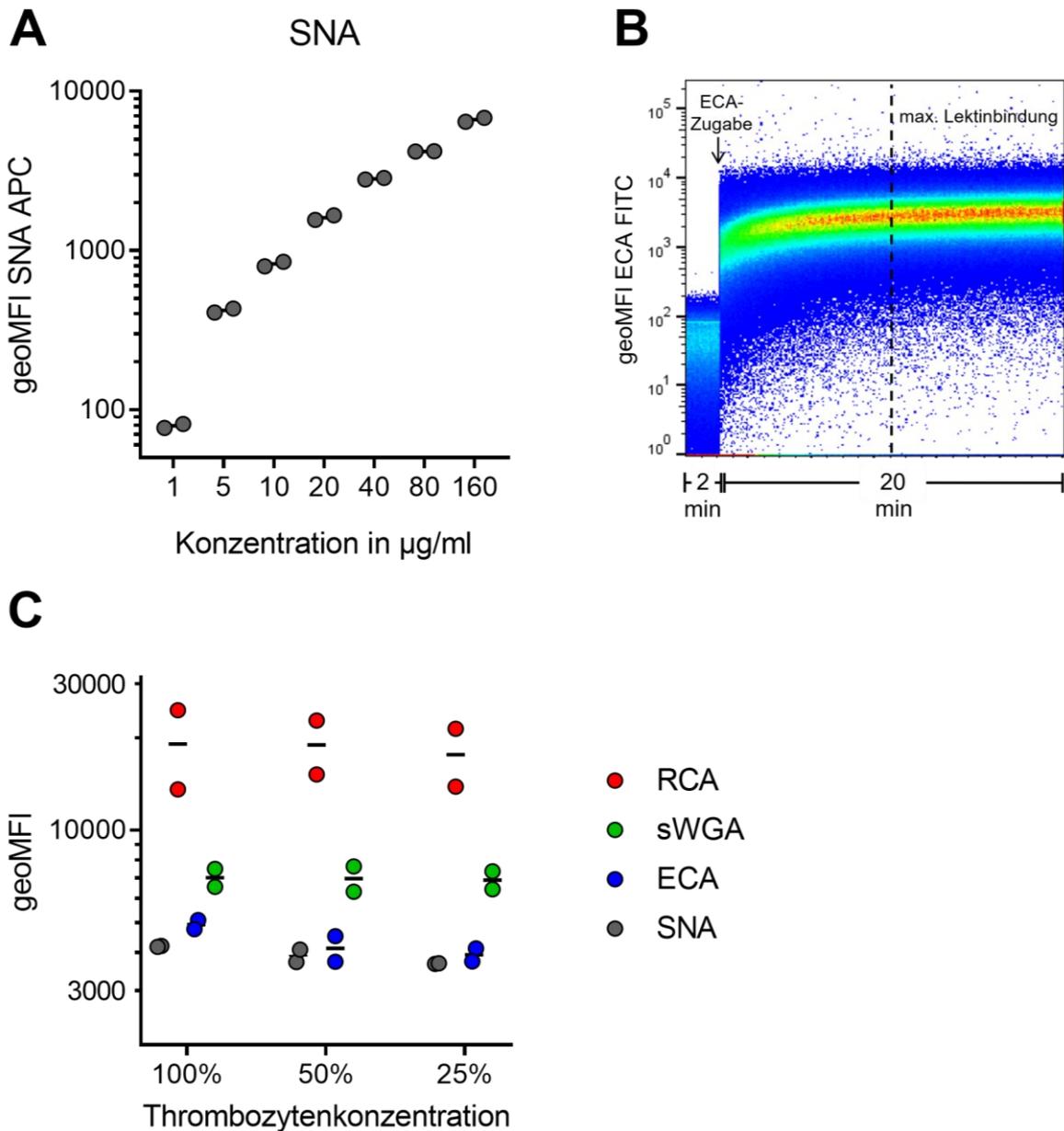


Abbildung 12: Etablierung des Lektin-Assays.

(A) Lektin-Titration für SNA bei durchflusszytometrischer Messung der Lektinbindung auf Thrombozyten zweier gesunder Proband:innen. (B) Kinetik der Lektinbindung des Lektins ECA auf Thrombozyten einer gesunden Proband:in. Der Farbverlauf (blau-grün-gelb-rot) repräsentiert die zunehmende Häufigkeit detektierter Thrombozyten bei entsprechendem geoMFI-Wert. (C) Menge gebundenen SNA (20 µg/ml, grau), RCA-I (20 µg/ml, rot), ECA (20 µg/ml, blau) und sWGA (5 µg/ml, grün) auf Thrombozyten zweier Proband:innen bei unterschiedlichen Thrombozytenkonzentrationen (100%, 50% und 25% der individuellen Thrombozytenzahl). (A,C) Balken zeigen Mittelwert; Y-Achse zeigt Werte in logarithmischer Darstellung. geoMFI, *geometric mean fluorescence intensity*; FITC, Fluoresceinisothiocyanat; APC, Allophycocyanin; SNA, *Sambucus nigra* Lektin; RCA-I, *Ricinus communis* Agglutinin I; ECA, *Erythrina cristagalli* Lektin; sWGA, *succinylated wheat germ* Agglutinin.

3.2.3.2 Thrombozyten sind bei Sepsis vermehrt desialyliert

Desialylierte Thrombozyten werden aus der Zirkulation u.a. über den hepatischen Ashwell-Morell-Rezeptor entfernt [70]. Eine verstärkte Desialylierung könnte folglich die Thrombozytopenie bei Sepsis begünstigen. Wir etablierten den Lektin-Assay, um in unseren Studienkohorten den Grad der Desialylierung von Thrombozyten bei Infektion und Sepsis zu analysieren. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob das Ausmaß der Desialylierung mit der Entwicklung der Thrombozytenzahl bei Infektion und Sepsis zusammenhängt.

Zum Zeitpunkt t_1 war die Menge an gebundenem SNA auf Thrombozyten bei Sepsis im Vergleich zur Kontroll-Kohorte signifikant reduziert (379 vs. 738 geoMFI; $p=.007$; Abbildung 13A), nicht aber auf Thrombozyten der Infektion-Kohorte (593 vs. 738 geoMFI; $p=.55$). Demgegenüber zeigten sich die Kohorten vergleichbar für die Menge an gebundenem RCA-I ($p=.31$; Abbildung 13B), ECA ($p=.85$; Abbildung 13C) und sWGA ($p=.49$; Abbildung 13D). Für keine Kohorte ergab sich auf Thrombozyten eine relevante Veränderung der Menge gebundener Lektine zwischen den Zeitpunkten t_1 und t_2 . Die Korrelation der SNA-Werte zum Zeitpunkt t_1 mit der Differenz der Thrombozytenzahl zwischen Tag 3 und Zeitpunkt t_1 zeigte einen geringen Zusammenhang für unsere Sepsis-Kohorte ($r=0.24$; $p=.47$; Abbildung 13F) und eine mittlere negative Korrelation für unsere Infektion-Kohorte ($r=-0.49$; $p=.15$).

Da die Messwerte der Lektinbindung auf Thrombozyten innerhalb unserer Kohorten eine breite Streuung aufwiesen, wurde der Zusammenhang der Menge gebundener Lektine mit der Menge exponierten GPIIb α , auf dem bekanntlich 80% der auf Thrombozyten gebundenen Sialinsäure lokalisiert ist [69], statistisch analysiert. Die Korrelationen zwischen Lektinbindung und exponiertem GPIIb α über alle Kohorten hinweg waren für alle untersuchten Lektine gering (SNA: $r=.10$, $p=.48$, Abbildung 13E; RCA: $r=-.08$, $p=.55$; ECA: $r=.29$, $p=.03$; sWGA: $r=.01$, $p=.95$).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Reduktion von gebundenem SNA auf Thrombozyten von Sepsis-Patient:innen auf eine vermehrte Desialylierung bei Sepsis hindeutet. Mit dem Verlust endständig-gebundener Sialinsäure wäre allerdings gleichzeitig eine vermehrte Detektion exponierter Galaktosereste zu erwarten, die sich in den Messdaten durch einen Anstieg gebundenen RCA-I und ECA darstellen würde. Unsere Daten zeigen einen derartigen Anstieg jedoch weder für RCA-I noch ECA. Die unerwartet breite Streuung unserer Lektin-Messwerte innerhalb der Kohorten (v.a. von RCA-I und ECA) ließ sich nicht durch interindividuelle Unterschiede der Menge exponierten GPIIb α auf der Thrombozytenoberfläche erklären. Abschließend erwies sich das Ausmaß der Desialylierung bei Sepsis nicht als guter Prädiktor für die Entwicklung der Thrombozytenzahl in den beiden Tagen nach Zeitpunkt t_1 .

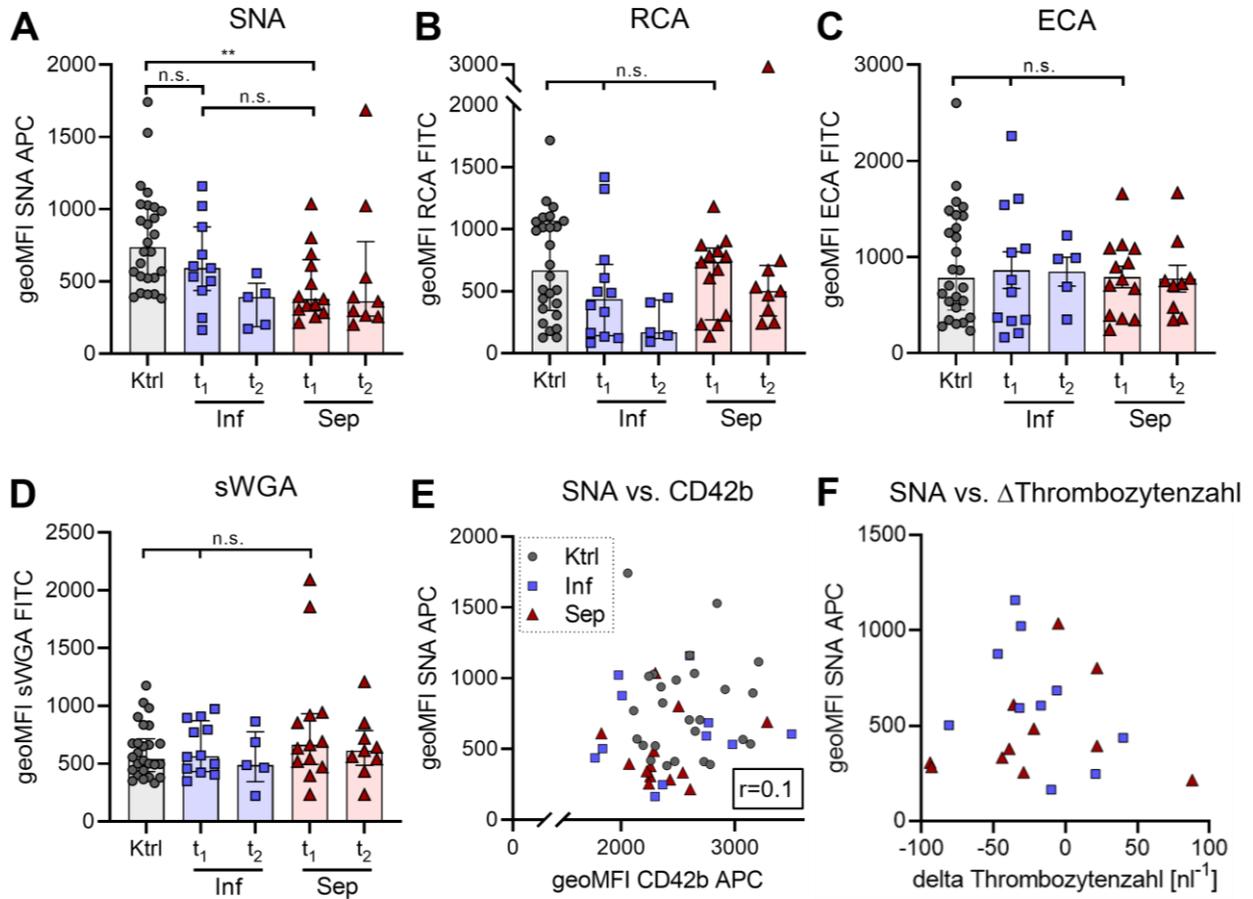


Abbildung 13: Thrombozyten sind bei Sepsis vermehrt desialyliert.

Die Thrombozytenglykosilierung wurde mittels Durchflusszytometrie im PRP von gesunden Proband:innen (Ktrl) und Patient:innen mit Infektion (Inf) oder Sepsis (Sep) zu den Zeitpunkten des Studieneinschlusses (t_1) und 5-7 Tage nach Studieneinschluss (t_2) analysiert. Gemessen wurde die Exposition (A) endständiger Sialinsäure mittels SNA (20 $\mu\text{g/ml}$), (B,C) endständiger Galaktose mittels RCA-I (20 $\mu\text{g/ml}$) und ECA (20 $\mu\text{g/ml}$), sowie (D) endständiger N-Acetylglucosamin mittels sWGA (5 $\mu\text{g/ml}$). (A-D) Graphen zeigen Median \pm IQR; Unterschiede wurden mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunn's Test analysiert. (E) Intraindividuelle Korrelation zwischen SNA und GPIb α für alle Kohorten zum Zeitpunkt t_1 . (F) Intraindividuelle Korrelation zwischen SNA-Werten (zum Zeitpunkt t_1) und der Differenz zwischen den Thrombozytenzahlen von Tag 3 und t_1 für Infektion und Sepsis. n.s., nicht signifikant. $**p < .01$. geoMFI, *geometric mean fluorescence intensity*; FITC, *Fluorescein isothiocyanat*; APC, *Allophycocyanin*; SNA, *Sambucus nigra* Lektin; RCA-I, *Ricinus communis* Agglutinin I; ECA, *Erythrina cristagalli* Lektin; sWGA, *succinylated wheat germ* Agglutinin.

3.3 Analyse der Thrombozytenfunktion unter statischen Bedingungen

3.3.1 Thrombozyten entwickeln einen δ -Granula-Defekt über das Infektion-Sepsis Kontinuum hinweg

Die Sekretion von δ -Granula und Freisetzung ihrer Inhalte ist elementarer Bestandteil der Thrombozytenaktivierung. Das aus δ -Granula freigesetztes ADP fördert nach der initialen Aktivierung die weitere Aggregation der Thrombozyten, was auch als *second wave* bezeichnet wird. Nachdem im Rahmen unserer Pilotstudie bereits ein δ -Granula-Defekt bei Patient:innen im Septischen Schock festgestellt wurde, sollte nun mittels Mepacrin-Assay evaluiert werden, wie sich dieser Defekt über das Infektion-Sepsis-Kontinuum hinweg darstellt. Das Antiprotozoikum Mepacrin reichert sich dabei während der Inkubationszeit selektiv in δ -Granula an und lässt sich nachfolgend aufgrund einer Eigenfluoreszenz im FITC-Kanal durchflusszytometrisch quantifizieren.

Zum Zeitpunkt t_1 zeigte sich ein ausgeprägtes Mepacrin-Beladungsdefizit der Thrombozyten der Sepsis-Kohorte von 40% im Vergleich zur Kontrollgruppe (98 geoMFI vs. 164 geoMFI; $p < .0001$; Abbildung 14A/B) und der Infektion-Kohorte von 16% im Vergleich zur Kontrollgruppe (138 vs. 164 geoMFI; $p = .13$). Die Mepacrin-Beladung war sowohl bei Infektion (138 vs. 112 geoMFI; $p = .02$) als auch Sepsis (98 vs. 84 geoMFI; $p = .02$) zum Zeitpunkt t_2 geringer als zum Zeitpunkt t_1 . Die absolute Menge abgegebenen Mepacrins nach Zugabe des Thrombinrezeptor-Agonisten TRAP-6 ergab ein ausgeprägtes Abgabedefizit der Sepsis-Kohorte zum Zeitpunkt t_1 im Vergleich zur Kontrollgruppe (40,6 vs. 89 geoMFI; $p = .0001$; Abbildung 14C). Aufgrund der interindividuell unterschiedlichen Mepacrin-Beladung wurde für eine aussagekräftige Beurteilung der δ -Degranulation die relative Mepacrin-Abgabe als Quotient aus absoluter Mepacrin-Abgabe und Mepacrin-Beladung berechnet (Abbildung 14D). Die relative Mepacrin-Abgabe der Sepsis-Kohorte war im Vergleich zur Kontrollgruppe verringert, verfehlte das Signifikanzniveau aber knapp (41,5% vs. 53,5%; $p = .06$).

Diese Ergebnisse lassen mit zunehmender Schwere der Infektionserkrankung eine progressive Reduktion in Thrombozyten gespeicherter δ -Granula vermuten. Dabei bleibt zu beachten, dass der Mepacrin-Assay eine indirekte Methode zur Quantifizierung der δ -Granula darstellt. Eine genaue Quantifizierung der δ -Granula kann mittels Transmissions-elektronenmikroskopie erfolgen. Aus funktionaler Sicht deutete sich bei der δ -Degranulation der Sepsis-Kohorte nach Agonistenzugabe eine leichtgradige Hyporeaktivität an.

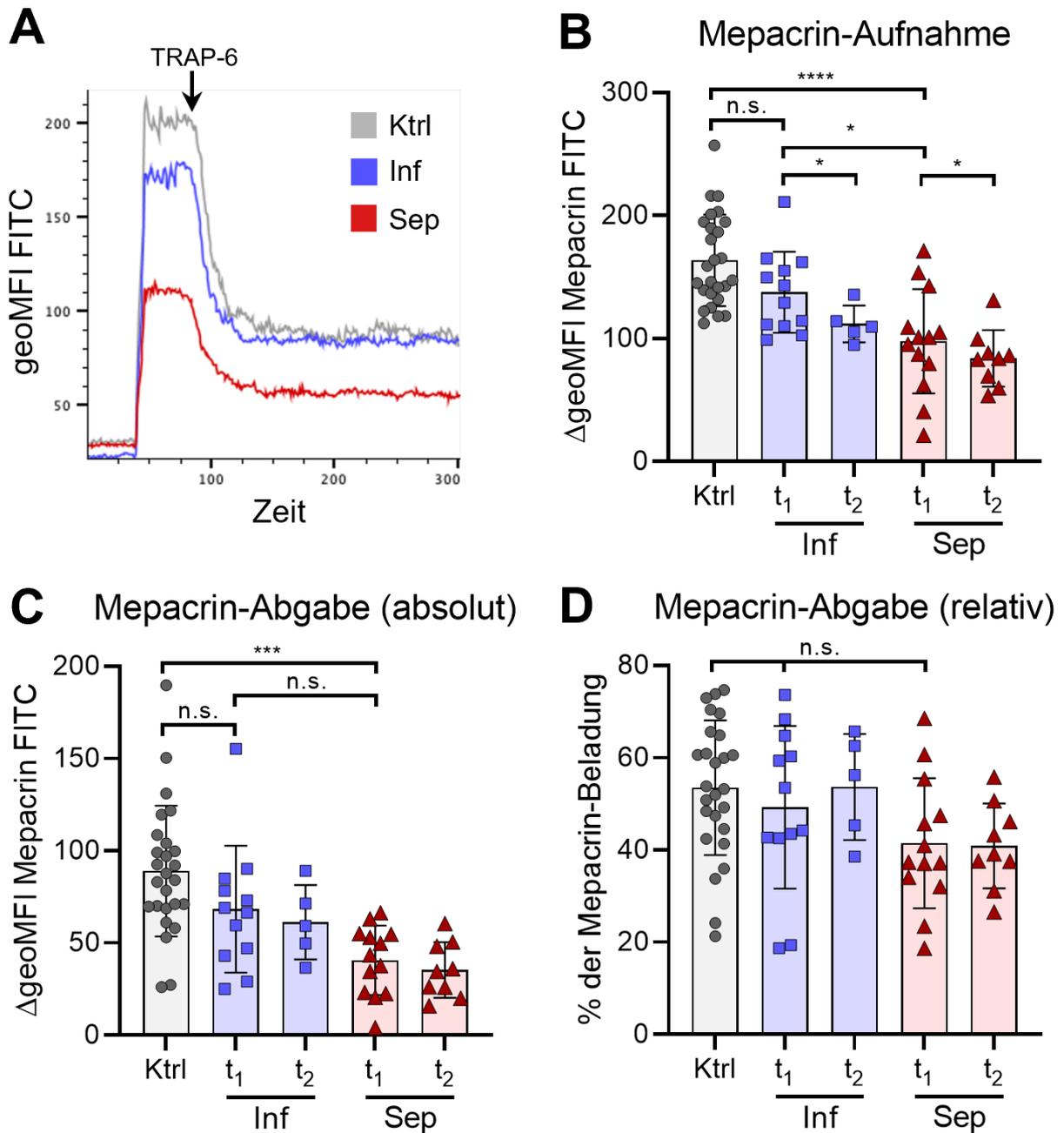


Abbildung 14: Thrombozyten entwickeln einen δ -Granula-Defekt über das Infektion-Sepsis-Kontinuum hinweg.

Die Menge an δ -Granula und deren Degranulation nach Zugabe von TRAP-6 (5 μ M) wurde indirekt mittels Mepacrin-Assay bei gesunden Proband:innen (Ktrl), Patient:innen mit Infektion (Inf) oder Sepsis (Sep) zu den Zeitpunkten des Studieneinschlusses (t₁) und 5-7 Tage nach Studieneinschluss (t₂) untersucht. (A) Repräsentative durchflusszytometrische Messkurven. (B) Mepacrin-Aufnahme berechnet als Differenz zwischen Baseline-Messung und Mepacrin-Beladung. (C) Mepacrin-Abgabe in absoluten Δ geoMFI-Werten (Differenz zwischen Mepacrin-Beladung vor Agonistenzugabe und 180 Sekunden nach Agonistenzugabe). (D) Relative Mepacrin-Abgabe berechnet als Quotient aus absoluter Mepacrin-Abgabe und Mepacrin-Beladung. (B-D) Graphen zeigen Mittelwert \pm SD; Unterschiede wurden mittels einfacher Varianzanalyse, Tukey's Test und t-Test analysiert. n.s., nicht signifikant; * $p < .05$; *** $p < .001$; **** $p < .0001$. Δ geoMFI, *delta geometric mean fluorescence intensity*; FITC, Fluoresceinisothiocyanat.

3.3.2 Bei Infektion und Sepsis aktivierte Thrombozyten zirkulieren nicht frei

Zur Beantwortung der Fragestellung, ob Thrombozyten bei Patient:innen mit Infektion oder Sepsis ein erhöhtes Aktivierungsniveau aufweisen, wurde die Quantität aktivierten Integrins $\alpha\text{IIb}\beta_3$ auf frei zirkulierenden Thrombozyten mittels PAC-1-Bindung durchflusszytometrisch gemessen. Der Antikörper PAC-1 bindet ausschließlich Integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$, das im Rahmen der Thrombozytenaktivierung eine Konformationsänderung durchlaufen hat. Zusätzlich wurde die Formation von PLAs als Marker der *in vivo* Thrombozytenaktivierung durch die durchflusszytometrische Bestimmung des prozentualen Anteils CD41/CD45-doppelpositiver Events an allen CD45-positiven Events analysiert [124].

Alle Kohorten wiesen zu beiden Messzeitpunkten äußerst niedrige Werte gebundenen PAC-1 auf (Abbildung 15A/B) und die Ergebnisse der Kontrollgruppe waren zum Zeitpunkt t_1 mit den Ergebnissen der Infektion-Kohorte (17 geoMFI vs. 23 geoMFI; $p=.99$) und Sepsis-Kohorte (17 geoMFI vs. 8 geoMFI; $p=.11$) vergleichbar. Eine vermehrte Bildung zirkulierender PLAs im Vergleich zur Kontrollgruppe ließ sich zum Zeitpunkt t_1 sowohl bei Patient:innen unserer Infektion-Kohorte (6,5% vs. 2,9%; $p<.001$; Abbildung 15C), als auch in unserer Sepsis-Kohorte (4,2% vs. 2,9%; $p=.013$) feststellen.

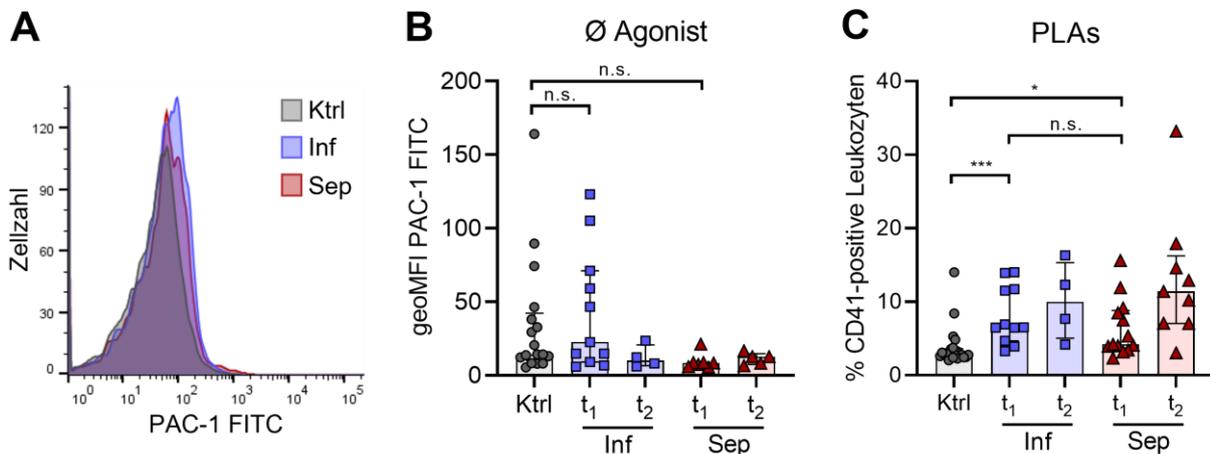


Abbildung 15: Bei Infektion und Sepsis aktivierte Thrombozyten zirkulieren nicht frei.

Die Analyse aktivierten Integrins $\alpha\text{IIb}\beta_3$ (PAC-1-Bindung) ohne vorherige Agonistenzugabe sowie PLA-Formation mittels Durchflusszytometrie erfolgte bei gesunden Proband:innen (Ktrl), Patient:innen mit Infektion (Inf) oder Sepsis (Sep) zu den Zeitpunkten des Studieneinschlusses (t_1) und 5-7 Tage nach Studieneinschluss (t_2). (A) Repräsentative durchflusszytometrische Messkurven der PAC-1-Bindung. (C) PLAs wurden in Prozent CD41+/CD45+ Events aller CD45+ Events angegeben. (B,C) Graph zeigt Median \pm IQR; Unterschiede wurden mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunn's Test analysiert. n.s., nicht signifikant; * $p<.05$, *** $p<.001$; geoMFI, *geometric mean fluorescence intensity*; FITC, Fluoresceinisothiocyanat; PLA, *platelet leukocyte aggregate*.

Diese Daten legen nahe, dass Thrombozyten bei Infektion und Sepsis nicht in einem (teil)aktivierten Zustand frei zirkulieren und *in vivo* aktivierte Thrombozyten folglich innerhalb

kurzer Zeit Aggregate mit Leukozyten bilden oder anderweitig aus der Zirkulation entfernt werden. Zugleich dient die Analyse der Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Voraktivierung als Baseline-Messung unserer im nachfolgenden Kapitel beschriebenen Untersuchung der Thrombozytenreaktivität nach Agonistenexposition.

3.3.3 Die Thrombozytenreaktivität ist bei Sepsis stärker beeinträchtigt als bei Infektion

Eine zentrale Fragestellung der vorliegenden Studie war, ob und in welchem Ausmaß sich die uns aus der Pilotstudie bekannte Hyporeaktivität der Thrombozyten bereits bei Patient:innen mit Infektion nachweisen lässt. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob tatsächlich der selektive GPVI-Agonist CRP-X_L der am besten geeignete Kandidat für einen Biomarker zur Sepsis-Früherkennung ist. Dazu wurde die Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Aktivierung (PAC-1-Bindung) der Thrombozyten nach Stimulation unterschiedlicher Rezeptoren mittels sechs Agonisten analysiert. Der Kollagenrezeptor GPVI wurde dabei zweifach mittels der Agonisten CRP-X_L und Convulxin untersucht. Hintergrund ist, dass GPVI auf ruhenden Thrombozyten überwiegend in Monomeren vorliegt und auf aktivierten Thrombozyten in Dimeren. Nur die dimere Form weist für Kollagene vom Typ I und III in physiologischen Konzentrationen eine hohe Affinität auf. Diese Eigenschaft wird durch den synthetischen Liganden CRP-X_L repliziert [127], wohingegen das Schlangengift Convulxin auch die monomere Form von GPVI mit hoher Affinität bindet [128].

Aufgrund der in Kapitel 2.2.4.5 geschilderten methodischer Schwierigkeiten konnten die Daten zahlreicher Messproben nicht für die Auswertung herangezogen werden (Tabelle 8). Die verbleibenden Messwerte zeigten für alle verwendeten Agonisten eine deutlich verringerte Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Aktivierung der Sepsis-Kohorte zum Zeitpunkt t_1 im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 16A-F). Mit Ausnahme der CRP-X_L-Messung einer Sepsispatient:in lagen für sämtliche Agonisten alle Messwerte der Sepsispatient:innen unterhalb des niedrigsten Messwertes der Kontrollgruppe. Die mittlere Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Aktivierung der Infektion-Kohorte ordnete sich für alle Agonisten zwischen die der Kontrollgruppe und die der Sepsis-Kohorte ein. Eine fast vollständige Abgrenzung der Messwerte der Sepsis-Kohorte von der Infektion-Kohorte ergab sich für den Agonisten ADP und die Kombination von ADP und U46619 (Abbildung 16E/F). Die Messwerte der Infektion-Kohorte zum Zeitpunkt t_2 wiesen für alle verwendeten Agonisten eine geringere, aber statistisch überwiegend nicht signifikante, mittlere Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Aktivierung auf als zum Zeitpunkt t_1 . Bei der Sepsis-Kohorte war die Thrombozytenreaktivität für alle Agonisten zwischen den beiden Messzeitpunkten t_1 und t_2 vergleichbar.

ERGEBNISSE

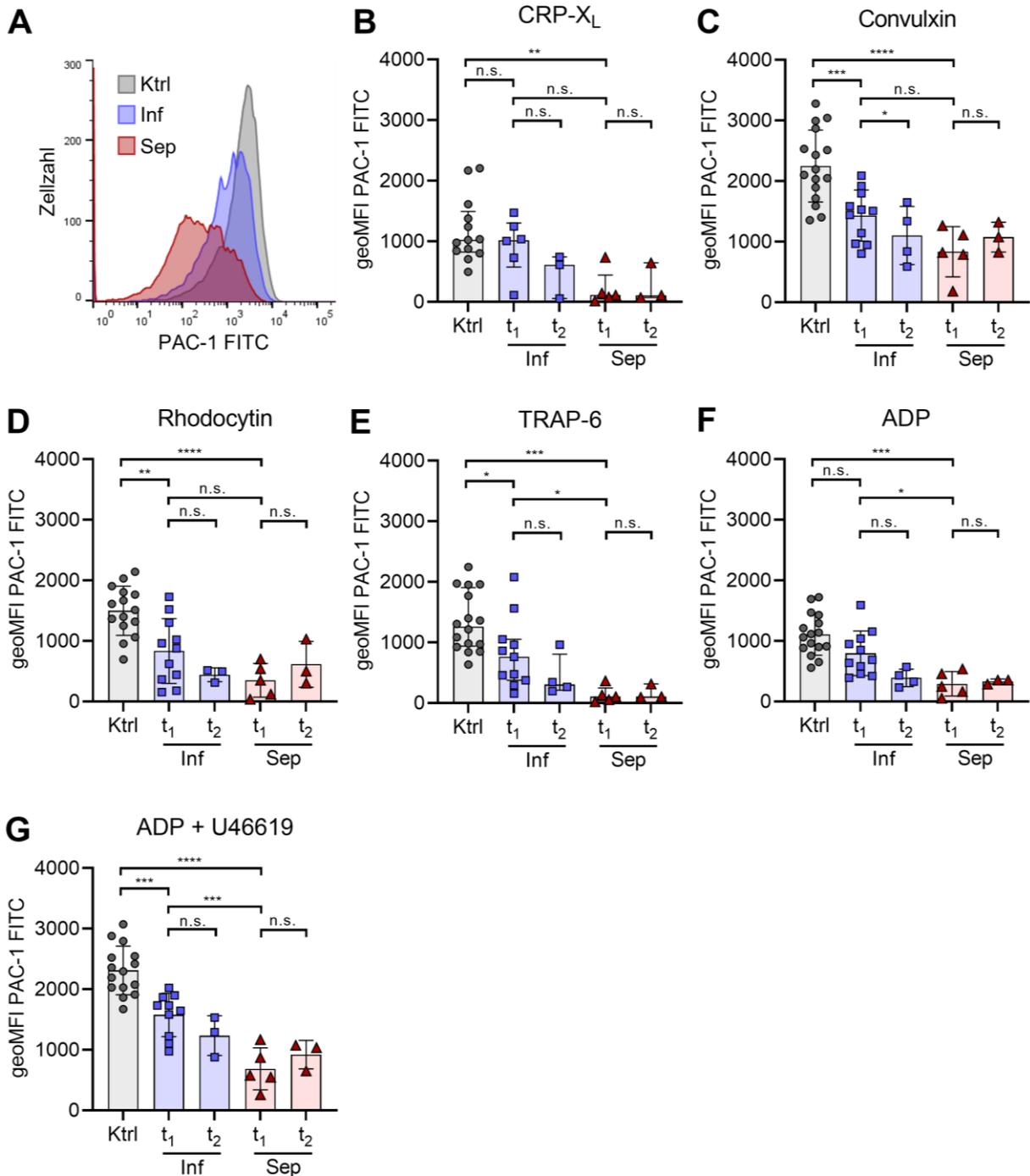


Abbildung 16: Die Thrombozytenreaktivität ist bei Sepsis stärker beeinträchtigt als bei Infektion.

Die Thrombozytenreaktivität wurde durchflusszytometrisch für gesunde Proband:innen (Ktrl) und Patient:innen mit Infektion (Inf) oder Sepsis (Sep) zu den Zeitpunkten des Studieneinschlusses (t₁) und 5-7 Tage nach Studieneinschluss (t₂) analysiert. Gemessen wurde die Integrin αIIbβ₃-Aktivierung nach Inkubation mit dem (B,C) GPVI-Agonisten CRP-X_L (0,01 µg/ml) und Convulxin (0,01 µg/ml), (D) CLEC-2-Agonisten Rhodocytin (10 nM), (E) PAR1-Agonisten TRAP-6 (5 µM), (F) P2Y_{1/12}-Agonisten ADP (5 µM) und (G) P2Y_{1/12}-Agonisten ADP (5 µM) + TXA₂-Rezeptoragonisten U46619 (2µM). (A) Repräsentative durchflusszytometrische Messkurven für ADP+U46619. (B) Graph zeigt Median ± IQR; Unterschiede wurden mittels Kruskal-Wallis-Test, Dunn's Test und Wilcoxon-Test analysiert. (C-G) Graphen zeigen Mittelwert ± SD; Unterschiede wurden mittels einfacher Varianzanalyse, Tukey's Test und t-Test analysiert. n.s., nicht signifikant. *p<.05, **p<.01, ***p<.001, ****p<.0001. geoMFI, *geometric mean fluorescence intensity*; FITC, *Fluoresceinisothiocyanat*; ADP, *Adenosindiphosphat*; CRP-X_L, *Cross-linked Collagen-Related Peptide*; TRAP-6, *Thrombin Receptor Activator Peptide 6*.

In der Zusammenschau zeigte sich, dass die Thrombozyten-Hyporeaktivität bereits bei hospitalisierten Patient:innen mit Infektionserkrankungen (SOFA-Score <2) detektierbar ist, aber im Vergleich zu Patient:innen mit Sepsis weniger ausgeprägt vorliegt. Die geringere mittlere Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Aktivierung der Infektion-Kohorte zum Zeitpunkt t_2 im Vergleich zu t_1 lässt sich vermutlich auf eine Patient:innenselektion zurückzuführen, da Infektionspatient:innen, die zum Zeitpunkt t_2 noch hospitalisiert waren, tendenziell auch schwerere Infektionsverläufe aufwiesen. Diese Hyporeaktivität konnte für alle verwendeten Agonisten dargestellt werden und betrifft folglich die Thrombozytenaktivierung mittels Kollagenrezeptor GPVI, Podoplaninrezeptor CLEC-2, Thrombinrezeptor PAR1, ADP-Rezeptoren $\text{P2Y}_{1/12}$, sowie den Thromboxan A₂-Rezeptor TXA₂-R. In der Konsequenz kann nicht mehr von einer selektiven GPVI-Dysfunktion, sondern von einer generalisierten Hyporeaktivität der Thrombozyten bei Infektion und Sepsis gesprochen werden, die sich auch unter maximaler Stimulation mittels zweier Agonisten (ADP + U46619) nicht reversibel zeigte.

3.3.3.1 Die Thrombozytenreaktivität ist ein vielversprechender Biomarker zur Sepsis-Früherkennung

Zur vorläufigen Beurteilung des diagnostischen Potenzials der durchflusszytometrisch quantifizierten Thrombozytenreaktivität für die Sepsis-Früherkennung wurden ROC (*receiver operating characteristics*)-Analysen für alle untersuchten Agonisten berechnet. Grundlage der Berechnung war die durchflusszytometrisch quantifizierte Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Aktivierung (PAC-1-Bindung) der Patient:innen mit Infektion und Sepsis zum Zeitpunkt t_1 . Für einen stichprobeninternen Vergleich wurden zudem ROC-Analysen für die diagnostischen Labormarker CRP, PCT und die Thrombozytenzahl erstellt.

Für alle verwendeten Agonisten ergab sich eine hohe *area under the curve* (AUC) von ≥ 0.80 (Tabelle 12, Abbildung 17). Mit einer AUC von 0.96 zeigten der Agonist TRAP-6 und die Agonistenkombination ADP+U46619 die höchsten Werte. Die niedrigsten Werte erzielten Rhodocytin (AUC 0.80) und Convulxin (AUC 0.85). Im Mittelfeld ordneten sich die Agonisten CRP-X_L (AUC 0.88) und ADP (AUC 0.89) ein. Im Vergleich dazu ergab sich für die Thrombozytenzahl als Parameter des SOFA-Scores nur eine AUC von 0.65 und für die beiden Labormarker C-reaktives Protein und Procalcitonin eine AUC von 0.89, bzw. 0.80.

Aufgrund der kleinen Stichprobengröße können die vorliegenden Ergebnisse lediglich als erste Orientierungshilfe bezüglich des diagnostischen Nutzens der durchflusszytometrisch gemessenen Thrombozytenreaktivität dienen. Dennoch zeichnet sich bereits ein hohes Potenzial für einige der Agonisten(kombinationen) wie z.B. TRAP-6 und ADP+U46619 ab. Eindrücklich ist derer Vergleich mit der sehr viel niedrigeren AUC der Thrombozytenzahl, die

ERGEBNISSE

als Parameter des SOFA-Scores bereits jetzt als Kriterium der Diskriminierung zwischen Infektion und Sepsis herangezogen wird.

Tabelle 12: ROC-Analysen für Infektion- und Sepsis-Kohorte zum Zeitpunkt t_1 .

ROC-Analyse wurden sowohl für die durchflusszytometrisch quantifizierte Integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$ -Aktivierung nach Thrombozytenstimulation mittels CRP-X_L, Convulxin, Rhodocytin, TRAP-6, ADP und ADP+U46619 berechnet, als auch für die Thrombozytenzahl, C-reaktives Protein und Procalcitonin. ADP, Adenosindiphosphat; AUC, *area under the curve*; CRP-X_L, *Cross-linked Collagen-Related Peptide*; ROC, *Receiver-operating characteristics*; TRAP-6; *Thrombin Receptor Activator Peptide 6*; KI, Konfidenzintervall.

Parameter	AUC	Standardfehler	95%-KI	P-Wert
CRP-X _L	0.88	0.10	0.68-1.00	0.036
Convulxin	0.85	0.10	0.66-1.00	0.027
Rhodocytin	0.80	0.11	0.57-1.00	0.062
TRAP-6	0.96	0.04	0.87-1.00	0.004
ADP	0.89	0.08	0.72-1.00	0.015
ADP + U46619	0.96	0.05	0.86-1.00	0.005
Thrombozytenzahl	0.65	0.11	0.43-0.87	0.201
C-reaktives Protein	0.89	0.08	0.74-1.00	0.001
Procalcitonin	0.80	0.12	0.57-1.00	0.035

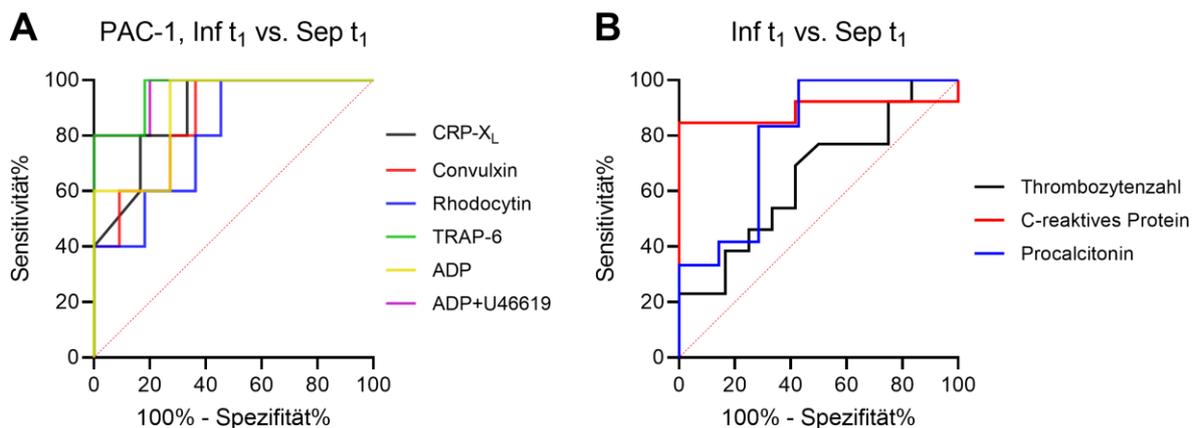


Abbildung 17: ROC-Kurven für die Infektion- und Sepsis-Kohorte zum Zeitpunkt t_1 .

ROC-Kurven für (A) Integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$ -Aktivierung (PAC-1 Bindung) nach Agonistenzugabe und (B) Thrombozytenzahl, C-reaktives Protein und Procalcitonin. ADP, Adenosindiphosphat; CRP-X_L, *Cross-linked Collagen-Related Peptide*; ROC, *Receiver-operating characteristics*; TRAP-6, *Thrombin Receptor Activator Peptide 6*.

3.3.3.2 Die Thrombozytenreaktivität korreliert deutlich mit SOFA-Score, Mepacrin-Abgabe und CRP

Zusätzlich wurde evaluiert, in welchem Zusammenhang die Thrombozytenreaktivität (TR) als unser potenzieller Biomarker zu anderen klinischen und laborchemischen Parametern und der Mepacrin-Entladung steht. Dazu wurde aufgrund ihres hohen Potenzials zur Diskriminierung zwischen Infektion- und Sepsis-Kohorte exemplarisch die Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Aktivierung (PAC-1 Bindung) nach Stimulation mittels der Agonistenkombination ADP+U46619 herangezogen, gegen klinische und laborchemische Parameter aufgetragen und Pearson-Korrelationskoeffizienten berechnet.

Niedrige Werte ergaben sich für die Korrelation der Thrombozytenreaktivität mit der Thrombozytenzahl ($r=0.17$; $p=.42$; Abbildung 18A), der Krankenhausverweildauer ($r=0.22$; $p=.42$; Abbildung 18E) und dem Procalcitonin-Spiegel ($r=-0.29$; $p=.33$; Abbildung 18C). Ein deutlicher Zusammenhang hingegen zeigte sich für die Thrombozytenreaktivität mit dem Entzündungsmarker C-reaktives Protein ($r=-0.50$; $p=.01$; Abbildung 18B), dem SOFA-Score ($r=-0.72$; $p=.002$; Abbildung 18D) und der relativen Mepacrin-Abgabe ($r=0.63$; $p=.001$; Abbildung 18F).

In der Zusammenschau der Ergebnisse fällt auf, dass die Thrombozytenreaktivität, trotz der hohen Korrelation mit dem SOFA-Score, mit der Thrombozytenzahl als einzelner Parameter des SOFA-Scores kaum zusammenhing. Überraschend ist zudem, dass die Plasmaspiegel des unspezifischen Entzündungsmarkers C-reaktives Protein eine deutlich höhere Korrelation mit der Thrombozytenreaktivität aufwies als der für bakterielle Infektionserkrankungen spezifischere Labormarker Procalcitonin. Die hohe Korrelation zwischen den durchflusszytometrischen Messwerten der Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Aktivierung und der Mepacrin-Abgabe jeweils nach Agonistenzugabe spricht dafür, dass beide Assays einen ähnlichen Funktionszustand der Thrombozyten testen.

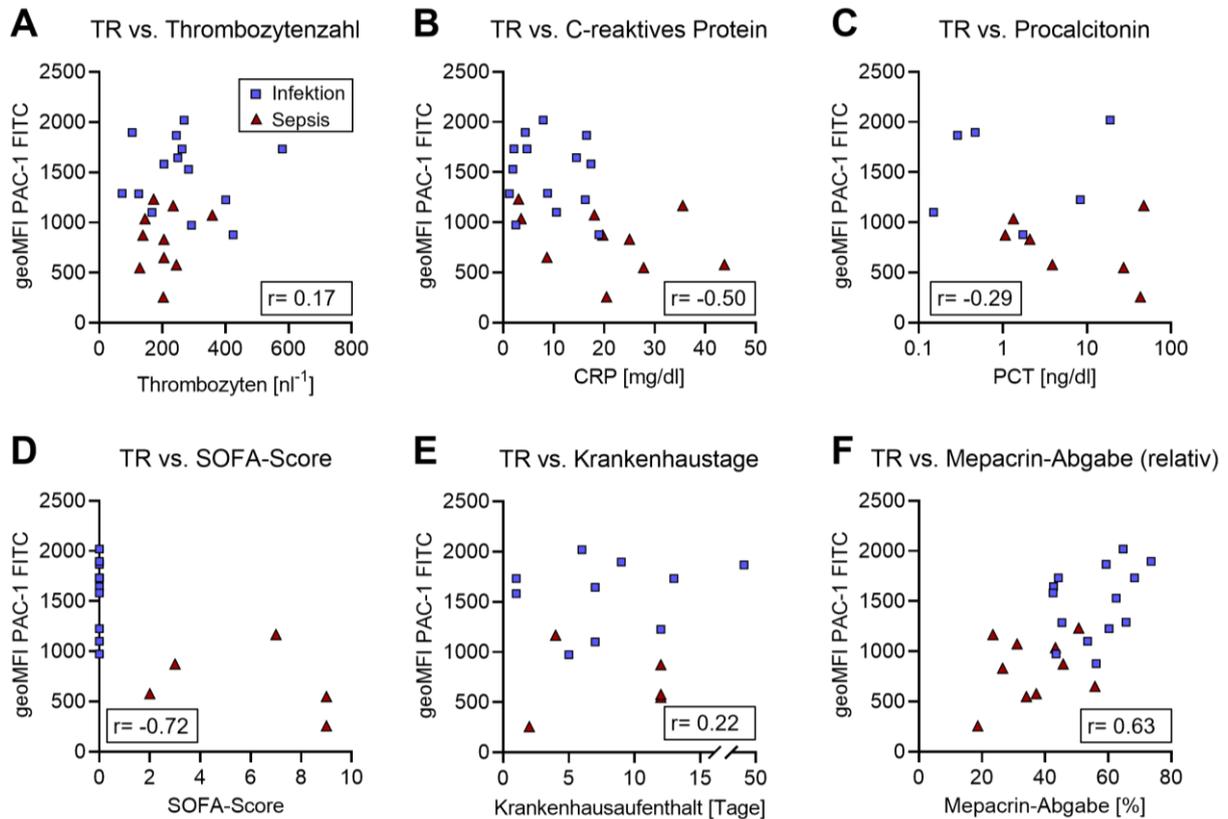


Abbildung 18: Thrombozytenreaktivität korreliert deutlich mit SOFA-Score, Mepacrin-Abgabe und CRP.

Die Thrombozytenreaktivität (TR), gemessen als Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Aktivierung nach Stimulation mittels der Agonistenkombination ADP+U46619, wurde für Patient:innen mit Infektion und Sepsis korreliert mit (A) der Thrombozytenzahl, (B) dem Plasmalevel des C-reaktiven Proteins und (C) Procalcitonins, (D) dem SOFA-Score, (E) der Krankenhausverweildauer und (F) der relativen Mepacrin-Abgabe. (A-C,F) Messwerte von Zeitpunkt t_1 und t_2 . (D,E) Messwerte von Zeitpunkt t_1 . CRP, C-reaktives Protein; geoMFI, *geometric mean fluorescence intensity*; FITC, Fluoresceinisothiocyanat; PCT, Procalcitonin; r, Pearson-Korrelationskoeffizient; SOFA, *sequential organ failure assessment*.

3.4 Analyse der Thrombozytenfunktion unter Flussbedingungen

Die Thrombozytenfunktionsanalyse mittels Durchflusszytometrie findet unter statischen Bedingungen statt und berücksichtigt weder die an der physiologischen Thrombozytenaktivierung beteiligten Scherkräfte noch Interaktionen zwischen Thrombozyten bei der Aggregatbildung. Aus diesem Grund untersuchten wir die Thrombozytenfunktion der Studienkohorten mittels INNOVANCE® *Platelet Function Analyser* (PFA)-200. Die während des automatisierten Analyseprozesses vorherrschenden Bedingungen modellieren die physiologischen Umstände der Thrombozytenaggregation an freiliegendem subendotheliale Kollagen im arteriellen Gefäßsystem bei Körpertemperatur. Ein entscheidender Unterschied entsteht durch die Verwendung von Citrat-Vollblut, wodurch die Blutgerinnung blockiert wird und der gemessene Verschluss der Membranöffnung auf die Fähigkeit der Thrombozyten zur Adhäsion und Aggregation i.S. der primären Hämostase zurückgeführt werden kann.

3.4.1 Thrombozytopenien führen zu verlängerter Verschlusszeit des PFA-200

Laut Herstellerangaben gelten die Referenzwerte physiologischer Verschlusszeiten des PFA-200 nur für Thrombozytenzahlen $>150 \text{ nl}^{-1}$. Da viele Infektions- und Sepsispatient:innen eine Thrombozytopenie aufweisen, wurde der isolierte Effekt verringerter Thrombozytenzahlen auf die Verschlusszeit und -kurve gesunder Proband:innen untersucht. Dazu wurde mit 3,2-prozentigem Citrat-Vollblut von drei gesunden Proband:innen zunächst eine Baseline-Messung mittels PFA-200 durchgeführt und die Thrombozytenzahl mittels Sysmex-Hämatologieanalysator bestimmt. Nachfolgend wurden mittels Zentrifugationsschritten auf die in Kapitel 2.2.5 beschriebene Vorgehensweise Blutproben mit reduzierter Thrombozytenzahl, sowie Citratblut-Kontrollproben ohne reduzierte Thrombozytenzahl generiert. Die Kontrollproben wurden den gleichen Zentrifugations- und Pipettierschritten wie die Blutproben mit reduzierter Thrombozytenzahl ausgesetzt und dienten der Störfaktorkontrolle einer möglichen Beeinflussung der Thrombozytenfunktion durch mechanische Scherkräfte. Alle Blutproben wurden diesem Prozedere zweimal aufeinander folgend unterzogen und nach jedem Durchgang eine Messung mittels PFA-200 und Sysmex durchgeführt.

Die PFA-200-Verschlusszeiten der Baseline-Messungen, einfach thrombozytendepletierten Blutproben und zweifach thrombozytendepletierten Blutproben wurden gegen die Thrombozytenzahl der jeweils untersuchten Blutprobe aufgetragen (Abbildung 19A). Die Daten zeigten normwertige Verschlusszeiten der Baseline-Messungen bei Thrombozytenzahlen $>100 \text{ nl}^{-1}$. Eine Probenmessung mit $89 \text{ Thrombozyten nl}^{-1}$ lag mit einer Verschlusszeit von 118 Sekunden am oberen Ende des Referenzbereichs. Alle weiteren Messungen mit niedrigeren Thrombozytenzahlen wiesen deutlich prolongierte Verschlusszeiten auf, während ein Messdurchgang zu gar keinem Verschluss der Membranöffnung innerhalb von 300 Sekunden führte. Die Abnahme der Thrombozytenzahl führte zu einer zunehmenden Abflachung der Verschlusskurven (Abbildung 19B-D). Gleichzeitig verliefen die Verschlusskurven kontinuierlich und wiesen keine Anzeichen einer Instabilität der Thrombozytenaggregate i.S. einer sprunghaften Zunahme der Durchflussrate auf. Die Ergebnisse der Kontrollproben ergaben allesamt normwertige Verschlusszeiten im Bereich von 82 bis 95 Sekunden bei konstanter Thrombozytenzahl (Daten nicht dargestellt).

Die Daten veranschaulichen einheitlich, dass eine ausgeprägte Thrombozytopenie zu zunehmend verlängerten Verschlusszeiten des PFA-200 führt. Auf Basis unserer Datenlage ließ sich eine Verlängerung der Verschlusszeit bei Thrombozytenzahlen $<100 \text{ Thrombozyten nl}^{-1}$ vermuten, während Thrombozytenzahlen $<50 \text{ Thrombozyten nl}^{-1}$ zu deutlich verlängerten Verschlusszeiten oder gar einem Ausbleiben des Membranverschlusses führen. Auf Basis der vorliegenden Daten wurde eine graphische Schätzung des Thrombozytenzahl-adjustierten Referenzbereichs der Verschlusszeit in Abbildung 19A eingezeichnet. Eine Verlängerung der

Verschchlusszeiten als Konsequenz der Probenpräparation mittels Zentrifugierens und Pipettierens konnte aufgrund der normwertigen Ergebnisse der Kontrollproben ausgeschlossen werden.

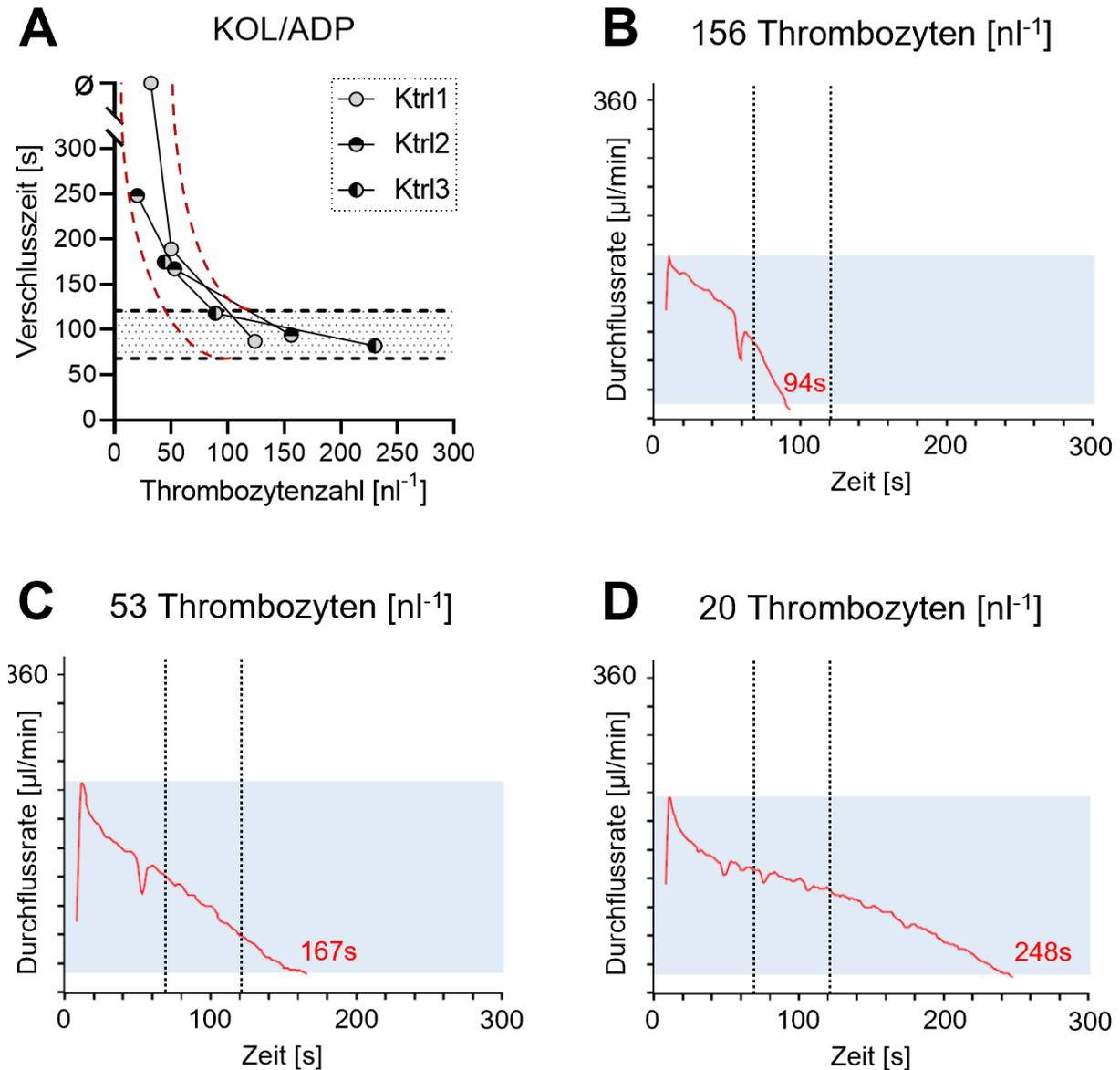


Abbildung 19: Thrombozytopenien führen zu verlängerter Verschlusszeit des PFA-200.

Der isolierte Effekt verringerter Thrombozytenzahlen auf die Verschlusszeit und -kurve des PFA-200 (KOL/ADP-Kartuschen) wurde mittels modifizierter Citrat-Blutproben von gesunden Proband:innen gemessen. (A) Verschlusszeiten in Abhängigkeit der Thrombozytenzahl der jeweiligen Blutprobe von drei gesunden Proband:innen (Ktrl1-3). Der Bereich zwischen den gestrichelten roten Linien stellt eine graphische Schätzung eines Thrombozytenzahl-adjustierten Referenzbereichs auf Basis der vorliegenden Daten dar. Ø, kein Verschluss. (B-D) Repräsentative Verschlusskurvenkurven eines Probanden bei (B) Baseline-Messung, (C) Messung nach der ersten Thrombozytendepletion und (D) Messung nach der zweiten Thrombozytendepletion. (A-D) Gestrichelte schwarze Linien indizieren den Hersteller-Referenzbereich der Verschlusszeit [68-121s] für >150 Thrombozyten nl⁻¹. s, Sekunde.

3.4.2 Die Thrombozytenaggregation unter arteriellen Flussbedingungen ist bei Infektion und Sepsis normal bis beschleunigt

Zur Untersuchung der Thrombozytenfunktion unter arteriellen Flussbedingungen bei Infektion und Sepsis wurden mittels PFA-200 Verschlusszeiten und -kurven gemessen und analysiert. Dabei wurde pro Patient:in, sofern logistisch möglich, sowohl eine Messung mittels KOL/ADP-Kartusche, als auch mittels KOL/EPI-Kartusche durchgeführt. Die Abkürzungen KOL/ADP, bzw. KOL/EPI, beziehen sich auf die für die Membranbeschichtung verwendeten Agonisten Kollagen (KOL), Adenosindiphosphat (ADP) und Epinephrin (EPI). Da die Einnahme von Acetylsalicylsäure (ASS) zu einer verlängerten Verschlusszeit bei der Messung mittels KOL/EPI-Kartusche führen kann, wurden Patient:innen mit entsprechender Medikation von der Auswertung ausgeschlossen.

Die mittleren Verschlusszeiten zum Zeitpunkt t_1 waren zwischen den Kohorten vergleichbar für die Agonisten KOL/ADP (83s vs. 76s vs. 73s; $p=.74$; Abbildung 20A) und KOL/EPI (107s vs. 81s vs. 118s; $p=.35$; Abbildung 20B). Unter Berücksichtigung des Hersteller-Referenzbereiches wiesen allerdings mehr als 40% der Patient:innen mit Infektion und mehr als 60% der Patient:innen mit Sepsis verkürzte oder verlängerte Verschlusszeiten auf. Da ausgeprägte Thrombozytopenien zu verlängerten Verschlusszeiten führen (Kapitel 3.4.1), wurden die Verschlusszeiten aller PFA-200-Messungen gegen die Thrombozytenzahl der untersuchten Blutprobe aufgetragen (Abbildung 20C/D) und für KOL/ADP zusätzlich die im vorherigen Kapitel vorgestellte graphische Schätzung des Thrombozytenzahl-adjustierten Referenzbereiches eingezeichnet. Dabei zeigte sich, dass die verlängerten Verschlusszeiten der Studienpatient:innen weitestgehend auf eine vorliegende Thrombozytopenie zurückzuführen waren. Zugleich wurden Patient:innenmessungen, die beschleunigte Verschlusszeiten aufweisen, unter Beachtung des adjustierten Referenzbereiches noch zahlreicher. Der Vergleich der Morphologie der Verschlusskurven von Sepsis-Patient:innen mit beschleunigter Verschlusszeit (Abbildung 20F) mit den Verschlusskurven gesunde Proband:innen (Abbildung 20E) ließ einen steileren Abfall der Durchflussrate bei Sepsis ohne sonstige morphologische Auffälligkeiten erkennen. Die Analyse der Morphologie der Verschlusskurven von Sepsis-Patient:innen mit verlängertem oder fehlendem Membranverschluss hingegen offenbarte neben dem Abflachen der Verschlusskurve in allen Fällen sprungartige Anstiege der Durchflussrate (Abbildung 20G).

Unsere Daten zur Thrombozytenfunktion unter arteriellem Scherstress ergaben unter Berücksichtigung der Thrombozytenzahlen bei Infektion und Sepsis eine klare Tendenz zur beschleunigten Aggregation. Die sprunghaften Anstiege der Durchflussrate in allen Verschlusskurven unserer Sepsis-Patient:innen mit verlängertem oder fehlendem Membranverschluss sind nicht allein durch die vorliegenden Thrombozytopenien erklärbar, da

sich derartige Ereignisse in den Verschlusskurven gesunder Proband:innen mit vergleichbaren und noch niedrigeren Thrombozytenzahlen nicht zeigten (Abbildung 19C/D). Folglich könnten die sprunghaften Anstiege der Durchflussrate eine Instabilität des Thrombozytenaggregats bei Sepsis mit ausgeprägter Thrombozytopenie darstellen, die zu einem wiederkehrenden „Aufreißen“ zuvor bereits verschlossener Bereiche führten.

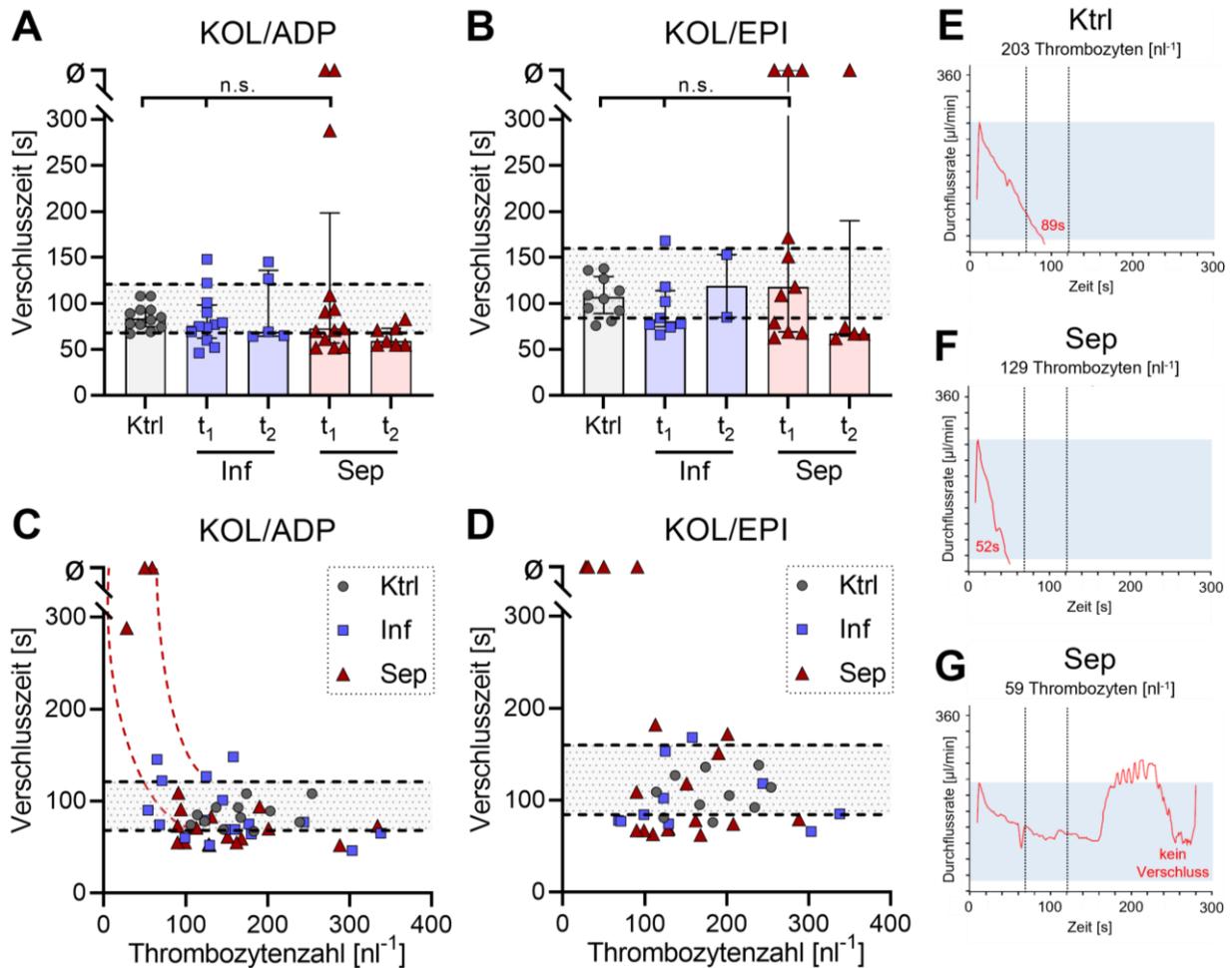


Abbildung 20: Die Thrombozytenaggregation unter arteriellen Flussbedingungen ist bei Infektion und Sepsis normal bis beschleunigt.

Die Thrombozytenfunktion wurde unter arteriellen Flussbedingungen mittels PFA-200 an Citratblut von gesunden Proband:innen (Ktrl), Patient:innen mit Infektion (Inf) oder Sepsis (Sep) zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses (t₁) und 5-7 Tage nach Studieneinschluss (t₂) analysiert. (A,C,E-G) Messungen mittels KOL/ADP-Kartusche. Die gestrichelten schwarzen Linien indizieren den Referenzbereich physiologischer Verschlusszeiten [68-121s] bei Thrombozytenzahlen >150 nl⁻¹. (C) Der Bereich zwischen den gestrichelten roten Linien stellt eine graphische Schätzung des Thrombozytenzahl-adjustierten Referenzbereichs auf Basis von Abbildung 19A dar. (B,D) Messungen der Verschlusszeit mittels KOL/EPI-Kartusche. Die gestrichelten schwarzen Linien indizieren den Referenzbereich physiologischer Verschlusszeiten [84-160s] bei Thrombozytenzahlen >150 nl⁻¹. (A,B) Graphen zeigen Median ± IQR; Unterschiede wurden mittels Kruskal-Wallis-Test, bzw. Wilcoxon-Test analysiert. (C,D) stellen die Verschlusszeiten aus Panel A/B in Abhängigkeit der Thrombozytenzahl der jeweiligen Citratblutprobe dar. (E-G) zeigen repräsentative Verschlusskurven inklusive Thrombozytenzahl der untersuchten Blutprobe (E) einer gesunden Proband:in mit normwertiger Verschlusszeit, (F) einer Sepsis-Patient:in mit verkürzter Verschlusszeit und (G) einer Sepsis-Patient:in mit verlangsamtem Membranverschluss. n.s., nicht signifikant; KOL, Kollagen; ADP, Adenosindiphosphat; EPI, Epinephrin. Ø, kein Verschluss.

4 DISKUSSION

4.1 Sind Thrombozyten bei Sepsis nun hypo-, normo-, oder hyperreaktiv? – Es kommt darauf an!

An der Pathophysiologie der Sepsis sind alle Funktionsbereiche von Thrombozyten beteiligt [129] und Thrombose- und Blutungsereignisse, sowie das *capillary leak syndrom*, sind häufige und lebensbedrohliche Komplikationen bei Sepsis [30, 32]. Folglich überrascht die geringe Anzahl durchgeführter Studien zur Untersuchung der humanen Thrombozytenreaktivität bei Sepsis. Deren unterschiedliche Ergebnisse und die Tatsache, dass der Großteil der Studien vor Einführung der Sepsis-3-Diagnosekriterien mit abweichenden Einschlusskriterien der Sepsis-Kohorten durchgeführt wurde, implizieren die Notwendigkeit der Durchführung neuer umfassender Studien. Aufgrund der inhomogenen Studienergebnisse bietet sich zur Einordnung unserer Forschungsergebnisse eine differenzierte Betrachtung der Thrombozytenfunktion bei Sepsis hinsichtlich der verwendeten Untersuchungsmethodik an.

4.1.1 Durchflusszytometrie

Mittels Durchflusszytometrie konnten wir in unserer vorangegangenen Pilotstudie eine Hyporeaktivität von Thrombozyten bei Sepsis nach Stimulation des Kollagenrezeptors GPVI und der ADP-Rezeptoren P2Y_{1/12} feststellen [120]. Im Rahmen der vorliegenden Dissertationsarbeit konnten wir diese Ergebnisse replizieren und bei unserer Sepsis-Kohorte zusätzlich eine ausgeprägte Hyporeaktivität der Integrin α IIb β 3-Aktivierung nach Stimulation des Podoplaninrezeptors CLEC-2, Thrombinrezeptors PAR1 und Thromboxanrezeptors TXA₂-R feststellen. Zudem war die beladungsadjustierte Mepacrin-Abgabe unserer Sepsis-Kohorte leichtgradig reduziert, was auf einen Defekt der δ -Degranulation bei Sepsis hinweist. Die Zusammenschau unserer Beobachtungen lässt folglich eine generalisierte Hyporeaktivität von Thrombozyten bei Sepsis und durchflusszytometrischer Analyse vermuten.

Unsere Daten zeigen eine hohe Übereinstimmung mit den Studienergebnisse von Yaguchi et al. und Lundahl et al. [112, 116], die mittels Durchflusszytometrie ebenfalls eine Hypoaktivität der Thrombozyten bei Sepsis im Sinne einer verringerten Integrin α IIb β 3-Aktivierung nach Stimulation der Thrombin-, Kollagen- und ADP-Rezeptoren feststellten (Tabelle 13). Eine deutliche Diskrepanz weisen unsere Daten zu den Ergebnissen von Tunjunputri et al. auf, die bei Gram-positiver Sepsis eine Hyperreaktivität und bei Gram-negativer Sepsis eine Normoreaktivität der Thrombozyten beobachteten [115]. Beim Vergleich der Studien fällt eine unterschiedliche Patient:innenauswahl auf. Lundahl et al. rekrutierten ausschließlich Patient:innen im septischen Schock von Intensivstation innerhalb von 24h nach Sepsis-Diagnosestellung. Auch Yaguchi et al. rekrutierten Sepsispatient:innen ausschließlich über die

Intensivstation, wobei analog der Sepsis-2 Kriterien vier Patient:innen eine unkomplizierte Sepsis (mittlerer SOFA-Score: 3 ± 2) und sechs Patient:innen eine schwere Sepsis oder einen Septischen Schock (mittlerer SOFA-Score: 8 ± 4) hatten. Demgegenüber war in der Studie von Tunjungputri et al. eine intensivmedizinische Behandlung ein Ausschlusskriterium der Sepsis-Kohorte, da die Autoren den Einfluss eines Organversagens auf die Thrombozytenfunktion ausschließen wollten und vorrangig den Einfluss der Gram-positiven oder -negativen Bakteriämie auf die Thrombozytenreaktivität messen wollten. Ein mittlerer SOFA-Score der Sepsis-Kohorte wird von den Autor:innen nicht angegeben. Auf Basis der zur Verfügung stehenden Informationen erscheint die Sepsis-Kohorte unserer Studie bezüglich der Patient:innenselektion mit den Kohorten von Lundahl et al. und Yaguchi et al. vergleichbar, da sich von unserer Sepsis-Kohorte ebenfalls 77% im septischen Schock befanden und sie zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses einen medianen SOFA-Score von 8 (IQR 3,5-9) aufwies. Im Gegensatz dazu widersprechen die Ein-/Ausschlusskriterien von Tunjungputri et al. den aktuellen Sepsis-3 Kriterien, nach denen die Organfunktionsstörung zentraler Aspekt der Diagnosestellung ist. Eine wahrscheinliche Ursache der Diskrepanz bezüglich der gemessenen Thrombozytenreaktivität zwischen den genannten Studien ist folglich der Schweregrad der Erkrankung der Sepsis-Kohorten.

4.1.2 Aggregometrie

Die primäre Hämostase ist physiologisch gekennzeichnet durch die Bereiche Thrombozytenadhäsion, -aktivierung und -aggregation. Während die Durchflusszytometrie von diesen Bereichen ausschließlich die Aktivierung von Thrombozyten auf Einzellzebene ohne Einfluss der Thrombozytenzahl oder von Plasmaproteinen untersucht, kann mittels Aggregometrie neben der Aktivierung zusätzlich die Aggregation von Thrombozyten analysiert werden. Die meisten publizierten Studien zur Thrombozytenreaktivität bei Sepsis wurde mittels Aggregometrie durchgeführt (Tabelle 13). Die Mehrzahl dieser Studien kommt zu dem Ergebnis, dass die Thrombozytenaggregation bei Sepsis reduziert ist [111-113, 120, 130]. Während einige Studien den Einfluss von verringerten Thrombozytenzahlen bei Sepsis-Patient:innen auf die Aggregation nur statistisch adressieren, konnten wir im Rahmen unserer Pilotstudie auch bei einheitlich eingestellten Thrombozytenzahlen der PRP-Proben eine deutlich reduzierte Aggregation nachweisen [120]. Akinosoglou et al. hingegen beschreiben eine erhöhte Aggregation bei Sepsis und normaler Thrombozytenaggregation bei Schwerer Sepsis und Septischem Schock [114]. Im Kontext der anderen Studien betrachtet, ist die Aussagekraft dieser Studie allerdings begrenzt, da sie als einzige Studie die Thrombozytenaggregation mittels des *point-of-care*-Vollblut-Aggregometers VerifNow™ untersucht und mittels der verwendeten Kartusche ausschließlich die Thrombozyten-

stimulation mittels des ADP-Rezeptors P2Y₁₂ ermittelt, wohingegen die anderen Studien jeweils mehrere Agonisten untersuchten.

4.1.3 PFA-200

Den Methoden der Durchflusszytometrie und Aggregometrie ist gemeinsam, dass sie die Thrombozytenreaktivität in Abwesenheit von Scherkräften, wie sie physiologische im Gefäßsystem vorzufinden sind, untersuchen und damit den Bereich der Thrombozytenadhäsion nicht abbilden. Unsere Messungen mittels des PFA-200 Systems im Rahmen der vorliegenden Studie sind die ersten uns bekannten Daten zur Funktionsanalyse humaner Thrombozyten bei Sepsis unter (arteriellen) Scherkräften. Dabei beobachteten wir überraschenderweise bei Sepsis-Patient:innen mehrheitlich normwertige bis gar beschleunigte Verschlusszeiten. Dies deutet auf eine physiologisch ausreichende Fähigkeit der Thrombozyten zur Adhäsion, Aktivierung und Aggregation unter arteriellen Flussbedingungen hin. Gleichzeitig ist bekannt, dass das PFA-200 für milde Thrombozytenfunktionsstörungen nicht sensibel ist [131, 132], weshalb diese Messdaten nicht im Sinne einer vollen Funktionstüchtigkeit der Thrombozyten unter arteriellen Scherkräften interpretiert werden können. Dennoch zeigen diese Daten, dass die primäre Hämostase bei Sepsis global betrachtet nicht in dem Ausmaß beeinträchtigt zu sein scheint, wie es unsere durchflusszytometrischen Daten zunächst vermuten ließen.

Die beschleunigten Verschlusszeiten unserer Sepsis-Kohorte könnten eine Hyperreaktivität der Thrombozyten unter arteriellen Flussbedingungen abbilden. Bekanntlich sind die Testergebnisse des PFA-200 aber neben der Thrombozytenzahl und dem Hämatokrit stark von den vWF-Plasmaleveln abhängig [131]. Der vWF gehört zu den Akute-Phase-Proteinen, weshalb vWF-Plasmalevel unter inflammatorischen Bedingungen ansteigen. Ware et al. maßen vWF-Plasmaspiegel bei 141 Sepsispatient:innen und fanden einen mittleren Anstieg derer von 350% im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe [133]. Folglich könnten die von uns gemessenen beschleunigten Verschlusszeiten des PFA-200 auf erhöhte vWF-Plasmaspiegel zurückzuführen sein. Dieser Hypothese sollte durch die Messung der vWF-Spiegel z.B. mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) im weiteren Studienverlauf nachgegangen werden.

Die Messwerte des PFA-200 können aber ebenfalls in Richtung verlangsamter Verschlusszeiten beeinflusst werden. Erniedrigte Hämatokrit-Werte [134] und Thrombozytenzahlen (Abbildung 19) führen zu verlangsamten Verschlusszeiten. Unsere Sepsis-Kohorte zeigt im Mittel sowohl verringerte Hämatokrit-Werte als auch Thrombozytenzahlen. Folglich dürften die unverzerrten Verschlusszeiten unserer Sepsis-Kohorte unter der isolierten Betrachtung dieser Gesichtspunkte noch kürzer als bereits gemessen sein. Kuiper et al. ermittelten für das PFA-

100 mittels multipler Regressionsanalyse mathematische Formeln, die die Ermittlung individueller Referenzintervalle für erniedrigte Hämatokrit-Werte und Thrombozytenzahlen ermöglichen [134]. Eine vergleichbare Arbeit für das PFA-200 wäre zukünftig hilfreich, um mittels der für Hämatokrit-, Thrombozytenzahl- und VWF-Plasmaspiegel-adjustierte Verschlusszeiten des PFA-200 auf bei Sepsis eine Aussage über die isolierte zugrundeliegende Thrombozytenfunktion treffen zu können.

4.1.4 Schlussfolgerung

Die Zusammenschau unserer Ergebnisse mit der Literatur über unterschiedliche Untersuchungsmethoden hinweg offenbart mehrheitlich Evidenz für das Vorliegen einer Hyporeaktivität der Thrombozyten bei Sepsis und Messung der Thrombozytenfunktion in Abwesenheit von Scherkräften mittels Durchflusszytometrie und Aggregometrie. Gleichzeitig konnte mit der vorliegenden Arbeit veranschaulicht werden, dass sich diese Ergebnisse eventuell nicht auf die Thrombozytenfunktion unter dem Einfluss arterieller Scherkräfte übertragen lassen und Thrombozyten unter diesen Umständen möglicherweise normoreaktiv sind. Eine höhere Fallzahl, sowie weitere Untersuchungen der Thrombozytenfunktion unter Flussbedingungen sind notwendig, um diese Hypothese weiter zu evaluieren.

Welchen pathophysiologischen Nutzen aber könnten derartige Veränderungen der Thrombozytenfunktion bei Sepsis haben? Eine Herunterregulation der Thrombozytenreaktivität für eine Umgebung mit geringen Scherkräften könnte eine überschießende Thrombozytenaktivierung im Bereich des Kapillarsystems an den bei Sepsis vermehrt freiliegenden subendothelialen Strukturen vorbeugen. Gleichzeitig könnte die Fähigkeit von Thrombozyten erhalten bleiben, unter Einwirkung hoher Scherkräfte, wie sie im arteriellen System vorherrschen, über den vWF-Rezeptorkomplex GPIb-IX-V aktiviert zu werden. Über welche Mechanismen die Bindung von GPIb-IX-V an immobilisierten vWF zur Integrin-Aktivierung führt, ist bislang nicht geklärt [135]. Eine aufschlussreiche Anschlussuntersuchung zur Überprüfung dieser Hypothesen wäre die Untersuchung der Thrombozytenreaktivität bei Sepsis mittels Flusskammer unter unterschiedlichen Flussraten. Sollten Thrombozyten von Sepsispatient:innen mit zunehmender Scherrate reaktiver werden, würde dies die Hypothese unterstützen. Unter klinisch-epidemiologischer Betrachtung sprechen erhöhte Inzidenzen für Ereignisse wie Myokardinfarkt und ischämischer Schlaganfall bei Sepsis-Patient:innen für die Hypothese, dass die Thrombozytenreaktivität bei Sepsis unter arteriellen Scherkräften nicht eingeschränkt oder gar erhöht ist [136, 137].

Tabelle 13: Studienergebnisse zur Thrombozytenreaktivität bei Sepsis.

Die Auflistung der Ergebnisse der Thrombozytenfunktionsmessungen erfolgt getrennt nach der verwendeten Untersuchungsmethode (oben: Durchflusszytometrie; unter: Aggregometrie). Yaguchi et al. und Weiss et al. untersuchten die Thrombozytenfunktion mit beiden Methoden und werden deshalb doppelt aufgelistet. Die Daten des SOFA-Scores werden dargestellt als Mittelwert (\pm SD) oder Median [IQR]. ICU, *intensive care unit* (dt. Intensivstation); LTA, Lichttransmissions Aggregometrie; PRP, *platelet rich plasma*; KOL, Kollagen; ADP, Adenosindiphosphat; CRP-XL, *Cross-linked Collagen-Related Peptide*; TRAP-6, *Thrombin Receptor Activator Peptide 6*; AA, Arachidonsäure; TXA2, Thromboxan A2.

Studienergebnisse zur Thrombozytenreaktivität bei Sepsis mittels Durchflusszytometrie und/oder Aggregometrie							
Studie	Fallzahl (n)	Sepsis-Kriterien	SOFA-Score	Analysezeitpunkte ab Diagnosestellung	Analysemethodik	Verwendete Agonisten	Thrombozytenreaktivität (Vergleich zu Gesunden)
Analyse mittels Durchflusszytometrie							
Yaguchi et al. (2004)	4 (Sepsis)	Sepsis-2	n/a	<24h oder Tag der Einweisung auf ICU	Fibrinogen, PAC-1, CD62P	KOL, TRAP-6	Reduziert
	6 (Schwere Sepsis/Septischer Schock)						
Lundahl et al. (1998)	16 (Septischer Schock)	Sepsis-1	n/a	<24h; +1x täglich an Tag 2-6	Fibrinogen	ADP, AA	Reduziert
Tunjungputri et al. (2017)	32	Sepsis-2	n/a	<72h nach positiver Blutkultur	Fibrinogen, CD62P	CRP-XL, ADP	Erhöht (bei gram-positiver Sepsis) Normal (bei gram-negativer Sepsis)
Weiss et al. (2021)	15 (14/15 im Septischen Schock)	Sepsis-3	9 [8-11]	<24h oder Tag der Einweisung auf ICU	PAC-1, CD62P	CRP-XL, Convulxin, ADP	Reduziert
Analyse mittels Aggregometrie							
Adamzik et al. (2012)	80 (Schwere Sepsis)	Sepsis-2	11,6 \pm 4,6	<24h	Multiplate® Vollblut Impedanz-Aggregometrie	KOL, ADP, TRAP-6, AA	Reduziert (im Vergleich zu post-OP-ICU-Patienten)
Akinosoglou et al. (2017)	30 (Infektion)	Sepsis-2	0 [0-1,25]	<4h	VerifyNow® P2Y12 Vollblut-LumiAggregometrie	ADP	Normal
	38 (Sepsis)		1 [0-2,5]				Erhöht
	33 (Schwere Sepsis/Septischer Schock)		4 [3-7]				Normal
Davies et al. (2014)	42 (Sepsis)	Sepsis-2	3 [1,25-3]	Unmittelbar; +6h; +24h	Multiplate® Vollblut Impedanz-Aggregometrie	KOL, ADP, AA	Normal bis leicht erhöht
	17 (Schwere Sepsis)		5 (\pm 1)				Reduziert (bei AA und ADP)
Woth et al. (2010)	26 (Septischer Schock)	Sepsis-2	9 (\pm 3)	<24h; +1x täglich an Tag 2-5	LTA mit PRP	KOL, ADP, Adrenalin	Reduziert
	45 (Schwere Sepsis)		9 (\pm 3,4)				Reduziert
Yaguchi et al. (2004)	16 (Sepsis)	Sepsis-2	3 (\pm 2)	<24h oder Tag der Einweisung auf ICU	LTA mit PRP	KOL, ADP, TRAP-6, AA, TXA2	Reduziert (verstärkte Reduktion bei niedrigen Thrombozytenzahlen)
	31 (Schwere Sepsis/Septischer Schock)		8 (\pm 4)				Reduziert
Weiss et al. (2021)	15 (14/15 im Septischen Schock)	Sepsis-3	9 [8-11]	<24h oder Tag der Einweisung auf ICU	LTA mit PRP	CRP-XL, Rhodocytin, TRAP-6	Reduziert

4.2 Eignet sich die Messung der Thrombozytenreaktivität potenziell als diagnostischer Biomarker für Sepsis?

Sepsis ist eine der führenden Todesursachen weltweit [8]. Die Früherkennung der Sepsis und eine leitliniengerechte Behandlung steigert die Überlebenschancen der Patient:innen erheblich [36, 121], weshalb die Identifikation neuer verlässlicher diagnostischer Biomarker erklärtes Ziel der Sepsis-Task Force ist [1]. Biomarker sind genau und reproduzierbar messbare Indikatoren für einen Erkrankungszustand, die z.B. für die Diagnosestellung oder Prognose nützlich sind. Im Rahmen einer Pilotstudie identifizierte unsere Arbeitsgruppe mittels Durchflusszytometrie eine ausgeprägte Hyporeaktivität der Thrombozyten bei Sepsis [120]. Diese Hyporeaktivität war bereits zum Zeitpunkt der Patient:innenaufnahme auf die Intensivstation in vollem Ausmaß messbar und ging einem Abfall der Thrombozytenzahl im Mittel um 1,6 Tage voraus. Folglich stellte sich uns unter dem Gesichtspunkt, möglicherweise einen neuen Biomarker für die Sepsis-Früherkennung identifiziert zu haben, die Frage, ob die Hyporeaktivität bereits bei hospitalisierten Patient:innen mit Infektionserkrankungen (SOFA-Score <2) detektiert werden kann.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die beschriebene Hyporeaktivität bereits bei Patient:innen mit Infektionserkrankungen besteht, aber in geringerem Ausmaß als bei Sepsis. Daraus lässt sich die Hypothese ableiten, dass die Entwicklung der Thrombozyten-Hyporeaktivität unter statischen Bedingungen bereits früh in der Infektion-Sepsis-Progression beginnt und mit zunehmender Schwere der Infektionserkrankung aggraviert. Diese Vermutung wird durch die negative Korrelation der Thrombozytenreaktivität mit dem SOFA-Score, sowie den Entzündungsmarkern CRP und PCT, unterstützt. Allerdings beruhen unsere Beobachtungen ausschließlich auf dem Vergleich der Kohorten. Keine Infektionspatient:in entwickelte im Beobachtungszeitraum unserer Studie eine Sepsis, sodass wir die Thrombozytenfunktion auf dem Infektion-Sepsis-Kontinuum nur inter- und nicht intraindividuell beurteilen können.

In unserer Pilotstudie stellte sich die durchflusszytometrisch quantifizierte Hyporeaktivität bei Stimulation des Kollagenrezeptors GPVI mittels des Agonisten CRP-X_L ausgeprägter dar als mittels der Agonisten Convulxin und ADP, weshalb die Thrombozytenreaktivität nach Stimulation mittels CRP-X_L als Sepsis-Biomarker diskutiert wurde [120]. Zur weiteren Evaluation der Fragestellung nach der optimalen Agonistenwahl, untersuchten wir in der vorliegenden Arbeit die Thrombozytenreaktivität mittels sechs unterschiedlicher Agonisten. Unsere ROC-Analysen zeigen mit AUC-Werten von ≥ 0.80 für alle untersuchten Agonisten(kombinationen) ein hohes Potenzial als potenzielle Sepsis-Biomarker. Besonders geeignet, zwischen den Kohorten Infektion und Sepsis zu diskriminieren, stellten sich auf

Grundlage unserer vorläufigen Daten die Agonisten(kombinationen) TRAP-6 und ADP+U46619 mit einer AUROC von jeweils 0.96 dar, die damit CRP-X_L (AUROC 0.88) überlegen waren.

Zur Beurteilung des diagnostischen Potenzials der mittels Durchflusszytometrie quantifizierten Thrombozytenreaktivität für die Sepsis-Früherkennung existieren keine Vergleichsstudien. Allerdings existieren wenige Studien, die diese Fragestellung mittels *point-of-care*-Geräten untersucht haben. Adamzik et al. untersuchten die Thrombozytenfunktion mittels des Aggregometers Multiplate® bei Patient:innen mit schwerer Sepsis und postoperativen intensivpflichtigen Patient:innen. Deren Ergebnisse ergaben, dass die Impedanz-aggregometrie unter Verwendung des Agonisten Kollagen (AUROC 0.81) als Biomarker für die Diagnose einer schweren Sepsis bei intensivpflichtigen Patient:innen den üblichen Laborparametern Procalcitonin (PCT), Interleukin(IL)-6 und C-reaktives Protein (CRP) leicht überlegen war [130]. Ebenfalls mittels Multiplate® Impedanz-Aggregometriedaten berechneten Davies et al. ROC-Analysen zwischen den gepoolten Kohorten SIRS/Unkomplizierte Sepsis und Schwere Sepsis/Septischer Schock. Das diagnostische Potenzial eine Sepsis mit Organversagen zu erkennen, war dabei am höchsten bei Verwendung des Agonisten ADP (AUC 0.74), lieferte aber letztlich nur eine vergleichbare diagnostische Wertigkeit wie die Analyse der Thrombozytenzahl (AUC 0.76). Akinosoglou et al. schließlich berechneten eine ROC-Analyse aus VerifyNow® P2Y₁₂ Vollblut-Aggregometriedaten zwischen den gepoolten Kohorten Gesundspender/Unkomplizierte Infektion und Sepsis/Schwere Sepsis/Septischer Schock. Mit einer AUC von 0.68 zeigte das VerifyNow® eine deutlich schlechtere Fähigkeit, eine Sepsis zu detektieren, als die ebenfalls erhobenen Inflammationsmarker CRP und IL-6. Alle drei Studien lassen sich aufgrund der abweichenden Vergleichskohorten und zugrundeliegenden Sepsis-Diagnosekriterien nicht direkt mit unseren Ergebnissen vergleichen. Dennoch zeichnet sich bezüglich des Potenzials als diagnostischer Biomarker eine Überlegenheit der Messung der Thrombozytenreaktivität mittels Durchflusszytometrie im Vergleich zu *point-of-care*-Aggregometern ab.

In einem systematischen Literaturreview identifizierten Pierrakos et al. 258 verschiedene diagnostische und prognostische Sepsis-Biomarker unterschiedlichsten Ursprungs wie z.B. Zellmembranrezeptoren, Metabolite oder Zytokine [138]. Der Großteil (84%) dieser Biomarker wurden allerdings nur jeweils in weniger als fünf Studien untersucht. Abgesehen von CRP und PCT sind die am besten untersuchten Biomarker IL-6, Presepsin und neutrophilen CD64 (nCD64) [138]. Von diesen konnte über mehrere Studien hinweg nur für die Expression von nCD64 eine diagnostische Überlegenheit gegenüber CRP und PCT ermittelt werden [139-141]. nCD64 ist ein hochaffiner IgG Fcγ-Rezeptor I, der auf inaktiven Neutrophilen nur in sehr geringen Mengen exprimiert wird, aber durch Zytokine während einer Infektion hochreguliert

wird [142]. Da nCD64 ebenfalls mittels Durchflusszytometrie gemessen wird, bietet sich ein direkter Vergleich des diagnostischen Potenzials der Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Aktivierbarkeit nach Agonistenzugabe mit der nCD64-Expression als Sepsis-Biomarker in zukünftigen Studien an. Ebenfalls sollte in der Zukunft das diagnostische Potenzial der Kombination der Thrombozytenreaktivität mit anderen Biomarkern zur Sepsis-Früherkennung untersucht werden. Beispielweise zeigte die Kombination aus nCD64 und SOFA-Score für die Vorhersage der 28-Tage-Mortalität eine höhere AUROC als jeder der Parameter einzeln betrachtet (0,92 vs. 0.89/0.85) [141]. Neben nCD64 existieren zahlreiche weitere vielversprechende Sepsis-Biomarker, deren adäquate Abhandlung den Rahmen dieser Arbeit jedoch übersteigen würde. An dieser Stelle sei deshalb auf entsprechende aktuelle Literaturreviews verwiesen [138, 143].

Die Zusammenschau unserer Ergebnisse mit der aktuellen Literatur ergibt, dass die Thrombozytenreaktivität unter Berücksichtigung unserer vorläufigen ROC-Analysen weiterhin ein interessanter und vielversprechender Kandidat für einen Biomarker zur Sepsis-Früherkennung ist. Weitere Schlussfolgerungen über das Potenzial der Thrombozytenreaktivität als Biomarker und den dafür am besten geeigneten Agonisten sollten aufgrund der bislang geringen Fallzahl aber erst nach Erhebung einer größeren Kohorte gezogen werden.

4.3 Sepsis-bedingte phänotypische Veränderungen der Thrombozyten

Im Rahmen unserer Untersuchungen fanden wir Hinweise auf Sepsis-bedingte Veränderungen des Thrombozyten-Phänotyps im Bereich der δ -Granula, Rezeptorausstattung und Glykosylierung.

4.3.1 δ -Granula-Defekt

Bereits in unserer Pilotstudie stellten wir eine deutlich verringerte Mepacrin-Aufnahme der Thrombozyten bei Sepsis fest. Dieses Ergebnis wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit repliziert. Die Thrombozyten unserer Sepsis-Kohorte wiesen im Mittel eine um 40% reduzierte Mepacrin-Aufnahme im Vergleich zur Kontrollgruppe auf und präsentierten damit einen indirekten Hinweis auf eine verringerte Anzahl gespeicherter δ -Granula. Diesem Hinweis sollte im nachfolgenden Studienverlauf mittels *whole mount*-Transmissionselektronenmikroskopie (WM-TEM) nachgegangen werden, um eine Reduktion der δ -Granula bei Sepsis-Thrombozyten auch morphologisch nachzuweisen.

Die Rolle der δ -Granula bei Sepsis ist weitestgehend unerforscht. Lediglich Claushuis et al. untersuchten Hermansky-Pudlak-Syndrom (*Hps*)*3coa*-Mäuse (mit reduzierter δ -Granula-

Anzahl) im Pneumosepsis-Modell nach *Klebsiella pneumoniae*-Infektion [144]. Dabei fanden sie bei *Hps3coa*-Mäusen eine tendenziell milder ausgeprägte Sepsis-induzierte Thrombozytopenie, als bei den Kontrollmäusen, aber keinen Unterschied bezüglich des Auftretens von Organblutungen zwischen den Kohorten.

Unter der Annahme, dass Thrombozyten im Rahmen der Infektion-Sepsis-Progression im Mittel 40% ihrer δ -Granula in den Blutstrom freisetzen, sollte über mögliche Konsequenzen nachgedacht werden. Da circa 90% des sich außerhalb des ZNS befindenden Serotonins im menschlichen Körper in den δ -Granula der Thrombozyten gespeichert ist [62], könnte die kontinuierliche Freisetzung eines signifikanten Teiles davon systemische Folgen nach sich ziehen. Studien zeigten wiederholt, dass die Freisetzung von Serotonin auf das Herz-Kreislauf-System nach einer kurzen initialen Phase der Vasokonstriktion zu einer langanhaltenden Vasodilatation und Blutdruckabfall führt [145]. Folglich könnte das von uns detektierte δ -Granula-Defizit an der Entstehung eines septischen Schocks beteiligt sein. Zusätzlich werfen unsere Ergebnisse die Frage nach der funktionellen Bedeutung von Thrombozyten mit einer vermeintlich verringerten δ -Granula-Anzahl bei Sepsis auf. Interessanterweise weisen Thrombozyten bei sog. *δ -Storage-Pool-Disorders* (δ -SPD) einen ähnlichen Phänotyp auf. Patient:innen mit jeder Art von δ -SPD leiden aufgrund eines quantitativen und/oder qualitativen δ -Granula-Defektes unter moderaten Blutungssyndromen mit geringer Beeinträchtigung des täglichen Lebens und erhöhtem Risiko für schwerwiegende Blutungen bei chirurgischen Operationen oder Verletzungen [62]. Daraus lässt sich ableiten, dass die Reduktion der δ -Granula-Anzahl eine Prädisposition für Blutungsereignisse darstellt. Blutungsereignisse sind bei Patient:innen mit Sepsis eine bekannte Komplikation und könnten folglich mechanistisch mit dem von uns detektierten δ -Granula-Defekt zusammenhängen.

Der Exploration möglicher Ursachen des vermeintlichen δ -Granula-Defizits konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter nachgegangen werden. Die leichte Reduktion der Mepacrin-Beladung unserer Infektion-Kohorte im Vergleich zur Kontrollgruppe liefert jedoch Hinweise auf einen graduellen Prozess der δ -Granula-Reduktion über das Infektion-Sepsis-Kontinuum hinweg. Ein Blick zu den nicht-syndromalen δ -SPD liefert leider keine Hinweise auf mögliche Ursachen der vermuteten δ -Granula-Reduktion, da die pathophysiologischen und molekularen Mechanismen dieser isolierten Thrombozytenstörungen bislang ebenfalls unbekannt sind [62]. Weitere Hinweise über die mechanistische Ursache des δ -Granula-Defizits könnte in zukünftigen Experimenten durch die Koinkubation gesunder mepacrinbeladerner Thrombozyten in Vollblut von Sepsis-Patient:innen untersucht werden. Eine Reduktion der Mepacrin-Beladung nach Koinkubation würde auf eine zelluläre oder plasmatische Ursache des δ -Granula-Defizits hinweisen, dem durch eine Koinkubation gesunder Thrombozyten in PRP und PPP weiter nachgegangen werden könnte.

4.3.2 Rezeptor-Shedding

Die Thrombozyten unserer Sepsis-Patient:innen wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine verringerte Expression von GPV und tendenziell auch GPIb α und GPVI auf, sowie erhöhte Expression von GPIX bei sonst normwertiger Ausstattung des Kollagen-Rezeptors Integrin β 1, Podoplanin-Rezeptors CLEC-2 und Fibrinogen-Rezeptorkomplexes Integrin α IIb β 3. Ein Abgleich unserer Ergebnisse mit der bestehenden Literatur zeigt eine dort durchgehend als normwertig beschriebene Rezeptorexpression bei Sepsis für Integrin α IIb β 3 [117, 118, 120], Integrin β 1 [112, 120], GPIb [112, 118, 120], GPIX [112, 120] und CLEC-2 [120]. In unserer Pilotstudie stellten wir eine verringerte Expression von GPVI und erhöhte Plasmakonzentrationen von sGPVI fest [120]. Die Expression von GPV wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nach unserem Wissen erstmalig bei Sepsis untersucht.

Die verringerte Expression von GPV und GPVI deutet auf ein verstärktes *Shedding* der Ektodomänen dieser Rezeptoren bei Sepsis durch die Metalloproteasen ADAM10/17 hin [126, 146]. Dies wird bei Sepsis möglicherweise ausgelöst durch erhöhte Level von oxidativem Stress, Scherstress oder Thrombin [126, 147]. Die Messung der erhöhten GPIX-Expression bei Sepsis könnte zurückzuführen sein auf ein erhöhtes MPV oder einen kompensatorischen Anstieg, da GPIX als einzige der von uns analysierten Komponenten des vWF-Rezeptorkomplexes keinem *Shedding* unterliegt. Auch ein Zufallsbefunde kommt in Betracht, da andere Studien keine erhöhte GPIX-Expression bei Sepsis fanden [112, 120]. Ob die veränderte Expression der Komponenten des Rezeptorkomplexes GPIb-IX-V bei Sepsis funktionale Bedeutung hinsichtlich der Adhäsionsfähigkeit des vWF-Rezeptorkomplexes hat, bleibt unklar. Als ergänzende Untersuchung bezüglich der verringerten Expression von GPV könnten im weiteren Studienverlauf die sGPV-Plasmalevel mittels ELISA gemessen werden.

4.3.3 Desialylierung

Sepsis und andere Infektionskrankheiten gehen häufig mit einer Thrombozytopenie einher [1]. Als einer der Hauptmechanismen für die Entfernung zirkulierender Thrombozyten bei Gesunden wurde der Verlust von 2,3-gebundener Sialinsäure identifiziert [64]. Mit unserem laborintern neu etablierten Lektin-Assay konnten wir bei unserer Sepsis-Kohorte eine Reduktion endständig-gebundener Sialinsäure auf Thrombozyten feststellen, was auf eine erhöhte Desialylierung bei Sepsis hinweist und die erniedrigte Thrombozytenzahlen unserer Sepsis-Kohorte mitbedingen könnte. Allerdings konnten wir keine erhöhte Exposition endständiger Galaktose nachweisen, die bei erhöhter Desialylierung erwartungsgemäß vermehrt freiliegen sollte. Auch erwies sich das Ausmaß der Desialylierung bei Sepsis nicht als Prädiktor für den Abfall der Thrombozytenzahl in den ersten drei Tagen nach Diagnosestellung. Auffällig zeigte sich zudem die teils inhomogene und breite Streuung

unserer Lektin-Datensätze innerhalb der einzelnen Kohorten (einschließlich der Kontroll-Kohorte). Diese Auffälligkeit ließ sich vor dem Hintergrund, dass 80% der auf Thrombozyten gebundenen Sialinsäure auf GPIb lokalisiert ist [69], nicht durch interindividuellen Unterschiede der Menge exponierten GPIb α auf der Thrombozytenoberfläche erklären.

Die biologischen Zusammenhänge dieser Beobachtungen sind uns zum aktuellen Zeitpunkt noch weitgehend unklar und signalisieren die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen. Zur initialen Abklärung möglicher methodisch-bedingter Ursachen für die Diskrepanzen unserer Beobachtungen erscheint die Messung der Lektinbindungen auf Thrombozyten vor und nach experimentell-induzierter Desialylierung mittels exogen hinzugegebener Neuraminidase sinnvoll. Zudem sollten Messungen mit einer weiteren Charge von Lektinen durchgeführt werden, um eine reagenzienbedingte Ursache auszuschließen.

Zusammenfassend lässt sich auf Basis der vorliegenden Daten vermuten, dass die Desialylierung bei Sepsis erniedrigte Thrombozytenzahlen mitbedingen könnte, aber wahrscheinlich nicht der primäre Mechanismus der Entstehung von Thrombozytopenien ist. Gleichzeitig signalisieren unsere Ergebnisse den großen Bedarf weiterer Studien, da die Desialylierung von Thrombozyten bei Sepsis-Patient:innen bislang unseres Wissens nach nur in einer weiteren Studie untersucht wurde. Li et al. maßen RCA-I, ECA und sWGA bei 261 Sepsis-Patient:innen mit und ohne Thrombozytopenie und fanden bei Sepsis-Patient:innen mit Thrombozytopenie für alle drei Parameter erhöhte Werte als Hinweise auf eine vermehrte Desialylierung [148]. Da die Autor:innen nur die Lektinbindung zweier Sepsis-Kohorten miteinander verglichen und keine Gesunder-Kohorte einschlossen, lassen sich deren Ergebnisse nur bedingt mit unseren Daten vergleichen, sind aber tendenziell im Einklang mit unseren SNA-Daten.

In Anbetracht der Tatsache, dass nur manche Erreger über eigene Neuraminidasen verfügen und diese sich wiederum zwischen den Erregern unterscheiden, erscheint es prinzipiell sinnvoll, das Ausmaß der Desialylierung in Abhängigkeit der identifizierten Erreger zu betrachten [75, 149, 150]. Die ausgeprägte Heterogenität der identifizierten Erreger in unseren Patient:innen-Kohorte (Tabelle 14) in Kombination mit unserer relativ kleinen Kohortengröße erlaubte im Rahmen dieser Arbeit noch keine aussagekräftige erregerspezifische Auswertung des Ausmaß der Desialylierung. Dies sollte jedoch zukünftig bei Vorliegen größerer Kohorten im Betracht gezogen werden.

4.4 Stärken und Limitationen der Arbeit

Die vorliegende Arbeit hat zahlreiche Stärken und Limitationen bezüglich des Studienaufbaus und der verwendeten Methodik.

(1) Das gewählte Studiendesign einer prospektiven kontrollierten Kohortenstudie, welches den Verlauf der Kohorten longitudinal begleitet, ist bezüglich der vorliegenden Forschungsfragestellungen sehr aussagekräftig. Unsere Studienpopulation weist eine hohe Repräsentativität für erwachsene Patient:innen mit schweren Infektionserkrankungen oder Sepsis ohne hämatoonkologische Grunderkrankung auf, da sie ein breites und repräsentatives Spektrum bezüglich ursächlicher Mikroorganismen, häufiger Komorbiditäten, Infektionsfoki und Schweregraden der Krankheitsverläufe abbildet. Die Krankenhausmortalität unserer Sepsis-Kohorte ist mit 30% mit deutschlandweiten Werten vergleichbar [9]. Dennoch wird die externe Validität unserer Ergebnisse durch die kleinen Kohortengrößen und das unizentrische Studiendesign eingeschränkt. Die vorliegenden Kohortengrößen waren zudem maßgeblich an der Auswahl der verwendeten statistischen Testverfahren beteiligt. Auf Basis unseres Studiendesigns wäre auch eine statistische Auswertung vieler Datensätze mittels zweifaktorieller Varianzanalyse mit Messwiederholung denkbar. Dagegen sprach jedoch die vorliegende Kombination aus kleinen Kohortengrößen, der uns a priori unbekanntem Verteilung unserer Stichproben aus der Grundgesamtheit, sowie zahlreiche a posteriori als nicht-normalverteilt getesteten Datensätze.

(2) Das mittlere Lebensalter unserer Infektion- und Sepsis-Kohorte war logistisch bedingt deutlich höher als das unserer Kontrollgruppe (69/70 Jahre vs. 29 Jahre). Der Einfluss des Lebensalters auf die Thrombozytenreaktivität ist aufgrund der begrenzten Anzahl existierender umfänglicher Studien nicht abschließend geklärt [151]. Davidzon-Castillo et al. konnten mittels Durchflusszytometrie eine erhöhte Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Aktivierung nach Agonistenzugabe bei älteren Menschen ($n=25$; mittleres Alter 79.5 ± 8.8 Jahre) im Vergleich zu jüngeren Menschen ($n=25$; mittleres Alter 35 ± 5 Jahre) im Sinne einer Hyperreaktivität im höheren Alter feststellen [152]. Im Rahmen einer Subgruppenanalyse unserer Pilotstudie konnten wir keinen Altersunterschied bezüglich der Thrombozytenreaktivität feststellen, doch deren Aussagekraft ist aufgrund der geringen Fallzahl ($n=2$) begrenzt. Diese Daten relativieren die im Rahmen der vorliegenden Arbeit mittels Durchflusszytometrie detektierte Hyporeaktivität der Thrombozyten bei Infektion und Sepsis jedoch nicht, sondern bestärken unsere Ergebnisse sogar. Eine ältere Kontrollgruppe hätte den Ergebnissen Davidzon-Castillo et al. zufolge tendenziell zu einer noch höheren Integrin-Aktivierung dieser geführt und damit die Hyporeaktivität unserer Infektion- und Sepsis-Kohorte in Relation noch weiter betont. Studien, die den Einfluss des Lebensalters auf die Verschlusszeiten des PFA-100 untersuchten, zeigten für ältere

Populationen beschleunigte Verschlusszeiten [153] oder keinen signifikanten Unterschied mit einer Tendenz zu beschleunigten Verschlusszeiten [154]. Diese Daten bekräftigen die Interpretation unserer PFA-200 Ergebnisse im Sinne einer mehrheitlichen Normreaktivität bei Infektion und Sepsis.

(3) Bezüglich der Auswahl unserer Stichprobe ist durch die konsekutive Auswahl aller gescreenten Studienteilnehmer:innen anhand im Vorfeld festgelegter Ein- und Ausschlusskriterien von einer hohen Objektivität auszugehen. Gleiches gilt für alle verwendeten Verfahren und Assay, die entweder vollautomatisiert (PFA-200, Sysmex) oder standardisiert nach Protokoll (Durchflusszytometrie) an jeweils dem gleichen Messgerät erfolgten. Folglich können wir einen untersucher- und geräteabhängigen Einfluss auf unsere Messergebnisse weitgehend ausschließen. Auch eine systematische Beeinflussung der Patient:innenpopulation durch die erforderliche Teilnahmeeinwilligung in Sinne eines *selection bias* erscheint unwahrscheinlich. Bei den wenigen Patient:innen oder rechtlichen Vertreter:innen, die eine Studienteilnahme ablehnten, ließ sich keine zugrundeliegende Systematik z.B. bezüglich der Krankheitsschwere der Patient:innen erkennen.

(4) Die Thrombozytenfunktion nimmt bekanntlich mit zunehmendem zeitlichem Abstand zwischen Blutentnahme und Testung ab. Um eine hohe Reliabilität unserer Funktionsanalysen zu gewährleisten und diese vergleichbar zu halten, fanden alle Messungen der Thrombozytenfunktion innerhalb des im Forschungsfeld etablierten Zeitfensters von 0,5-4 Stunden nach Blutentnahme statt [123]. Dieser Umstand hatte zur Folge, dass Thrombozytenfunktionsmessungen mittels Durchflusszytometrie aufgrund des zeitaufwendigen Prozederes bei einem defekten Agonisten-Aliquot oder Puffersystem nicht wiederholt werden konnten. In der Konsequenz ergaben sich einige nicht auswertbare Messdurchgänge, die die statistische *Power* unserer durchflusszytometrischen Thrombozytenfunktionsanalysen merklich verringert.

(5) Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kann die durchflusszytometrisch analysierte Thrombozytenreaktivität auf unterschiedliche Agonisten lediglich anhand der Integrin-Aktivierung mittels PAC-1-Bindung beurteilt werden. Die Messung eines zweiten Aktivierungsmarkers, P-Selektin, zur Quantifizierung der alpha-Degranulation war Teil unseres Versuchsaufbaus. Aufgrund einer fehlerhaften geräteinternen Kompensationseinstellung des Durchflusszytometers war der Datensatz retrospektiv nicht auswertbar. Allerdings untersuchten wir bereits im Rahmen unserer Pilotstudie die Exposition von P-Selektin nach Thrombozytenaktivierung bei Sepsis und fanden eine deutlich verringerte Exposition von P-Selektin ebenfalls im Sinne einer Hyporeaktivität.

(6) Abschließend kann der Einfluss einzelner Störfaktoren auf die Funktion und den Phänotyp der Thrombozyten unserer Studienkohorten nicht sicher ausgeschlossen werden. Gründe

hierfür wären beispielsweise bislang unbekannte Einflüsse von Komorbiditäten, (intensivmedizinischen) Interventionen oder verschriebener Medikamente auf die Thrombozytenfunktion. Aus der Literatur bekannte potenzielle Störfaktoren wurden im Rahmen unserer Patient:inneneinschlusskriterien berücksichtigt. Zusätzlich wurde im Rahmen unserer Pilotstudie der Einfluss gängiger Antibiotika auf die Thrombozytenfunktion untersucht und kein Effekt festgestellt [120].

4.5 Ausblick & abschließende Bemerkungen

In dieser Dissertationsarbeit wurde gezeigt, dass die uns von Sepsis-Patient:innen bekannte durchflusszytometrisch gemessene Thrombozyten-Hyporeaktivität bereits bei hospitalisierten Patient:innen mit Infektionserkrankungen (SOFA-Score <2) in abgeschwächtem Ausmaß nachgewiesen werden kann. Auf Basis unserer aktuellen Datenlage bleibt diese Thrombozytendysfunktion damit weiterhin ein vielversprechender Kandidat für einen neuen Biomarker zur Sepsis-Früherkennung. Zusätzlich stellten wir bei der Analyse der Thrombozytenfunktion unter arteriellen Flussbedingungen eine normale bis beschleunigte Aggregation der Thrombozyten bei Sepsis fest. Dies veranschaulicht, dass Ergebnisse der Thrombozytenfunktionsanalyse zwischen statischen und dynamischen Untersuchungsbedingungen variieren können und beide Methoden folglich komplementär erscheinen.

Die vorliegende Arbeit basiert auf dem Datensatz der ersten 25 erhobenen Patient:innen einer fortlaufenden Studie mit einer geplanten Fallzahl von insgesamt 130 Patient:innen. Deren Rekrutierung wird im weiteren Studienverlauf die externe Validität unserer bisherigen Ergebnisse durch eine größere Fallzahl erhöhen und zur Beantwortung zahlreicher Folgefragestellungen hilfreich sein. Einige der in dieser Arbeit angeführten Anschlussfragestellungen konnten im weiteren Studienverlauf bereits untersucht werden. Dem indirekten Hinweis des Mepacrin-Beladungsdefizits bei Sepsis folgend, konnte mittels WM-TEM eine reduzierte Anzahl an δ -Granula bei Thrombozyten von Sepsis:Patient:innen morphologisch nachgewiesen werden [155]. Ferner ergaben Flusskammerexperimente, dass Sepsis-Thrombozyten unter venösen Scherkräften (200s^{-1}) im Vergleich zur Kontrollgruppe eine tendenziell normwertige Aggregation aufwiesen, während diese unter arteriellen Scherkräften (1000s^{-1}) stark reduziert war. Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu unseren PFA-200 Ergebnissen und der in dieser Arbeit aufgestellten Hypothese (Kapitel 4.1), dass Sepsis-Thrombozyten bei hohen Scherraten möglicherweise normoreaktiv und bei abnehmenden Scherraten zunehmend hyporeaktiv sind.

Einige Wochen nach Beendigung der Patient:innenrekrutierung für dieses Promotionsprojekt kam es zum Ausbruch der COVID-19 Pandemie. In der Konsequenz wurde im weiteren Studienverlauf zusätzlich als vierte Kohorte die Thrombozytenfunktion von hospitalisierten Patient:innen mit COVID-19 untersucht, da im Pandemieverlauf schon früh eine erhöhte Inzidenz thromboembolischer Komplikationen bei COVID-19 auffiel [156]. Interessanterweise konnte bei COVID-19 im Kontrast zu Sepsis unter arteriellen Scherraten eine uneingeschränkte Thrombozytenaggregation in der Flusskammer detektiert werden, die für die hohe Inzidenz thromboembolischer Ereignisse mitverantwortlich sein könnte und sich durch eine äußerst niedrige Dosis eines klinisch etablierten GPIIb/IIIa-Inhibitors wie Tirofiban auf ein ähnliches Aggregationsniveau wie bei Sepsis reduzieren ließ. Damit könnten unsere Studienergebnisse künftig zur klinische Entscheidungsfindung bei der Auswahl der medikamentösen Thromboseprophylaxe mit dem besten Nutzen-Risiko-Verhältnis bei COVID-19 beitragen.

Während der Fokus dieser Promotionsarbeit auf einer möglichst umfassenden Beschreibung der Funktion und des Phänotyps von Thrombozyten bei Sepsis und Infektion lag, sollte im weiteren Studienverlauf zusätzlich die mechanistische Ursachenklärung der beschriebenen Veränderungen der Thrombozytenfunktion adressiert werden. Einen ersten Schritt in diese Richtung stellt die Durchführung von Koinkubationsexperimenten dar. Dabei werden Thrombozyten von Gesundspender:innen isoliert, mit einem thrombozytenspezifischen Marker markiert und anschließend in Vollblut von Sepsis-Patient:innen (sowie als Kontroll-Reaktion im Vollblut einer zweiten Gesundspender:in) inkubiert, deren Thrombozyten zuvor mit einem zweiten spezifischen Antikörper markiert wurden. Anschließend können die Thrombozytenreaktivität, δ -Granula, Desialylierung und ggf. Rezeptorausstattung der Thrombozyten nach Standard-Protokoll mittels Durchflusszytometrie untersucht werden. Lassen sich auf diese Weise die von Sepsis-Thrombozyten bekannten Veränderungen bei den Thrombozyten von Gesundspender:innen induzieren, kann zur weiteren Differenzierung, ob die ursächliche Komponente zellulären oder plasmatischen Ursprungs ist, in einem zweiten Schritt eine Koinkubation in PPP und ggf. PRP durchgeführt werden. Bezogen auf die Thrombozytenreaktivität konnten wir in ersten Experimenten bereits zeigen, dass eine Hyporeaktivität in Thrombozyten von Gesundspender:innen durch Sepsis-Vollblut, nicht aber durch Sepsis-PPP induzierbar war, was auf eine zelluläre Ursache hinweist [120]. Folglich ist es z.B. denkbar, dass Thrombozyten während des inflammatorischen Geschehens durch Zell-Zell-Kontakte teilaktiviert werden und in hyporeaktivem Zustand weiter im Blutstrom zirkulieren.

Wie eingangs erwähnt, wird das heterogene Syndrom Sepsis zunehmend mit dem Ziel eines individualisierteren klinischen Managements durch die Beschreibung klinischer Sepsis-Phänotypen differenzierter betrachtet [7]. Mit dem Vorliegen eines größeren Datensatzes zur

Thrombozytenfunktion bei Sepsis kann zukünftig eine vergleichende Subgruppenanalyse der Thrombozytenfunktion zwischen diesen Sepsis-Phänotypen erfolgen. Auch eine Ausweitung unserer Forschungsfragestellungen auf pädiatrische Patient:innen mit Sepsis sollte in der Zukunft perspektivisch erwogen werden.

Motivation und Ziel der vorliegenden Forschungsarbeit war es, die Diagnosestellung und Therapie künftiger Patient:innen mit schweren Infektionserkrankungen oder Sepsis durch ein genaueres Verständnis der pathophysiologischen Zusammenhänge zu verbessern und folglich zu einer Erhöhung deren Überlebenschancen und Lebensqualität beizutragen.

5 LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M *et al.* The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016; 315: 801-810.
- 2 Bone RC BR, Cerra FB, et al. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992; 20: 864-874.
- 3 Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D *et al.* 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med* 2003; 29: 530-538.
- 4 Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonça A, Bruining H *et al.* The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med* 1996; 22: 707-710.
- 5 Shankar-Hari M, Phillips GS, Levy ML, Seymour CW, Liu VX, Deutschman CS *et al.* Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016; 315: 775-787.
- 6 Seymour CW, Liu VX, Iwashyna TJ, Brunkhorst FM, Rea TD, Scherag A *et al.* Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016; 315: 762-774.
- 7 Seymour CW, Kennedy JN, Wang S, Chang CH, Elliott CF, Xu Z *et al.* Derivation, Validation, and Potential Treatment Implications of Novel Clinical Phenotypes for Sepsis. *JAMA* 2019; 321: 2003-2017.
- 8 Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, Shackelford KA, Tsoi D, Kievlan DR *et al.* Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet* 2020; 395: 200-211.
- 9 Bauer M, Groesdonk HV, Preissing F, Dickmann P, Vogelmann T, Gerlach H. [Mortality in sepsis and septic shock in Germany. Results of a systematic review and meta-analysis]. *Anaesthetist* 2021; 70: 673-680.
- 10 Gaieski DF, Edwards JM, Kallan MJ, Carr BG. Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. *Crit Care Med* 2013; 41: 1167-1174.
- 11 Iwashyna TJ, Cooke CR, Wunsch H, Kahn JM. Population burden of long-term survivorship after severe sepsis in older Americans. *J Am Geriatr Soc* 2012; 60: 1070-1077.

- 12 Fleischmann-Struzek C, Rose N, Reinhart K. [Sepsis-associated deaths in Germany: characteristics and regional variation]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 2021; 1-8.
- 13 Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001; 29: 1303-1310.
- 14 Liang L, Moore B, Soni A. National Inpatient Hospital Costs: The Most Expensive Conditions by Payer, 2017: Statistical Brief #261. *Healthcare Cost and Utilization Project (HCUP) Statistical Briefs*. Agency for Healthcare Research and Quality (US): Rockville (MD), 2020.
- 15 Perner A, Gordon AC, De Backer D, Dimopoulos G, Russell JA, Lipman J *et al*. Sepsis: frontiers in diagnosis, resuscitation and antibiotic therapy. *Intensive Care Med* 2016; 42: 1958-1969.
- 16 Vincent JL, Marshall JC, Namendys-Silva SA, François B, Martin-Loeches I, Lipman J *et al*. Assessment of the worldwide burden of critical illness: the intensive care over nations (ICON) audit. *Lancet Respir Med* 2014; 2: 380-386.
- 17 Vincent JL, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD *et al*. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA* 2009; 302: 2323-2329.
- 18 Ertmer C, Rehberg S. [Pathophysiology of sepsis]. *Dtsch Med Wochenschr* 2016; 141: 1067-1073.
- 19 Savva A, Roger T. Targeting toll-like receptors: promising therapeutic strategies for the management of sepsis-associated pathology and infectious diseases. *Front Immunol* 2013; 4: 387.
- 20 Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 1-5.
- 21 Denning NL, Aziz M, Gurien SD, Wang P. DAMPs and NETs in Sepsis. *Front Immunol* 2019; 10: 2536.
- 22 Hayden MS, Ghosh S. NF- κ B in immunobiology. *Cell Res* 2011; 21: 223-244.
- 23 van der Poll T, van de Veerdonk FL, Scicluna BP, Netea MG. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. *Nat Rev Immunol* 2017; 17: 407-420.
- 24 Strnad P, Tacke F, Koch A, Trautwein C. Liver - guardian, modifier and target of sepsis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017; 14: 55-66.

- 25 Boomer JS, To K, Chang KC, Takasu O, Osborne DF, Walton AH *et al.* Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA* 2011; 306: 2594-2605.
- 26 Schulte W, Bernhagen J, Bucala R. Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets--an updated view. *Mediators Inflamm* 2013; 2013: 165974.
- 27 Arina P, Singer M. Pathophysiology of sepsis. *Curr Opin Anaesthesiol* 2021; 34: 77-84.
- 28 Joffre J, Hellman J, Ince C, Ait-Oufella H. Endothelial Responses in Sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2020; 202: 361-370.
- 29 Tressel SL, Kaneider NC, Kasuda S, Foley C, Koukos G, Austin K *et al.* A matrix metalloprotease-PAR1 system regulates vascular integrity, systemic inflammation and death in sepsis. *EMBO Mol Med* 2011; 3: 370-384.
- 30 Taeb AM, Hooper MH, Marik PE. Sepsis: Current Definition, Pathophysiology, Diagnosis, and Management. *Nutr Clin Pract* 2017; 32: 296-308.
- 31 Stark K, Massberg S. Interplay between inflammation and thrombosis in cardiovascular pathology. *Nat Rev Cardiol* 2021; 18: 666-682.
- 32 Iba T, Levy JH. Sepsis-induced Coagulopathy and Disseminated Intravascular Coagulation. *Anesthesiology* 2020; 132: 1238-1245.
- 33 Cecconi M, Evans L, Levy M, Rhodes A. Sepsis and septic shock. *Lancet* 2018; 392: 75-87.
- 34 Herold G. *Innere Medizin* 2022. De Gruyter, 2021, pp 323-326.
- 35 Brunkhorst FM, Weigand MA, Pletz M, Gastmeier P, Lemmen SW, Meier-Hellmann A *et al.* [S3 Guideline Sepsis-prevention, diagnosis, therapy, and aftercare : Long version]. *Med Klin Intensivmed Notfmed* 2020; 115: 37-109.
- 36 Seymour CW, Gesten F, Prescott HC, Friedrich ME, Iwashyna TJ, Phillips GS *et al.* Time to Treatment and Mortality during Mandated Emergency Care for Sepsis. *N Engl J Med* 2017; 376: 2235-2244.
- 37 Nicolai L, Massberg S. Platelets as key players in inflammation and infection. *Curr Opin Hematol* 2020; 27: 34-40.
- 38 Deppermann C. Platelets and vascular integrity. *Platelets* 2018; 29: 549-555.
- 39 Brandes R, Lang F, Schmidt RF. *Physiologie des Menschen*, 32 edn. Springer, 2019, pp 298-305.
- 40 Jelkmann W. Allgemeine Eigenschaften des Blutes. *Physiologie des Menschen*. Springer, 2019, pp 285-305.

- 41 Thomas SG. 3 - The Structure of Resting and Activated Platelets. In: Michelson AD (ed). *Platelets (Fourth Edition)*. Academic Press, 2019, pp 47-77.
- 42 White JG, Michelson A. Platelet structure. *Platelets* 2007; 2: 45-71.
- 43 Wagner CL, Mascelli MA, Neblock DS, Weisman HF, Collier BS, Jordan RE. Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. *Blood* 1996; 88: 907-914.
- 44 Kauskot A, Hoylaerts MF. Platelet receptors. *Handb Exp Pharmacol* 2012: 23-57.
- 45 Bennett JS. Structure and function of the platelet integrin α IIb β 3. *J Clin Invest* 2005; 115: 3363-3369.
- 46 Clemetson KJ, Clemetson JM. Platelet receptors. *Platelets*. Elsevier, 2019, pp 169-192.
- 47 Miura Y, Takahashi T, Jung SM, Moroi M. Analysis of the interaction of platelet collagen receptor glycoprotein VI (GPVI) with collagen. A dimeric form of GPVI, but not the monomeric form, shows affinity to fibrous collagen. *J Biol Chem* 2002; 277: 46197-46204.
- 48 White JG, Krumwiede M. Further studies of the secretory pathway in thrombin-stimulated human platelets. *Blood* 1987; 69: 1196-1203.
- 49 Escolar G, Leistikow E, White JG. The fate of the open canalicular system in surface and suspension-activated platelets. *Blood* 1989; 74: 1983-1988.
- 50 White JG. Platelets are coverocytes, not phagocytes: uptake of bacteria involves channels of the open canalicular system. *Platelets* 2005; 16: 121-131.
- 51 Gremmel T, Frelinger AL, 3rd, Michelson AD. Platelet Physiology. *Semin Thromb Hemost* 2016; 42: 191-204.
- 52 King SM, Reed GL. Development of platelet secretory granules. *Semin Cell Dev Biol* 2002; 13: 293-302.
- 53 Berger G, Massé JM, Cramer EM. Alpha-granule membrane mirrors the platelet plasma membrane and contains the glycoproteins Ib, IX, and V. *Blood* 1996; 87: 1385-1395.
- 54 Flaumenhaft R, Sharda A. Platelet secretion. *Platelets*. Elsevier, 2019, pp 349-370.
- 55 Giannini S, Falet H, Hoffmeister K. Platelet glycobiology and the control of platelet function and lifespan. *Platelets*. Elsevier, 2019, pp 79-97.

- 56 Burkhardt JM, Vaudel M, Gambaryan S, Radau S, Walter U, Martens L *et al.* The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways. *Blood* 2012; 120: e73-82.
- 57 Ramström S, Oberg KV, Akerström F, Enström C, Lindahl TL. Platelet PAR1 receptor density--correlation to platelet activation response and changes in exposure after platelet activation. *Thromb Res* 2008; 121: 681-688.
- 58 Li S, Tarlac V, Christanto RBI, French SL, Hamilton JR. Determination of PAR4 numbers on the surface of human platelets: no effect of the single nucleotide polymorphism rs773902. *Platelets* 2021; 32: 988-991.
- 59 Baurand A, Raboisson P, Freund M, Léon C, Cazenave JP, Bourguignon JJ *et al.* Inhibition of platelet function by administration of MRS2179, a P2Y1 receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 2001; 412: 213-221.
- 60 Ohlmann P, Lecchi A, El-Tayeb A, Müller CE, Cattaneo M, Gachet C. The platelet P2Y(12) receptor under normal and pathological conditions. Assessment with the radiolabeled selective antagonist [(3)H]PSB-0413. *Purinergic Signal* 2013; 9: 59-66.
- 61 White JG. The dense bodies of human platelets: inherent electron opacity of the serotonin storage particles. *Blood* 1969; 33: 598-606.
- 62 Dupuis A, Bordet JC, Eckly A, Gachet C. Platelet δ -Storage Pool Disease: An Update. *J Clin Med* 2020; 9.
- 63 Youssefian T, Massé JM, Rendu F, Guichard J, Cramer EM. Platelet and megakaryocyte dense granules contain glycoproteins Ib and IIb-IIIa. *Blood* 1997; 89: 4047-4057.
- 64 Grozovsky R, Giannini S, Falet H, Hoffmeister KM. Regulating billions of blood platelets: glycans and beyond. *Blood* 2015; 126: 1877-1884.
- 65 Junt T, Schulze H, Chen Z, Massberg S, Goerge T, Krueger A *et al.* Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science* 2007; 317: 1767-1770.
- 66 Demirin H, Ozhan H, Ucgun T, Celer A, Bulur S, Cil H *et al.* Normal range of mean platelet volume in healthy subjects: Insight from a large epidemiologic study. *Thrombosis research* 2011; 128: 358-360.
- 67 Jansen AJ, Josefsson EC, Rumjantseva V, Liu QP, Falet H, Bergmeier W *et al.* Desialylation accelerates platelet clearance after refrigeration and initiates GPIIb/IIIa metalloproteinase-mediated cleavage in mice. *Blood* 2012; 119: 1263-1273.
- 68 Okumura I, Lombart C, Jamieson GA. Platelet glycoprotein IIb/IIIa. II. Purification and characterization. *J Biol Chem* 1976; 251: 5950-5955.

- 69 Li R, Hoffmeister KM, Falet H. Glycans and the platelet life cycle. *Platelets* 2016; 27: 505-511.
- 70 Gros A, Syvannarath V, Lamrani L, Ollivier V, Loyau S, Goerge T *et al.* Single platelets seal neutrophil-induced vascular breaches via GPVI during immune-complex-mediated inflammation in mice. *Blood* 2015; 126: 1017-1026.
- 71 Hoffmeister KM, Falet H. Platelet clearance by the hepatic Ashwell-Morrell receptor: mechanisms and biological significance. *Thromb Res* 2016; 141 Suppl 2: S68-72.
- 72 Grozovsky R, Begonja AJ, Liu K, Visner G, Hartwig JH, Falet H *et al.* The Ashwell-Morell receptor regulates hepatic thrombopoietin production via JAK2-STAT3 signaling. *Nat Med* 2015; 21: 47-54.
- 73 Qian H, Buza-Vidas N, Hyland CD, Jensen CT, Antonchuk J, Månsson R *et al.* Critical role of thrombopoietin in maintaining adult quiescent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 2007; 1: 671-684.
- 74 Wang Y, Chen W, Zhang W, Lee-Sundlov MM, Casari C, Berndt MC *et al.* Desialylation of O-glycans on glycoprotein Ib α drives receptor signaling and platelet clearance. *Haematologica* 2021; 106: 220-229.
- 75 Grewal PK, Aziz PV, Uchiyama S, Rubio GR, Lardone RD, Le D *et al.* Inducing host protection in pneumococcal sepsis by preactivation of the Ashwell-Morell receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: 20218-20223.
- 76 Deppermann C, Kratofil RM, Peiseler M, David BA, Zindel J, Castanheira F *et al.* Macrophage galactose lectin is critical for Kupffer cells to clear aged platelets. *J Exp Med* 2020; 217.
- 77 Bilzer M, Roggel F, Gerbes AL. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int* 2006; 26: 1175-1186.
- 78 Kaser A, Brandacher G, Steurer W, Kaser S, Offner FA, Zoller H *et al.* Interleukin-6 stimulates thrombopoiesis through thrombopoietin: role in inflammatory thrombocytosis. *Blood* 2001; 98: 2720-2725.
- 79 Levi M, Opal SM. Coagulation abnormalities in critically ill patients. *Crit Care* 2006; 10: 222.
- 80 Versteeg HH, Heemskerk JW, Levi M, Reitsma PH. New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev* 2013; 93: 327-358.
- 81 Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 403-412.
- 82 van der Meijden PEJ, Heemskerk JWM. Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. *Nat Rev Cardiol* 2019; 16: 166-179.

- 83 Watson SP, Herbert JM, Pollitt AY. GPVI and CLEC-2 in hemostasis and vascular integrity. *J Thromb Haemost* 2010; 8: 1456-1467.
- 84 Cohen S, Braiman A, Shubinsky G, Ohayon A, Altman A, Isakov N. PKC θ is required for hemostasis and positive regulation of thrombin-induced platelet aggregation and alpha-granule secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 385: 22-27.
- 85 Bledzka K, Qin J, Plow EF. Integrin α IIb β 3. *Platelets* 2019: 227-241.
- 86 Offermanns S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ Res* 2006; 99: 1293-1304.
- 87 Swieringa F, Spronk HMH, Heemskerk JWM, van der Meijden PEJ. Integrating platelet and coagulation activation in fibrin clot formation. *Res Pract Thromb Haemost* 2018; 2: 450-460.
- 88 Crawley JT, Zanardelli S, Chion CK, Lane DA. The central role of thrombin in hemostasis. *J Thromb Haemost* 2007; 5 Suppl 1: 95-101.
- 89 Levaditi C. Sur l'état de la cytase dans le plasma des animaux normaux et des organismes vaccinés contre le vibron cholérique. *Ann Inst Pasteur* 1901; 15: 894-924.
- 90 Cox D, Kerrigan SW, Watson SP. Platelets and the innate immune system: mechanisms of bacterial-induced platelet activation. *J Thromb Haemost* 2011; 9: 1097-1107.
- 91 Brennan MP, Loughman A, Devocelle M, Arasu S, Chubb AJ, Foster TJ *et al.* Elucidating the role of Staphylococcus epidermidis serine-aspartate repeat protein G in platelet activation. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 1364-1372.
- 92 Cognasse F, Hamzeh H, Chavarin P, Acquart S, Genin C, Garraud O. Evidence of Toll-like receptor molecules on human platelets. *Immunol Cell Biol* 2005; 83: 196-198.
- 93 Hu H, Armstrong PC, Khalil E, Chen YC, Straub A, Li M *et al.* GPVI and GPIIb α mediate staphylococcal superantigen-like protein 5 (SSL5) induced platelet activation and direct toward glycans as potential inhibitors. *PLoS One* 2011; 6: e19190.
- 94 Blair P, Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev* 2009; 23: 177-189.
- 95 Portier I, Campbell RA. Role of Platelets in Detection and Regulation of Infection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2021; 41: 70-78.

- 96 Palankar R, Kohler TP, Krauel K, Wesche J, Hammerschmidt S, Greinacher A. Platelets kill bacteria by bridging innate and adaptive immunity via platelet factor 4 and FcγRIIA. *J Thromb Haemost* 2018; 16: 1187-1197.
- 97 Deppermann C, Kubes P. Platelets and infection. *Semin Immunol* 2016; 28: 536-545.
- 98 Aggrey AA, Srivastava K, Ture S, Field DJ, Morrell CN. Platelet induction of the acute-phase response is protective in murine experimental cerebral malaria. *J Immunol* 2013; 190: 4685-4691.
- 99 Deppermann C, Kubes P. Start a fire, kill the bug: The role of platelets in inflammation and infection. *Innate Immun* 2018; 24: 335-348.
- 100 Rondina MT, Carlisle M, Fraughton T, Brown SM, Miller RR, 3rd, Harris ES *et al.* Platelet-monocyte aggregate formation and mortality risk in older patients with severe sepsis and septic shock. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2015; 70: 225-231.
- 101 Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM *et al.* Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med* 2007; 13: 463-469.
- 102 Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS *et al.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004; 303: 1532-1535.
- 103 Jiménez-Alcázar M, Rangaswamy C, Panda R, Bitterling J, Simsek YJ, Long AT *et al.* Host DNases prevent vascular occlusion by neutrophil extracellular traps. *Science* 2017; 358: 1202-1206.
- 104 Ho-Tin-Noé B, Boulaftali Y, Camerer E. Platelets and vascular integrity: how platelets prevent bleeding in inflammation. *Blood* 2018; 131: 277-288.
- 105 Goerge T, Ho-Tin-Noe B, Carbo C, Benarafa C, Remold-O'Donnell E, Zhao BQ *et al.* Inflammation induces hemorrhage in thrombocytopenia. *Blood* 2008; 111: 4958-4964.
- 106 Rayes J, Watson SP. Platelet GPVI repairs its own damage. *Blood* 2015; 126: 933-934.
- 107 Lax S, Rayes J, Wichaiyo S, Haining EJ, Lowe K, Grygielska B *et al.* Platelet CLEC-2 protects against lung injury via effects of its ligand podoplanin on inflammatory alveolar macrophages in the mouse. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2017; 313: L1016-L1029.
- 108 Rayes J, Jadoui S, Lax S, Gros A, Wichaiyo S, Ollivier V *et al.* The contribution of platelet glycoprotein receptors to inflammatory bleeding prevention is stimulus and organ dependent. *Haematologica* 2018; 103: e256-e258.

- 109 Boulaftali Y, Hess PR, Getz TM, Cholka A, Stolla M, Mackman N *et al.* Platelet ITAM signaling is critical for vascular integrity in inflammation. *J Clin Invest* 2013; 123: 908-916.
- 110 Laursen MA, Larsen JB, Larsen KM, Hvas AM. Platelet function in patients with septic shock. *Thromb Res* 2020; 185: 33-42.
- 111 Woth G, Varga A, Ghosh S, Krupp M, Kiss T, Bogár L *et al.* Platelet aggregation in severe sepsis. *J Thromb Thrombolysis* 2011; 31: 6-12.
- 112 Yaguchi A, Lobo FL, Vincent JL, Pradier O. Platelet function in sepsis. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 2096-2102.
- 113 Davies GR, Mills GM, Lawrence M, Battle C, Morris K, Hawkins K *et al.* The role of whole blood impedance aggregometry and its utilisation in the diagnosis and prognosis of patients with systemic inflammatory response syndrome and sepsis in acute critical illness. *PLoS One* 2014; 9: e108589.
- 114 Akinosoglou K, Theodoraki S, Xanthopoulou I, Perperis A, Gkavogianni T, Pistiki A *et al.* Platelet reactivity in sepsis syndrome: results from the PRESS study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2017; 36: 2503-2512.
- 115 Tunjungputri RN, van de Heijden W, Urbanus RT, de Groot PG, van der Ven A, de Mast Q. Higher platelet reactivity and platelet-monocyte complex formation in Gram-positive sepsis compared to Gram-negative sepsis. *Platelets* 2017; 28: 595-601.
- 116 Lundahl TH, Petersson J, Fagerberg IH, Berg S, Lindahl TL. Impaired platelet function correlates with multi-organ dysfunction. A study of patients with sepsis. *Platelets* 1998; 9: 223-225.
- 117 Gawaz M, Dickfeld T, Bogner C, Fateh-Moghadam S, Neumann FJ. Platelet function in septic multiple organ dysfunction syndrome. *Intensive Care Med* 1997; 23: 379-385.
- 118 Gawaz M, Fateh-Moghadam S, Pilz G, Gurland HJ, Werdan K. Platelet activation and interaction with leucocytes in patients with sepsis or multiple organ failure. *Eur J Clin Invest* 1995; 25: 843-851.
- 119 Gawaz M, Fateh-Moghadam S, Pilz G, Gurland HJ, Werdan K. Severity of multiple organ failure (MOF) but not of sepsis correlates with irreversible platelet degranulation. *Infection* 1995; 23: 16-23.
- 120 Weiss LJ, Manukjan G, Pflug A, Winter N, Weigel M, Nagler N *et al.* Acquired platelet GPVI receptor dysfunction in critically ill patients with sepsis. *Blood* 2021; 137: 3105-3115.
- 121 Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S *et al.* Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical

- determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med* 2006; 34: 1589-1596.
- 122 Beck S, Öftering P, Li R, Hemmen K, Nagy M, Wang Y *et al.* Platelet glycoprotein V spatio-temporally controls fibrin formation. *Nature Cardiovascular Research* 2023.
- 123 Knöfler R, Eberl W, Schulze H, Bakchoul T, Bergmann F, Gehrlich S *et al.* [Diagnosis of inherited diseases of platelet function. Interdisciplinary S2K guideline of the Permanent Paediatric Committee of the Society of Thrombosis and Haemostasis Research (GTH e. V.)]. *Hamostaseologie* 2014; 34: 201-212.
- 124 Finsterbusch M, Schrottmaier WC, Kral-Pointner JB, Salzmann M, Assinger A. Measuring and interpreting platelet-leukocyte aggregates. *Platelets* 2018; 29: 677-685.
- 125 Manukjan G, Eilenberger J, Andres O, Schambeck C, Eber S, Schulze H. Functional Classification of Paediatric Patients with Non-syndromic Delta-Storage Pool Deficiency. *Hamostaseologie* 2019; 39: 383-391.
- 126 Montague SJ, Andrews RK, Gardiner EE. Mechanisms of receptor shedding in platelets. *Blood* 2018; 132: 2535-2545.
- 127 Haining EJ, Nicolson PL, Onselaer M-B, Poulter NS, Rayes J, Thomas MR *et al.* GPVI and CLEC-2. *Platelets*. Elsevier, 2019, pp 213-226.
- 128 Horii K, Brooks MT, Herr AB. Convulxin forms a dimer in solution and can bind eight copies of glycoprotein VI: implications for platelet activation. *Biochemistry* 2009; 48: 2907-2914.
- 129 Vardon-Bouines F, Ruiz S, Gratacap MP, Garcia C, Payrastra B, Minville V. Platelets Are Critical Key Players in Sepsis. *Int J Mol Sci* 2019; 20.
- 130 Adamzik M, Görlinger K, Peters J, Hartmann M. Whole blood impedance aggregometry as a biomarker for the diagnosis and prognosis of severe sepsis. *Crit Care* 2012; 16: R204.
- 131 Favaloro EJ. Clinical utility of closure times using the platelet function analyzer-100/200. *Am J Hematol* 2017; 92: 398-404.
- 132 Lordkipanidzé M, Hvas A-M, Harrison P. Clinical Tests of Platelet Function. *Platelets*. Elsevier, 2019, pp 593-608.
- 133 Ware LB, Eisner MD, Thompson BT, Parsons PE, Matthay MA. Significance of von Willebrand factor in septic and nonseptic patients with acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 766-772.
- 134 Kuiper G, Houben R, Wetzels RJH, Verhezen PWM, Oerle RV, Ten Cate H *et al.* The use of regression analysis in determining reference intervals for low

- hematocrit and thrombocyte count in multiple electrode aggregometry and platelet function analyzer 100 testing of platelet function. *Platelets* 2017; 28: 668-675.
- 135 Li R. The glycoprotein Ib-IX-V complex. *Platelets*. Elsevier, 2019, pp 193-211.
- 136 Imran BMN. Sepsis and cardiovascular events: The story so far. *Ann Acad Med Singap* 2022; 51: 261-262.
- 137 Shao IY, Elkind MSV, Boehme AK. Risk Factors for Stroke in Patients With Sepsis and Bloodstream Infections. *Stroke* 2019; 50: 1046-1051.
- 138 Pierrakos C, Velissaris D, Bisdorff M, Marshall JC, Vincent JL. Biomarkers of sepsis: time for a reappraisal. *Crit Care* 2020; 24: 287.
- 139 Jämsä J, Ala-Kokko T, Huotari V, Ohtonen P, Savolainen ER, Syrjälä H. Neutrophil CD64, C-reactive protein, and procalcitonin in the identification of sepsis in the ICU - Post-test probabilities. *J Crit Care* 2018; 43: 139-142.
- 140 Muzlovic I, Ihan A, Stubljarić D. CD64 index on neutrophils can diagnose sepsis and predict 30-day survival in subjects after ventilator-associated pneumonia. *J Infect Dev Ctries* 2016; 10: 260-268.
- 141 Yin WP, Li JB, Zheng XF, An L, Shao H, Li CS. Effect of neutrophil CD64 for diagnosing sepsis in emergency department. *World J Emerg Med* 2020; 11: 79-86.
- 142 Repp R, Valerius T, Sendler A, Gramatzki M, Iro H, Kalden JR *et al*. Neutrophils express the high affinity receptor for IgG (Fc gamma RI, CD64) after in vivo application of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 1991; 78: 885-889.
- 143 Barichello T, Generoso JS, Singer M, Dal-Pizzol F. Biomarkers for sepsis: more than just fever and leukocytosis-a narrative review. *Crit Care* 2022; 26: 14.
- 144 Claushuis TAM, de Vos AF, Roelofs J, de Boer OJ, van 't Veer C, van der Poll T. Platelet-Dense Granules Worsen Pre-Infection Thrombocytopenia during Gram-Negative Pneumonia-Derived Sepsis. *J Innate Immun* 2019; 11: 168-180.
- 145 Watts SW, Morrison SF, Davis RP, Barman SM. Serotonin and blood pressure regulation. *Pharmacol Rev* 2012; 64: 359-388.
- 146 Gardiner EE, Karunakaran D, Shen Y, Arthur JF, Andrews RK, Berndt MC. Controlled shedding of platelet glycoprotein (GP)VI and GPIb-IX-V by ADAM family metalloproteinases. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 1530-1537.
- 147 Brill A, Chauhan AK, Canault M, Walsh MT, Bergmeier W, Wagner DD. Oxidative stress activates ADAM17/TACE and induces its target receptor

- shedding in platelets in a p38-dependent fashion. *Cardiovasc Res* 2009; 84: 137-144.
- 148 Li MF, Li XL, Fan KL, Yu YY, Gong J, Geng SY *et al*. Platelet desialylation is a novel mechanism and a therapeutic target in thrombocytopenia during sepsis: an open-label, multicenter, randomized controlled trial. *J Hematol Oncol* 2017; 10: 104.
- 149 Grewal PK, Uchiyama S, Ditto D, Varki N, Le DT, Nizet V *et al*. The Ashwell receptor mitigates the lethal coagulopathy of sepsis. *Nat Med* 2008; 14: 648-655.
- 150 Kullaya V, de Jonge MI, Langereis JD, van der Gaast-de Jongh CE, Büll C, Adema GJ *et al*. Desialylation of Platelets by Pneumococcal Neuraminidase A Induces ADP-Dependent Platelet Hyperreactivity. *Infect Immun* 2018; 86.
- 151 Montenont E, Rondina MT, Campbell RA. Altered functions of platelets during aging. *Curr Opin Hematol* 2019; 26: 336-342.
- 152 Davizon-Castillo P, McMahon B, Aguila S, Bark D, Ashworth K, Allawzi A *et al*. TNF-alpha-driven inflammation and mitochondrial dysfunction define the platelet hyperreactivity of aging. *Blood* 2019; 134: 727-740.
- 153 Cho YU, Chi HS, Jang S, Park CJ. [Reconfirmation of preanalytical variables and establishment of reference intervals of platelet function analyzer-100 closure times in Korean adults]. *Korean J Lab Med* 2007; 27: 318-323.
- 154 Sestito A, Sciahbasi A, Landolfi R, Maseri A, Lanza GA, Andreotti F. A simple assay for platelet-mediated hemostasis in flowing whole blood (PFA-100): reproducibility and effects of sex and age. *Cardiologia* 1999; 44: 661-665.
- 155 Weiss LJ, Drayss M, Manukjan G, Zeitlhofer MJ, Kleiss J, Weigel ML *et al*. Uncoupling of platelet granule release and integrin activation suggests GPIIb/IIIa as therapeutic target in COVID-19. *Blood Adv* 2022.
- 156 Klok FA, Kruijff M, van der Meer NJM, Arbous MS, Gommers D, Kant KM *et al*. Incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19. *Thromb Res* 2020; 191: 145-147.

6 APPENDIX

6.1 Tabelle 14: Mikrobiologische Erregernachweise und Antibiotikatherapien

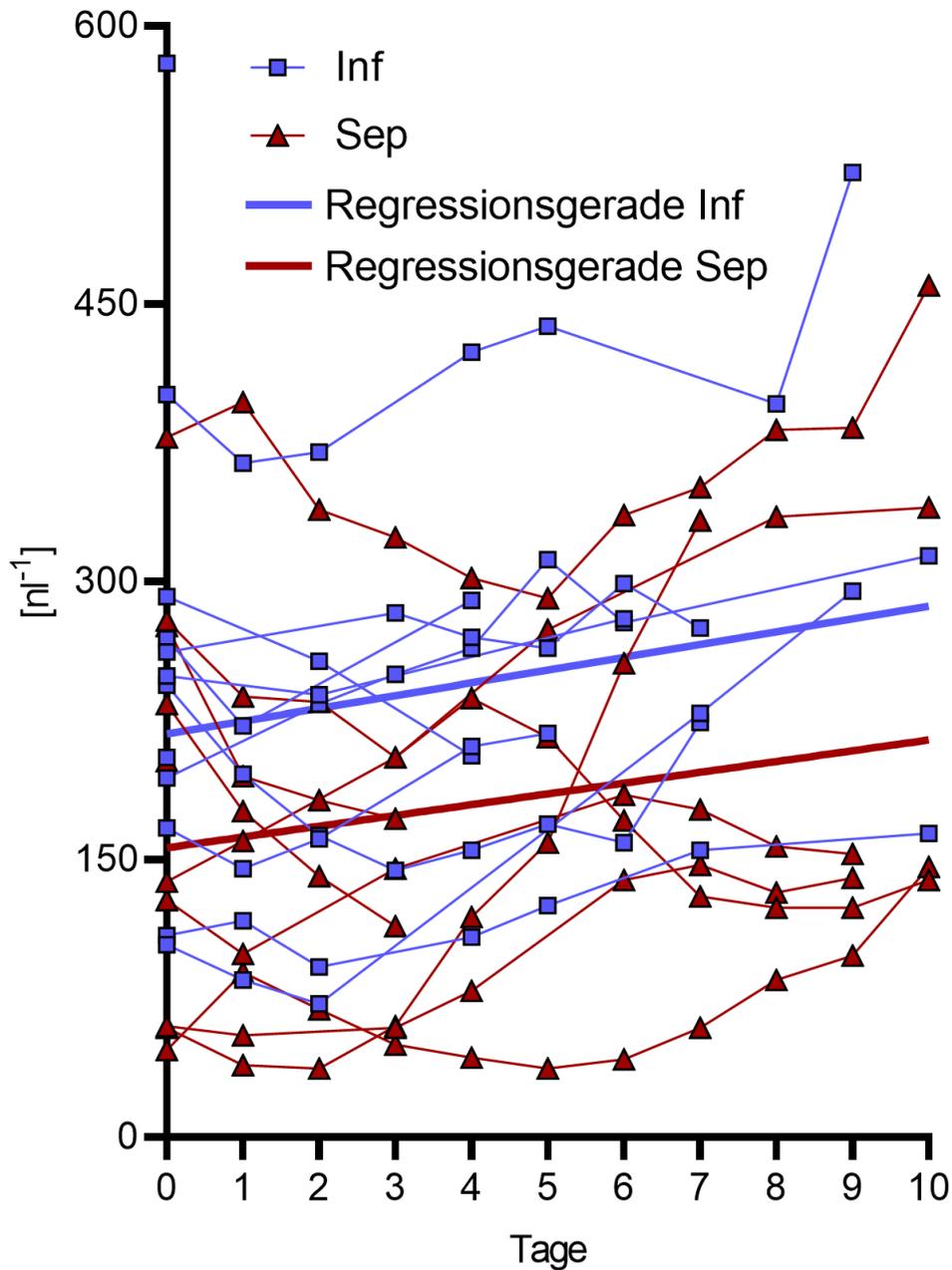
Tabelle 14: Mikrobiologische Erregernachweise und Antibiotikatherapien.

Kohorte	ID	Erreger (untersuchtes Material)	Antibiotikatherapie
Infektion	101	Enterococcus faecalis (Urinkultur)	Ampicillin/Sulbactam 3g
	102	kein Nachweis	keines
	103	kein Nachweis	Metronidazol 500mg, Ceftriaxon 2g
	104	kein Nachweis	Clarithromycin 250mg, Ceftriaxon 2g
	105	Escherichia coli (Urin- & Blutkultur); Pseudomonas aeruginosa (Urinkultur)	Piperacillin/Tazobactam 4+0,5g
	106	kein Nachweis	Clarithromycin 250mg, Ceftriaxon 2g
	107	Escherichia coli (Blutkultur)	Piperacillin/Tazobactam 4+0,5g
	108	Pseudomonas aeruginosa (Urinkultur)	Piperacillin/Tazobactam 4+0,5g, Cefazolin 2g
	109	kein Nachweis	Ampicillin/Sulbactam 3g
	110	Cytomegalievirus	Clarithromycin 500mg, Aciclovir 400mg, Piperacillin/Tazobactam 4+0,5g
	111	kein Nachweis	Ampicillin/Sulbactam 3g, Clarithromycin 500mg
	112	Mykoplasma pneumoniae, Chlamydia pneumoniae	Piperacillin/Tazobactam 4+0,5g
Sepsis	101	Escherichia coli (Blutkultur)	Piperacillin/Tazobactam 4+0,5g
	102	Klebsiella pneumoniae (Trachealsekret)	Piperacillin/Tazobactam 4+0,5g
	103	Streptokokkus pneumoniae	Piperacillin/Tazobactam 4+0,5g
	104	Enterococcus faecalis (Blutkultur und Aszites)	Piperacillin/Tazobactam 4+0,5g
	105	Staphylococcus epidermidis (Blutkultur)	Meropenem 1g, Vancomycin 1mg/l
	106	kein Nachweis	Meropenem 1g, Ciprofloxacin 400mg, Linezolid 600mg
	107	kein Nachweis	Meropenem 1g

APPENDIX

	108	Rhinoviren; Enteroviren (Sputum)	Piperacillin/Tazobactam 4+0,5g, Clarithromycin 250mg
	109	Escherichia coli (Urinkultur); Streptokokkus pneumoniae (Sputum)	Piperacillin/Tazobactam 4+0,5g
	110	Mykoplasma pneumoniae; Chlamydia pneumoniae	Piperacillin/Tazobactam 4+0,5g, Clarithromycin 250mg, Cotrimoxazol 960mg
	111	Enterokokken (Urinkultur); Klebsiella pneumoniae (Sputum)	Ampicillin/Sulbactam 3g
	112	Rhinoviren und Enteroviren (Rachenspühlwasser)	Clarithromycin 500mg, Ampicillin/Sulbactam 3g
	113	kein Nachweis	Piperacillin/Tazobactam 4+0,5g

6.2 Abbildung 21: Thrombozytenzahlen im Krankheitsverlauf

**Abbildung 21: Thrombozytenzahlen im Krankheitsverlauf.**

Dargestellt ist die individuelle Entwicklung der Thrombozytenzahl jeder einzelnen Patient:in mit Infektion (Inf) oder Sepsis (Sep). Durch Linien verbundene Messpunkte repräsentieren jeweils des Verlauf einer Patient:in. Fette durchgezogene Linien sind Regressionsgeraden für die Kohorten Infektion ($Y = 6,902 \cdot X + 217,8$) und Sepsis ($Y = 5,820 \cdot X + 156,3$).

6.3 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Ausschrift
AA	<i>Arachidonic acid</i> (Arachidonsäure)
ADAM	<i>A Disintegrin and Metalloproteinase</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AMR	Ashwell-Morell-Rezeptor
APC	Allophycocyanin
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	<i>Area under the curve</i>
AUROC	<i>Area under the curve of the receiver-operating characteristics</i>
BMI	<i>Body-Mass-Index</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CLEC-2	<i>C-type-lectin-like-2</i>
COPD	Chronische obstruktive Lungenerkrankung
COVID-19	<i>Coronavirus Disease 2019</i>
CRP	C-reaktives Protein
CRP-X _L	<i>Cross-linked Collagen-Related Peptide</i>
CVVHDF	Kontinuierliche veno-venöse Hemodiafiltration
DAMP	<i>Damage Associated Molecular Pattern</i>
DM	Diabetes mellitus
ECA	Erythrina Cristagalli Lectin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EPI	Epinephrin
EZM	Extrazellulären Matrix
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FiO ₂	Inspiratorische Sauerstoff-Fraktion
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GCS	<i>Glasgow coma scale</i>
geoMFI	<i>geometric mean fluorescence intensity</i>
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GP	Glykoprotein
Hb	Hämoglobin
ICU	<i>Intensive care unit</i> (Intensivstation)
ID	<i>Identification</i>
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Inf	Infektions-Kohorte

APPENDIX

IQR	<i>Interquartile range</i> (Interquartilabstand)
ITAM	<i>Immunoreceptor Tyrosine Activating Motif</i>
KOL	Kollagen
Ktrl	Kontrollgruppe
LTA	Lichttransmissions-Aggregometrie
MAP	<i>Mean arterial pressure</i>
MCH	<i>Mean corpuscular hemoglobin</i>
MCV	<i>Mean corpuscular volume</i>
MPV	<i>Mean platelet volume</i> (Mittleres Thrombozytenvolumen)
n/v	Nicht verfügbar
NETs	<i>Neutrophile extracellular traps</i>
OCS	<i>Open canalicular system</i>
PAMP	<i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i>
PaO ₂	Sauerstoff-Partialdruck
PAR1	<i>Protease-activated receptor 1</i>
PCT	Procalcitonin
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PFA-200	<i>Platelet Function Analyzer 200</i>
PLA	<i>Platelet-leukocyte-aggregate</i>
PPP	<i>Platelet poor plasma</i>
PRP	<i>Platelet rich plasma</i>
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i> (Mustererkennungszepetor)
PSGL-1	<i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i>
qSOFA	<i>quick SOFA</i>
RCA-I	Ricinus Communis Agglutinin I
ROC	<i>Receiver-operating characteristics</i>
rpm	<i>Rounds per minute</i>
s	Sekunden
SD	<i>Standard deviation</i> (Standardabweichung)
Sep	Sepsis-Kohorte
sGPVI	lösliche GPVI-Ektodomäne
SIRS	<i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i>
SNA	Sambucus nigra Lectin
SOFA	<i>Sequential Organ Failure Assessment</i>
SSC-A	<i>Side scatter area</i>
sWGA	<i>Succinylated Wheat Germ Agglutinin</i>
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor

APPENDIX

TPO	Thrombopoetin
TR	Thrombozytenreaktivität
TRAP-6	<i>Thrombin receptor activator peptide 6</i>
TXA2	Thromboxan A2
UKW	Universitätsklinikum Würzburg
v/v	<i>Volume to volume</i>
vWF	von Willebrand Faktor
w/v	<i>Weight to volume</i>
WM-TEM	<i>Whole mount-Transmissionselektronenmikroskopie</i>
δ-SPD	<i>δ-Storage-Pool-Disorders</i>

6.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Thrombozytenmorphologie im Ruhezustand und nach Aktivierung.....	7
Abbildung 2: Thrombozytenglykom und seine Rolle bei der Steuerung der Thrombozytenzahl.	11
Abbildung 3: Schematischer Ablauf der Kohortenrekrutierung.	20
Abbildung 4: Gating-Strategie zur Analyse von Thrombozytenrezeptoren.	22
Abbildung 5: Gating-Strategie zur Analyse zirkulierender PLAs in Vollblut.	23
Abbildung 6: Gating-Strategie zur Analyse der Lektinbindung in PRP.	24
Abbildung 7: Gating-Strategie zur durchflusszytometrischen Analyse der δ -Granula.	26
Abbildung 8: Schematischer Aufbau einer Messzelle des INNOVANCE® PFA-200.....	28
Abbildung 9: Verringerte Thrombozytenzahlen und erhöhtes MPV bei Sepsis.	35
Abbildung 10: Hinweise auf erhöhtes Rezeptoren-Shedding bei Sepsis.	37
Abbildung 11: Schematische Darstellung der Lektinbindung.	38
Abbildung 12: Etablierung des Lektin-Assays.	40
Abbildung 13: Thrombozyten sind bei Sepsis vermehrt desialyliert.	42
Abbildung 14: Thrombozyten entwickeln δ -Granula-Defekt über Infektion-Sepsis-Kontinuum hinweg.	44
Abbildung 15: Bei Infektion und Sepsis aktivierte Thrombozyten zirkulieren nicht frei.	45
Abbildung 16: Die Thrombozytenreaktivität ist bei Sepsis stärker beeinträchtigt als bei Infektion.	47
Abbildung 17: ROC-Kurven für die Infektion- und Sepsis-Kohorte zum Zeitpunkt t_1	49
Abbildung 18: Thrombozytenreaktivität korreliert deutlich mit SOFA-Score, Mepacrin-Abgabe, CRP.	51
Abbildung 19: Thrombozytopenien führen zu verlängerter Verschlusszeit des PFA-200.....	53
Abbildung 20: Die Thrombozytenaggregation unter arteriellen Flussbedingungen ist bei Infektion und Sepsis normal bis beschleunigt.	55
Abbildung 21: Thrombozytenzahlen im Krankheitsverlauf.	86

6.5 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Sequential Organ Failure Assessment (SOFA)-Score.	2
Tabelle 2: Wichtige Thrombozytenrezeptore.....	9
Tabelle 3: Verwendete Reagenzien.	17
Tabelle 4: Verwendete Geräte und Zubehör.	19
Tabelle 5: Verwendete Antikörper zur Messung membranständiger Proteine.....	22
Tabelle 6: Verwendete Reagenzien zur Analyse der δ -Granula.	25
Tabelle 7: Verwendete Agonisten zur Messung der Thrombozytenreaktivität.	26
Tabelle 8: Auflistung von der Datenauswertung ausgeschlossener Messungen.....	27
Tabelle 9: Epidemiologische und klinische Charakterisierung der Studienkohorten.	31
Tabelle 10: Zentrallabordaten und Score-Werte der Patient:innenkohorten.....	33
Tabelle 11: Blutbild (Sysmex KX-21).....	34
Tabelle 12: ROC-Analysen für Infektion- und Sepsis-Kohorte zum Zeitpunkt t_1	49
Tabelle 13: Studienergebnisse zur Thrombozytenreaktivität bei Sepsis.	60
Tabelle 14: Mikrobiologische Erregernachweise und Antibiotikatherapien.	84

6.6 Publikationsliste

Teile der Promotionsarbeit wurden vorab auf einer wissenschaftlichen Konferenz präsentiert und als Originalarbeiten publiziert.

Konferenz:

Mathis Weigel, Lukas Weiss, Georgi Manukjan, Dirk Weismann and Harald Schulze: Platelet function analysis as a potential tool for early sepsis diagnosis. EUREKA International Symposium, 2022. Poster presentation.

Originalarbeiten:

Lukas J. Weiss, Georgi Manukjan, Annerose Pflug, Nadine Winter, Mathis Weigel, Nils Nagler, Markus Kredel, Thiên-Trí Lâm, Bernhard Nieswandt, Dirk Weismann, Harald Schulze: Acquired platelet GPVI receptor dysfunction in critically-ill patients with sepsis. Blood 2021.

Lukas J. Weiss, Maria Drayss, Georgi Manukjan, Maximilian Zeitlhofer, Judith Kleiss, Mathis Weigel, Johannes Herrmann, Kristina Mott, Sarah Beck, Philipp Burkard, Thien-Tri Lam, Karina Althaus, Tamam Bakchoul, Stefan Frantz, Patrick Meybohm, Bernhard Nieswandt, Dirk Weismann, and Harald Schulze: Uncoupling of platelet granule release and integrin activation suggests GPIIb/IIIa as therapeutic target in COVID-19. Blood Advances 2022.

6.7 Danksagungen

Allen voran bedanke ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Harald Schulze für die herausragende Betreuung dieser Forschungsarbeit. Ich hatte immer das Gefühl einen Ansprechpartner an meiner Seite zu haben und erinnere mich gerne an jede leidenschaftliche Erläuterung zur Thrombozytenbiologie zwischen Labortür und Angel. Außerdem bedanke ich mich herzlich bei den zwei weiteren Mitgliedern meines Thesis-Betreuerkomitees, Prof. Dr. Dr. Andreas Beilhack und Prof. Dr. Markus Kredel, für ihre Beratung und die Bereitschaft zur Begutachtung dieser Dissertationsarbeit. Ein besonderer Dank gebührt Lukas Weiß für die beispiellose Einarbeitung in das Forschungsprojekt, die zahllosen gemeinsamen Stunden in Klinik und Labor und die Bereitschaft mir bei Fragen stets wissend zur Seite zu stehen.

Ausdrücklich bedanken möchte ich mich ebenfalls

-bei Dr. Georgi Manukjan, Nadine Winter und allen weiteren Mitgliedern der AG Schulze und AG Nieswandt für die Methodeneinweisungen, das Labormanagement, und jede Unterstützung bei labortechnischen Fragen.

-bei unserem leitenden Studienarzt PD Dr. med. Dirk Weismann und den Stationsärzt:innen der Medizinischen Klinik und Poliklinik I des UKW für Konsultationen bei klinischen Fragestellungen.

-bei allen Studienpatient:innen und Proband:innen für ihre selbstlose Bereitschaft zur Studienteilnahme.

-bei der Graduate School of Life Sciences Würzburg für meine Aufnahme in das Exzellenzprogramm und die damit einhergehende ideelle und finanzielle Förderung meiner Forschungstätigkeit.

-bei meinem Vater für die finanzielle Unterstützung meiner Lebenshaltungskosten während meiner Forschungstätigkeit.

Und abschließend bedanke ich mich von ganzem Herzen bei meiner Partnerin, die mich in meinem Wunsch, diese experimentelle Doktorarbeit umzusetzen, stets unterstützt und begleitet hat.

6.8 Lebenslauf

6.9 Eidesstattliche Erklärung / Affidavit

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled "Platelet function analysis as a potential tool for early sepsis diagnosis" is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Place, Date

Signature

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Thrombozytenfunktionsanalyse als potenzielles Instrument zur Früherkennung von Sepsis“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ort, Datum

Unterschrift