

Thrombozytenfunktionsanalyse bei Patienten mit Sepsis

Platelet Function Analysis in Septic Patients

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,

Klasse Biomedizin

Vorgelegt von

Lukas Johannes Weiß

aus

Fürth

Würzburg 2022

Eingereicht am:
Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. rer. nat. Christoph Otto

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

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

3. Betreuer: Prof. Dr. med. Justus Müller

4. Betreuer: Priv.-Doz. Dr. med. Dirk Weismann

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Heide Weiß, † 08.01.2018

Vorbemerkung: In dieser Arbeit wurde aus Gründen der Lesbarkeit weitestgehend das generische Maskulinum verwendet. Es sind explizit alle binären und nicht-binären Geschlechter miteingeschlossen. Englischsprachige Begriffe wurden kursiv gefasst.

Zusammenfassung

Sepsis ist eine dysregulierte Reaktion des Organismus auf eine Infektion und der häufigste Grund für die Aufnahme auf eine Intensivstation. Bei Patienten mit Sepsis werden oft Blutungs- und Thromboseereignisse beobachtet, welche in einer Disseminierten Intravasalen Gerinnung (DIG) gipfeln können. Thrombozyten sind die Schlüsselzellen von Thrombose und Hämostase. Bei Sepsis und DIG kommt es häufig zu einem Abfall der Thrombozytenzahl, doch Blutungs- und Thromboseereignisse können unabhängig von der Thrombozytenzahl auftreten, was zusätzlich eine Veränderung der Thrombozytenfunktion nahelegt. Während die Thrombozytenzahl Gegenstand vieler Studien war und Bestandteil des diagnostischen SOFA-Scores ist, wurde die Thrombozytenfunktion bisher in nur wenigen Studien, mit zum Teil kontroversen Ergebnissen, untersucht.

In dieser Arbeit wurde deshalb die Thrombozytenfunktion bei 15 Patienten mit Sepsis zu drei Zeitpunkten im Krankheitsverlauf untersucht: I Aufnahmetag auf die Intensivstation; II Tag 5-7 auf der Intensivstation; III Tag der Entlassung von der Intensivstation. Zu den Zeitpunkten I und II konnte bei unauffälliger Rezeptorexpression keine Voraktivierung der Thrombozyten mittels Durchflusszytometrie festgestellt werden. Jedoch war die Aktivierung nach Stimulation mit multiplen Agonisten signifikant reduziert. Besonders ausgeprägt war die Hyporeaktivität bei Stimulation des Kollagen-Rezeptors GPVI mit dem selektiven Agonisten CRP-X_L. Im Immunoblot wurde gezeigt, dass nach GPVI-Stimulation eine reduzierte Phosphorylierung der nachgeschalteten Proteine Syk und LAT im Vergleich zum Gesundspender induziert wird. In Kreuzinkubationsexperimenten hatte die (Co-)Inkubation von Thrombozyten in Plasma von Sepsispatienten oder mit Bakterienisolaten aus Sepsis-Blutkulturen keinen Effekt auf die Thrombozytenreaktivität. Allerdings konnte durch Sepsis-Vollblut eine signifikante GPVI-Hyporeaktivität in Thrombozyten von gesunden Probanden induziert werden, was einen zellulären Mediator als Ursache des Defekts nahelegt. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass insbesondere die GPVI-Signalkaskade bei Sepsis massiv beeinträchtigt ist. Der Immunorezeptor GPVI ist ein vielversprechendes Zielmolekül, um die Pathogenese der Sepsis, des *Capillary Leak* und die immunregulatorische Rolle von Thrombozyten besser zu verstehen. Die GPVI-Hyporeaktivität könnte als zukünftiger Biomarker für die Sepsis-Frühd Diagnose genutzt werden.

Summary

Sepsis is the dysregulated immune response of a host to infection and the leading cause for intensive care unit (ICU) treatment worldwide. Patients often suffer from bleeding and thrombotic events, which can escalate to a disseminated intravascular coagulation (DIC). Platelets are important regulators of hemostasis and thrombocytopenia is a hallmark of sepsis and DIC. However, bleeding and thrombosis are observed independently from thrombocytopenia suggesting that altered platelet function might contribute. While platelet number has been investigated in multiple studies and is an integral part of the diagnostic SOFA-score, platelet function during sepsis remains ill-defined.

We assessed platelet function in 15 patients with sepsis in a single center study at three times during disease: I intensive care unit (ICU) admission day; II day 5-7 at ICU; III day of ICU discharge. Platelets of all patients at time point I and II had an overall unaltered receptor expression shown by flow cytometry, were not preactivated, but showed a markedly impaired response upon stimulation with multiple agonists. The defect was most prominent upon stimulation of the collagen receptor GPVI with the selective agonist CRP-X_L. Sepsis platelets failed to induce phosphorylation of downstream effectors Syk and LAT, as shown by immunoblotting. Next, we asked which factor(s) in patients can induce GPVI hyporeactivity. Incubation of platelets from healthy individuals in plasma of sepsis patients did not cause pre-activation or altered platelet responsiveness. However, platelet incubation in sepsis whole blood diminished CRP-X_L reactivity, suggesting the contribution of a cellular component. Co-incubation of healthy platelets with bloodborne heat-inactivated bacteria or antibiotics did neither lead to platelet preactivation nor impaired platelet reactivity upon GPVI stimulation.

Taken together, our results imply that GPVI function is highly deficient in sepsis patients. GPVI is a promising target, which can pave the way for a better understanding of platelet function in innate immunity and the regulation of vascular integrity. GPVI hyporeactivity might serve as a robust biomarker for the early identification of sepsis patients in the future.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Grundlagen der Sepsis	1
1.1.1 Epidemiologie: häufige und schwerwiegende Erkrankung	1
1.1.2 Sepsis-Definition im Wandel der Zeit	2
1.1.3 Pathophysiologie der Sepsis	5
1.1.4 Schnelle Diagnosestellung und Therapie sind entscheidend	6
1.1.5 Komplikationen der Sepsis	7
Disseminierte Intravasale Gerinnung	7
<i>Capillary Leak</i> -Syndrom	7
1.2 Biologie und Funktion der Thrombozyten	8
1.2.1 Morphologie, Thrombozytopoese & Thrombozytenabbau	8
1.2.2 Die (Hem-)ITAM-Rezeptoren GPVI & CLEC-2	9
1.2.3 Thrombozytenfunktion	11
Vermittlung der primären Hämostase	11
Aufrechterhaltung der vaskulären Integrität	12
Regulation der Immunantwort	12
1.3 Zielsetzung der Arbeit	14
2 Material und Methoden	15
2.1 Material	15
2.1.1 Instrumente	15
2.1.2 Reagenzien	15
2.1.3 Antikörper	16
2.1.4 Verwendete Puffer und Lösungen	17
2.2 Methoden	21
2.2.1 Patientenrekrutierung	21
2.2.2 Thrombozytenisolation und Aufreinigung	23
2.2.3 Aggregometrie-Analyse und Thrombozyten-Lyse	23
2.2.4 Blutgruppenbestimmung mittels <i>Bedside</i> -Test	24
2.2.5 Bradford-Assay	24
2.2.6 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese und Immunoblot	24
2.2.7 <i>Membran-Stripping</i>	26
2.2.8 Erstellen der löslichen GPVI-Ektodomänen-Positivkontrolle	26
2.2.9 GPVI-Ektodomänen-ELISA	27

Inhaltsverzeichnis

2.2.10 TPO- und IL-6-ELISA	27
2.2.11 Vollblut-Kreuzinkubation.....	28
2.2.12 Plasma-Kreuzinkubation.....	28
2.2.13 Immunfluoreszenzfärbung und Analyse der Thrombozytenfunktion	29
2.2.14 Thiazolorange.....	29
2.2.15 Mepacrin-Assay.....	30
2.2.16 Asservierung und Kultivierung der Bakterien	31
2.2.17 Kultivierung von <i>Porphyromonas gingivalis</i>	32
2.2.18 Bakterien-Thrombozyten-Co-Inkubation.....	32
2.2.19 Antibiotika-Inkubation	33
2.2.20 Statistische Analyse	33
3 Ergebnisse	34
3.1 Patientenkohorte.....	34
3.1.1 Klinische und infektiologische Kohortenübersicht	34
3.1.2 Blutbild und Routinelaborparameter.....	36
3.1.3 Patienten mit Sepsis zeigen erniedrigte Thrombozytenzahlen	38
3.1.4 Unauffällige Expression des vWF- und Fibrinogen-Rezeptors.....	40
3.1.5 Thrombozyten von Patienten mit Sepsis sind nicht voraktiviert	41
3.2 Funktionelle Analyse der Thrombozytenfunktion	43
3.2.1 Thrombozyten von Sepsispatienten sind hyporeaktiv	43
3.2.2 Die Funktion der δ -Granula ist bei Sepsis eingeschränkt.....	48
3.3 Molekulare Analyse der (Hem-)ITAM-Rezeptor-Signalkaskaden	49
3.3.1 Rezeptorexpression und <i>Shedding</i>	49
3.3.2 Dysfunktionale (Hem-)ITAM-Signaltransduktion bei Sepsis.....	51
3.3.3 Thrombozyten haben bei Sepsis einen ITIM-Rezeptor-Defekt	53
3.3.4 CRP-X _L -Dosisescalation normalisiert die Thrombozytenaktivierung.....	55
3.3.5 Thrombozyten von Patienten mit Sepsis sind nicht apoptotisch	57
3.4 Kreuzinkubationsexperimente mit PPP und Vollblut.....	58
3.4.1 Einfluss von ABH-Inkompatibilität auf die Thrombozytenfunktion	58
3.4.2 GPVI-Reaktivität nach Inkubation in Sepsis-Plasma.....	59
3.4.3 Inkubation in Sepsis-Vollblut induziert Thrombozytenhyporeaktivität	61
3.4.4 Erhöhte Anzahl von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten bei Sepsis	62
3.4.5 Thrombozyten-Bakterien-Co-Inkubation.....	63
3.4.6 Fixation mit 4% Paraformaldehyd.....	64

Inhaltsverzeichnis

3.5 Vollblut-Bakterien-Co-Inkubation induziert keine Hyporeaktivität	65
3.6 Untersuchung möglicher Störfaktoren	67
3.6.1 Lebensalter ist nicht ursächlich für Thrombozyten-Hyporeaktivität	67
3.6.2 Antibiotika haben keinen Einfluss auf die Thrombozytenfunktion	68
3.7 <i>Survival vs. Non-Survival</i>	69
3.8 Übersicht Patienten und Assays	71
4 Diskussion	73
4.1 (Hem-)ITAM-Hyporeaktivität bei Sepsis - <i>Good or Bad Cop?</i>	73
4.2 Was ist die Ursache des GPVI-Defekts?	75
4.3 Sind Thrombozyten bei Sepsis hypo- oder hyperreaktiv?	78
4.4 Transfusion und Inhibition von Thrombozyten in der Therapie	82
4.5 Begrenztes Material, kleine Fallzahl, gesunde Kontrollgruppe	83
4.6 Ausblick	85
4.6.1 Tiermodelle zur Untersuchung der Pathophysiologie	85
4.6.2 Thrombozytendysfunktion als Marker für Diagnose und Prognose?	86
4.7 Zusammenfassende Bemerkungen	88
5 Literaturverzeichnis	89
6 Appendix	102
6.1 Abkürzungsverzeichnis	102
6.2 Abbildungsverzeichnis	104
6.3 Tabellenverzeichnis	105
6.4 Publikationsliste	106
6.5 Danksagung	107
6.6 Lebenslauf	108
6.7 Affidavit	110
6.8 Eidesstattliche Erklärung	110

1 Einleitung

In dieser Doktorarbeit werden Fragen der Sepsis- und Thrombozyten-Forschung behandelt. Die Einleitung wird inhaltlich in zwei Blöcke gegliedert. Zunächst wird in das Krankheitsbild Sepsis und daraufhin in die Thrombozytenbiologie eingeführt. Zu Beginn soll eine Übersicht über Häufigkeit, Definition, Klinik und Pathophysiologie der Sepsis gegeben werden.

1.1 Grundlagen der Sepsis

1.1.1 Epidemiologie: häufige und schwerwiegende Erkrankung

Sepsis ist die schwerste Verlaufsform einer akuten Infektion. Jedes Jahr erkranken weltweit 20 Millionen Menschen an Sepsis, davon 250000 in Deutschland [1, 2]. Die Inzidenz steigt seit Jahren kontinuierlich an, was hauptsächlich auf den demographischen Wandel zurückgeführt wird [1, 3]. Im Krankheitsverlauf der Sepsis versterben 20% bis 30% der Patienten [4]. Insgesamt sind im Jahr 2013 weltweit 8 Millionen Menschen an Sepsis gestorben, davon 67800 in Deutschland [1, 3]. Im Gegensatz zur Inzidenz ist die Mortalität über die vergangenen Jahrzehnte leicht abgefallen, was mit einer verbesserten Patientenversorgung begründet wird [5]. Bei den überlebenden Patienten bestehen häufig gravierende gesundheitliche Einschränkungen fort und das Risiko, nach dem Krankenhausaufenthalt eine somatische oder psychiatrische Erkrankung zu entwickeln, ist deutlich erhöht. Diese Krankheitsbilder werden unter den Begriffen Post-Sepsis Syndrom oder Post-ICU Syndrom subsumiert [6, 7].

Sepsis ist ein kostenintensives Krankheitsbild für das Gesundheitssystem. Dies liegt zum einen an der hohen Fallzahl sowie der häufig erforderlichen material- und personalaufwändigen Intensivtherapie. Zum anderen ist der Klinikaufenthalt der Patienten mit Sepsis überdurchschnittlich lang [2]. Insgesamt wurden in den Vereinigten Staaten 2011 schätzungsweise 20 Milliarden US-Dollar für die Sepsis-Therapie ausgegeben. Dies entsprach etwa 5,2% der jährlichen totalen Krankenhauskosten [8].

1.1.2 Sepsis-Definition im Wandel der Zeit

Bis in die zweite Hälfte des 20. Jahrhunderts gab es keine global einheitliche Sepsis-Definition [9]. Im Rahmen der ersten Sepsis-Konsensus-Konferenz 1992 wurde Sepsis als pathologische Reaktion eines Wirtsorganismus auf einen Krankheitserreger definiert. Diese pathologische Reaktion wurde durch vier einfach zu erhebende klinische und laborchemische Parameter charakterisiert (Abbildung 1) und als systemische inflammatorische Reaktion (SIRS) bezeichnet [10]. Es wurde das Konzept eines dynamischen Krankheitsbildes entworfen, welches in der mildesten Ausprägung als Sepsis bezeichnet wird (SIRS+Infektion), bei zusätzlicher Organschädigung, Hypotonie oder Hypoperfusion in die schwere Sepsis übergeht und in der Schwerstform bei zusätzlicher Hypotonie trotz Katecholamin- und/oder adäquater Volumentherapie als Septischer Schock bezeichnet wird [11].

Problematisch ist, dass SIRS auch durch viele nicht-infektiöse Erkrankungen ausgelöst werden kann (z.B. Pankreatitis, Myokardinfarkt, Trauma) und die SIRS-Kriterien häufig bereits bei trivialen Infekten erfüllt werden. Auf der anderen Seite werden schwere Verlaufsformen nur unzureichend erkannt [12]. Die Sepsis I-Kriterien wurden deshalb im Rahmen der zweiten Sepsis-Konsensus-Konferenz 2001 durch einen Katalog von labormedizinischen und klinischen Parametern ergänzt, um deren Trennschärfe zu erhöhen. Allerdings haben sich die Sepsis II-Kriterien in der klinischen Anwendung nicht durchgesetzt, da sich die aufgeführten Symptome ebenfalls als zu unspezifisch und im klinischen Alltag nicht praktikabel erwiesen haben (Abbildung 1) [10, 13].

In der dritten Sepsis-Konsensus-Konferenz 2016 wurde die SIRS-Definition verlassen. Sepsis wurde als eine manifeste Organschädigung durch eine fehlgeleitete Immunantwort auf eine Infektion definiert. Wie in den Sepsis I-Kriterien wurde Sepsis als dynamisches Krankheitsbild skizziert, welches zum Septischen Schock exarzerbieren kann. Im Zentrum der Sepsis III-Kriterien steht eine Organschädigung. Für die Abschätzung der Organdysfunktion wurde die Verwendung des *sequential organ failure assessment* (SOFA)-Scores empfohlen (Abbildung 1) [14]. Ab einem Anstieg des SOFA-Scores um ≥ 2 Punkte wird von einer manifesten Organdysfunktion ausgegangen.

Zur schnellen Identifikation möglicher Sepsispatienten wurde der *quickSOFA* (qSOFA)-Score entwickelt. Dieser setzt sich aus drei Parametern (Atemfrequenz ≥ 22 /min, veränderter Bewusstseinszustand und systolischer Blutdruck ≤ 100 mmHg) zusammen, für deren Erhebung keine Labordiagnostik erforderlich ist. Für die Erfüllung jedes Kriteriums wird ein Punkt addiert. Ab einem qSOFA-Score von zwei oder größer sollen die Patienten kritisch auf eine mögliche Organdysfunktion geprüft werden und das Einleiten oder die Eskalation einer Therapie evaluiert werden [15].

Einen Ausblick auf eine zukünftige Weiterentwicklung der Sepsis-Kriterien geben Seymour und Kollegen. In einer retrospektiven Analyse von 64000 Patienten wurden vier dominierende Sepsis-Phänotypen herausgearbeitet (α , β , γ , δ), welche anhand des klinischen Bildes, des Infektfokus, der klinischen Chemie und der Prognose voneinander differierten und unterschiedlich auf therapeutische Maßnahmen ansprachen [16]. Die verschiedenen Begriffsdefinitionen bedingen, dass sich Studienpopulationen mit der Einschlussdiagnose Sepsis unterscheiden können.

Einleitung

A

Sepsis I-Definition: SIRS-Kriterien (Bone et al. 1992)
<ol style="list-style-type: none"> 1. Hypothermie (≤ 36 °C) oder Hyperthermie (≥ 38 °C) 2. Tachykardie (≥ 90 /min) 3. Tachypnoe (≥ 20 /min) oder niedriger aPO_2 (< 33 mmHg) 4. Leukozytose ($\geq 12\ 000$ /μl) oder Leukopenie ($\leq 4\ 000$ /μl)

B

Sepsis II-Definition: Erweiterte klinische / laborchemische Kriterien (Levy et al 2001)	
Allgemeine Symptome <ul style="list-style-type: none"> • Hyperthermie $> 38,3$ °C • Hypothermie < 36 °C • Herzfrequenz > 90 /min • Tachypnoe > 30 /min • Vigilanzminderung • Ödembildung • Hyperglykämie ≥ 110 mg/dl 	Organdysfunktion <ul style="list-style-type: none"> • INR $> 1,5$ • Ileus • Thrombopenie < 100 /nl • Bilirubin > 4 mg/dl • Kreatinin-Anstieg $> 0,5$ mg/dl • $PaO_2/FiO_2 < 300$ mmHg
Hämodynamik <ul style="list-style-type: none"> • Arterielle Hypotension MAP < 70 mmHg • Herzindex $< 3,5$ (l/min)m^{-2} • Gemischtvenöse O_2-Sättigung > 70 % • Laktat > 3 mmol/l • Verlängerte Rekapillarierungszeit 	Inflammation <ul style="list-style-type: none"> • Leukozytose • Leukopenie • > 10 % unreife Neutrophile Granulozyten • Plasmatisches C-reaktives Protein > 2 SD über dem Normwert • Plasmatisches Procalcitonin > 2 SD über dem Normwert

C

Sepsis III-Definition: SOFA-Score (Singer et al. 2016)					
Punkte	0	1	2	3	4
PaO_2/FiO_2 [mmHg]	≥ 400	≤ 400	≤ 300	≤ 200	≤ 100
Thrombozyten [/nl]	≥ 150	≤ 150	≤ 100	≤ 50	≤ 20
Bilirubin [mg/dl]	$< 1,2$	$1,2 - 1,9$	$2,0 - 5,9$	$6,0 - 11,9$	$\geq 12,0$
MAP [mmHg] D/A/N [μ g/kg/min]	> 70	< 70	D	A ($\leq 0,1$) N ($\leq 0,1$)	A ($\geq 0,1$) N ($\geq 0,1$)
Kreatinin [mg/dl] Urin-Exkretion [ml/d]	$1,2$	$1,2 - 1,9$	$2,0 - 3,4$	$3,5 - 4,9$ < 500	≥ 5 < 200

Abbildung 1: Gegenüberstellung der verschiedenen Sepsis-Kriterien. (A) Die SIRS-Kriterien wurden 2001 durch **(B)** einen Katalog an klinischen und laborchemischen Parametern ergänzt. **(C)** Seit 2016 ist ein Anstieg des SOFA-Scores Grundlage einer Sepsis-Diagnose. MAP: Mittlerer Arterieller Druck, D: Dobutamin, A: Adrenalin, N: Noradrenalin.

1.1.3 Pathophysiologie der Sepsis: überschießende pro- und anti-inflammatorische Immunreaktion

Sepsis kann durch bakterielle, fungale, virale und parasitäre Infektionen entstehen. Den größten Anteil machen die bakteriellen Infektionen aus. Die häufigsten grampositiven Erreger sind *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* sowie *Enterococcus spp.*, während bei den gramnegativen Bakterien *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* und *Pseudomonas aeruginosa* dominieren [17]. Der häufigste Infektfokus ist das respiratorische System (64%), gefolgt von abdomineller (20%), vaskulärer (15%) und urogenitaler (14%) Lokalisation [9].

Charakteristisch ist der parallele Ablauf von pro- und anti-inflammatorischen Prozessen. Die ausufernde pro-inflammatorische Aktivität ist ursächlich für die Endorganschädigung: Zellen des angeborenen Immunsystems (Neutrophile Granulozyten, Natürliche Killerzellen (NKs) und Makrophagen) erkennen über spezifische Rezeptoren Pathogen-assoziierte molekulare Strukturen (PAMPs). Dies induziert die Expression von pro-inflammatorischen Interleukinen (IL) und Zytokinen wie IL-1, IL-6 oder von Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α). Es kommt zur Expression von Akute-Phase-Proteinen wie Fibrinogen oder Procalcitonin [18]. Durch die Aktivierung von Neutrophilen Granulozyten und Monozyten steigt die Menge reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) mit konsekutiver Endothelschädigung und Thrombozytenaggregation. Das Komplementsystem und die Gerinnungskaskade werden aktiviert, was die Bildung von Thromben in den Kapillaren fördert [19, 20].

Innerhalb der ersten Stunden nach Initiation der pro-inflammatorischen Antwort steigt die Aktivität der anti-inflammatorischen Signalkaskaden. Es kommt zur verstärkten Expression von IL-10 sowie von IL-1-Antagonisten. Die intrazelluläre Degradation von PAMPs trägt zusätzlich zur Reduktion der pro-inflammatorischen Aktivität bei. Die anti-Inflammation bedingt eine starke Anfälligkeit für Sekundärinfektionen, welche durch Apoptose von Zellen der erworbenen Immunität begünstigt wird [21, 22].

1.1.4 Schnelle Diagnosestellung und Therapie sind entscheidend

Die Prognose der Patienten verschlechtert sich sukzessiv ohne adäquate Therapie [23]. Deswegen soll innerhalb der ersten drei Stunden nach Krankenhausvorstellung mit der Durchführung der Therapiemaßnahmen des sogenannten *3-hour bundle* begonnen werden [24]. Ob ein noch rascherer Therapiebeginn innerhalb von einer Stunde nach Krankenhausvorstellung einen weiteren Überlebensvorteil bringt, ist aktuell Gegenstand der wissenschaftlichen Diskussion [25]. Die Diagnosestellung wird dadurch erschwert, dass es kein bekanntes Sepsis-spezifisches Symptom gibt. Neue Biomarker wie Adrenomedulin werden erprobt, um eine frühere und spezifischere Diagnosestellung zu ermöglichen [26].

Die Therapiemaßnahmen lassen sich in 3 Übergruppen gliedern: 1. Kontrolle des Infektgeschehens, 2. hämodynamische Stabilisierung und 3. supportive Therapie. Die Kontrolle des Infektgeschehens wird durch Gabe von antiinfektiven Medikamenten (Antibiotika, Antimykotika, Virustatika) und eine Fokussanierung bewirkt. Die hämodynamische Stabilisierung wird durch Volumentherapie mittels kristalloiden Lösungen sowie der Gabe von Vasopressoren (z.B. Noradrenalin) oder inotrop wirkenden Medikamenten (z.B. Dobutamin) durchgeführt [27]. Die Gabe von Steroiden kann bei Patienten mit persistierendem Schock erwogen werden [28]. Zum Bereich der supportiven Therapie zählen die Beatmungstherapie, Nierenersatzverfahren, Analgesie, Sedierung, Stressulkus- und Thromboseprophylaxe, Blutzuckerkontrolle sowie die Ernährung des Patienten. Die Transfusion von Blutprodukten wie Erythrozyten oder Thrombozytenkonzentraten kann unter Umständen erforderlich sein [29, 30]. Immunsuppressive und immunmodulatorische Therapieansätze haben in bisherigen klinischen Studien durchwachsene Ergebnisse gezeigt. Genauere Untersuchungen sind aktuell Gegenstand der biomedizinischen Forschung [31].

1.1.5 Komplikationen der Sepsis

Verschiedene Probleme können während einer Sepsis auftreten. Für die spätere Einordnung der experimentellen Ergebnisse sollen zwei mögliche Komplikationen detaillierter eingeführt werden.

Disseminierte Intravasale Gerinnung

Mit einer Mortalität von ca. 25% ist die Disseminierte Intravasale Gerinnung (DIG) eine schwerwiegende Komplikation der Sepsis [32]. Charakteristisch sind eine massive Aktivierung des Gerinnungssystems mit der Bildung von Thromben, während zeitgleich durch den Verbrauch von Gerinnungsfaktoren und Thrombozyten Blutungen auftreten [33]. Die *International Society for Thrombosis and Haemostasis* (ISTH) hat ein *Scoring*-Schema mit hoher Sensitivität (91%) und Spezifität (97%) zur Diagnose einer DIG entwickelt (Tabelle 1) [34-36].

Tabelle 1: ISTH-DIG-Scoring-Schema: Eine DIG wird ab ≥ 5 Punkten wahrscheinlich.

Punkte	0	1	2	3
Thrombozyten	>100	50-100	<50	–
D-Dimere [mg/l]	<0,5	–	0,5-2	>2
Fibrinogen [g/l]	>1	<1	–	–
INR	–	1,25-1,7	<1,7	–

Capillary Leak-Syndrom

Sepsispatienten leiden häufig unter massiven Ödemen. Diese entstehen durch eine gesteigerte mikrovaskuläre Permeabilität [37, 38]. Im Extravasalraum können sich dabei bis zu 50 l Flüssigkeit ansammeln [38]. Dies erschwert die therapeutisch notwendige hämodynamische Stabilisierung der Patienten und führt zu einer relativen intravasalen Hypovolämie. Die Gasaustauschfläche der Lunge wird durch die Akkumulation von Flüssigkeit verringert und das Risiko einer Gewebhypoxie nimmt zu. Azidose oder ein direkter Effekt von TNF- α und Interleukin-1 wurden als Mediator des *Capillary Leak-Syndroms* diskutiert [39-41]. Durch Erkenntnisse der letzten 15 Jahre sind unter anderem Thrombozyten als wichtiger Regulator der vaskulären Integrität in den Fokus geraten.

1.2 Biologie und Funktion der Thrombozyten

Im zweiten Teil der Einleitung wird eine kurze Einführung in die Thrombozytenbiologie gegeben. Im Fokus stehen dabei die Funktionen, welche Thrombozyten in der Zirkulation übernehmen.

1.2.1 Morphologie, Thrombozytopoese & Thrombozytenabbau

Thrombozyten sind mit einem Durchmesser von 2-4 μm die kleinsten Zellen des Blutes. Im Durchschnitt zirkulieren im Vollblut eines Erwachsenen zwischen 150 und 350 Thrombozyten pro nl. Thrombozyten entstehen durch Abschnürprozesse aus polyploiden Megakaryozyten im Knochenmark. Entscheidende Mediatoren der Thrombopoese sind Thrombopoietin (TPO) mit dem dazugehörigen, ausschließlich auf Megakaryozyten und Thrombozyten exprimierten Rezeptor c-Mpl. Die Expression von TPO wird unter anderem durch Interleukin-6 gesteigert. Dies ist eine Grundlage der bei Infektionen auftretenden reaktiven Thrombozytose [42]. Thrombozyten haben in

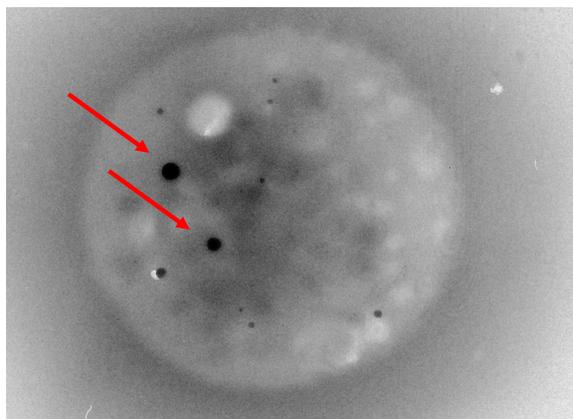


Abbildung 2: δ -Granula. Darstellung der elektronendichten Granula (Pfeile) mittels *Whole Mount*-Transmissions-Elektronenmikroskopie.

der Zirkulation eine mittlere Halbwertszeit von sieben bis zehn Tagen. Danach werden sie durch Leber und Milz aus der Zirkulation entfernt [43]. Dieser Prozess wird durch Deglykosylierung der Glykoproteine auf der Thrombozytenoberfläche und den hepatischen Ashwell-Morell-Rezeptor vermittelt [44, 45].

Thrombozyten haben verschiedene Arten von Granula. In den α -Granula sind unter anderem Fibrinogen, Faktor V, von-Willebrand-Faktor (vWF) und P-Selektin enthalten [46]. Die δ -Granula (ca. 3-8 pro Thrombozyt) werden auf Grund ihrer hohen Elektronendichte auch als dichte Granula bezeichnet und sind kleiner als die α -Granula. Sie beinhalten Moleküle wie Serotonin, ATP, ADP, Polyphosphate und Calcium-Ionen (Abbildung 2) [47]. Die dritte granuläre Struktur sind Lysosomen, deren Funktion in Thrombozyten bislang noch unzureichend erforscht ist [48].

Auf ihrer Oberfläche exprimieren Thrombozyten eine Reihe von Rezeptoren. Der GPIb/V/IX-Rezeptorkomplex vermittelt die Bindung an vWF und ist wichtig für die Adhäsion von Thrombozyten unter Flussbedingungen [49]. Thrombozyten exprimieren auch einige Integrine, welche für die Interaktion mit Matrixproteinen essenziell sind. Zentral ist dabei Integrin α IIb β 3, welches in seiner aktiven Konformation unter anderem Fibrinogen bindet und über einen komplexen *outside-in/inside-out* Signaltransduktions-Mechanismus Adhäsion und die Bildung eines stabilen Thrombus vermittelt [50]. Darüber hinaus wurden Integrin α 2 β 1 (Kollagen-Rezeptor), α 5 β 1 (Fibronektin-Rezeptor) und α 6 β 1 (Laminin-Rezeptor) beschrieben [51]. Die Stimulation einiger weiterer Oberflächenrezeptoren mit spezifischen Agonisten kann die Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten induzieren. Hierzu zählen vor allem G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren (GPCR) wie z.B. der P2Y1- und der P2Y12-Rezeptor, die durch ADP aktiviert werden und die Thrombinrezeptoren PAR1 und PAR4 [52]. Eine besondere Rolle nimmt der Immunorezeptor GPVI ein.

1.2.2 Die (Hem-)ITAM-Rezeptoren GPVI & CLEC-2

GPVI ist neben Integrin α 2 β 1 der Haupt-Kollagen-Rezeptor auf Thrombozyten. Er gehört zu der Gruppe der Immunorezeptoren und zeigt enge strukturelle Verwandtschaft mit dem NK- und dem Fc α -Rezeptor [53]. Neben Kollagen kann GPVI auch durch das Schlangengift Convulxin sowie den synthetischen Agonisten *Collagen-Related-Peptide* (CRP) aktiviert werden. CRP besteht aus der repetitiven Aminosäuresequenz Glycin-Prolin-Hydroxyprolin (GPO) und wird in Thrombozytenstimulationsassays in seiner quervernetzten Form CRP-*crosslinked* (CRP-X_L) verwendet [53-55]. Die Fc γ -Domäne ist für die Signaltransduktion essenziell. Sie enthält zwei *immunoreceptor tyrosine activating motif* (ITAM)-Sequenzen, bestehend jeweils aus den Aminosäuren YxxL, welche durch sieben Aminosäuren voneinander getrennt sind. Die Fc γ -Kette ist über ein in der transmembranären Region von GPVI gelegenes Arginin mit dem Rezeptor verbunden [56]. GPVI liegt auf nicht aktivierten Thrombozyten in stöchiometrischem Verhältnis in monomerer und dimerisierter Form vor. Die Aktivierung des Rezeptors durch Kollagenbindung führt zur Dimerisierung und zur Phosphorylierung der ITAM-Domäne der Fc γ -Kette durch die Src-Familien-Kinasen. Dies erlaubt die Rekrutierung der Tyrosin-Kinase Syk, welche über ihre SH-2-Domäne an die phosphorylierten ITAM-Motive bindet.

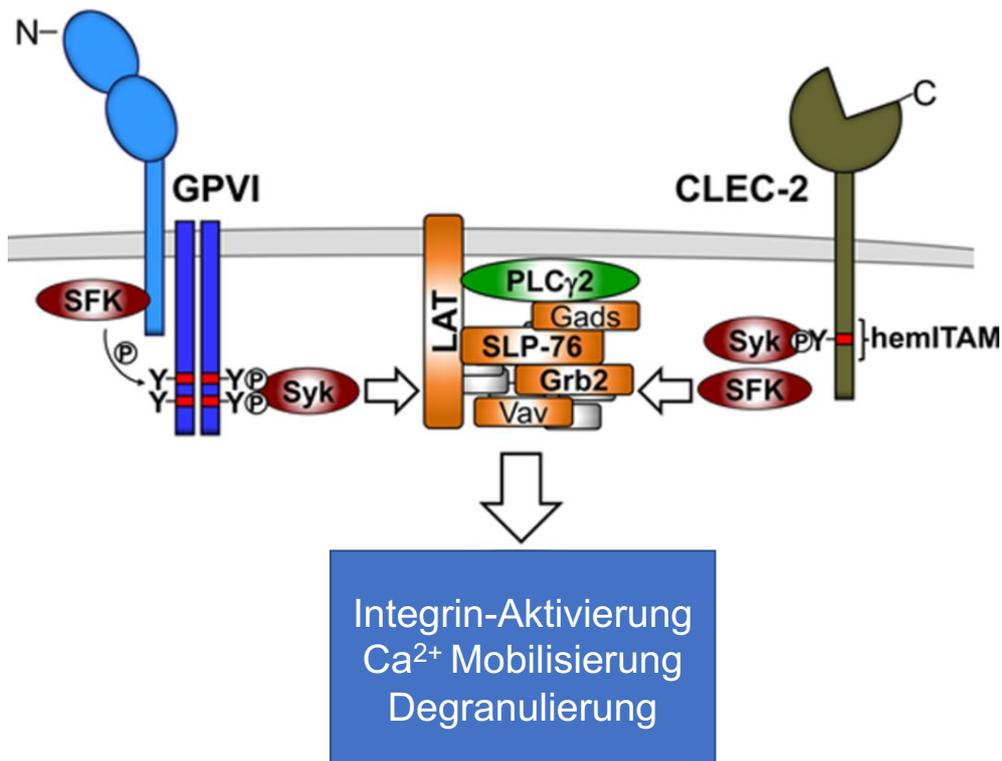


Abbildung 3: Die GPVI- und CLEC-2-Signalkaskade (Stegner *et al.*, ATVB, 2014).

Über die Aktivierung von Syk kommt es zur Rekrutierung weiterer Signalmoleküle wie LAT, SLP-76, PLC γ 2 und PI3K und letztendlich zum Ca²⁺-Influx mit konsekutiver Thrombozytenaktivierung (Abbildung 3) [57]. GPVI ist ein vielversprechender pharmakologischer Angriffspunkt, da die Blockade zur Verhinderung der Thrombusbildung ohne gesteigerte Blutungsneigung führt [58].

Der *C-type-lectin-receptor 2* (CLEC-2) wird als Hem-ITAM-Rezeptor klassifiziert, da er über lediglich ein ITAM-Motiv verfügt. CLEC-2 ist für die Trennung von Lymph- und Blutkreislauf wichtig [59]. Der einzige bekannte endogene Agonist ist Podoplanin, welches unter anderem auf lymphatischen Endothelzellen und Podozyten exprimiert wird [60]. Darüber hinaus aktiviert das Schlangengift Rhodocytin CLEC-2. Die Stimulation führt zu Phosphorylierung des ITAM-Motivs durch die Src-Familien-Kinasen mit anschließender Bindung von Syk über die SH-2-Domäne (Abbildung 3). Die Signaltransduktion zeigt große Überschneidungen mit der GPVI-Kaskade [53]. Die Aktivität der (Hem-)ITAM-Rezeptoren wird in einem negativen Rückkopplungsmechanismus durch die sogenannten *immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif* (ITIM)-Rezeptoren reguliert. Charakteristisch für diese ist die ITIM-Aminosäuresequenz IVLxYxxLV in der zytoplasmatischen Domäne. Bisher wurden auf der Thrombozytenoberfläche die ITIM-Rezeptoren PECAM-1, G6b-B, TLT-1, CEACAM-1, CEACAM-2 und PIR-B identifiziert [61].

1.2.3 Thrombozytenfunktion

Das Verständnis der Aufgaben von Thrombozyten in der Zirkulation hat sich über die letzten Jahre gewandelt und bei vielen (patho-)physiologischen Prozessen konnte ein Beitrag der Thrombozyten aufgezeigt werden. In drei Kernbereiche der Thrombozytenfunktion soll im Folgenden eingeführt werden.

Vermittlung der primären Hämostase

Thrombozyten vermitteln die primäre Hämostase, indem sie durch schnelle, lokal begrenzte Adhäsion und Aggregation Gefäßläsionen versiegeln [62]. Nach Schädigung des Endothels kommt es initial zur Assoziation des vWF mit Kollagen der subendothelialen Matrix. Thrombozyten binden über die GPIb-Domäne des GPIb/V/IX-Rezeptorkomplexes an die A1-Bindestelle des vWF [63]. Da diese Bindungen schnell ausgebildet werden, aber nicht langfristig bestehen, führen sie nicht zu einer dauerhaften Thrombozytenadhäsion. Stattdessen kommt es zu einer Rollbewegung. Die dauerhafte Bindung wird durch Aktivierung des Integrins $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ und den Kollagen-Rezeptor vermittelt. Die Herstellung einer vollständigen Bindung ist bei niedrigeren Scherraten $<500\text{s}^{-1}$ auch ohne den vWF isoliert über GPVI und Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ möglich [64, 65].

Nach Aktivierung der Thrombozyten kommt es zu einer Reihe morphologischer und metabolischer Veränderungen. Die Bindung an Kollagen/vWF führt über verschiedene Signalkaskaden zur Aktivierung von $\text{PLC}\gamma$ und IP_3 , was einen pulsatilen Ca^{2+} -Einstrom und eine intrazelluläre Ca^{2+} -Mobilisierung induziert [66]. Die Thrombozyten verändern ihre diskoide Form, bilden Fortsätze aus und degranulieren. Durch die Entleerung der δ -Granula wird unter anderem ADP freigesetzt. Durch Aktivierung der Cyclooxygenase-1 werden Arachidonsäurederivate in Thromboxan A₂ umgewandelt. Diese Agonisten vermitteln die Aktivierung weiterer Thrombozyten, welche sich an den bestehenden Thrombus anlagern. Es kommt zur zunehmenden Aggregation [67].

Aufrechterhaltung der vaskulären Integrität

Thrombozyten sind unter inflammatorischen Bedingungen essenziell für die Aufrechterhaltung der vaskulären Integrität. So wurde im Mausmodell gezeigt, dass bei alleiniger Thrombozytendepletion ohne Entzündung keine Blutungsereignisse auftreten. Allerdings induzieren unter thrombozytopenen Bedingungen inflammatorische Stimuli, wie eine reverse Arthus-Reaktion, eine *Klebsiella pneumoniae*-Infektion oder eine lokale Bestrahlung, den Verlust der vaskulären Integrität und eine Einblutung in das Gewebe [68, 69]. Das Auftreten von petechialen Hautblutungen nach UV-B-Bestrahlung bei thrombozytopenen Patienten bestätigt die in der Maus gemachten Beobachtungen unabhängig im Menschen [70]. Dies zeigt, dass Thrombozyten bei Inflammation eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der vaskulären Integrität haben. Diese Funktion wird vor allem durch die (Hem-)ITAM-Rezeptoren vermittelt. Unter inflammatorischen Bedingungen wurden in GPVI^{-/-} und CLEC-2^{-/-} Mäusen auch bei normaler Thrombozytenzahl massive Blutungen beobachtet. Eine mögliche Erklärung liefern die Ergebnisse von Gros und Kollegen, die herausfanden, dass Thrombozyten bei Entzündung durch eine GPVI-vermittelte Bindung die Lücken im Gefäßendothel verschließen, welche bei der Diapedese von Neutrophilen Granulozyten entstehen [71, 72]. Demgegenüber bleibt die vaskuläre Integrität bei Blockade oder Knock-Out von GPCRs wie PAR-4 oder P2Y12 erhalten, obwohl diese Rezeptoren bei traumatischen Gefäßläsionen eine Schlüsselrolle bei der Blutstillung haben. Diese Ergebnisse legen nahe, dass sich die Pathophysiologie von inflammatorischen und traumatischen Blutungen unterscheidet [73].

Regulation der Immunantwort

Thrombozyten verfügen auch über Rezeptoren, welche typischerweise auf Immunzellen vorkommen und nehmen immunregulatorische Funktionen wahr. Sie exprimieren *Toll-like*-Rezeptoren, Immunorezeptoren oder die co-stimulatorischen Peptide CD40 und CD40L. Über den TLR-4 Rezeptor vermitteln Thrombozyten die Aktivierung von Neutrophilen Granulozyten und die Bildung von *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs). Außerdem regulieren sie die Transmigration der Neutrophilen Granulozyten über das Endothel [74]. In einem Mausmodell konnte bei Sepsis eine protektive CD40L-positive Thrombozytensubfraktion nachgewiesen werden, welche vorwiegend der Milz entstammt [75].

Thrombozyten können immunologisch auch die Funktion von Effektorzellen wahrnehmen. Sie sind in der Lage Bakterien einzukapseln, um die Ausbreitung des Pathogens im Körper zu verhindern („Immunothrombose“), oder aktiv *Plasmodium spp.* in infizierten Erythrozyten zu eliminieren [76]. Auch eine aktive Phagozytose von Bakterien und HI-Viren sowie die gezielte Migration zu Pathogenen wurde beschrieben [77, 78].

Bei Sepsis wurden ebenfalls immunologische Funktionen der Thrombozyten gezeigt. Hierbei wurden die meisten Untersuchungen im Mausmodell gemacht. Dort führte die Depletion von Thrombozyten oder GPVI zu einer stark verminderten Pathogen-*Clearance* bei pulmonaler *Klebsiella pneumoniae*-Infektion und gesteigerter Mortalität [55]. Nach Infektion mit *Salmonella typhi* wurde gezeigt, dass Thrombozyten über eine CLEC-2-Podoplanin abhängige Interaktion mit Makrophagen die Immunantwort positiv beeinflussen und die Prognose verbessern [79, 80]. Guo und Kollegen konnten zeigen, dass Thrombozyten bei Sepsis über MHC-I-Komplexe mit Immunzellen interagieren und so das *Outcome* beeinflussen [81].

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Sepsis ist eine häufige und lebensbedrohliche Erkrankung, für deren effektive Therapie eine frühe Diagnosestellung mit anschließendem Therapiebeginn entscheidend ist. Allerdings wird dies erschwert, da sich Sepsis häufig mit unspezifischen Symptomen äußert und ein Sepsis-definierendes Symptom nicht bekannt ist. Auffallend ist, dass wesentliche durch Thrombozyten regulierte Bereiche (Hämostase, Vaskuläre Integrität, Immunregulation) bei Sepsis pathologisch verändert sind. Denn Sepsis ist häufig mit hämorrhagischer Diathese, dem Verlust vaskulärer Integrität sowie fehlgeleiteter Immunantwort assoziiert. Allerdings wurde in den meisten klinischen Studien lediglich die Thrombozytenzahl analysiert. Die Thrombozytenfunktion war Gegenstand weniger Studien und die Studienergebnisse lieferten zum Teil diametral unterschiedliche Ergebnisse. Molekulare Untersuchungen der Signaltransduktion sind in keiner der angeführten Studien durchgeführt worden. Obwohl jüngste Studien im Tiermodell einen bedeutenden Einfluss der (Hem-)ITAM-Rezeptoren GPVI und CLEC-2 auf den Krankheitsverlauf unterstreichen, ist deren Funktion in Patienten gänzlich unbekannt. Ziel dieser Arbeit ist es deshalb, mit leitlinienkonformen Analyseverfahren folgende Kernfragen zu beantworten:

- I. Sind die Thrombozyten von Patienten mit Sepsis in Hinblick auf ihre Morphologie, Rezeptorausstattung und Biogenese verändert? Zeigen die Thrombozyten Zeichen von Voraktivierung?
- II. Weist die Thrombozytenfunktion von Patienten mit Sepsis Veränderungen auf? Wann treten diese auf? Sind diese diagnostisch und prognostisch relevant? Gibt es Veränderungen im Zeitverlauf?
- III. Funktioniert die Signaltransduktion der ITAM-Rezeptoren bei Sepsis?
- IV. Lassen sich Veränderungen in Thrombozyten gesunder Kontrollprobanden durch Inkubation in Vollblut/Plasma von Patienten induzieren?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Instrumente

Tabelle 2: Liste der verwendeten Instrumente.

Instrument	Hersteller
Aggregometer Apact 4S	DiaSys (Flacht, Deutschland)
Amersham Imager 600	GE Healthcare (Little Chalfont, GB)
BacT/ALERT® FA Plus	bioMérieux (Marcy-l'Étoile, Frankreich)
BacT/ALERT® FN Plus	bioMérieux (Marcy-l'Étoile, Frankreich)
Blutagarplatten	bioMérieux (Marcy-l'Étoile, Frankreich)
ELISA-Reader Multiscan Ex-reader	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
FACS Celesta™ Durchflusszytometer	Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA)
Heraeus™ Megafuge™ 8R Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
MacConkey-Agarplatten	bioMérieux (Marcy-l'Étoile, Frankreich)
Medtrokarte® NK4	Medtro (Leimen, Deutschland)
Megastar 1.6 Zentrifuge	VWR International (Radnor, PA, USA)
Mini-PROTEAN Tetra-Cell	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)
NanoDrop™ 2000c Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Schädler-Agarplatten	bioMérieux (Marcy-l'Étoile, Frankreich)
Sysmex KX21N	Sysmex Corporation (Köbe, Japan)

2.1.2 Reagenzien

Tabelle 3: Liste der verwendeten Reagenzien.

Reagenz	Hersteller
Acetylsalicylsäure (ASS)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Apyrase (Grad III)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Bradford-Lösung	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)
CRP-X _L	Cambridge Research Biochemicals (Billingham, GB); Kreuzvernetzung im Haus
Nitrocellulose Membran 0,2 µm	GE Healthcare (Little Chalfont, GB)
PageRuler Prestained Protein Marker	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Pepstatin	Roche Diagnostics (Risch, Schweiz)
PGE ₁	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Rhodocytin	Johannes Eble (Münster, Deutschland)
Rothiphorese Gel 30 Acrylamid Artikel-Nr.:3029.1	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Roti-Lumin plus ECL Lösung	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Thrombin (bovin)	Roche Diagnostics (Risch, Schweiz)
TRAP-6	Bachem Holding (Bubendorf, Schweiz)
Tween 20	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden in höchstem Reinheitsgrad von Sigma-Aldrich, Thermo Fisher Scientific oder Carl Roth bezogen

2.1.3 Antikörper

Tabelle 4: Antikörperliste. K: Kaninchen, M: Maus, R: Ratte, Z: Ziege.

Antikörper	Klon	Hersteller
K- α -Phospho-LAT (Tyr191)	/	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
K- α -Phospho-Syk (Tyr525/526)	C87C1	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
K- α -Syk	/	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
K- α -Phospho-SHP-1 (Tyr564)	D11G5	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
K- α -SHP-1	C14H6	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
K- α -Phospho-SHP-2 (Tyr542)	/	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
K- α -SHP-2	D50F2	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
M- α - CD41/CD61-FITC	PAC-1	Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA)
M- α -BCL-X _L	D-3	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)
M- α -CD14-Pacific Blue	M5E2	Biologend (San Diego, CA, USA)
M- α -CD41a-PE-Cy5	HIP8	Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA)
M- α -CD41a-VioBlue®	REA386	Milteny Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
M- α -CD42b-PE-Cy5	HIP1	Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA)
M- α -CD62P-APC	AK-4	Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA)
M- α -CLEC2-APC	AYP1	Biologend (San Diego, CA, USA)
M- α -GAPDH	6C5	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)
R- α -GPVI	328-D3	Nieswandt-Labor (Würzburg, Deutschland)
R- α -GPVI-HRP	338-E7	Nieswandt-Labor (Würzburg, Deutschland)
R- α -GPVI (JAQ1)-HRP	98A3	Nieswandt-Labor (Würzburg, Deutschland)
M- α -Phospho-Tyr	4G10	Merck Millipore (Burlington, MA, USA)
M- α -Podoplanin-APC	NZ-1.3	Invitrogen (Waltham, MA, USA)
Z- α -Kaninchen-IgG HRP	/	Dako (Hamburg, Deutschland)
Z- α -Maus-IgG HRP	/	Dako (Hamburg, Deutschland)
Z- α -Ratte-IgG HRP	/	Dako (Hamburg, Deutschland)

Alle angeführten Maus-, Ratten- und Kaninchenantikörper sind gegen humane Proteine gerichtet.

2.1.4 Verwendete Puffer und Lösungen

Hepes-Tyrodes-Puffer ohne Ca²⁺

NaCl	137 mM
NaHCO ₃	12 mM
HEPES	5 mM
KCl	2,7 mM
MgCl ₂	1 mM
Na ₂ HPO ₄	0,43 mM
Glucose-Lösung	0,1% (v/v) Zugabe unmittelbar vor Nutzung
Albumin Fraktion V (BSA)	0,36% (w/v) Zugabe unmittelbar vor Nutzung // pH 7,34

Hepes-Tyrodes-Puffer mit Ca²⁺

NaCl	137 mM
NaHCO ₃	12 mM
HEPES	5 mM
KCl	2,7 mM
CaCl ₂	2 mM
MgCl ₂	1 mM
Na ₂ HPO ₄	0,43 mM
Glucose-Lösung	0,1% (v/v) Zugabe unmittelbar vor Nutzung
Albumin Fraktion V	0,36% (v/v) Zugabe unmittelbar vor Nutzung // pH 7,34

Tris *buffered* saline (TBS)

NaCl	137 mM
Tris-HCl	20 mM
	// pH 7,3

Laemmli Gelelektrophorese Laufpuffer

Tris	40 mM
Glycin	0,95 mM
SDS	0,5% (w/v)

2x Lysepuffer

NaCl	150 mM
HEPES	15 mM
EGTA	10 mM
Triton X-100	2% (v/v)
Natriumorthovanadat	2 mM Zugabe unmittelbar vor Nutzung
PMSF	1 mM Zugabe unmittelbar vor Nutzung
Aprotinin A	1 mM Zugabe unmittelbar vor Nutzung
Leupeptin	1 mM Zugabe unmittelbar vor Nutzung
Pepstatin	1 mM Zugabe unmittelbar vor Nutzung
	// pH 7,4

Trenngel Gelelektrophoresepuffer

Tris-HCl	1,5 M
	// pH 8,8

Sammelgel Gelelektrophoresepuffer

Tris-HCl	1 M
	// pH 6,8

SDS 4x reduzierender Probenpuffer

Tris-HCl	200 mM
Glycerol	40% (v/v)
SDS	8% (w/v)
β -Mercaptoethanol	2% (v/v)
Bromphenolblau	0,04% (w/v)

SDS 4x nicht reduzierender Probenpuffer

Tris-HCl	200 mM
Glycerol	40% (v/v)
SDS	8% (w/v)
Bromphenolblau	0,04% (w/v)

Material und Methoden

Tank-Blot Puffer

NaHCO ₃	10 mM
Na ₂ CO ₃	3 mM
Methanol	20% (v/v) Zugabe unmittelbar vor Nutzung

TBS-T Waschpuffer

TBS	-
Tween 20	0,1% (v/v) Zugabe unmittelbar vor Nutzung

Hard-Strippingpuffer

Tris-HCl	62,5 mM
SDS	2% (w/v)
β-Mercaptoethanol	0,7% (v/v) Zugabe unmittelbar vor Nutzung // pH 6,7

ELISA-Coatingpuffer

NaHCO ₃	0,1 M // pH 9,5
--------------------	--------------------

ELISA-Waschpuffer

PBS	-
NaCl	0,3 M
Tween 20	0,05 % (v/v)

Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS)

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM
Na ₂ HPO ₄	8,21 mM // pH 7,14

4% Paraformaldehyd (PFA)

PBS	-
PFA	4% (w/v)

Alle Puffer wurden mit Reinstwasser aus einem Milli-Q® Integral 3 System (Merck-Millipore) angefertigt. Für die Einstellung des pH-Werts wurden NaOH oder HCl benutzt.

2.2 Methoden

2.2.1 Patientenrekrutierung

Die Rekrutierung der Patienten erfolgte mit gültigem Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Würzburg (Schriftzeichen 102/17). Die Studie wurde in Einklang mit der Erklärung von Helsinki in der letztgültigen Version durchgeführt. Zwischen September 2017 und Mai 2018 erfolgte die Rekrutierung von 15 Patienten mit Sepsis von der Intensivstation des Universitätsklinikums Würzburg. Die Entnahme von 16 ml Vollblut erfolgte nicht-invasiv durch Routineversorgungskatheter in Natrium-Citrat-Monovetten (3,2%) nach ärztlicher Aufklärung und Einwilligung durch den Patienten. Falls der Patient nicht einwilligungsfähig war, erfolgte die Einwilligung durch einen befugten Angehörigen oder juristischen Vertreter und dem für die Studie berufenen Konsiliararzt. Die Blutabnahme wurde auf folgende Zeitpunkte terminiert:

I: Aufnahme auf die Intensivstation.

II: Tag 5-7 auf der Intensivstation.

III: Tag der Entlassung von Intensivstation.

Für die Studienaufnahme sollte das Krankheitsbild Sepsis sowohl gemäß Sepsis I- als auch Sepsis III-Kriterien vorliegen [11, 15]. Der Studienausschluss erfolgte auf Grundlage von hämato-onkologischen Erkrankungen oder einer vorliegenden Schwangerschaft. Die Patienten wurden zusätzlich in die Kategorien „Sepsis“ oder „Septischer Schock“ eingeteilt. Der detaillierte Algorithmus zur Rekrutierung der Patienten ist in Abbildung 4 dargestellt. Tagesaktuell wurde zu jedem Patienten ein Kontrollproband nach Aufklärung und schriftlicher Einwilligung rekrutiert. Für den Studieneinschluss wurde sichergestellt, dass Gesundspender 7 Tage vor Blutentnahme keine Medikamente mit Einfluss auf die Thrombozytenfunktion eingenommen hatten [82], mindestens 18 Jahren alt und frei von akuter Krankheit waren. Insgesamt wurden 19 Gesundspender rekrutiert.

Material und Methoden

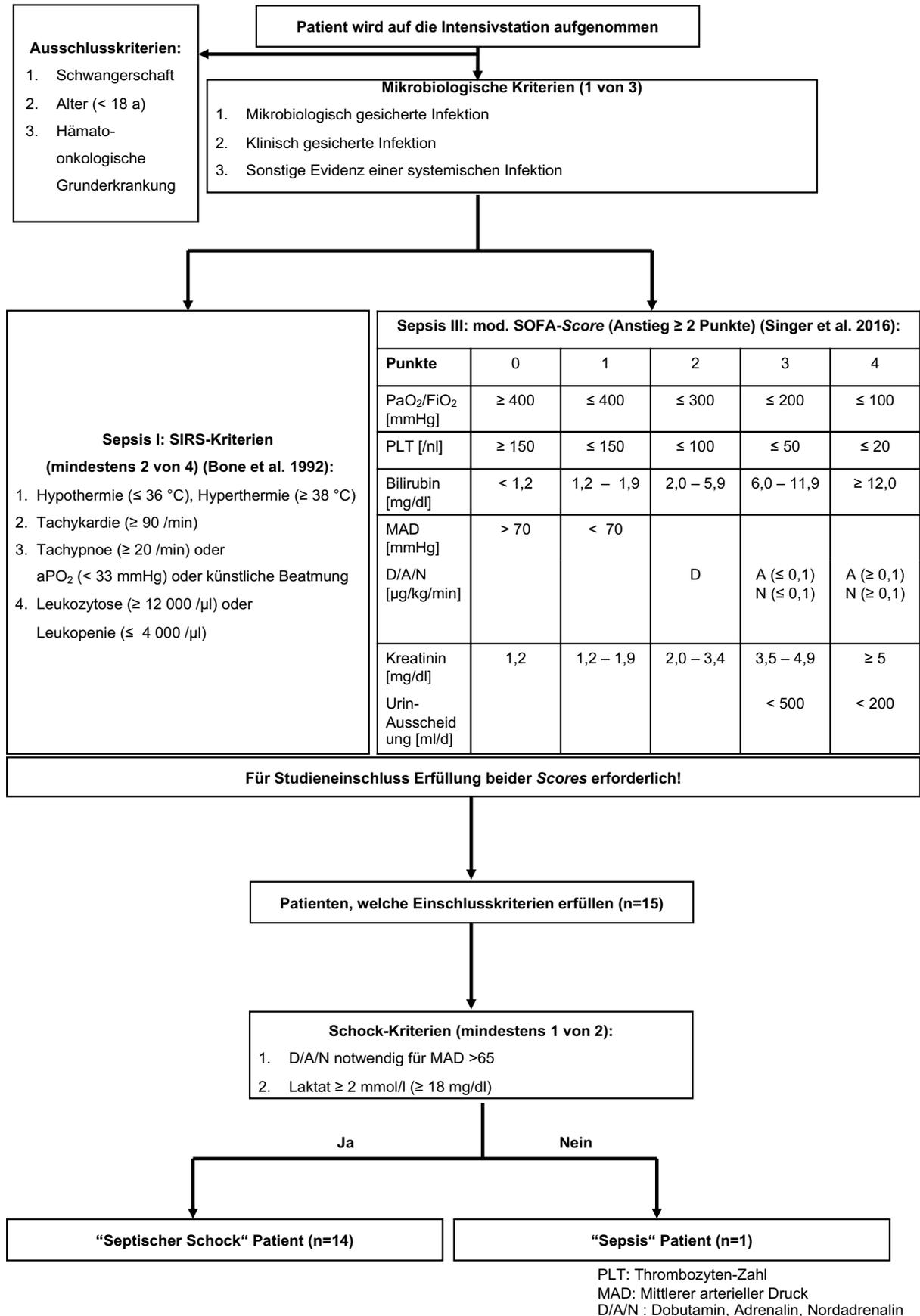


Abbildung 4: Algorithmus zur Studienaufnahme der Patienten.

2.2.2 Thrombozytenisolation und Aufreinigung

Bei den Kontrollprobanden erfolgte nach Durchführung von Wisch- und Sprühdesinfektion die Venenpunktion mit einer 21 Gauge Kanüle. Vorzugsweise wurde die *Vena cubitalis* punktiert. Die ersten 3 ml Vollblut wurden verworfen. Bei Patienten wurde das Blut aus bereits bestehenden Routineversorgungskathetern nach adäquater Desinfektion und Verwerfen der ersten 2 ml Blut gewonnen. Das Vollblut wurde bei beiden Methoden in Citrat-Monovetten (9 Teile Vollblut + 1 Teil Na⁺-Citrat) gesammelt. Die Monovetten wurden bei 152 g für 20 Minuten zentrifugiert, das Plättchen-reiche Plasma (PRP) abgenommen und mit ASS (finale Konzentration 2 µM) versetzt. Im Anschluss an 30 Minuten Inkubationszeit wurden die Proben, nach Zugabe von PGE₁ (final 1 µM) und Apyrase (final 2 U/ml), bei 1000 g für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Plättchen-arme Plasma (PPP) wurde abgenommen, in mit 1% BSA beschichteten Cryovials gesammelt und nach einem Schockfrost-Prozess auf Trockeneis bei -80 °C asserviert. Um Restplasma zu entfernen, wurden die pelletierten Thrombozyten in 1 ml Hepes-Tyrodes-Puffer ohne Ca²⁺ resuspendiert und pelletiert (1000 g, 10 min). Der Überstand wurde abgenommen. Durch Hinzufügen eines kalkulierten Volumens Hepes-Tyrodes-Puffer mit Ca²⁺ wurde eine Thrombozytenkonzentration von 500 /nl eingestellt.

2.2.3 Aggregometrie-Analyse und Thrombozyten-Lyse

Das Aggregometer wurde auf 37 °C aufgewärmt und 160 µl Thrombozytensuspension wurden in Aggregometrie-Küvetten gegeben. Unmittelbar nach Zugabe des Agonisten wurde die Aufzeichnung unter *stirring conditions* begonnen. Als *Blank* diente Hepes-Tyrodes-Puffer mit Ca²⁺. Nach definierter Zeit (300 sek, 600 sek, 900 sek, 3600 sek) wurde die Aufzeichnung gestoppt und im Anschluss 160 µl eiskalter 2x Lysepuffer zu der Thrombozytensuspension gegeben. Nach einem 30-minütigen Inkubationsprozess wurden die Proteinlysate zentrifugiert (20800 g, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde bei -80 °C asserviert.

2.2.4 Blutgruppenbestimmung mittels *Bedside-Test*

Mit jeweils unterschiedlichen Kanülen wurde eine kleine Menge Vollblut aus den Citrat-Monovetten entnommen und in eines der beiden Testfelder der Medtrokarte® NK4 injiziert. Durch diskretes Schwenken der Testkarte (30 sek) erfolgte die Vermischung von Blut und Testlösung. Agglutination im Testfeld zeigt das Vorhandensein des jeweiligen Antigens (A/B) auf den Erythrozyten an.

2.2.5 Bradford-Assay

Die Ermittlung des Proteingehalts erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers in einem Nanodrop-Photospektrometer. Vor der Messung wurde eine BSA-Eichreihe mit 10, 50, 250, 500, 1000 und 1500 µg/ml angelegt.

2.2.6 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese und Immunoblot

Thrombozyten-Lysate wurden durch Verdünnung mit H₂O auf ein Volumen von 24 µl bei jeweils identischer Protein-Konzentration eingestellt (Proteinmenge 9-16 µg). Nach Zugabe von 4x Probenpuffer wurden die Proben für 5 min bei 95 °C erhitzt und dabei die Proteine denaturiert. Im Anschluss an eine kurze Inkubation auf Eis erfolgte die Beladung des Gels. Für die Gelelektrophorese wurden ausschließlich selbst gegossene Acrylamid-Gele verwendet (Acrylamidgehalt 10% oder 13,5%).

Trenngel 10%

H ₂ O	2,5 ml
Trenngel-Puffer	1,5 ml
SDS (10%)	60 µl
Acrylamid-Lösung	2 ml
APS	60 µl
TEMED	6 µl

Trenngel 13,5%

H ₂ O	1,5 ml
Trenngel-Puffer	1,5 ml
SDS (10%)	60 µl
Acrylamid-Lösung	2,7 ml
APS	60 µl
TEMED	6 µl

Sammelgel 3%

H ₂ O	1 ml
Sammelgel-Puffer	0,5 ml
SDS (10%)	20 µl
Acrylamid-Lösung	300 µl
APS	20 µl
TEMED	2 µl

Die Gelelektrophorese wurde unter Verwendung eines Laemmli-Laufpuffers bei 120 V durchgeführt. Im Anschluss erfolgte der Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran bei 350 mA für 60 min. Gelelektrophorese und Transfer wurden mit einem Mini-PROTEAN Tetra-Cell System (Bio-Rad) durchgeführt. Die Proteinbindungsstellen der Membran wurden durch Blockade mittels 5% BSA oder 5% Milch gesättigt (Blockadezeit: 60 Minuten, RT), um unspezifische Signale bei der Entwicklung zu reduzieren. Die Inkubation mit dem Primär-Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C.

Tabelle 5: Verwendete Immunoblot-Antikörper. K: Kaninchen, M: Maus, R: Ratte, Z: Ziege.

Primär-Antikörper	Verdünnung Primär-Antikörper	Medium
M-α-GAPDH	1:1000	5% BSA
M-α-GPVI (JAQ1)-HRP	1:3000	TBS-T
K-α-Phospho-LAT (Tyr191)	1:2000	5% BSA
K-α-Phospho-Syk (Tyr525/526)	1:2000	2,5% Milch
K-α-Syk	1:2000	5% BSA
K-α-Phospho-SHP-1 (Tyr564)	1:2000	5% BSA
K-α-SHP-1	1:2000	5% BSA
K-α-Phospho-SHP-2 (Tyr542)	1:2000	5% BSA
K-α-SHP-1	1:2000	5% BSA
M-α-Phospho-Tyr	1:2000	2,5% Milch
M-α-BCL-x _L	1:200	2,5% Milch

Nach dem Waschen der Membranen in TBS-T (3 x 10 min, RT), erfolgte die Inkubation in Sekundär-Antikörper-Suspension (120 min, 4 °C). Für alle Antikörper wurde der Spezies-adaptierte, HRP-gekoppelte Sekundär-Antikörper in einer Verdünnung von 1:2500 verwendet, mit folgenden Ausnahmen:

1. M- α -GPVI (JAQ1)-HRP: Der Primär-Antikörper ist bereits HRP gekoppelt. Die Verwendung eines Sekundär-Antikörpers war nicht indiziert.
2. M- α -BCL-X_L: Verdünnung Sekundär-Antikörper 1:1000.

Im Anschluss an einen erneuten Waschschrift in TBS-T (3 x 5 min, RT) wurde Entwicklerlösung auf die Membranen aufgetragen. Die Entwicklung wurde in einem Amersham Imager 600 (GE Healthcare, Little Chalfont, GB) durchgeführt (Modus: *Chemiluminescence*, *Exposure: Auto*, *High dynamic range: On*).

2.2.7 Membran-Stripping

Bei einigen Membranen war eine erneute Färbung mit einem anderen Primär-Antikörper erforderlich. Durch *Stripping* sollten die bereits gebundenen Antikörper entfernt werden. Dazu wurde die Membran in *Hard-Stripping*-Puffer inkubiert (Temperatur 56 °C, Zeit 60 min). Anschließend wurde die Membran in TBS-T gewaschen (21 °C, 3 x 15 min). Nach erneutem Blockieren der Membran wurde der Primär-Antikörper aufgetragen.

2.2.8 Erstellen der löslichen GPVI-Ektodomänen-Positivkontrolle

Thrombozyten wurden nach Standardprotokoll gewaschen, aufgereinigt und in einer Konzentration von 500/nl in HEPES-Tyrodes-Puffer mit Ca²⁺ resuspendiert (Kapitel 2.2.2). Zu der Thrombozytensuspension wurde 100 μ M Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon (CCCP) gegeben (60 min, 37 °C), um die Abtrennung des Kollagen-Rezeptors GPVI von der Thrombozytenoberfläche zu induzieren. Durch zwei aufeinanderfolgende Zentrifugationsschritte (Nr.1: 2000 g, 10 min; Nr.2: 14200 g, 10 min) und anschließender Abnahme des Überstandes wurden verbliebene Zellen und größere Zellbestandteile entfernt. Die Proteinlösung wurde bei -20 °C asserviert.

2.2.9 GPVI-Ektodomänen-ELISA

MediSorp™ 96 Well ELISA-Platten wurden über Nacht bei 4 °C mit 50 µl 328-D3-Antikörper (Verdünnung 1:500 mit ELISA-Coatingpuffer) beschichtet. Die Zugabe von 200 µl 5 % Milch (2 h, 37 °C) sollte die Anzahl unspezifischer Proteinbindungen vermindern. Der Inhalt der Reaktionskammern wurde abgegossen und die Reaktionskammern mit 400 µl Waschpuffer gespült. Nach langsamem Auftauen auf Eis, Zentrifugation (2000 g, 10 min) und Abnahme des Überstandes wurden die zu testenden Plasmaproben in folgenden Verdünnungsschritten aufgetragen: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128. Die Verdünnung wurde mit PBS durchgeführt. Als Standardkurve diente die in Kapitel 2.2.8 hergestellte Positivkontrolle. Diese wurde in der ersten Reaktionskammer unverdünnt und in den weiteren Wells mit PBS verdünnt (Verdünnungsstufen 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64) aufgetragen. Nach Inkubation (90 min, 37 °C) und Durchführung von 3 Waschschritten mit jeweils 200 µl Waschpuffer wurde der HRP-gekoppelte 338-E7-Antikörper (Verdünnung 1:500 in Waschpuffer) hinzugegeben (45 min, RT). Nach erneuten 3 Waschschritten (200 µl) wurde als Substrat 50 µl TMB hinzugegeben. Nach 5 Minuten Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl H₂SO₄ beendet. Die Entwicklung erfolgte bei OD 450 nm, Korrekturwellenlänge OD 650 nm im ELISA-Reader Multiscan Ex.

2.2.10 TPO- und IL-6-ELISA

Die Assays wurden gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. PPP wurde nach dem in Kapitel 2.2.2 geschilderten Vorgehen aufbereitet und jeweils in Duplikaten aufgetragen. Die Probenverdünnung erfolgte mit dem vom Hersteller vorgesehenen Puffer, angepasst an die Detektionsgrenzen des Assays. Die Entwicklung erfolgte im ELISA-Reader Multiscan Ex gemäß den Angaben des Herstellers.

2.2.11 Vollblut-Kreuzinkubation

Thrombozyten eines Gesundspenders wurden nach dem Standardprotokoll (Kapitel 2.2.2) isoliert und in Hepes-Tyrodes-Puffer ohne Ca^{2+} aufgenommen. In Abweichung zum Standardprotokoll wurde kein PGE_1 hinzugegeben, die Zentrifugation wurde bei 500 g durchgeführt und der Waschschrift ausgelassen. Die Thrombozytenzahl wurde auf 150 /nl bei einem Volumen von 500 μl eingestellt. Um nach Zugabe zu Vollblut eine Diskriminierung zwischen den aufgereinigten und den nativ im Vollblut vorhandenen Thrombozyten zu ermöglichen, wurden zu der Thrombozytensuspension 10 μl M- α -CD42b-PE-Cy5-Antikörper gegeben und diese im Anschluss 5 Minuten im Dunkeln inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (500 g, 10 min, keine Zugabe von PGE_1) wurde der Überstand mit überschüssigem M- α -CD42b-PE-Cy5-Antikörper von dem Thrombozytenpellet sorgfältig abgenommen und verworfen, sodass keine Verschleppung von freiem Antikörper in das Vollblut stattfinden konnte. Das Thrombozyten-Pellet wurde in der Folge im Vollblut des Patienten und eines anderen Gesundspenders resuspendiert. Nach erneuter Inkubation (37 °C, 15 min, 200 rpm) im abgedunkelten Heizblock erfolgte die Zugabe unterschiedlicher Agonisten und die Analyse im Durchflusszytometer.

2.2.12 Plasma-Kreuzinkubation

Von einem Gesundspender wurde nach Standardprotokoll (Kapitel 2.2.2) PRP isoliert. Zeitgleich wurde asserviertes, kryokonserviertes PPP auf Eis aufgetaut und langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Verbliebene Zellen und Kryopräzipitate wurden durch Zentrifugation (2000 g, 10 min) und Abnahme des Überstandes entfernt. Nach Pelletierung der Thrombozyten des Gesundspenders (500 g, 10 min) wurden diese in den präparierten Plasmaproben resuspendiert und inkubiert (37 °C, 60 min, 200 rpm). Im Anschluss an die Agonistenzugabe erfolgte die Untersuchung im Durchflusszytometer.

2.2.13 Immunfluoreszenzfärbung und Analyse der Thrombozytenfunktion

Tabelle 6: Antikörpervolumina. M: Maus.

Antikörper	Volumen
M- α -CD14-Pacific Blue	1 μ l
M- α -CD41a-Pe-Cy5	5 μ l
M- α -CD41a-VioBlue [®]	2 μ l
M- α -CD62P-APC	5 μ l
M- α -CLEC2-APC	2 μ l
M- α - PAC1-FITC	15 μ l
M- α -Podoplanin-APC	5 μ l

Für die durchflusszytometrische Untersuchung wurden 5 μ l Untersuchungsmaterial (Vollblut, PRP, Thrombozytensuspension) in 45 μ l Hepes-Tyrodes-Puffer ohne Ca²⁺ aufgenommen. Nach Zugabe eines Agonisten wurden die Ansätze für 5 Minuten inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Antikörperzugabe (Tabelle 6). Nach weiteren 15 Minuten Inkubation in

Dunkelheit wurde die Reaktion mit 1 ml FACS-Flow-Puffer abgestoppt und die Proben bis zur Messung abgedunkelt auf Eis aufbewahrt. Die Auswertung erfolgte mit FlowJo, (Version 10, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Die *Gating*-Strategie ist in Abbildung 5 dargestellt.

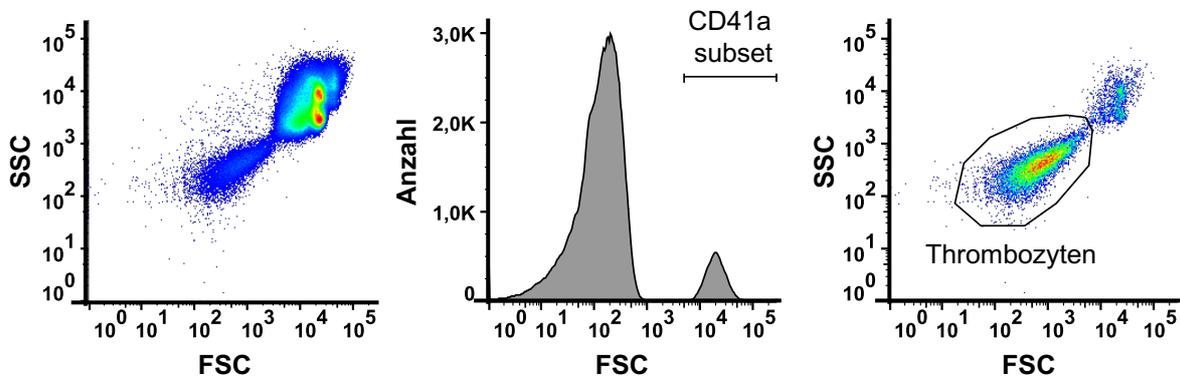


Abbildung 5: *Gating* der Thrombozytenpopulation. Nach *subgating* der CD41a positiven Ereignisse wurde die Thrombozytenpopulation im *Forward/Side Scatter* identifiziert und markiert.

2.2.14 Thiazolorange

Das Anfärben retikulierter Thrombozyten erfolgte mit Thiazolorange. Zu 50 μ l verdünntem Vollblut (1 + 9 in Hepes-Tyrodes-Puffer ohne Ca²⁺) wurde Thiazolorange-Lösung [1 μ g/ml] gegeben. Die Inkubation erfolgte in Dunkelheit bei Raumtemperatur für 60 Minuten. Die anschließende Immunfluoreszenzfärbung wurde gemäß dem Standardprotokoll durchgeführt (Kapitel 2.2.13). Die *Gating*-Strategie ist in Abbildung 6 dargestellt.

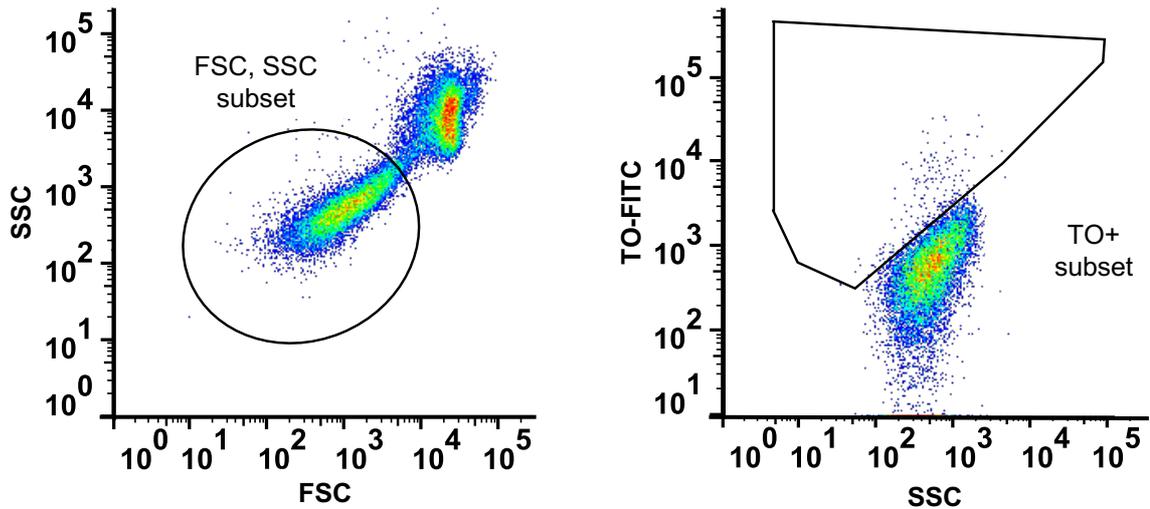


Abbildung 6: *Gating* der Thiazolorange-positiven Ereignisse.

2.2.15 Mepacrin-Assay

Mit diesem Versuch sollte die Funktion der δ -Granula untersucht werden. Dafür wurde das fluoreszierende Antiprotozoikum Mepacrin genutzt, welches selektiv in die δ -Granula aufgenommen wird. Die Proben wurden gemäß dem Standardprocedere vorbereitet (Kapitel 2.2.2 und 2.2.13). Abweichend vom Protokoll wurde die Thrombozytensuspension bei Raumtemperatur und nicht auf Eis aufbewahrt. Zunächst wurde die unbeladene Probe im FITC-Kanal mit der Wellenlänge 488 nm für 60 Sekunden im Durchflusszytometer gemessen. Zur Bestimmung der Mepacrin-Aufnahme wurde Mepacrin zu Vollblut gegeben [65 μ M] (30 min, 37°C). Anschließend wurde die Fluoreszenz im FITC-Kanal für ebenfalls 60 Sekunden bestimmt. Um die Mepacrin-Freisetzung zu quantifizieren, wurden die mit Mepacrin beladenen Thrombozyten mit TRAP-6 [5 μ M] stimuliert. Die Änderung der Signalintensität wurde über 300 Sekunden aufgezeichnet (Abbildung 7).

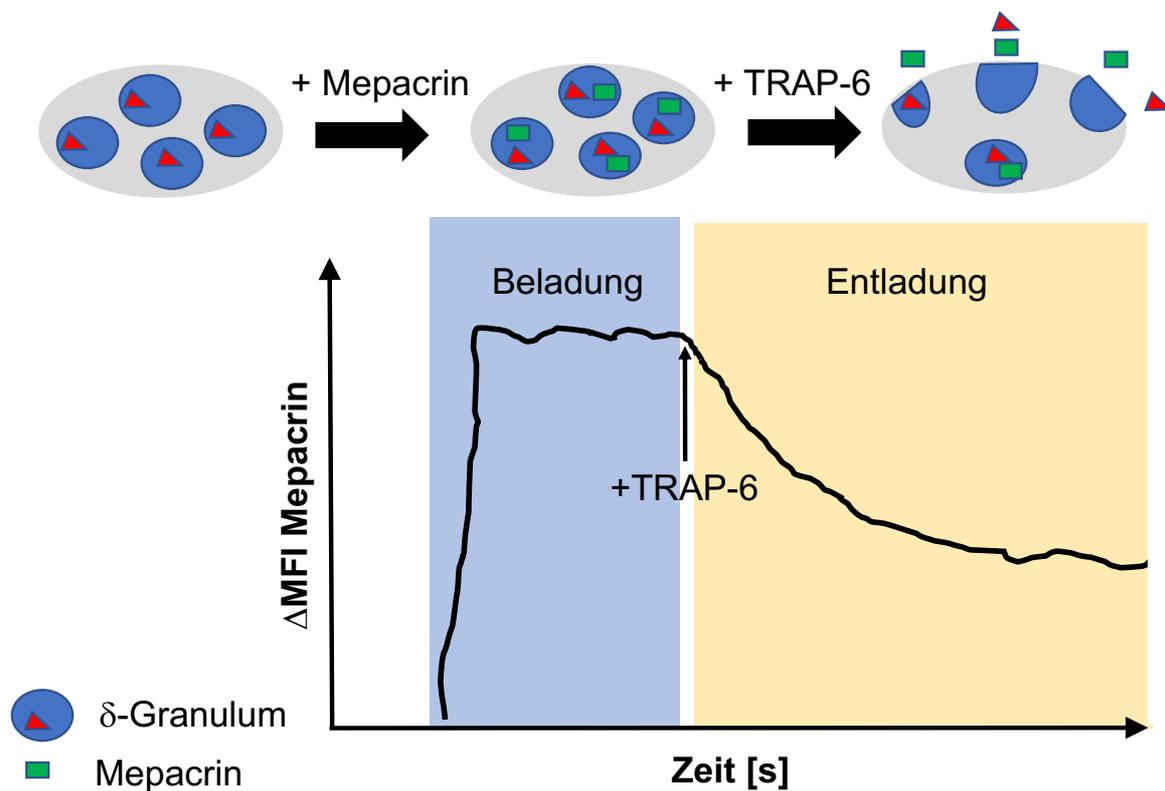


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Mepacrin-Assays. Mepacrin wird in Vollblut gegeben und reichert sich selektiv in den δ -Granula an. Die Stimulation der Thrombozyten mit TRAP-6 führt zur Degranulation. Aufgrund der fluoreszierenden Eigenschaften des Mepacrins kann anhand der Änderung der Signalintensität auf Vorhandensein und Entladekapazität der δ -Granula geschlossen werden.

2.2.16 Asservierung und Kultivierung der Bakterien

Die Pathogene wurden in Blutkulturflaschen im Rahmen der mikrobiologischen Routinediagnostik bei Patienten mit Sepsis kultiviert. Die Identifikation und Asservierung wurde durch das Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg durchgeführt. Um sicherzustellen, dass es sich beim identifizierten Keim nicht um ein durch Kontamination bedingtes Artefakt handelt, wurden folgende Mindestanforderungen an einen positiven Blutkulturbefund gestellt: 1. Der Keim musste in mehr als einer Blutkultur nachweisbar gewesen sein. 2. Es musste sich in Bezug auf das Krankheitsbild Sepsis um einen typischen Keim handeln.

Alle Bakterien, welche diese Bedingungen erfüllten, wurden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Glycerol-Stocks asserviert. Zur Vermehrung der Pathogene wurden die einzelnen Keime aufgetaut und auf Blutagar-Platten in einem 3-Ösenausstrich aufgetragen. Gramnegative Keime wurden zusätzlich auf MacConkey-Agar ausgestrichen.

Zum Ansetzen von planktonischen Kulturen wurden die Bakterien in *Brain-Heart-Infusion*-Medium überführt. Die Bakterien wurden bei 37 °C über Nacht im Brutschrank (5% CO₂) aufbewahrt. Im Anschluss wurden großflächig Bakterien mit einem Wattestäbchen von der Agar-Platte abgenommen und in 1 ml Hepes-Tyrodes-Puffer ohne Ca²⁺ überführt. Sämtliche Experimente mit Bakterien wurden in sterilen Werkbänken der biologischen Sicherheitsstufe 2 durchgeführt.

2.2.17 Kultivierung von *Porphyromonas gingivalis*

P. gingivalis wurde unter anaeroben Bedingungen über 72 h auf Schädler-Agarplatten gezüchtet. Im Anschluss erfolgte die Überführung in 1 ml Hepes-Tyrodes-Puffer ohne Ca²⁺ mittels Wattestäbchen.

2.2.18 Bakterien-Thrombozyten-Co-Inkubation

Die OD₆₀₀ der Bakteriensuspension wurde abhängig vom Assay durch Verdünnung mit Hepes-Tyrodes-Puffer ohne Ca²⁺ auf 1, 0,1 oder 0,01 eingestellt. 900 µl Vollblut oder PRP wurden mit 100 µl Bakteriensuspension gemischt und im Heizblock inkubiert (37 °C, 200 rpm). Zu definierten Zeitpunkten (5, 15, 60 min) erfolgte die Materialentnahme für eine weitere Analyse mittels Durchflusszytometrie. Bei Inkubation mit lebenden Bakterien wurde aus Gründen der biologischen Sicherheit zum Abstoppen der Reaktion nach Antikörperfärbung statt FACS-Flow-Probenpuffer 4%-PFA zur Fixierung und Inaktivierung der biologischen Proben verwendet. Die Fixation selbst hatte keinen Einfluss auf die gemessenen Parameter (Kapitel 3.4.6).

2.2.19 Antibiotika-Inkubation

Ein kalkuliertes Volumen Antibiotika-Lösung wurde zu 1 ml Vollblut gegeben, um die durch die *United States Federal Drug Agency* (FDA) oder den Hersteller ermittelte *Peak-Plasma-Konzentration* einzustellen (Tabelle 7). Im Anschluss wurden die Proben im Heizblock inkubiert (120 min, 37 °C, 200 rpm). Daraufhin wurde eine durchflusszytometrische Untersuchung der Thrombozytenfunktion durchgeführt.

Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Antibiotika in Inkubationsexperimenten.

Medikament	Peak-Plasma-Konzentration	Hersteller
Piperacillin/ Tazobactam	298 µg/ml / 34 µg/ml	Fresenius Kabi (Bad Homburg vor der Höhe, Deutschland)
Vancomycin	60 µg/ml	Hikma Pharmaceuticals (London, GB)
Ciprofloxacin	4,56 µg/ml	Fresenius Kabi (Bad Homburg vor der Höhe, Deutschland)
Metronidazol	25 µg/ml	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
NaCl	/	Fresenius Kabi (Bad Homburg vor der Höhe, Deutschland)

2.2.20 Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mit Graph-Pad-Prism (Version 8, La Jolla, CA, USA) durchgeführt. Zur Untersuchung der statistischen Verteilung wurde der D'Agostino-Pearson-Test verwendet. Die Signifikanzanalyse nicht normalverteilter Parameter mehrerer Gruppen gegen eine unabhängige Gruppe wurde mittels eines Kruskal-Wallis-Tests durchgeführt. Bei Analyse von lediglich zwei unabhängigen Gruppen wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test verwendet. Für die Analyse nicht normalverteilter abhängiger Gruppen wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rangest verwendet. Ab einem p-Wert <0,05 wurde von einem signifikanten Unterschied ausgegangen. Sofern nicht anders deklariert, erfolgte die graphische Auftragung der Daten als Median ± Interquartilabstand (IQR).

3 Ergebnisse

3.1 Patientenkohorte

Für die Studie wurden 15 intensivpflichtige Patienten mit Sepsis nach dem in Kapitel 2.2.1 geschilderten Vorgehen rekrutiert. Da Sepsis ein sehr heterogenes Krankheitsbild in Bezug auf Alter, Vorerkrankungen und dem Spektrum an bakteriellen, viralen und fungalen Erregern ist, soll in den folgenden Kapiteln zunächst eine genaue Betrachtung der Patientenkohorte erfolgen.

3.1.1 Klinische und infektiologische Kohortenübersicht

Tabelle 8: Übersicht über *Outcome*, Pathogene, Vorerkrankungen und Therapie der Patienten.

Patientenübersicht	Sepsis n=15
Mortalität	6/15
DIG (DIG-Score ≥ 5)	4/15
Isoliertes Pathogen	
Gram -	8/15
Gram +	3/15
Gram + und Gram -	3/15
Unbekannt	1/15
Infekt-Fokus	
Lunge	9/15
Harnwege	3/15
Weitere	3/15
Komorbidität	
Herzinsuffizienz	2/15
COPD	3/15
Diabetes mellitus	5/15
Chronische Niereninsuffizienz	3/15
Devices	
Dialyse (CVVH)	7/15

Von den 15 eingeschlossenen Studienpatienten erfüllten 14 die Kriterien des Septischen Schocks. Es wurden 13 internistische und zwei chirurgische Patienten in die Studie eingeschlossen. Die Patienten wurden innerhalb von kurzer Zeit nach Krankenseinlieferung auf die Intensivstation verlegt. Acht von 15 Patienten wurden innerhalb von zwölf Stunden nach Krankenhausvorstellung auf die Intensivstation aufgenommen, zwölf von 15 innerhalb von 24 Stunden und alle 15 innerhalb von 36 Stunden. Die Patienten wurden auch früh im Krankheitsverlauf für die Studie rekrutiert.

Bei fünf von 15 Patienten erfolgte die erste studienbedingte Blutentnahme innerhalb von 24 Stunden nach Vorstellung im Krankenhaus, bei 13 von 15 innerhalb von 48 Stunden und bei allen Patienten innerhalb von 72 Stunden. Damit konnten eine Variabilität durch präanalytische Probleme minimiert werden.

Im Krankheitsverlauf sind sechs Patienten verstorben (Mortalität 40 %), neun wurden von der Intensivstation entlassen, davon drei vor Zeitpunkt II. Aus diesen Gründen konnten zum Zeitpunkt II nur noch elf und am Entlasstag noch sieben Messungen durchgeführt werden. Die Patienten hatten ein breites Spektrum an Vorerkrankungen, unter denen vor allem Diabetes mellitus Typ 2 (5/15), COPD (3/15) und chronische Niereninsuffizienz (3/15) dominierten. Die Mehrheit der Kohorte hatte eine Pneumonie (9/15). Der zweithäufigste Infektfokus waren Infektionen des Urogenitaltrakts (3/15) (Tabellen 8, 9). Bei acht Patienten wurde ein gramnegativer und bei drei Patienten ein ausschließlich grampositiver Infekt nachgewiesen. Bei jeweils drei Patienten wurden sowohl grampositive als auch gramnegative Pathogene nachgewiesen. Aufgrund von Nierenversagen wurden sieben Patienten im Krankheitsverlauf dialysiert. Es wurde ein breites Spektrum an Antibiotika verwendet, wobei Piperacillin/Tazobactam am häufigsten eingesetzt wurde (11/15) (Tabellen 8, 9). Das breite Spektrum an Vorerkrankungen, mikrobiologischen Befunden und Therapien zeigt, wie unterschiedlich Patienten mit der Einschlussdiagnose Sepsis sein können.

Die Gesunderkohorte war mit einem medianen Alter von 32 Jahren (*Range* 22-61) wesentlich jünger als die Patientenkohorte (medianes Alter 70, *Range* 19-84). Auf Grund der Altersdifferenz zwischen den beiden Kohorten wurde noch eine Gruppe älterer Probanden rekrutiert, um Alter als möglichen Störfaktor der Analysen auszuschließen (Kapitel 3.6.1).

Ergebnisse

Tabelle 9: Übersicht der isolierten Bakterienspezies und der verwendeten Antibiose.

ID	Festgestelltes Pathogen (Material)	Antibiose zur Zeit der Blutentnahme
21	<i>Enterococcus faecium</i> (5, 9)	P/T, X
22	<i>Escherichia coli</i> (2)	M, A/S, Cx, V
23	<i>Klebsiella pneumoniae</i> * (1, 2)	Mp, V
24	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> * (5)	P/T, Cx, Mp, V, Cm, Mx, Cz
25	/	P/T, V, M
26	<i>Pasteurella multocida</i> , <i>Proteus mirabilis</i> (3)	P/T, Cx, V
27	<i>Enterobacter hormachei</i> (8), <i>Enterococcus faecium</i> (8), <i>Enterobacter cloacae</i> (4, 5)	P/T, Lx, Lz
28	<i>Escherichia coli</i> * (1)	P/T, A/S, Cx
29	<i>Enterococcus faecalis</i> * (1), <i>Escherichia coli</i> (8)	P/T, Cx
30	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1, 6)	P/T, Cx, V
31	<i>Escherichia coli</i> (2)	P/T, M
32	<i>Escherichia coli</i> (7), <i>Klebsiella pneumoniae</i> (7), <i>Enterococcus faecium</i> (7)	P/T, Ip
33	<i>Klebsiella oxytoca</i> (2)	V, Mp, Cx, E
34	<i>Escherichia coli</i> (1, 8)	P/T, Cx
35	<i>Enterococcus faecium</i> (1)	M, Mp

* Bakterien wurden isoliert und in Co-Inkubations-Assays getestet (Kapitel 3.5).

P/T: Piperacillin/Tazobactam [°]	Lx: Levofloxacin	Lz: Linezolid
X: Rifaximin	Ip: Imipinem	Mp: Meropenem
A/S: Ampicillin/Sulbactam	E: Erythromycin	V: Vancomycin [°]
M: Metronidazol [°]	Cm: Clarithromycin	Cz: Ceftazidim
Cx: Ciprofloxacin [°]	Mx: Moxifloxacin	

[°] Antibiotika wurden in Co-Inkubations-Assays getestet (Kapitel 3.6.2).

1: Blutkultur	2: Trachealsekret	3: Brochoalveoläre Lavage
4: Pleura-Punktat	5: Katheterspitze	6: Wundabstrich
7: Bauchhöhlenabstrich	8: Urin	9: Aszites

3.1.2 Blutbild und Routinelaborparameter

Sepsis schädigt zahlreiche Organsysteme. Deshalb soll im Folgenden eine genaue Betrachtung der Routinelaborparameter der Patienten erfolgen [11, 15]. Die Parameter wurden im Rahmen der klinischen Routinediagnostik durch das Zentrallabor des Universitätsklinikums Würzburg erfasst.

Auffallend war die anämische Labor constellation mit reduzierten Werten der Erythrozytenzahl, des Hämoglobins und des Hämatokrits (Tabelle 10). Obwohl sich der Gesamtgesundheitszustand der Patienten bis zum Tag der Entlassung verbesserte, hatten die Patienten im Median eine ausgeprägtere anämische Labor constellation. MCHC, MCH und MCV waren allerdings in der Patientenkohorte im Mittel normwertig.

Ergebnisse

Dies deutet auf eine Verdünnungsanämie hin, welche durch die hohe therapeutische Flüssigkeitsgabe verursacht werden kann und einen häufigen Befund bei Patienten auf der Intensivstation darstellt [83].

Darüber hinaus war der Kreatininwert am Tag der Entlassung im Median höher als zum Zeitpunkt I und II. Dies kann durch die Umstellung der Patienten von einer kontinuierlichen auf eine diskontinuierliche Dialyse erklärt werden, was bei drei von vier Patienten mit Kreatinin-Werten über 2 mg/dl zum Zeitpunkt III dokumentiert wurde. Die Werte der Entzündungsmarker C-reaktives Peptid (CRP) und Procalcitonin waren erhöht, sanken aber von Zeitpunkt I bis III kontinuierlich. Analog dazu normalisierten sich auch die Leukozytenzahlen, was auf eine suffiziente Therapie der Infektion hinweist.

Der SOFA-Score war bei allen Patienten deutlich erhöht. Der mediane SOFA-Score war bei Entlassung von der Intensivstation niedriger als im Krankheitsverlauf, was den verbesserten Gesamtzustand widerspiegelt.

Tabelle 10: Laborwerte und SOFA-Score der Patienten. Darstellung des Medians (IQR).

Laborwert	I Aufnahmetag (n=15)	II Tag 5-7 (n=11)	III Entlasstag (n=7)
Leukozyten [5000-12000 / μ l]	19150 (11050 – 23725)	11300 (8350 – 14375)	7500 (7000 – 9525)
Erythrozyten [4-6 *10 ⁶ / μ l]	3,31 (3,09 – 3,51)	2,47 (2,39 – 2,69)	2,87 (2,32 – 3,11)
Hämoglobin [14-18 g/dl]	10,2 (9,7 – 11,0)	8,0 (7,5 – 8,4)	8,6 (7,6 – 9,4)
Hämatokrit [42-50 %]	29,9 (28,8 – 33,1)	23,8 (21,8 – 25,4)	25,7 (22,9 – 28,6)
MCV [82-94 fl]	92,6 (89,8 – 96,6)	91,9 (90,6 – 96,2)	92,9 (91,0 – 95,2)
MCH [27-33 pg]	30,7 (29,8 – 32,5)	31,7 (30,0 – 33,5)	30,2 (30,0 – 31,6)
MCHC [32-36 g/dl]	33,3 (33,1 – 34,2)	33,8 (33,3 – 34,0)	33,2 (32,7 – 33,3)
Kreatinin [0-1,17 mg/dl]	1,94 (1,40 – 2,86)	1,69 (1,13 – 2,45)	3,54 (1,72 – 5,33)
Bilirubin [0,1-1,2 mg/dl]	1,7 (0,9 – 5,0)	2,3 (1,3 – 5,1)	1,7 (1,2 – 3,8)
Harnstoff [10-50 mg/dl]	84,2 (63,1 – 130,6)	77,1 (36,8 – 128,2)	81,3 (36,8 – 102,2)
C-reaktives Protein [0-0,5 mg/dl]	25,8 (19,9 – 33,0)	12,6 (11,1 – 16,8)	5,5 (3,8 – 6,5)
Procalcitonin [0-0,5 ng/dl]	21,4 (6,1 – 48,5)	14,3 (8,5 – 28,0)	/
SOFA-Score	9 (8 – 11)	9 (7,5 – 10)	5 (4 – 7,5)

3.1.3 Patienten mit Sepsis zeigen erniedrigte Thrombozytenzahlen

Thrombozytopenie ist ein Leitbefund der Sepsis und Bestandteil des diagnostischen SOFA-Scores [15]. Bei Aufnahme auf die Intensivstation hatten zwei von 15 Patienten eine Thrombozytose (>350 /nl), fünf von 15 eine Thrombozytopenie (<150 /nl) und acht normwertige Thrombozytenzahlen im Vollblut (Median: 167, IQR: 122,5; 231,5). Im Krankheitsverlauf entwickelten sechs weitere Patienten eine Thrombozytopenie. Bei Entlassung von der Intensivstation lag die Thrombozytenzahl aller Patienten wieder im Referenzbereich (Abbildung 8A). Dies zeigt, dass Thrombozytopenie ein häufiger Befund während einer Sepsis ist, der aber tendenziell eher im Krankheitsverlauf und nicht zu Krankheitsbeginn zu beobachten ist.

Neben einer erniedrigten Thrombozytenzahl wurden eine Erhöhung des MPV und des Anteils an retikulierter Thrombozyten als Sepsis-Diagnoseparameter beschrieben [84, 85]. Da neugebildete Thrombozyten ein größeres Volumen und noch residuelle RNA haben, spiegeln beide Parameter eine gesteigerte Thrombopoese wieder [86]. Zum Zeitpunkt II kam es parallel zum Abfall der Thrombozytenzahl zu einem Anstieg des MPV und des Anteils retikulierter Thiazolorange-positiver Thrombozyten, was durch eine Thrombozytopenie-*getriggerte* Neubildung von Thrombozyten erklärt werden könnte (Abbildungen 8B-C). Da Thrombopoese wesentlich durch TPO und indirekt durch IL-6 reguliert wird, wurden die Plasma-Spiegel dieser Zytokine mittels ELISA bestimmt. Zum Zeitpunkt II war eine signifikante Zunahme des TPO-Spiegels von 138 pg/ml auf 160 pg/ml messbar. Der höchste IL-6-Spiegel lag zum Zeitpunkt I vor und geht damit dem Anstieg des TPO voraus (Abbildungen 8D-E). Diese Daten legen auf zellulärer und plasmatischer Ebene nahe, dass bei Patienten mit Sepsis eine Thrombopenie die Sekretion von TPO triggert und darüber eine gesteigerte Neubildung von Thrombozyten vermittelt.

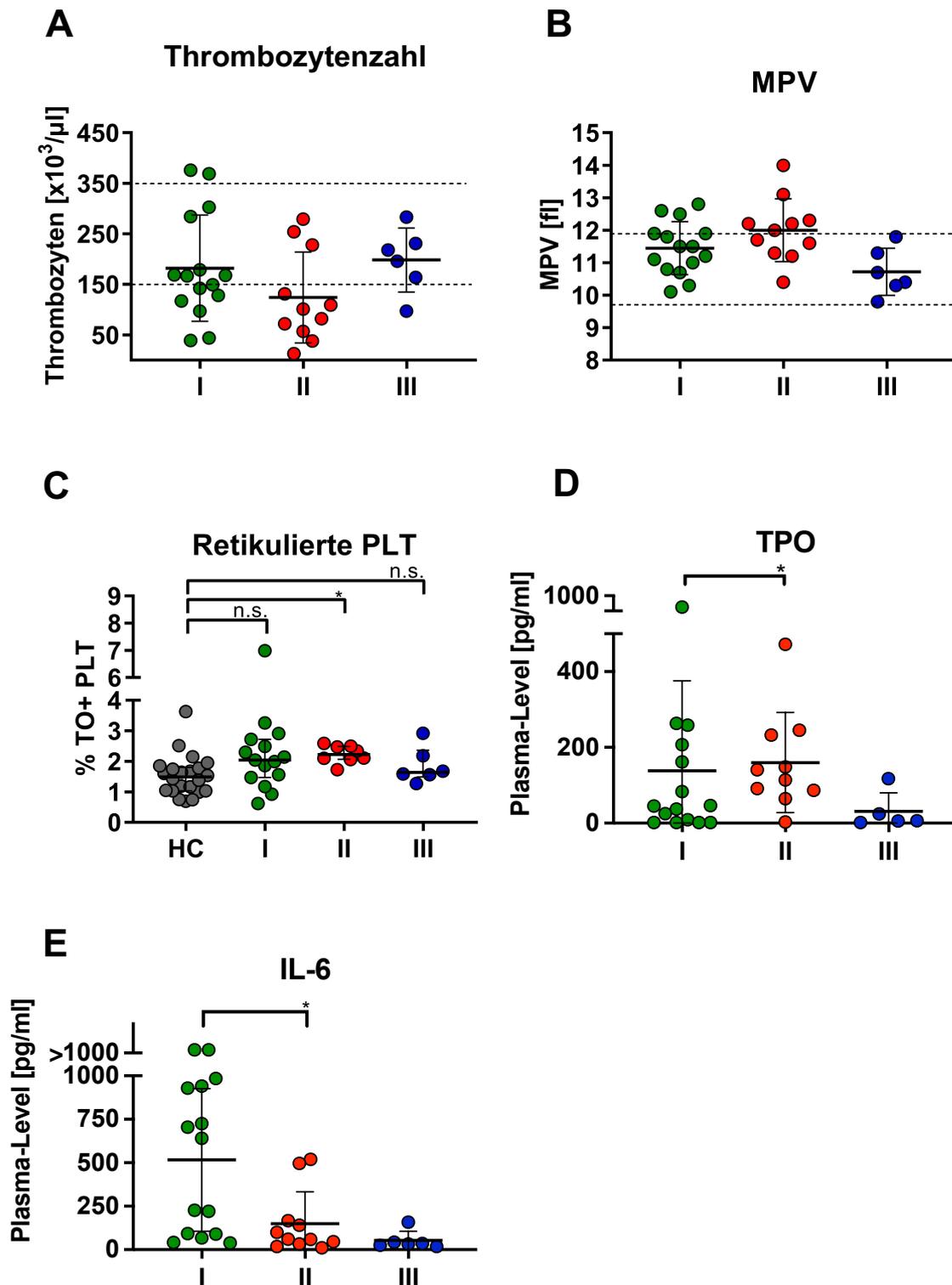


Abbildung 8: Thrombozytenzahl, Antigen- Oberflächenexpression und Thrombopoese. Die Messwerte der Patienten mit Sepsis (S) sind zu folgenden Zeitpunkten dargestellt: I: Tag der Aufnahme auf die Intensivstation, II: Tag 5-7 auf der Intensivstation, III: Entlassungstag von der Intensivstation. **(A)** Thrombozytenzahl zu den Zeitpunkten I, II und III. **(B)** Mittleres Thrombozyten-Volumen (MPV) **(C)** Retikulierte Thrombozyten ermittelt durch Thiazolorange-Färbung. **(D)** TPO- und **(E)** IL-6 Plasma-Spiegel wurden im PPP der Patienten mittels ELISA bestimmt. **(A, B)** Referenzbereiche sind durch gestrichelte Linien dargestellt. **(A-E)** Balken zeigen Median \pm IQR an. Die statistische Analyse wurde mit den folgenden Tests durchgeführt: **(A, B, D, E)** Kolmogorov-Smirnov-Test **(C)**, Kruskal-Wallis-Test. n.s. nicht-signifikant, * $p < 0,05$.

3.1.4 Unauffällige Expression des vWF- und Fibrinogen-Rezeptors

Der vWF- und Fibrinogen-Rezeptor sind für die Bildung eines soliden Thrombus wichtig. Deswegen wurde die Expression der Rezeptorbestandteile mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Weder für Untereinheiten des multimeren vWF-Rezeptors (CD42a und CD42b) noch für Bestandteile des Fibrinogen-Rezeptors (CD41 und CD61) konnten Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen festgestellt werden (Abbildungen 9A-B). Diese Daten zeigen, dass eine veränderte Thrombozytenfunktion bei Patienten mit Sepsis voraussichtlich nicht auf eine veränderte Expression des vWF- und Fibrinogen-Rezeptors zurückzuführen ist.

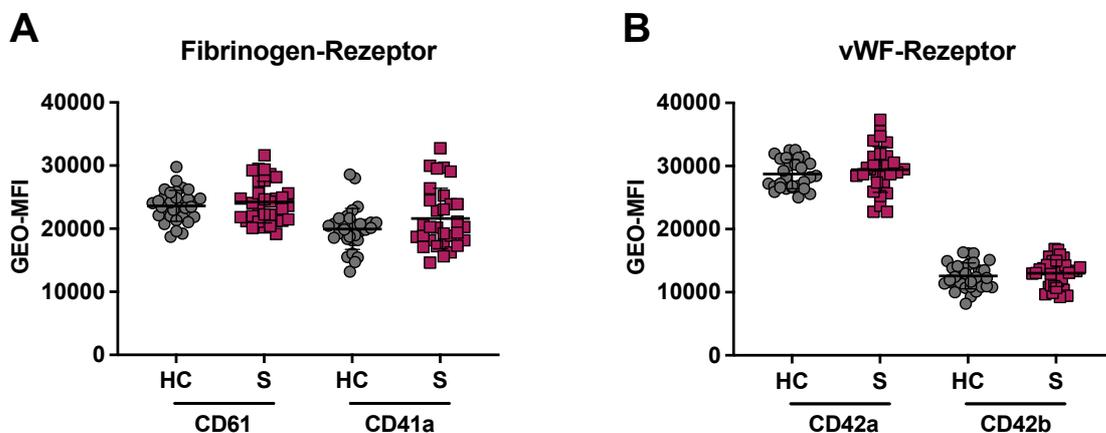


Abbildung 9: Expression des Fibrinogen- und vWF-Rezeptors. Dargestellt sind durchflusszytometrische Messwerte der Obeflächenexpression des (A) Fibrinogen- und (B) vWF-Rezeptors auf Thrombozyten von gesunden Kontrollen (HC) sowie von Patienten mit Sepsis (S). Balken zeigen Median \pm IQR an. Die statistische Analyse wurde mittels Kolmogorov-Smirnov-Test durchgeführt.

3.1.5 Thrombozyten von Patienten mit Sepsis sind nicht voraktiviert

Eine potenzielle Erklärung für die gehäufte Thrombozytopenie bei Patienten mit Sepsis wäre ein gesteigerter Thrombozytenverbrauch in der Peripherie. Daher wurden Thrombozyten von Patienten unter Ruhebedingungen (ohne Zugabe eines Agonisten) mittels Durchflusszytometrie auf die Expression von Aktivierungsmarkern untersucht. Folgende Parameter wurden analysiert: 1. Die aktivierte Konformation des Integrins $\alpha\text{IIb}\beta_3$, welche spezifisch durch den Antikörper PAC-1 gebunden wird. 2. Die Quantifizierung von P-Selektin (CD62P), welches durch Degranulierung der α -Granula an die Zelloberfläche kommt.

Der Anteil an CD62P-positiven Thrombozyten war unter Ruhebedingungen nicht erhöht (Abbildungen 10A-B). Darüber hinaus war keine erhöhte PAC-1-Bindung nachzuweisen (Abbildungen 10C-D). Eine vorzeitige Degranulation und (Vor-)Aktivierung von Thrombozyten der Patienten mit Sepsis war nicht zu beobachten.

Die Diagnosekriterien der DIG wurden von vier der 15 Patienten erfüllt (Kapitel 3.1.1, Tabelle 8). Auch bei diesen DIG-Patienten war keine Voraktivierung ruhender Thrombozyten im Vollblut festzustellen. Dies legt nahe, dass es unter Sepsis-Bedingungen nicht zu einer (Vor-)Aktivierung von Thrombozyten kommt. Alternativ könnten die aktivierten Thrombozyten auch schnell entfernt werden, sodass diese zum Zeitpunkt der Blutabnahme nicht mehr in der Zirkulation nachweisbar sind.

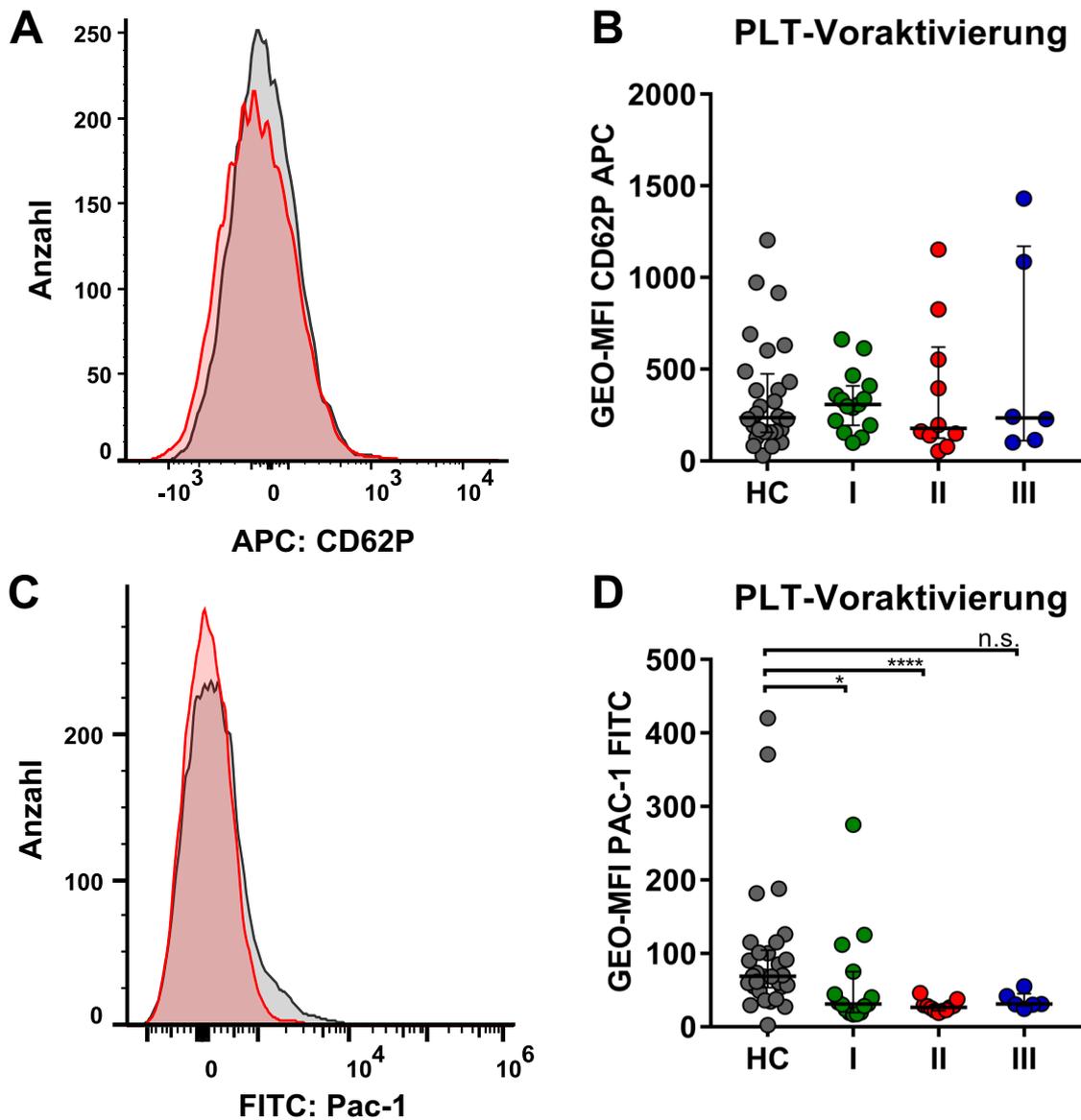


Abbildung 10: Untersuchung der Thrombozytenvoraktivierung. Dargestellt sind die Messwerte gesunder Kontrollen (HC) sowie der Patienten mit Sepsis zu folgenden Zeitpunkten: I: Tag der Aufnahme auf die Intensivstation, II: Tag 5-7 auf der Intensivstation, III: Entlassungstag von der Intensivstation. **(A-D)** Voraktivierung wurde durch Messung der **(A, B)** CD62P-Exposition und der **(C, D)** PAC-1-Bindung mittels Durchflusszytometrie untersucht. **(A, C)** Repräsentative Kurven von Patienten (rot) und Kontrollen (grau). Balken zeigen Median \pm IQR an. Die statistische Analyse wurde mittels Kruskal-Wallis-Test durchgeführt: n.s. nicht-signifikant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

3.2 Funktionelle Analyse der Thrombozytenfunktion

3.2.1 Thrombozyten von Sepsispatienten sind hyporeaktiv

Obwohl die Thrombozytenfunktion unkompliziert mit *Point-of-Care*-Analyseverfahren bestimmt werden kann, sind die präanalytischen Anforderungen der Verfahren im Hinblick auf die minimale Thrombozytenzahl oder den Hämatokritwert bei Sepsis häufig nicht erfüllt. Deswegen erfolgte die Untersuchung der Thrombozytenfunktion im Vollblut auf Einzelzellebene mittels Durchflusszytometrie und Lichttransmissions-Aggregometrie. Nach Stimulation mit dem selektiven GPVI-Agonisten CRP-X_L [0,01 µg/ml] zeigten 14 von 15 Patienten bereits zum Aufnahmezeitpunkt eine stark verminderte Integrin αIIbβ3-Aktivierung (Abbildungen 11A-B). Zum Zeitpunkt II wiesen alle Patienten eine deutlich verminderte Reaktivität auf. Das Schlangentoxin Convulxin aktiviert ebenfalls selektiv GPVI, induziert aber eine stärkere Rezeptor-Quervernetzung als CRP-X_L [56, 87]. Auch nach Stimulation mit Convulxin [0,01 µg/ml] war die Integrin-Aktivierung bei den Patienten reduziert, allerdings weniger stark als nach Aktivierung mit CRP-X_L (Abbildung 11C), was ein möglicher Hinweis für eine gestörte GPVI-*Cluster*-Bildung auf der Thrombozytenoberfläche ist.

Neben den Immunorezeptoren sollte auch die Funktion der GPCRs untersucht werden. ADP bindet an den P2Y₁₂- sowie an den P2Y₁-Rezeptor und ist ein wichtiger Agonist sowohl in der ersten als auch der zweiten Phase der Thrombozytenaktivierung [88]. Bei *in vitro*-Stimulation von Thrombozyten von Sepsispatienten mit 5 µM ADP fanden wir zum Zeitpunkt I eine stark verminderte Integrin-Aktivierung (Abbildung 11D). Diese lag zum Aufnahmezeitpunkt auf die Intensivstation bereits bei zehn von 15 Patienten vor, während zum Zeitpunkt II alle Patienten eine deutliche Hyporeaktivität zeigten. Diese Daten legen nahe, dass eine reduzierte Thrombozytenfunktion ein häufiger und früh auftretender Befund einer Sepsis-Erkrankung ist.

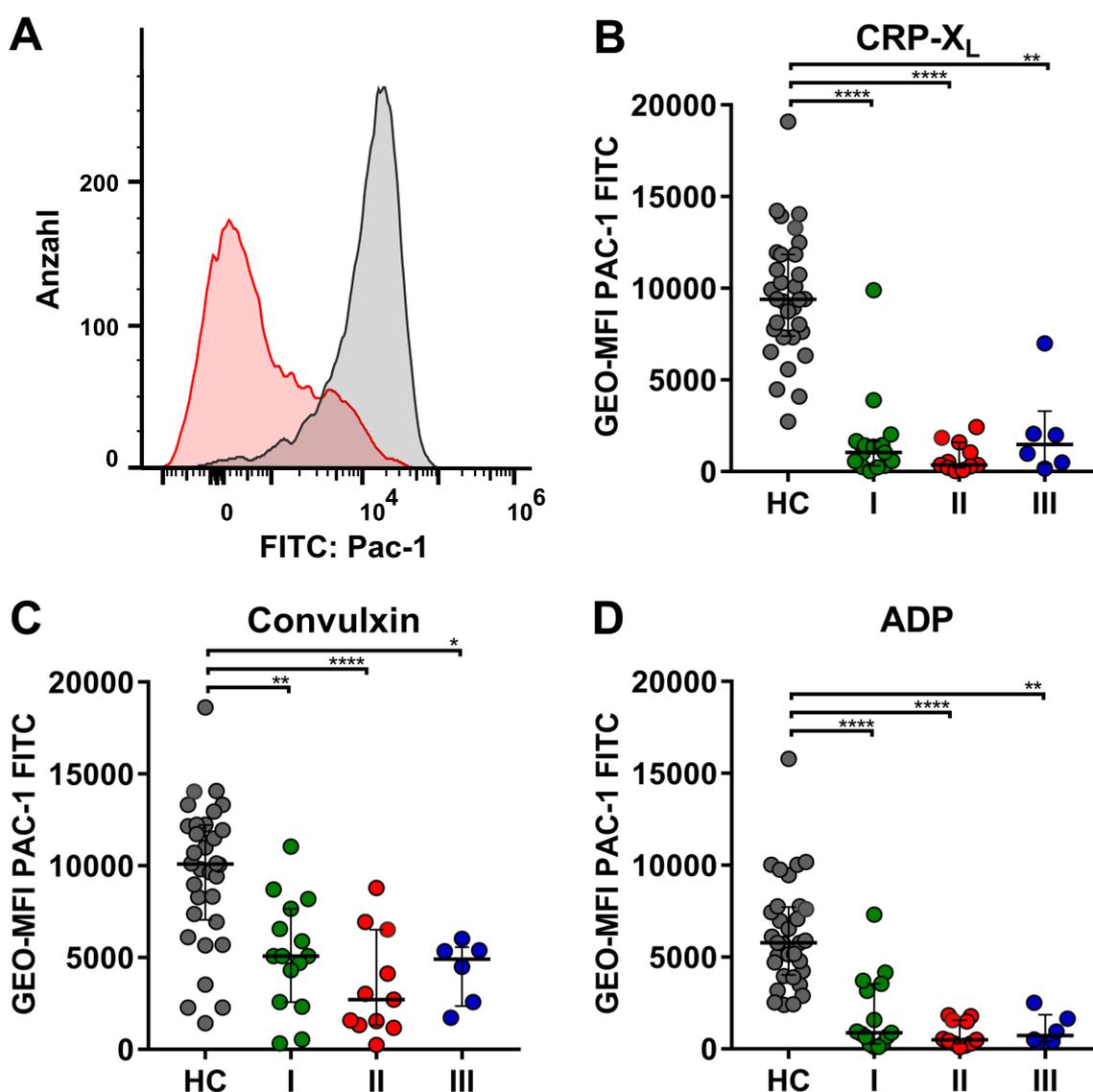


Abbildung 11: Durchflusszytometrische Messung der Integrin α IIb β 3-Aktivierung (PAC-1-Bindung) nach Stimulation. Dargestellt sind Messwerte gesunder Kontrollen (HC) sowie der Patienten mit Sepsis zu folgenden Zeitpunkten: I: Tag der Aufnahme auf die Intensivstation, II: Tag 5-7 auf der Intensivstation, III: Entlassungstag von der Intensivstation. **(A-D)** Aktivierung des Integrins α IIb β 3 wurde in Vollblut nach Stimulation mit **(B)** CRP-X_L [0,01 μ g/ml], **(C)** Convulxin [0,01 μ g/ml] oder **(D)** ADP [5 μ M] ermittelt. Eine repräsentative Kurve nach Zugabe von CRP-X_L dargestellt in Teilabbildung **A**. Balken zeigen Median \pm IQR an. Die statistische Analyse wurde mittels Kruskal-Wallis-Test durchgeführt: n.s. nicht-signifikant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Die CD62P-Expression war in Thrombozyten von Sepsispatienten nach Stimulation mit CRP-X_L [0,01 µg/ml] oder ADP [5 µM] im Vergleich zu Gesundspendern ebenfalls zu allen erfassten Zeitpunkten reduziert (Abbildungen 12A-D). Allerdings war hier der Unterschied zwischen Gesundspendern und Patienten nicht so stark ausgeprägt wie bei Analyse der Integrin-Aktivierung.

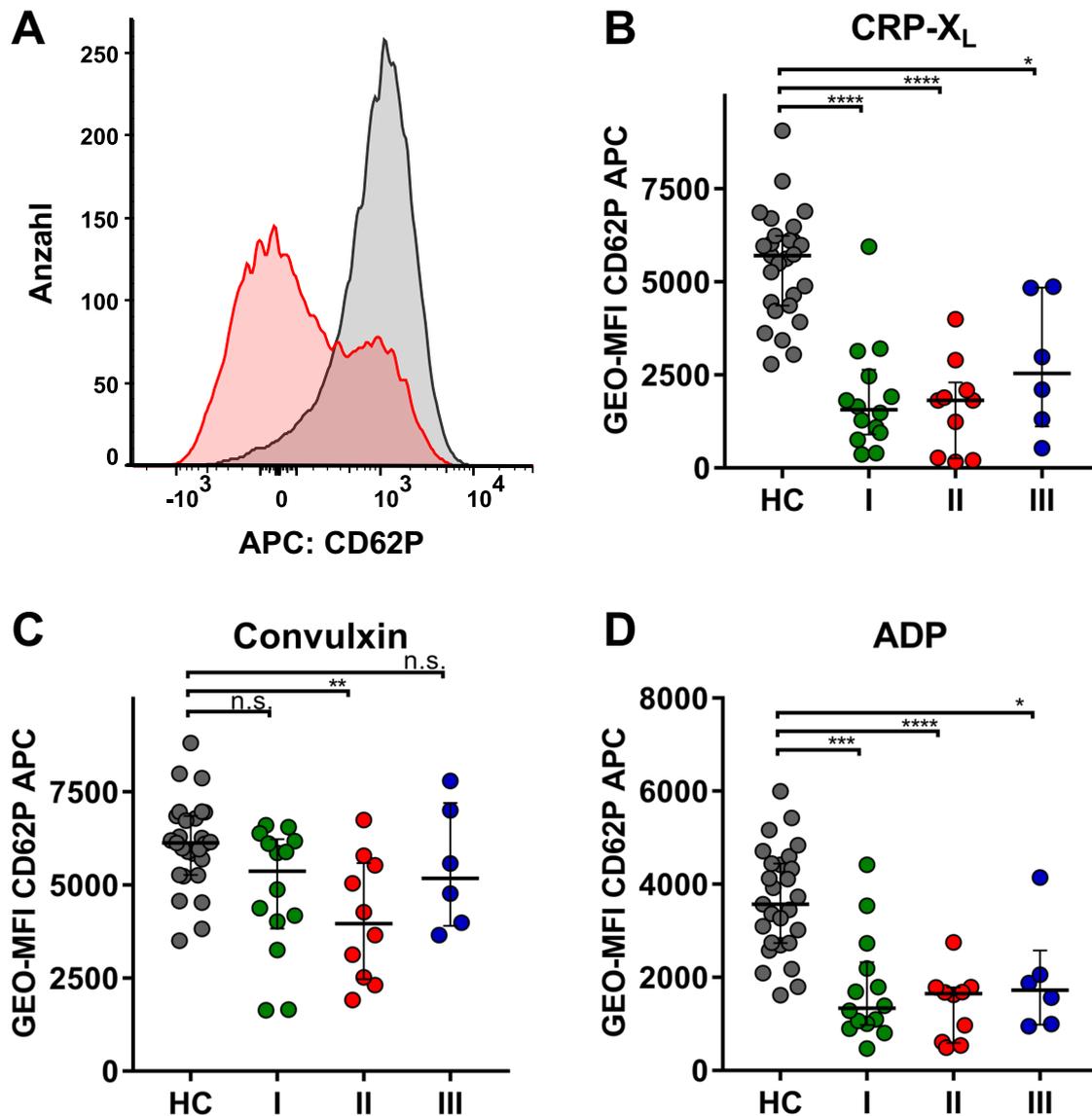


Abbildung 12: Messung der CD62P-Oberflächenexpression nach Thrombozytenstimulation mittels Durchflusszytometrie. Dargestellt sind Messwerte gesunder Kontrollen (HC) sowie der Patienten mit Sepsis zu folgenden Zeitpunkten: I: Tag der Aufnahme auf die Intensivstation, II: Tag 5-7 auf der Intensivstation, III: Entlassungstag von der Intensivstation. **(A-D)** CD62P-Expression wurde in Vollblut nach Stimulation mit **(B)** CRP-X_L [0,01 µg/ml], **(C)** Convulxin [0,01 µg/ml] oder **(D)** ADP [5 µM] mittels Durchflusszytometrie gemessen. Eine repräsentative Kurve nach CRP-X_L-Zugabe dargestellt in **A**. Balken zeigen Median ± IQR an. Die statistische Analyse wurde mittels Kruskal-Wallis-Test durchgeführt: n.s. nicht-signifikant, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001.

Bei Stimulation mit Convulxin [0,01 µg/ml] war zu den Zeitpunkten I und III kein Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen feststellbar. Zum Zeitpunkt II war die Thrombozytenreaktivität signifikant reduziert (Abbildung 12C). Eine Normalisierung der Thrombozytenfunktion über die Zeit war bei keinem Agonisten feststellbar.

Bei 10/15 Patienten lag genug Biomaterial zur Analyse der Thrombozytenfunktion mittels Lichttransmissions-Aggregometrie vor. Diese wurde ohne Zugabe von externem Fibrinogen durchgeführt, um eine anschließende molekularbiochemische Analyse nicht zu beeinträchtigen. Auf Grund des in den α -Granula enthaltenen Fibrinogens ist eine Aggregation der Thrombozyten dennoch möglich. Zum Zeitpunkt I war die maximale Aggregation nach Stimulation mit CRP-X_L von Patienten mit Sepsis in 7/10 Fällen deutlich reduziert. Während die maximale Aggregation auf CRP-X_L-Stimulation zum Zeitpunkt II bei allen Patienten deutlich eingeschränkt war, zeigte sich zum Zeitpunkt III eine Erholung der Reaktivität (Abbildungen 13A-B). Nach Stimulation mit dem selektiven CLEC-2-Agonisten Rhodocytin [10 nM] wies die Patientenkohorte zum Zeitpunkt I eine bimodale Verteilung auf: fünf von acht Patienten zeigten eine deutlich verminderte Aggregation nach CLEC-2-Stimulation, wohingegen die Thrombozyten bei drei von acht Patienten eine normale Reaktivität aufwiesen. Die Thrombozytenaggregation der Patienten nach Rhodocytin-Stimulation verbesserte sich sukzessiv im Krankheitsverlauf und wies zum Zeitpunkt III keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollkohorte mehr auf. (Abbildungen 13C-D). Bei selektiver Stimulation mit dem PAR-1-Rezeptoragonisten TRAP-6 aggregierten die Thrombozyten der Patienten schwächer als die der Kontrollen. Allerdings war die maximale Aggregation mit einem Mittelwert von 34,2% wesentlich höher als bei Stimulation mit den anderen Agonisten (Abbildungen 13E-F). Dieser Befund legt nahe, dass Thrombozyten von Sepsispatienten in ihrer Funktion stark eingeschränkt sind, die Hyporeaktivität allerdings nicht alle Signalkaskaden in gleichem Ausmaß betrifft.

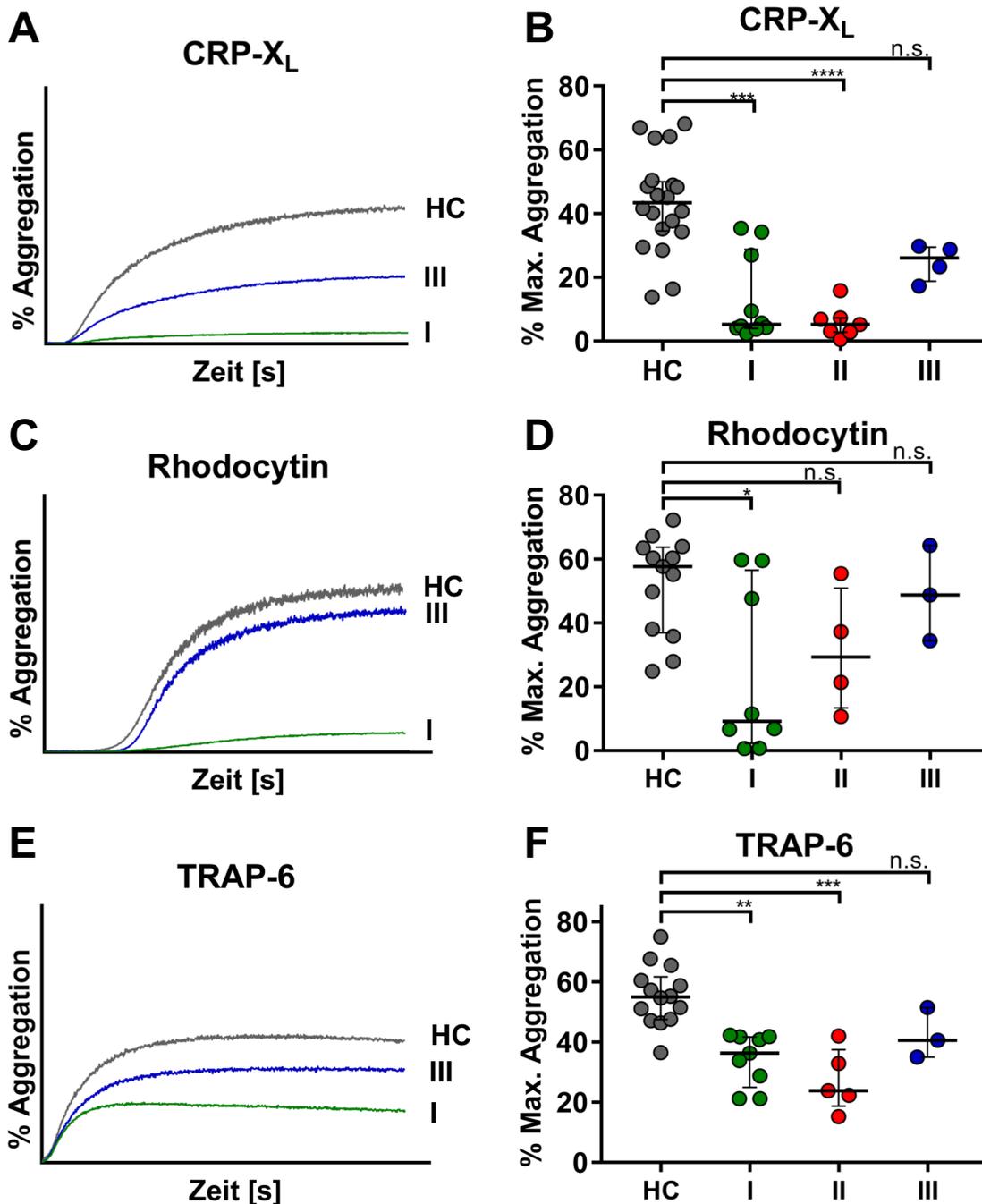


Abbildung 13: Thrombozytenfunktionsanalyse mittels Aggregometrie. Dargestellt sind Messwerte gesunder Kontrollen (HC) sowie der Patienten mit Sepsis zu folgenden Zeitpunkten: I: Tag der Aufnahme auf die Intensivstation, II: Tag 5-7 auf der Intensivstation, III: Entlassungstag von der Intensivstation. Aggregometrie wurde mit gewaschenen Thrombozyten durchgeführt [500 /nl]. Die maximale Aggregation wurde nach Stimulation mit (A, B) CRP-X_L [0,1 µg/ml], (C, D) Rhodocytin [10 nM] bzw. (E, F) TRAP-6 [10 µM] erfasst. (A, C, E) Repräsentative Aggregometrie-Kurven einer Kontrolle (HC) sowie eines Patienten mit Sepsis zum Zeitpunkt I und III. CRP-X_L-Messung für 5 Minuten, Rhodocytin- und TRAP6-Messungen für 10 Minuten. Balken zeigen Median ± IQR an. Die statistische Analyse wurde mittels Kruskal-Wallis-Test durchgeführt: n.s. nicht-signifikant, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001.

3.2.2 Die Funktion der δ -Granula ist bei Sepsis eingeschränkt

Die elektronendichten δ -Granula spielen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Thrombozyten, indem sie ADP, Ca^{2+} und Serotonin freisetzen. Auf Grund des beobachteten Thrombozytenfunktionsdefekts, sollte deshalb die Funktionsfähigkeit der δ -Granula mit einem kinetischen Mepacrin-Assay untersucht werden [89]. Elf von 15 Patienten zeigten zum Zeitpunkt I und II eine stark reduzierte Mepacrin-Aufnahme. Zum Zeitpunkt III war ebenfalls eine im Mittel verringerte Aufnahme erkennbar, welche sich aber durch die geringe Anzahl an Patienten nicht statistisch signifikant belegen ließ. (Abbildung 14A). Nach Stimulation mit TRAP-6 war auch die Mepacrin-Ausschüttung zum Zeitpunkt I und II signifikant reduziert. Eine tendenziell verringerte Mepacrin-Abgabe konnte zum Zeitpunkt III beobachtet werden (Abbildung 14B). Diese Daten legen eine Dysfunktion oder ein Fehlen der δ -Granula nahe und sprechen bei den hier untersuchten Patienten mit Sepsis für eine beeinträchtigte *Second Wave*-Aktivierung der Thrombozyten, welche die beobachtete Thrombozyten-Hyporeaktivität begünstigen könnte.

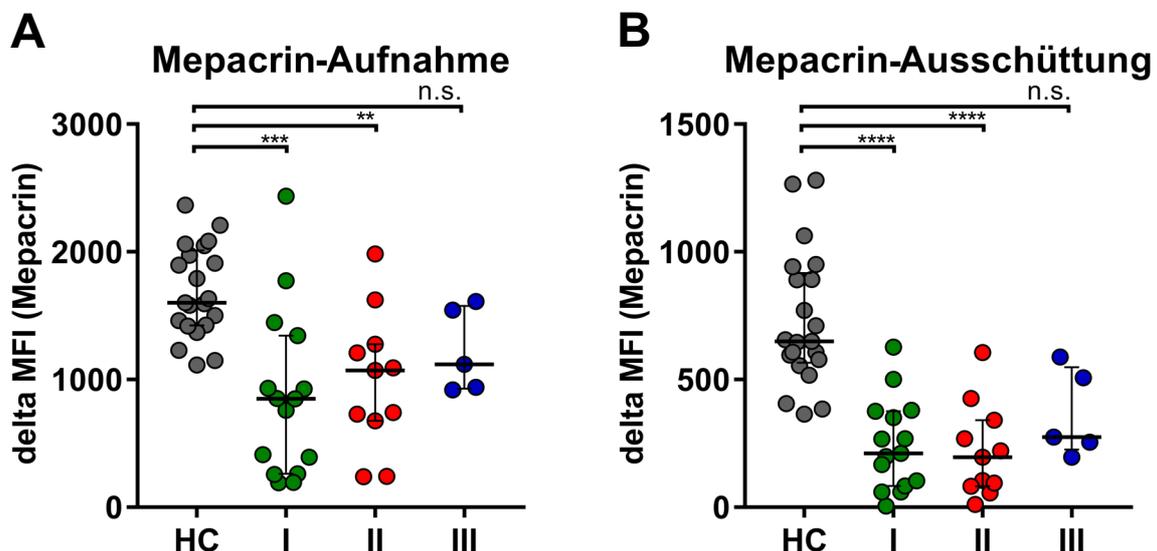


Abbildung 14 Analyse der δ -Granula-Funktion mittels Mepacrin-Assay. Dargestellt sind Messwerte gesunder Kontrollen (HC) sowie von Patienten mit Sepsis (S) zu folgenden Zeitpunkten: I: Tag der Aufnahme auf die Intensivstation, II: Tag 5-7 auf der Intensivstation, III: Entlassungstag von der Intensivstation. **(A)** Mepacrin-Aufnahme **(B)** und -Ausschüttung nach TRAP-6-Stimulation [5 μM] ermittelt durch durchflusszytometrische Analyse. Balken zeigen Median \pm IQR an. Die statistische Analyse wurde mittels Kruskal-Wallis-Test durchgeführt: n.s. nicht-signifikant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

3.3 Molekulare Analyse der (Hem-)ITAM-Rezeptor-Signalkaskaden

3.3.1 Rezeptorexpression und *Shedding*

Als nächstes wurde geprüft, ob die reduzierte (Hem-)ITAM-Rezeptor-Funktion auf eine veränderte Rezeptorexpression zurückzuführen ist. In der Durchflusszytometrie war zwischen Patienten und Kontrollen kein Unterschied in der CLEC-2-Expression feststellbar (Abbildung 15A). Demgegenüber wiesen die Thrombozyten aller Patienten unserer Kohorte zu sämtlichen Zeitpunkten eine signifikant reduzierte GPVI-Expression im Vergleich zur Gesunderkohorte auf (Abbildung 15B). Bisher sind zwei Mechanismen bekannt, wie GPVI von der Oberfläche von Thrombozyten entfernt werden kann: 1. Rezeptorinternalisierung oder 2. ADAM 10/17 vermitteltes *Shedding* [58]. Zum Ausschluss einer gesteigerten Rezeptorinternalisierung, wurde in Thrombozytenlysaten unter Ruhebedingungen und nach Zugabe von CRP-X_L [0,1 µg/ml, 60 min] die GPVI-Expression mittels Immunoblot untersucht. Die Bandenintensität von GPVI war in den Proben der Sepsispatienten im Vergleich mit den Kontrollen reduziert, was gegen Rezeptorinternalisierung spricht. Nach CRP-X_L-Stimulation nahm die Bandenintensität sowohl bei Patienten als auch bei Kontrollen ab, was Rezeptor-*Shedding* als möglichen Mechanismus nahelegt (Abbildungen 15C-D). Deshalb wurde als nächstes die Menge der *gesheddeten* GPVI-Ektodomäne (sGPVI) im PPP von Sepsispatienten mittels ELISA quantifiziert. Zum Zeitpunkt II war der sGPVI-Plasma-Spiegel in Relation zur Kontrollgruppe erhöht (Abbildung 15E). Zu den Zeitpunkten I und III war kein Unterschied im Vergleich zur Kontrollkohorte zu beobachten. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass die reduzierte GPVI-Funktion nicht generell auf gesteigertes Rezeptor-*Shedding* zurückgeht und dass sGPVI kein geeigneter Biomarker zur Sepsis-Früherkennung ist. Da eine intakte GPVI-Signalkaskade Voraussetzung für funktionales Rezeptor-*Shedding* ist, legen diese Daten eher eine Restaktivität der Signalkaskade nahe [90].

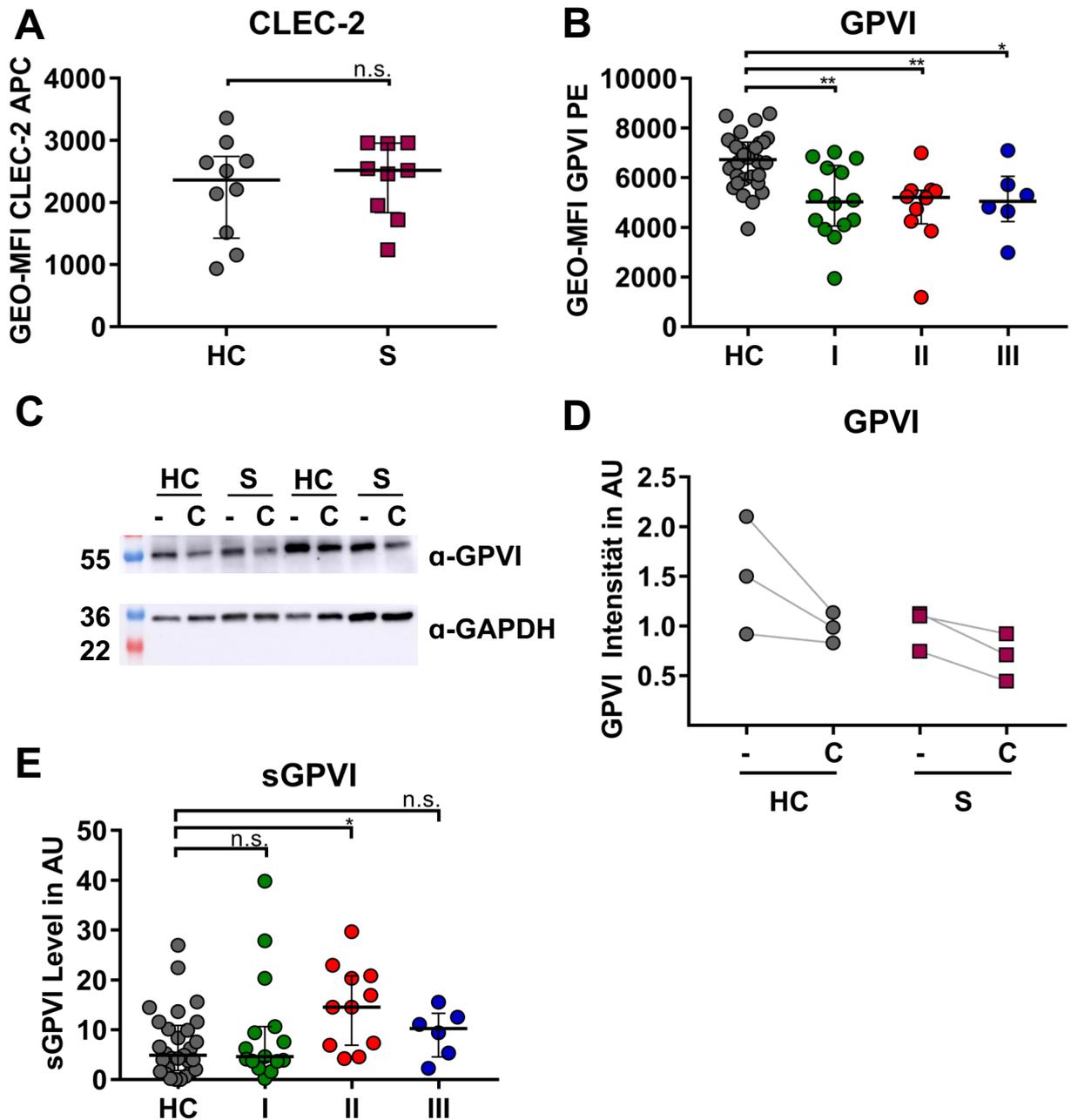
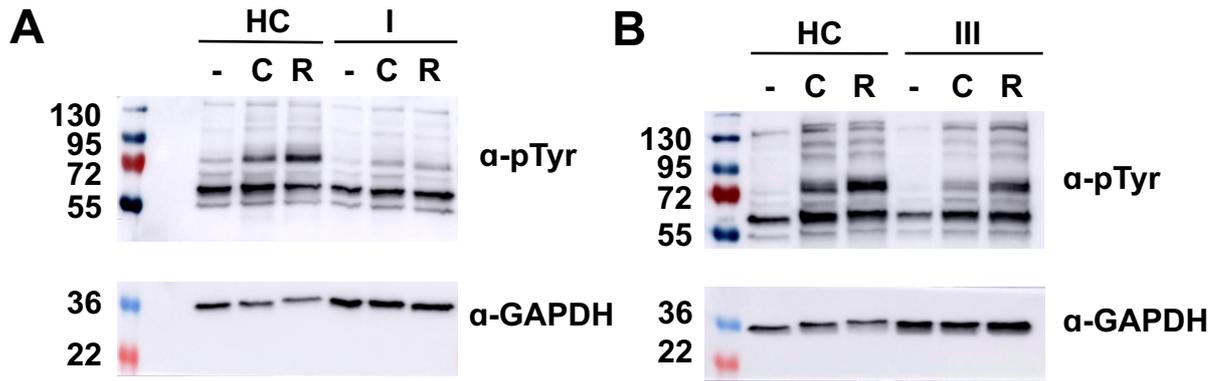


Abbildung 15: Quantifizierung der (Hem-)ITAM-Rezeptorexpression und plasmatischen GPVI-Ektodomäne. Dargestellt sind die Messwerte gesunder Kontrollen (HC) sowie der Patienten mit Sepsis (S) zu folgenden Zeitpunkten: I: Tag der Aufnahme auf die Intensivstation, II: Tag 5-7 auf der Intensivstation, III: Entlassungstag von der Intensivstation. **(A)** CLEC-2- und **(B)** GPVI-Expression auf Thrombozyten. Messung mittels Durchflusszytometrie. **(C, D)** Analyse der GPVI-Expression in Thrombozytenlysaten ohne Agonistenzugabe (-) sowie nach Stimulation mit CRP-X_L [0,1 µg/ml] mittels Immunoblot. Die GPVI-Bandenintensität wurde in Relation zur GAPDH-Bande gesetzt (Angabe in *arbitrary units*, AU). Ein repräsentativer Immunoblot ist in Abbildung C dargestellt. **(E)** Quantifizierung der GPVI-Ektodomäne (sGPVI) in PPP mittels ELISA. Balken zeigen Median ± IQR an. Die statistische Analyse wurde mittels **(A)** Kolmogorov-Smirnov-Test und **(B, E)** Kruskal-Wallis-Test durchgeführt: n.s. nicht-signifikant, *p < 0,05, **p < 0,01.

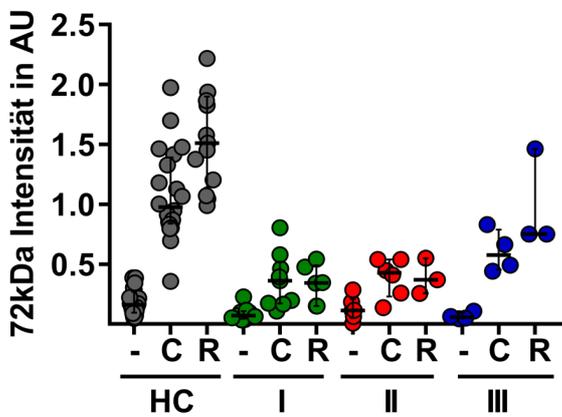
3.3.2 Dysfunktionale (Hem-)ITAM-Signaltransduktion bei Sepsis

Die Funktionsfähigkeit der (Hem-)ITAM-Rezeptor-Signaltransduktion sollte auch auf molekularer Ebene untersucht werden. Deswegen wurde die Phosphorylierung der Tyrosin-Reste von einigen relevanten Signalproteinen mittels Immunoblot (4G10-Antikörper) analysiert. Unter Ruhebedingungen waren zwischen Patienten und Kontrollen keine Veränderungen im Bandenmuster (Anzahl und Intensität der Banden, Molekulargewicht der Proteine) zu beobachten (Abbildungen 16A-C). Nach Stimulation der Thrombozyten mit CRP-X_L [0,1 µg/ml] oder Rhodocytin [10 nM] waren bei Probanden unter Verwendung des 4G10-Antikörpers multiple zusätzliche Banden detektierbar, während diese induzierbaren Banden bei Patienten nicht beobachtet werden konnten (Abbildungen 16A-C). Dies wird im Besonderen bei Analyse der Bande bei ca. 72 kDa deutlich, welche die Phosphorylierung des Proteins Syk widerspiegelt. Mittels Epitop-spezifischer Antikörper (Phospho-Syk Y525/526) konnte dieser Befund bestätigt werden. Auch die Phosphorylierung des Signalproteins LAT (Phospho-LAT Y191) blieb bei den Patienten nach Stimulation mit CRP-X_L aus (Abbildungen 16D-F). Diese Beobachtung lässt auf einen generellen Defekt in der Signalkaskade schließen, welcher proximal von Syk liegt (Kapitel 1.2.2, Abbildung 3). Der Signaldefekt ist somit entweder direkt auf Höhe des Rezeptors oder auf Höhe der Fc_γ-Domäne präsent. Da auch eine reduzierte Expression der Signaltransduktionsproteine für den Defekt ursächlich sein könnte, wurde die Expression von Syk in Thrombozyten bei Sepsis mittels Immunoblot überprüft. Syk war in den Thrombozyten von Patienten im gleichen Maß nachweisbar wie in Kontrollen, was eine reduzierte Syk-Expression als Ursache des Signaldefekts ausschließt (Abbildung 16G).

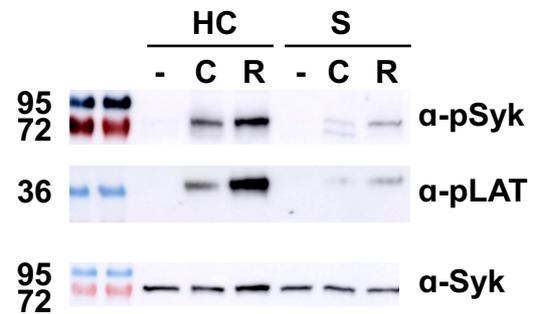
Abbildung 16: Molekulare Analyse der (Hem-)ITAM-Rezeptor-Signaltransduktion. Immunoblot-Analysen gesunder Kontrollen (HC) und von Patienten mit Sepsis (S) zu folgenden Zeitpunkten: I: Tag der Aufnahme auf die Intensivstation, II: Tag 5-7 auf der Intensivstation, III: Entlassungstag von der Intensivstation. Durchführung der Lyse nach 5 Minuten bei CRP-X_L-Stimulation [0,1 µg/ml] und nach 10 Minuten bei Rhodocytin-Stimulation [10nM]. **(A-C)** Färbung mit Anti-Phospho-Tyrosin-Antikörper 4G10. Die 72 kDa Phospho-Tyrosin-Bande wurde in Relation zu GAPDH oder Syk gesetzt (Angabe in *arbitrary units*, AU). **(D-F)** Phosphorylierung von Syk und LAT wurde mittels Immunoblot untersucht und jeweils in Relation zur Basalexpression von Syk bzw. LAT gesetzt. Repräsentative Immunoblots in Abbildung **A**, **B** und **D**. **(G)** Darstellung der Syk-Expression. Balken zeigen Median ± IQR an.



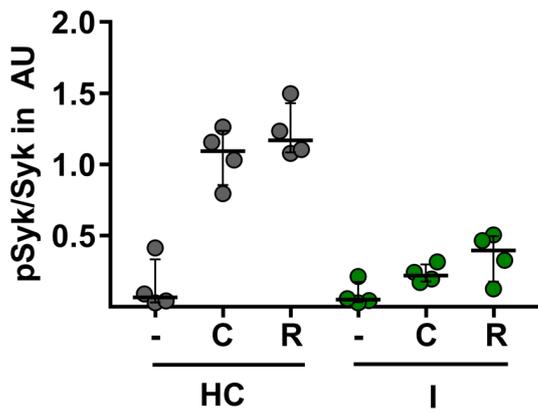
C Tyrosin-Phosphorylierung



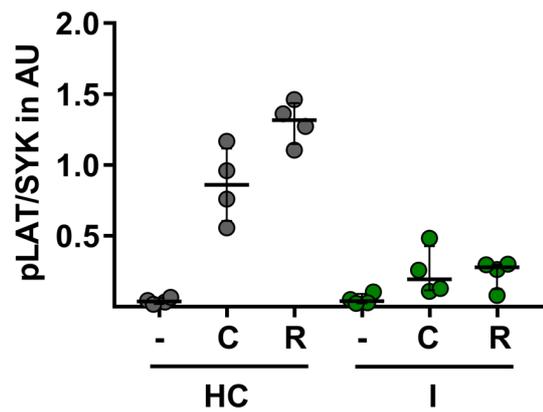
D



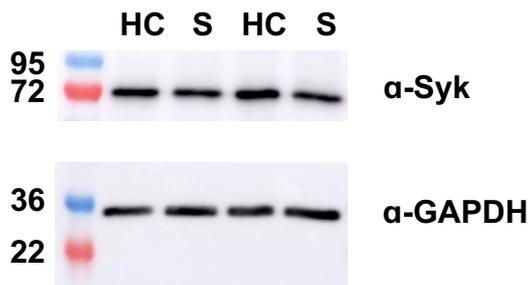
E Phospho-Syk



F Phospho-LAT



G



3.3.3 Thrombozyten haben bei Sepsis einen ITIM-Rezeptor-Defekt

Die ITIM-Rezeptor-Familie ist ein wichtiger negativer Regulator der ITAM-Rezeptoren, indem sie durch die Phosphatasen SHP-1 und SHP-2 die Dephosphorylierung der Src-Familien-Kinasen (Fyn/Lyn/Src) induzieren. Da eine gesteigerte Aktivität der ITIM-Rezeptoren den (Hem-)ITAM-Rezeptor-Defekt bei Sepsis vermitteln könnte, wurde die Phosphorylierung der Signalproteine SHP-1 und SHP-2 mittels Immunoblot analysiert. Unter Ruhebedingungen konnte kein Unterschied in Expression und Phosphorylierung von SHP-1 und SHP-2 zwischen Patienten und Kontrollen festgestellt werden (Abbildungen 17A-D). Nach Stimulation mit CRP-X_L [0,1 µg/ml] und Rhodocytin [10 nM] war eine Phosphorylierung von SHP-1 und SHP-2 detektierbar, welche bei Thrombozyten von Patienten mit Sepsis ausblieb (Abbildungen 17A-D). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine verstärkte ITIM-Rezeptor-Aktivität unter ruhenden Bedingungen nicht ursächlich für die Hyporeaktivität der Thrombozyten bei Sepsis ist. Das zusätzliche Ausbleiben der Phosphorylierung nach GPVI/CLEC-2-Stimulation weist auf einen nicht funktionierenden Rückkopplungsmechanismus hin und damit auf einen Defekt *upstream* in der (Hem-)ITAM-Rezeptor-Signalkaskade.

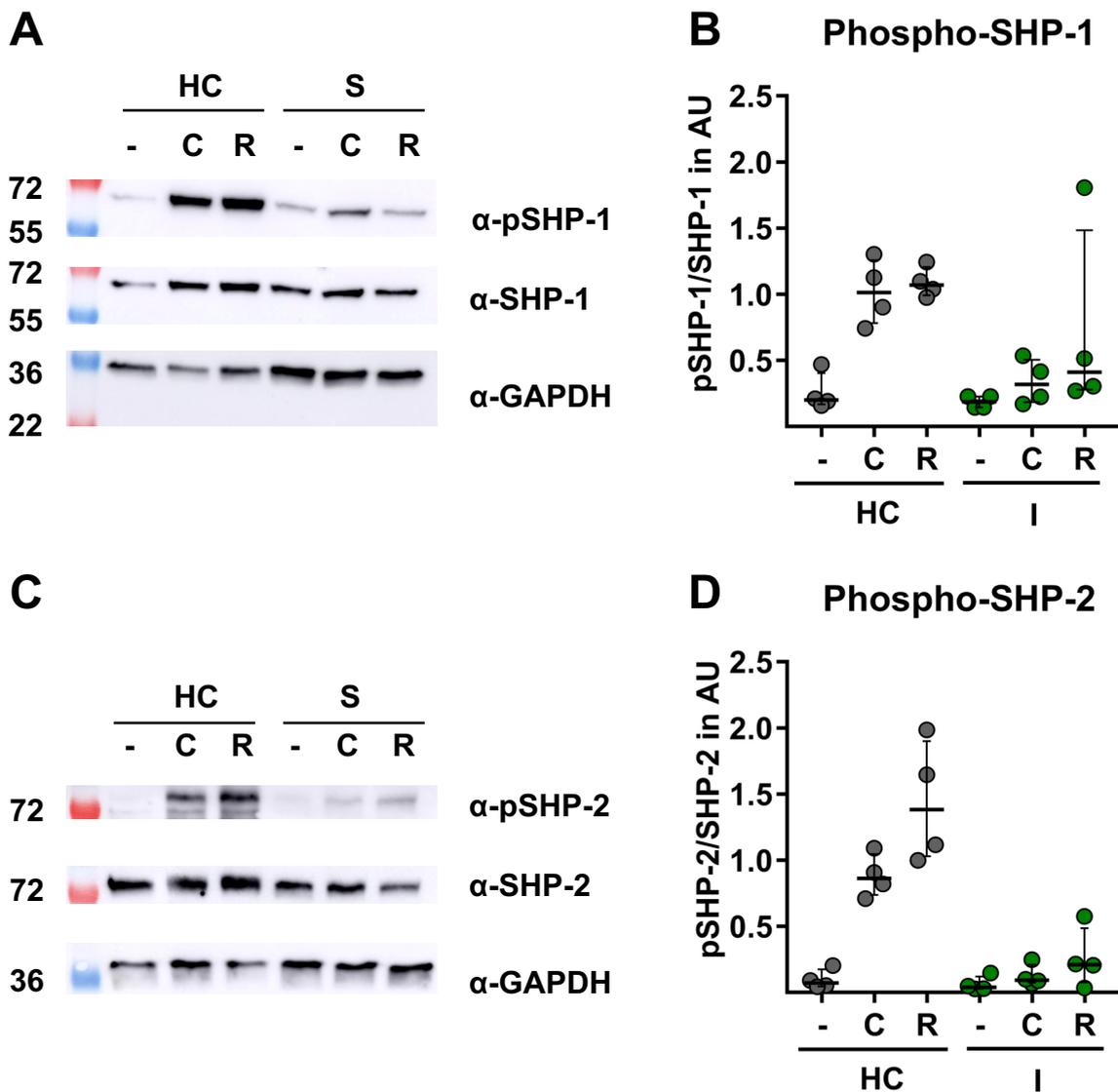


Abbildung 17: Molekulare Analyse der ITIM-Rezeptor-Signalkaskade. (A-D) Untersuchung der SHP-1 und SHP-2-Phosphorylierung in Thrombozyten-Lysaten gesunder Kontrollen und bei Sepsis zum Zeitpunkt I ohne Agonistenzugabe (-) sowie nach Stimulation mit CRP-X_L (C) [0,1 µg/ml] oder Rhodocytin (R) [10 nM]. Die Lyse wurde bei CRP-X_L-Stimulation nach 5 Minuten und bei Rhodocytin-Stimulation nach 10 Minuten durchgeführt. (B, D) Die Intensität der pSHP-1- bzw. pSHP-2-Bande wurde in Relation zur GAPDH-Bande gesetzt (Angabe in *arbitrary units*, AU). Darstellung repräsentativer Western Blots in Abbildung A und C. Balken zeigen Median ± IQR an.

3.3.4 CRP-X_L-Dosiseskulation normalisiert die Thrombozytenaktivierung

Da die GPVI-Rezeptordichte auf der Thrombozytenoberfläche reduziert war, wurde als nächstes geprüft, ob es durch eine gesteigerte Dosis des Agonisten möglich ist, die Rezeptoraktivität durch *Clustering* wieder herzustellen. Die Thrombozyten wurden deshalb mit der zehnfachen Dosis CRP-X_L [1 µg/ml] stimuliert. Die Thrombozyten der Sepsispatienten reagierten auf eine Dosiseskulation mit einer relativen Steigerung der maximalen Aggregation gegenüber der normalen Dosis CRP-X_L [0,1 µg/ml]. Dennoch erreichte die maximale Aggregation nicht das Niveau der Kontrollen (Abbildungen 18A-B). Auf molekularer Ebene nahm die Tyrosin-Phosphorylierung in Thrombozyten von Patienten mit Sepsis nach Dosiseskulation im Vergleich zur Normaldosis zu, aber in geringerem Ausmaß als bei den Probanden (Abbildungen 18C-D). Diese Ergebnisse zeigen, dass die GPVI-Signalkaskade bei Sepsis grundsätzlich funktional ist. Da eine Dosissteigerung oder die Verwendung von GPVI-*clusternden* Agonisten wie Convulxin (Kapitel 3.2.1, Abbildungen 11-12) zu einer Normalisierung der Thrombozytenfunktion führte, wäre eine Ausdünnung von GPVI auf der Thrombozytenoberfläche zumindest eine in Betracht zu ziehende Erklärung des beobachteten Funktionsdefekts.

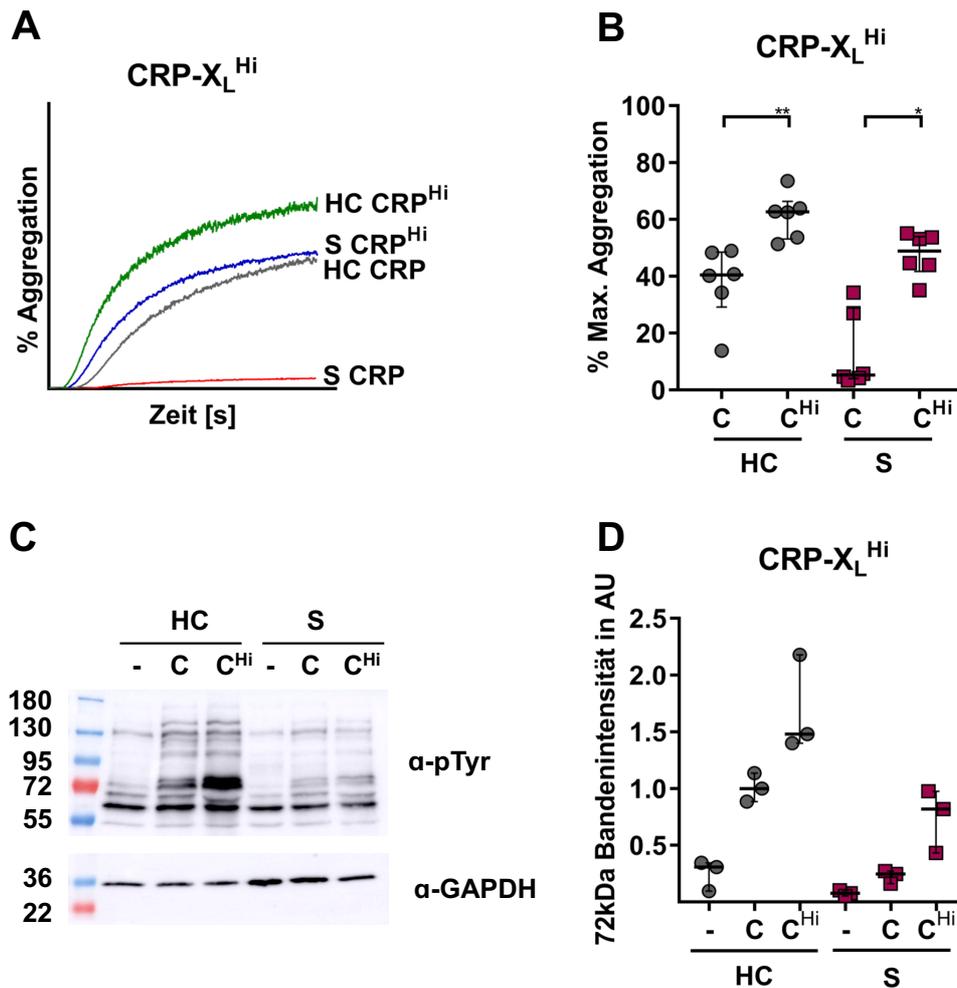


Abbildung 18: Stimulation von Thrombozyten mit erhöhter Dosis CRP-X_L. (A-B) Stimulation gewaschener Thrombozyten [500 /nl] von gesunden Spendern (HC) und Patienten (S) mit CRP-X_L Normaldosis [0,1 µg/ml] oder erhöhter CRP-X_L Dosis (CRP^{Hi}) [1 µg/ml] im Aggregometer. Dauer der Messung: 5 Minuten. Eine repräsentative Reaktionskurve ist in Abbildung A dargestellt. (C-D) Immunoblot-Analyse von Thrombozytenlysaten. Analyse der Tyrosin-Phosphorylierung mittels 4G10-Antikörper. Die Intensität der 72 kDa Phospho-Tyrosin-Bande wurde in Relation zu GAPDH oder Syk gesetzt (Angabe in *arbitrary units*, AU). Ein repräsentativer Westen Blot ist in Abbildung C dargestellt. Die statistische Analyse wurde mittels Kolomogorov-Smirnov-Test durchgeführt. *p < 0,05, **p < 0,01.

3.3.5 Thrombozyten von Patienten mit Sepsis sind nicht apoptotisch

Gesteigerte Apoptose der Thrombozyten wurde bei Sepsis beschrieben [91]. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die beobachtete Hyporeaktivität. Deshalb wurde das anti-apoptotische Protein BCL-X_L mittels Immunoblot in Thrombozytenlysaten in einem Teil unserer Patientenkohorte quantifiziert. Im Vergleich zu den Kontrollen konnte kein Unterschied in der Expression von BCL-X_L detektiert werden (Abbildungen 19A-B). Diese Ergebnisse legen nahe, dass im analysierten Sepsis-Kollektiv zumindest dieser Apoptoseweg der Thrombozyten in keiner gesteigerten Form abläuft und deshalb auch wahrscheinlich nicht ursächlich für die Hyporeaktivität der Thrombozyten ist.

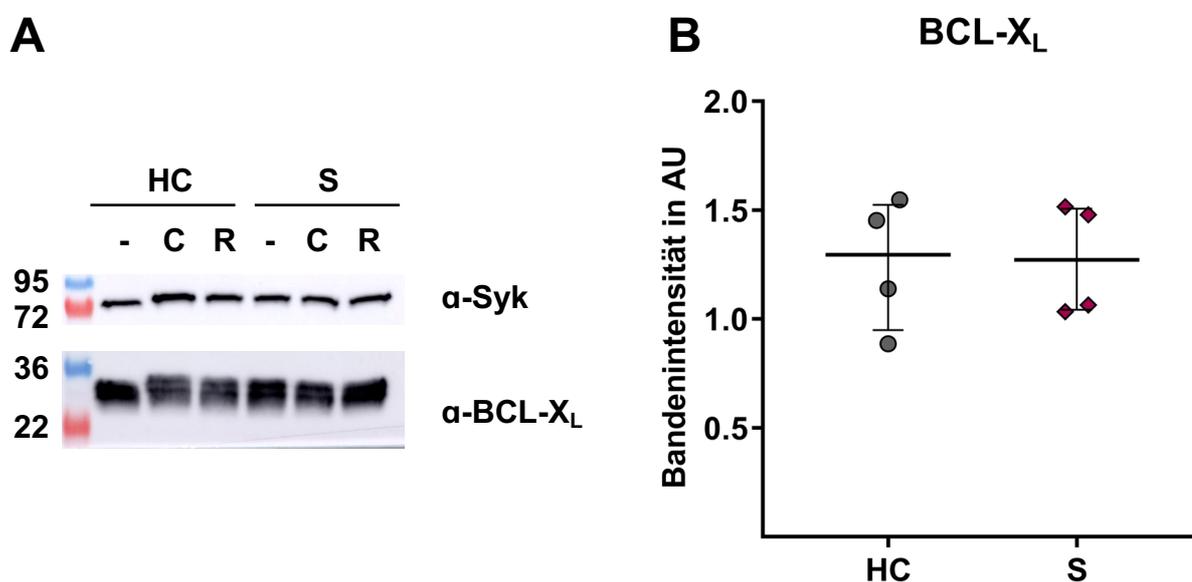


Abbildung 19: Untersuchung der BCL-X_L-Expression. (A, B) Thrombozyten-Lysate gesunder Kontrollen (HC) und von Patienten mit Sepsis (S) zum Zeitpunkt I ohne Agonistenzugabe (-), nach Stimulation mit CRP-X_L (C) [0,1 µg/ml] oder Rhodocytin (R) [10 nM] wurden mittels Immunoblot analysiert. Die Lyse wurde bei CRP-X_L-Stimulation nach 5 Minuten, bei Rhodocytin-Stimulation nach 10 Minuten durchgeführt. Repräsentativer Westen Blot in Teilabbildung A. (B) Die Intensität der BCL-X_L-Bande der unstimulierten Thrombozyten wurde in Relation zu Syk oder GAPDH gesetzt (Angabe in *arbitrary units*, AU). Balken zeigen Median ± IQR an.

3.4 Kreuzinkubationsexperimente mit PPP und Vollblut

In unseren bisherigen Experimenten wurden die Thrombozyten im Vollblut und autologen Plasma untersucht. Wo und wann die Thrombozyten den beobachteten Funktionsdefekt erwerben, bleibt unklar. Deshalb wurden in den folgenden Versuchsreihen *ex vivo*-Kreuzinkubationen durchgeführt. In diesen wurde untersucht, ob die bei Sepsispatienten nachgewiesene Hyporeaktivität durch Inkubation von Thrombozyten in Sepsis-PPP oder Vollblut induzierbar ist.

3.4.1 Einfluss von ABH-Inkompatibilität auf die Thrombozytenfunktion

Für die Inkubationsexperimente war es erforderlich, Thrombozyten in ABH-inkompatiblem Vollblut/Plasma zu inkubieren, da die mögliche Kontrollkohorte zu klein war, um tagesaktuell einen ABH-kompatiblen Spender zu rekrutieren. Deswegen sollte zunächst überprüft werden, ob eine ABH-Inkompatibilität die Thrombozytenfunktion beeinflusst. Thrombozyten unterschiedlicher Gesundspender wurden jeweils in ABH-kompatiblen bzw. ABH-inkompatiblem Plasma inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben im Aggregometer mittels CRP-X_L oder TRAP-6 stimuliert. Dabei konnte kein Einfluss der Blutgruppe auf die Thrombozytenfunktion detektiert werden (Abbildung 20), so dass in den folgenden Experimenten auf ein *ABH-Matching* verzichtet werden konnte.

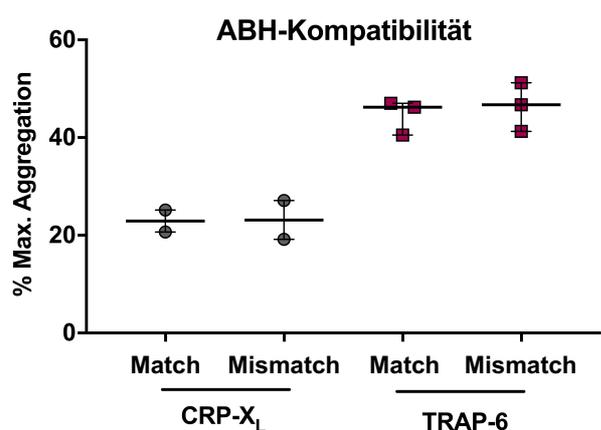


Abbildung 20: Analyse des Einflusses von ABH-Inkompatibilität auf die Thrombozytenfunktion. Gewaschene Thrombozyten wurden in ABH-kompatiblen (*Match*) und ABH-inkompatiblem (*Mismatch*) PPP für 60 Minuten inkubiert. Die Analyse der Thrombozytenfunktion erfolgte mittels Aggregometrie nach Stimulation mit CRP-X_L [0,1 µg/ml] oder TRAP-6 [10 µM].

3.4.2 Keine Änderung der GPVI-Reaktivität nach Inkubation in Sepsis-Plasma

Im Rahmen einer Sepsis kommt es im Blutplasma zu multiplen Veränderungen im Proteom (Expression und Abundanz). Beispielsweise finden sich vermehrt Fibrin-Spaltprodukte, welche die GPVI-Funktion beeinträchtigen können [54, 92]. Deshalb sollte der Einfluss von Sepsis-Plasma auf Thrombozyten gesunder Probanden durch Inkubation untersucht werden. Als Kontrolle wurde Plasma der korrespondierenden Gesundspenders verwendet. Nach 60 Minuten Inkubation erfolgte die durchflusszytometrische Analyse. Unter Ruhebedingungen war keine vermehrte Expression von Aktivierungsmarkern zu beobachten. Nach Zugabe von CRP-X_L [0,01 µg/ml] oder TRAP-6 [5 µM] waren CD62P-Exposition und Integrin αIIbβ3-Aktivierung in beiden Gruppen gleich stark ausgeprägt (Abbildungen 21A-B).

Aus logistischen Gründen wurde mit kryokonserviertem Sepsis-Plasma gearbeitet. Es sollte ausgeschlossen werden, dass das Ergebnis artifiziell durch den Einfrier-Auftau-Zyklus beeinflusst wird. Deshalb wurde der Assay bei einigen Patienten zusätzlich mit frischem (nicht kryokonserviertem) Plasma durchgeführt. Es konnte dabei weder in der Aggregometrie noch in der Durchflusszytometrie ein Einfluss von kryokonserviertem oder frischem Plasma auf die Thrombozytenfunktion beobachtet werden (Abbildungen 21C-D). Plasmatische Faktoren sind folglich wahrscheinlich nicht die alleinige Ursache der Thrombozyten-Hyporeaktivität bei Sepsis.

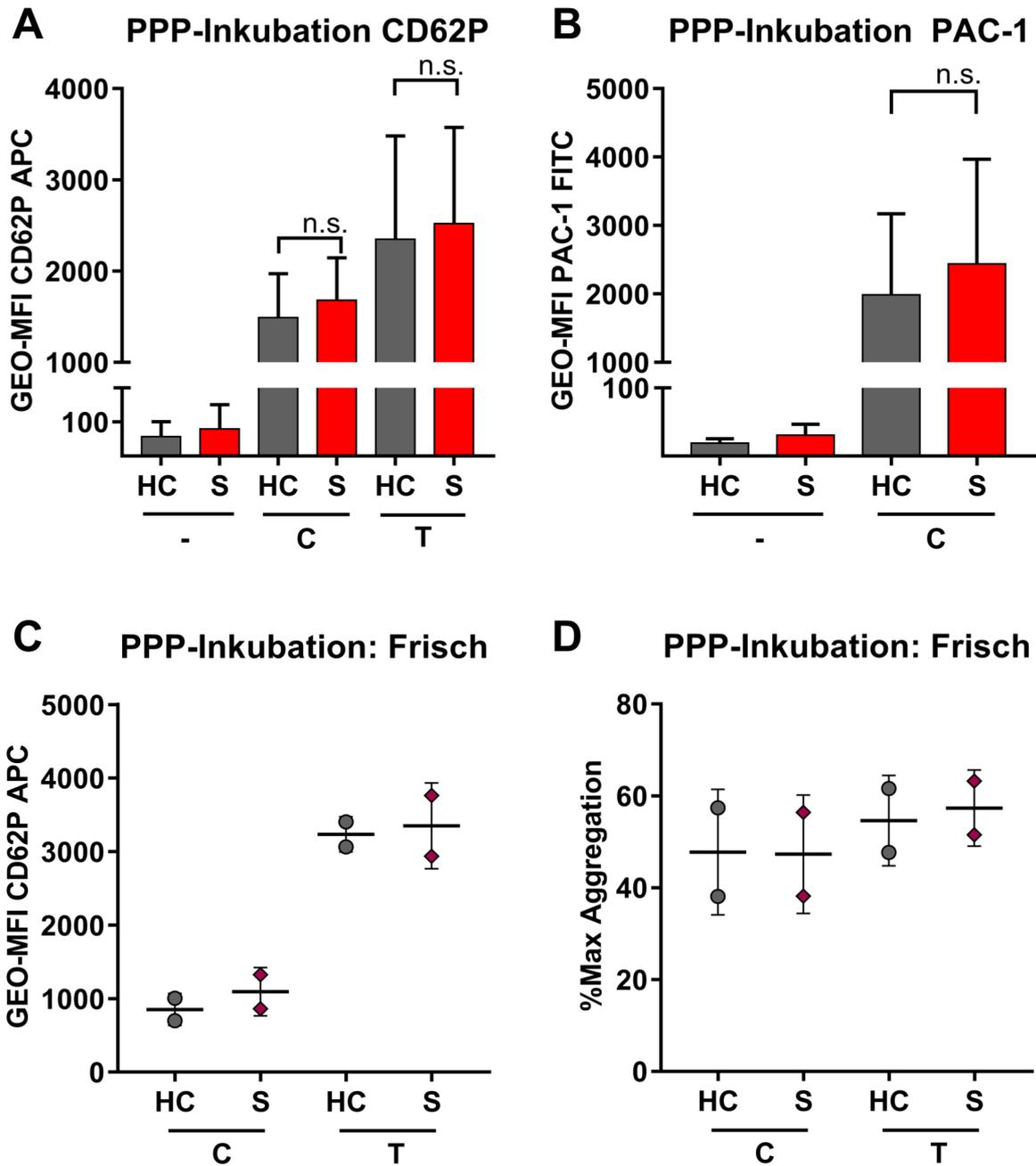


Abbildung 21: Untersuchung des Einflusses von Sepsis-Plasma auf die Thrombozytenfunktion. Die CD62P-Oberflächenexpression ist auf Thrombozyten ohne Agonistenzugabe (-) sowie nach Stimulation mit CRP-X_L [0,01 µg/ml] (C) oder TRAP-6 [5 µM] (T) dargestellt. (A, B) Gewaschene Thrombozyten wurden in kryokonserviertem PPP von Patienten mit Sepsis (S) bzw. der korrespondierenden Kontrolle für 60 Minuten inkubiert (n=8). (C, D) Gewaschene Thrombozyten wurden in frisch gewonnenem PPP von Patienten mit Sepsis (S) bzw. der korrespondierenden Kontrolle für 60 Minuten inkubiert. Die Analyse der Thrombozytenfunktion erfolgte mittels (C) Durchflusszytometrie und (D) Aggregometrie (n=2). (A-D) In den Graphen ist der Mittelwert ± SD dargestellt. Die statistische Analyse wurde mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test durchgeführt: n.s. nicht-signifikant.

3.4.3 Inkubation in Sepsis-Vollblut induziert Thrombozytenhyporeaktivität

Neben löslichen plasmatischen Faktoren, kommen auch zelluläre Faktoren als mögliche Ursache der Hyporeaktivität in Betracht. Deshalb wurden gewaschene Thrombozyten gesunder Kontrollen in Vollblut von Patienten mit Sepsis sowie in Vollblut der korrespondierenden tagesaktuellen Kontrolle inkubiert und stimuliert. Die Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Um zwischen den Thrombozyten des Empfängers und denen des Vollblut-Spenders unterscheiden zu können, wurden die Spender-Thrombozyten zusätzlich mit einer subsättigenden Konzentration eines CD42b-PE-Cy5-Antikörper markiert. Nach Inkubation im Vollblut von Sepsispatienten war ohne Zugabe eines Agonisten keine erhöhte Expression von CD62P oder des aktivierten Integrins $\alpha\text{IIb}\beta_3$ auf Thrombozyten zu beobachten (Abbildungen 22A-B). Nach Stimulation mit CRP-X_L [0,01 $\mu\text{g}/\text{ml}$] oder TRAP-6 [5 μM] zeigten die im Sepsis-Vollblut inkubierten Thrombozyten eine signifikant reduzierte Aktivierung des Integrins $\alpha\text{IIb}\beta_3$. Darüber hinaus ist die CD62P-Expression nach TRAP-6-Stimulation signifikant geringer ausgeprägt (Abbildungen 22A-B). Durch Inkubation in Vollblut von Patienten mit Sepsis kann folglich eine Hyporeaktivität induziert werden, was einen zellulären Faktor als (Co-)Mediator des Defekts nahelegt.

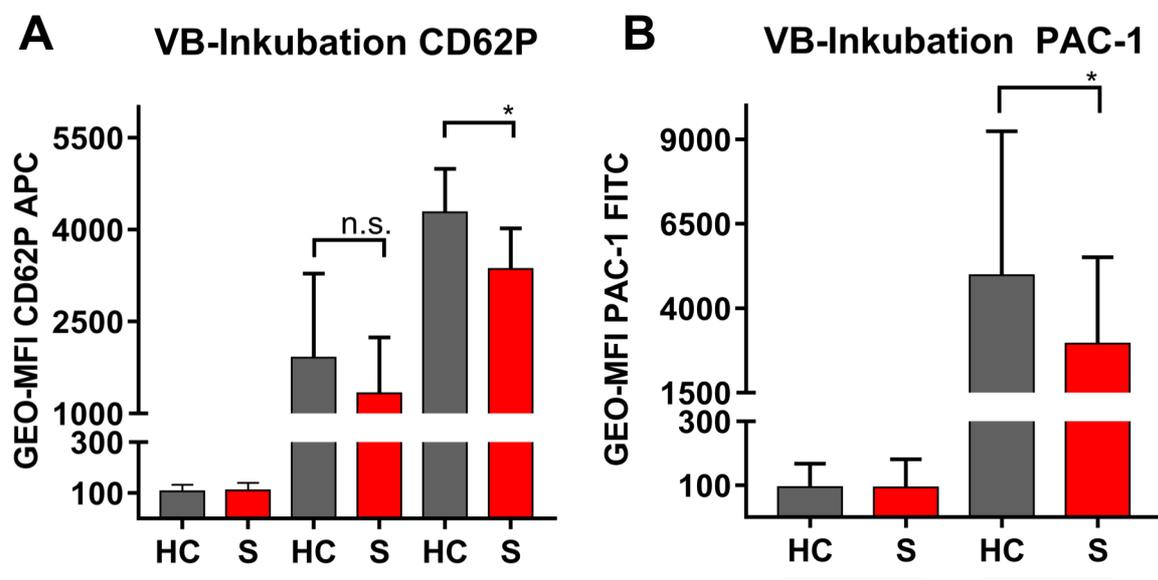


Abbildung 22: Vollblut-Kreuzinkubation. Die CD62P-Oberflächenexpression ist auf Thrombozyten ohne Agonistenzugabe (-) sowie nach Stimulation mit CRP-X_L [0,01 $\mu\text{g}/\text{ml}$] (C) oder TRAP-6 (T) [5 μM] dargestellt. (A, B) Gewaschene CD42b-PE-Cy5 gefärbte Thrombozyten wurden in Vollblut von Patienten mit Sepsis (S) und der jeweiligen korrespondierenden Kontrolle resuspendiert (HC) und für 15 Minuten inkubiert. (n=7). In den Graphen ist der Mittelwert \pm SD dargestellt. Die statistische Analyse wurde mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test durchgeführt: n.s. nicht-signifikant, *p < 0,05.

3.4.4 Erhöhte Anzahl von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten bei Sepsis

Thrombozyten interagieren unter entzündlichen Bedingungen verstärkt mit Leukozyten. Deshalb wurden Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate (CD41a+/CD45+ Ereignisse) im Vollblut quantifiziert. In der Patientenkohorte fand sich zu allen Zeitpunkten eine erhöhte Anzahl CD41a+/CD45+ *Events* (Abbildung 23A). Es wurde gezeigt, dass die Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten über CLEC-2 und auf Leukozyten exprimiertes Podoplanin vermittelt werden kann [64, 79]. Eine vermehrte Expression von Podoplanin auf CD11b+/CD45+ myeloiden Zellen konnte in unserer Kohorte von Sepsispatienten mittels durchflusszytometrischer Analyse nicht detektiert werden (Abbildung 23B). Diese Ergebnisse legen eine hohe Interaktion zwischen Thrombozyten und Leukozyten nahe, welche wahrscheinlich aber nicht über die CLEC-2/Podoplanin-Achse vermittelt wird.

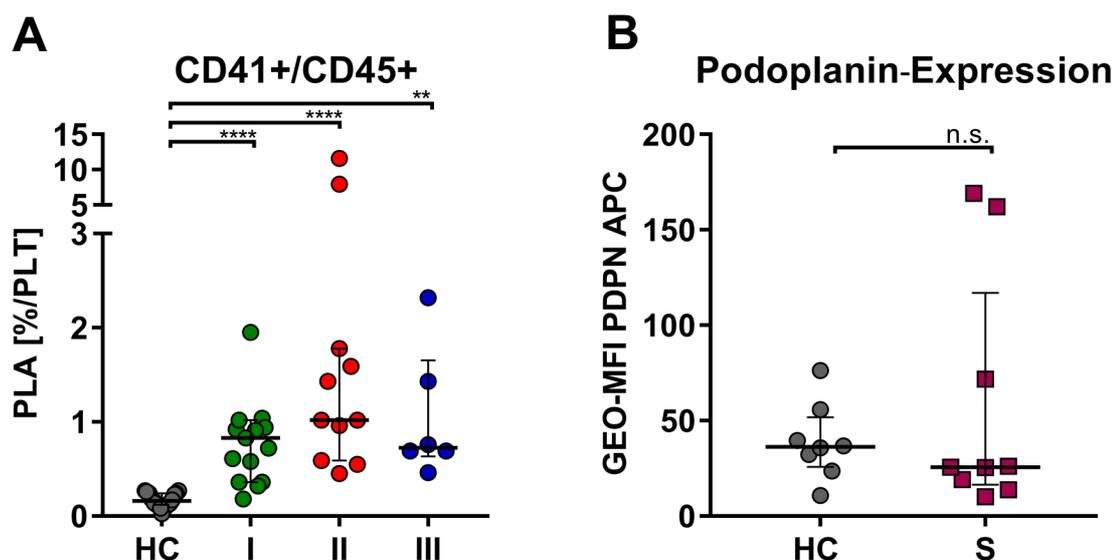


Abbildung 23: Untersuchung der Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion. (A) Fraktion der Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate (CD41+/CD45+) angegeben in Prozent der gesamten Thrombozyten. (B) Die Podoplanin-Expression auf CD11b+/CD45+ Zellen wurde im Vollblut von Patienten mit Sepsis (S) und Kontrollen (HC) mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Die Graphen zeigen den Median \pm IQR. Die statistische Analyse wurde mit den folgenden Tests durchgeführt: (A) Kruskal-Wallis-Test (B) Kolmogorov-Smirnov-Test: n.s. nicht-signifikant, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001.

3.4.5 Thrombozyten-Bakterien-Co-Inkubation

Über verschiedene Oberflächenrezeptoren - wie den Fc γ R1a Immunrezeptor oder den TLR4-Rezeptor - können Thrombozyten direkt mit bakteriellen Antigenen interagieren [93]. Auch Exotoxine, wie das *Staphylococcus aureus* α -Toxin, können zur Aggregation von Thrombozyten führen [94]. Eine bakteriell-induzierte Thrombozyten-Agglutination in der Peripherie mit einer konsekutiven Negativselektion dysfunktionaler Thrombozyten könnte das Vorhandensein hyporeaktiver Thrombozyten in unserer Patientenkohorte erklären. In 14 von 15 Studienpatienten war es gelungen, mindestens einen potenziell pathogenen Keim nachzuweisen. Ein Bakteriennachweis war spezifisch in der Blutkultur bei 6 von 15 Patienten erfolgreich (Kapitel 3.1.1, Tabelle 9). Zur näheren Untersuchung der Interaktion zwischen Bakterien und Thrombozyten, wurden die aus Patienten-Blutkulturen isolierten Pathogene weiter charakterisiert (Tabelle 11) und dann für Co-Inkubationsexperimente verwendet. Als Positivkontrolle diente ein Bakterienstamm *Porphyromonas gingivalis*, welcher Thrombozytenaggregation induziert [95] und unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung stand.

Tabelle 11: Charakterisierung der Sepsis-Pathogene.

Spezies	Gram-Färbung	Morphologie	Funktionelle Eigenschaften
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	Stäbchen	Indol negativ Oxidase negativ
<i>Escherichia coli</i>	-	Stäbchen	Indol positiv Oxidase negativ
<i>Staphylokokkus haemolyticus</i>	+	Kokken	Katalase positiv Latex-Agglutination positiv
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	Kokken	Katalase negativ Pyrase positiv
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	-	Stäbchen	/

3.4.6 Fixation mit 4% Paraformaldehyd hat keinen Einfluss auf die Thrombozytenfunktionsanalyse

Die Arbeit mit den humanpathogenen Keimen erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie in den dortigen Laborräumen. Um die Proben unter den standardisierten Bedingungen am Durchflusszytometer untersuchen zu können, mussten die Keime im Blut vollständig inaktiviert werden. Dies erfolgte durch Zugabe von 4% Paraformaldehyd. Da Effekte der Fixation von Thrombozyten auf die Aktivierungsmarker beschrieben worden sind [96], sollte zunächst ein Stimulations- und Messprotokoll nach PFA-Zugabe etabliert werden, um eine mögliche Verfälschung der Messung durch die Fixation auszuschließen.

Eine Aktivierung der Thrombozyten unter Ruhebedingungen war auch nach PFA-Zugabe nicht zu beobachten (Abbildungen 24A-B). Nach Stimulation mit CRP-X_L [0,01 µg/ml] oder TRAP-6 [5 µM] wurde hingegen sowohl eine Zunahme der CD62P-Oberflächenexpression als auch der Integrin αIIbβ3-Aktivierung beobachtet (Abbildungen 24A-B). Da die Zugabe von PFA keine Auswirkungen auf unsere Messung hatte, konnte die zuvor etablierte Fixation in den folgenden Experimenten verwendet werden.

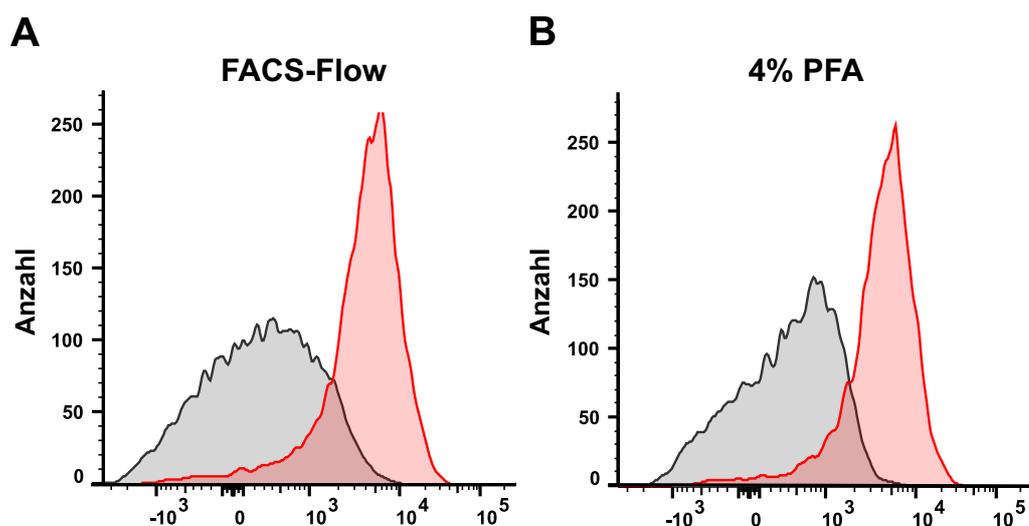


Abbildung 24: Fixation der Proben mittels 4% Paraformaldehyd. (A-B) CD62P-Expression auf Thrombozyten wurde in Vollblut ohne Agonistenzugabe (grau) sowie nach Stimulation mit CRP-X_L [0,01 µg/ml] (rot) mittels Durchflusszytometrie gemessen. **(A)** Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von FACS-Flow-Puffer **(B)** Abstoppen durch Zugabe von 4 % PFA.

3.5 Vollblut-Bakterien-Co-Inkubation induziert keine Hyporeaktivität

Der direkte Einfluss von Sepsis-Pathogenen auf Thrombozyten wurde in Co-Inkubationsexperimenten mit vitalen Bakterien und Vollblut von drei gesunden Probanden untersucht. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Expression von Aktivierungsmarkern unter Ruhebedingungen sowie jeweils nach Zugabe von CRP-X_L [0,01 µg/ml] gemessen. *Porphyromonas gingivalis* und *Enterococcus faecalis* induzierten in einer Konzentration von 0,1 CFU/ml die Aktivierung von Thrombozyten (Abbildungen 25A-D). Nach Co-Inkubation mit *Escherichia coli* und *Klebsiella pneumoniae* war keine erhöhte CD62P-Expression zu beobachten. Unabhängig vom verwendeten Bakterienstamm führte die Zugabe von CRP-X_L [0,01 µg/ml] zur Aktivierung (Abbildungen 25A-D). Zusammenfassend legen diese Daten nahe, dass der beobachtete Thrombozytenfunktionsdefekt bei Patienten mit Sepsis nicht (allein) durch eine direkte Interaktion mit den hier verwendeten Bakterien-Stämme verursacht wird.

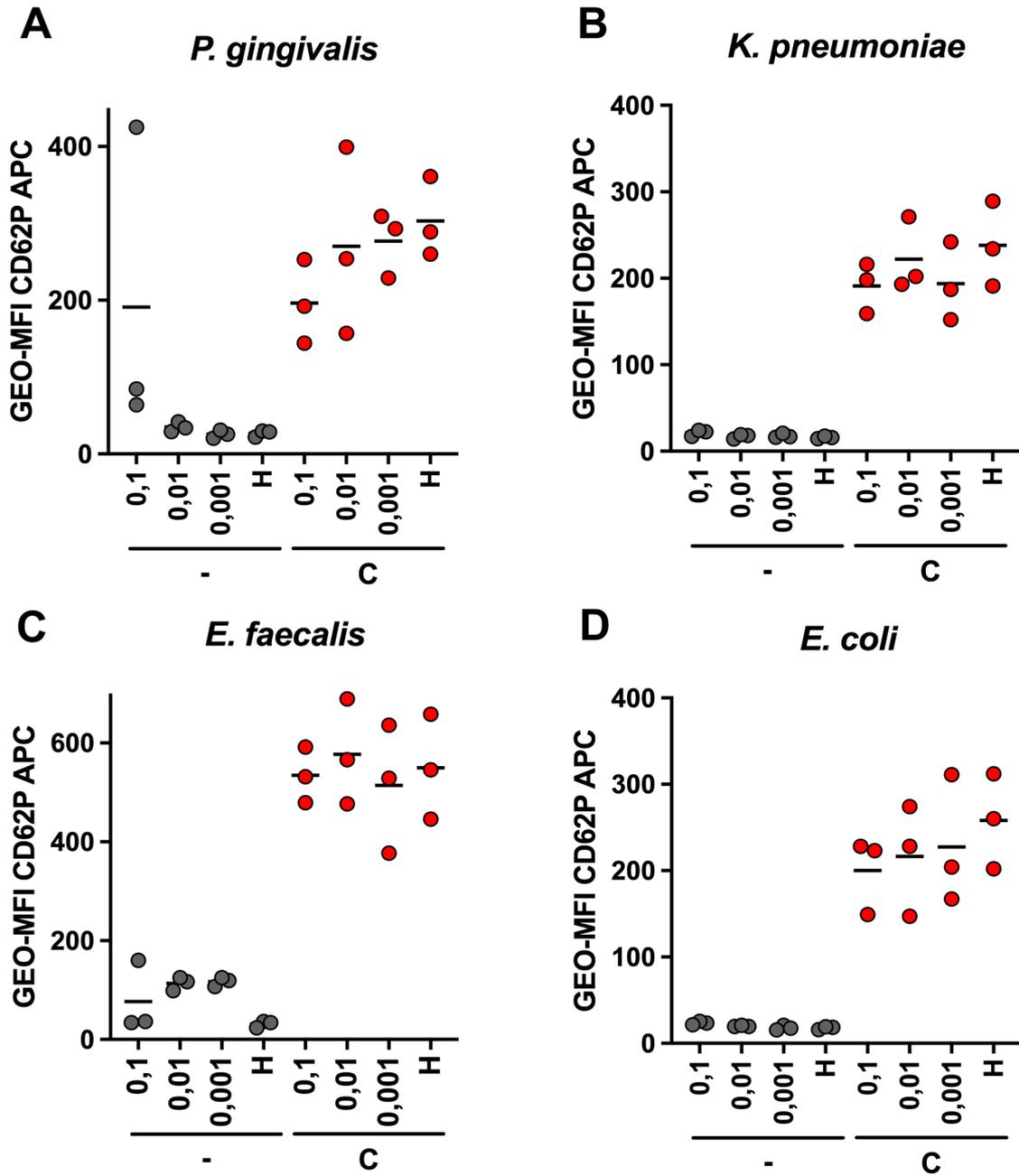


Abbildung 25: Vollblut-Bakterien-Co-Inkubation. Die CD62P-Oberflächenexpression ist auf Thrombozyten ohne Agonistenzugabe (-) sowie nach Stimulation mit CRP-X_L (C) [0,01 µg/ml] dargestellt. (A-D) Vollblut von gesunden Blutspendern wurde mit Hapes-Tyrodes-Puffer (H) oder Bakterien-Isolaten in verschiedener Konzentration versetzt (Optische Dichte: 1; 0,1; 0,01). Nach 15-minütiger Inkubation wurde die CD62P-Expression unter Ruhebedingungen gemessen. Nach 60 Minuten Inkubation erfolgte die Stimulation mit CRP-X_L. Die Balken zeigen den Mittelwert.

3.6 Untersuchung möglicher Störfaktoren

3.6.1 Erhöhtes Lebensalter ist nicht ursächlich für Thrombozyten-Hyporeaktivität bei Sepsis

Mit 70 Jahren (*Range* 19-84) war das mediane Alter der Patienten unserer Kohorte signifikant höher als das der Probanden in der Kontrollkohorte mit 32 Jahren (*Range* 22-61). Zum Ausschluss einer altersbedingten Ursache der Thrombozytenhyporeaktivität, wurden auch ältere (mittleres Alter: 67 Jahre), Kontrollspender für unsere Studie rekrutiert. Im Rahmen einer Routineuntersuchung wurde diesen Blut abgenommen und mit Proben jüngerer Spender (mittleres Alter: 23,5 Jahre) nach Stimulation verglichen. In der Durchflusszytometrie konnte kein Unterschied in der CD62P-Expression nach Stimulation mit TRAP-6 [5 μ M] oder CRP-X_L [0,01 μ g/ml] zwischen jüngeren und älteren Kontrollspendern detektiert werden (Abbildung 26A). Auch in der Aggregometrie wurde eine vergleichbare Aktivierung nach Stimulation mit CRP-X_L [0,1 μ g/ml], TRAP-6 [10 μ M] oder Rhodocytin [10 nM] beobachtet (Abbildung 26B). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Altersdifferenz nicht ursächlich für die Thrombozytenfunktionsstörung bei Sepsis ist.

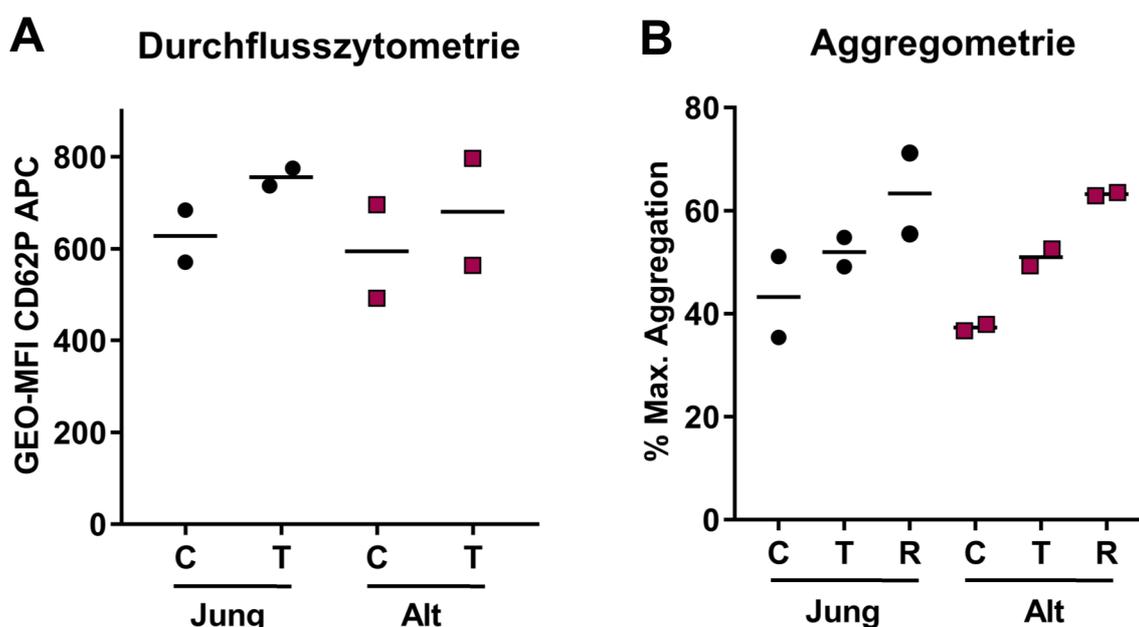


Abbildung 26: Thrombozytenfunktion älterer (mittleres Alter: 67 Jahre) und jüngerer (mittleres Alter: 23,5 Jahre) Probanden. (A) Analyse der CD62P-Expression nach Stimulation mit CRP-X_L (C) [0,01 μ g/ml] bzw. TRAP-6 (T) [5 μ M] mittels Durchflusszytometrie. (B). Die maximale Aggregation wurde nach Stimulation mit CRP-X_L [0,1 μ g/ml], Rhodocytin (R) [10 nM] bzw. TRAP-6 [10 μ M] erfasst. Die Balken zeigen den Mittelwert.

3.6.2 Antibiotikainkubation hat keinen Einfluss auf die Thrombozytenfunktion

Die Patienten unserer Kohorte wurden mit verschiedenen Antibiotika und antibakteriellen Chemotherapeutika therapiert (Kapitel 3.1.1, Tabelle 9.). Diese Medikation kann verschiedene Nebenwirkungen verursachen. Beschriebene Komplikationen bei Gabe der beta-Lactam Antibiotika Piperacilin oder Cefotaxim sind Blutungen und abnormale Thrombozytenaggregation [82]. Aus diesem Grund wurde zunächst der Effekt der studienrelevanten antibiotischen Therapie auf die Thrombozytenfunktion untersucht.

In Vollblut wurde die *Peak*-Plasma-Konzentration von Piperacilin/Tazobactam, Metronidazol, Ciprofloxacin oder Meropenem eingestellt. Als Kontrolle diente 0,9% NaCl-Lösung. Nach 60 Minuten Inkubation wurde die Thrombozytenfunktion mittels Durchflusszytometrie untersucht. Unter Ruhebedingungen war keine vermehrte CD62P-Oberflächenexpression auf den in Antibiotika-inkubierten Thrombozyten feststellbar (Abbildung 27A). Bei der anschließenden Stimulation mit TRAP-6 [5 µM] oder CRP-X_L [0,01 µg/ml] wurde das gleiche Maß an Thrombozytenaktivierung nach Antibiotika-Inkubation erzielt wie nach NaCl-Zugabe (Abbildung 27B). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die bei den Sepsispatienten beobachtete Hyporeaktivität wahrscheinlich nicht durch antibiotische Therapie bedingt ist.

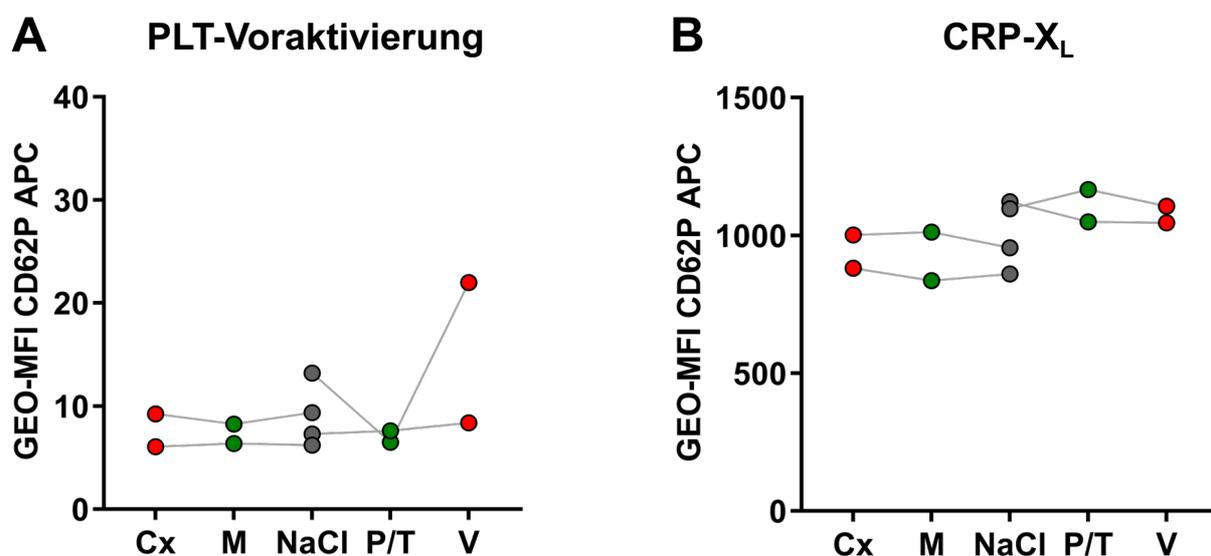
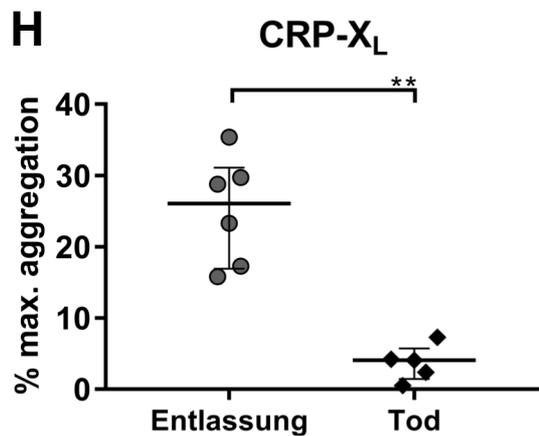
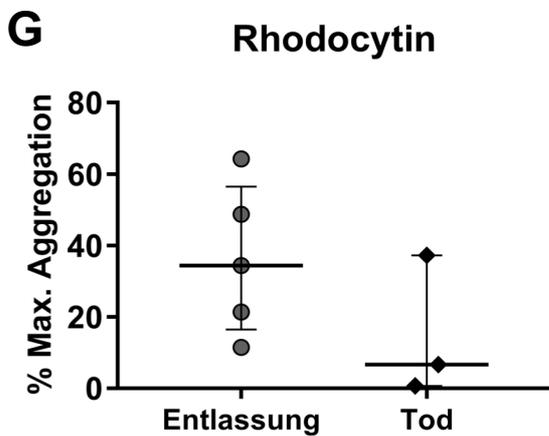
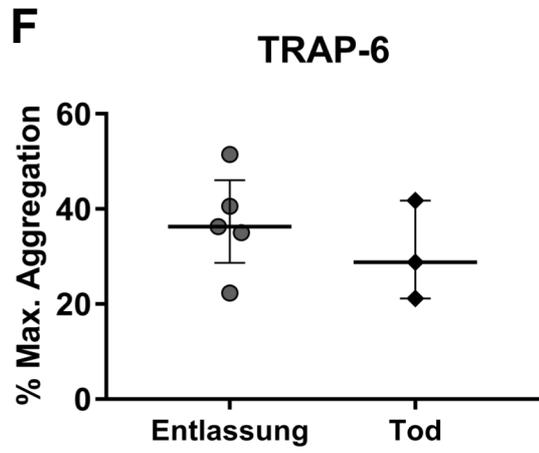
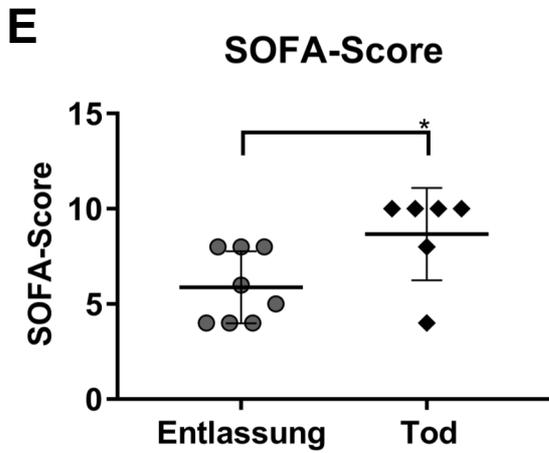
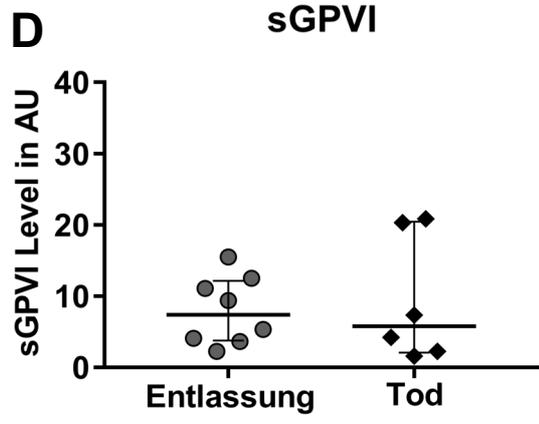
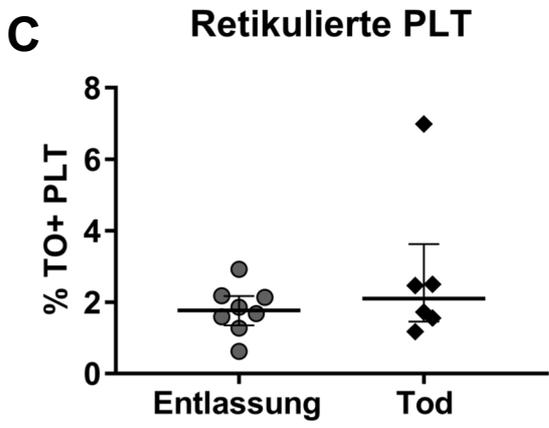
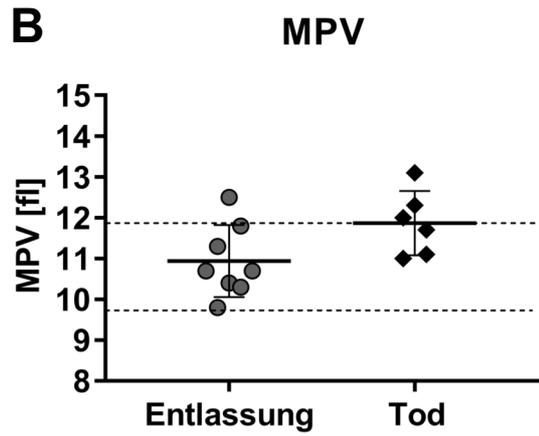
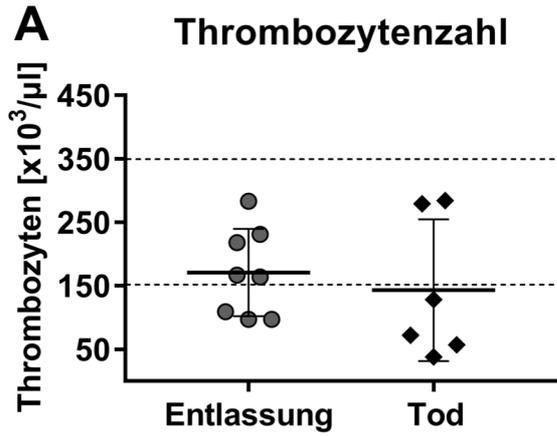


Abbildung 27: Antibiotikainkubation. Zu Vollblut von Probanden wurden verschiedene Antibiotika gegeben. Die Inkubation wurde für 120 min bei 37 °C durchgeführt. Anschließend wurde die CD62P-Expression auf Thrombozyten **(A)** ohne Agonistenzugabe bzw. **(B)** nach CRP-X_L-Stimulation [0,01 µg/ml] gemessen. Die folgenden Medikamente wurden verwendet: Piperacilin/Tazobactam [P=298 µg/ml, T=34 µg/ml], Vancomycin [V=60 µg/ml], Metronidazol [M=25 µg/ml] oder Ciprofloxacin [CX=456 µg/ml]. Die Datenpunkte jedes individuellen Gesundheitspenders wurden miteinander verbunden.

3.7 Survival vs. Non-Survival

Abschließend wurden die Patienten nach Ihrem *Outcome* (Entlassung vs. Tod) gruppiert und die klinischen/diagnostischen Parameter sowie die Thrombozytenaggregation am letzten verfügbaren Messzeitpunkt verglichen. In der Studienkohorte konnte kein signifikanter Unterschied zwischen versterbenden und überlebenden Personen auf Grundlage der Thrombozytenzahl, des mittleren Plättchenvolumens oder der retikulierten Thrombozytenfraktion ermittelt werden (Abbildungen 28A-C). Während auf Grundlage eines erhöhten Plasma-Spiegels der GPVI-Ektodomäne kein Rückschluss auf das jeweilige *Outcome* gezogen werden konnte (Abbildung 28D), war der SOFA-Score jener Patienten, die im Krankheitsverlauf starben, signifikant höher als bei den überlebenden Patienten (Abbildung 28E). Während nach TRAP-6- [10 µM] oder Rhodocytin-Stimulation [10 nM] kein Unterschied in der maximalen Aggregation bestand (Abbildungen 28F-G), war die Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit CRP-X_L bei allen Patienten bei Entlassung signifikant stärker ausgeprägt (16-35%) im Vergleich zu den Patienten, die verstarben (0-7%, mediane Dauer bis zum Versterben nach der letzten Messung: 6 Tage, *Range* 3-12 Tage) (Abbildung 28H). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die maximale Aggregation nach CRP-X_L-Stimulation eine mögliche prognostische Aussage über das *Outcome* einer Sepsis-Erkrankung geben könnte.

Abbildung 28: Assoziation von Thrombozytenfunktion, klinischen/diagnostischen Parametern mit Outcome. Aufgetragen ist der letzte verfügbare Messwert jedes Patienten (Entlassung/Tod). **(A)** Thrombozytenzahl **(B)** Mittleres Plättchenvolumen (MPV). **(C)** Retikulierte Thrombozyten ermittelt durch Thiazolorange Färbung. Messung mit Durchflusszytometer. **(D)** Plasma-Spiegel der GPVI-Ektodomäne ermittelt durch ELISA. **(E)** SOFA-Score. **(F-H)** Aggregometrie wurde mit gewaschenen Thrombozyten durchgeführt [500 /nl]. Die maximale Aggregation wurde nach Stimulation mit **(F)** TRAP-6 [10 µM], **(G)** Rhodocytin [10 nM] bzw. **(H)** CRP-X_L [0,1 µg/ml] erfasst. **(A, B)** Referenzbereiche sind durch gestrichelte Linien dargestellt. **(A-H)** Balken zeigen Median ± IQR an. Die statistische Analyse wurde mittels Kolmogorov-Smirnov-Test durchgeführt: n.s. nicht-signifikant, *p < 0,05, **p < 0,01.



3.8 Übersicht Patienten und Assays

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die Assays, welche mit den Proben der jeweiligen Patienten durchgeführt wurden. Außerdem sind relevante Laborparameter und das jeweilige Patienten-*Outcome* aufgeführt.

Tabelle 12: Übersicht Patienten und Assays.

ID		PLT [/nl]	MPV [fl]	SOFA- Score	FACS	Aggregometrie	Molekulare Analyse	Zusätzliche Assays
21	I	168	10,3	11	+			E
	II	101	10,4	9	+			E
	III	97	10,4	4	+	C ^{Lo}	pTyr	E
22	I	376	10,1	8	+		pTyr	E
	II	72	12,3	10	+			E
	III	Tod						
23	I	44	11,8	14	+			E
	II	13	14,0	12	+			E
	III	231	11,3	8	+			E
24	I	303	11,9	11	+	C ^{Lo} , T	pTyr	
	II	228	12,2	15	+	C ^{Lo} , T	pTyr	
	III	283	11,8	8	+	C ^{Lo} , T, R, C ^{Hi}	pTyr	
25	I	117	11,5	14	+	C ^{Lo} , T, R	pTyr,	E, P
	II	109	11,3	9	+	C ^{Lo} , T, R, C ^{Hi}	pTyr	E, P
	III	196	9,8	4	+			E, P
26	I	169	11,2	7	+	C ^{Lo} , R	pTyr, pSyk, Syk, pLAT	E, P
	II	38	13,1	10	+			E, P
	III	Tod						
27	I	142	11,5	8	+	C ^{Lo} , T, R, C ^{Hi}	pTyr, pSyk, Syk, pLAT, GPVI, pSHP1,SH P1, pSHP2, SHP2	E, P
	II	82	12,2	8	+	C ^{Lo}	pTyr	E, P
	III	164	10,3	4	+	C ^{Lo} , T, R, C ^{Hi}	pTyr, GPVI	E, P

Ergebnisse

ID		PLT [/nl]	MPV [fL]	SOFA- Score	FACS	Aggregometrie	Molekulare Analyse	Zusätzliche Assays
28	I	179	10,8	9	+	C ^{Lo} , T, R, C ^{Hi}	pTyr, pSyk, Syk, pLAT, GPVI, pSHP1, SHP1	E
	II	131	11,2	5	+	C ^{Lo} , T, R	pTyr, GPVI	E
	III	218	10,7	6	+	C ^{Lo} , T, R, C ^{Hi}	pTyr, GPVI	E
29	I	39	12,8	13	++			E
	II	57	12,0	10	++	C ^{Lo}		E
	III	Tod						
30	I	128	11,0	10	+++	C ^{Lo} , T	pTyr, pSyk, Syk, pLAT, pSHP1, SHP1, pSHP2, SHP2	E, B
	II	Tod						
31	I	284	11,1	8	+++	C ^{Lo} , T, R, C ^{Hi}	pTyr, pSHP2, SHP2	E, B
	II	Tod						
32	I	167	10,7	5	+++	C ^{Lo} , T, R	pTyr	E, P, B
	II	Entlassung						
33	I	149	11,9	10	+++	C ^{Lo} , T, R	pTyr, pSHP1, SHP1, pSHP2, SHP2	E, P, B
	II	254	11,6	7	+++	C ^{Lo} , T, R	pTyr	E, P, B
	III							
34	I	97	12,5	8	+++			E, P, B
	II	Entlassung						
35	I	369	12,6	9	+++	C ^{Lo} , T, R, C ^{Hi}	pTyr	E, P
	II	279	11,7	4	+++	C ^{Lo} , T, R	pTyr	E, P, B
	III	Tod						

FACS:

+: Rezeptorexpression, retikulierte Thrombozyten, Thrombozytenfunktions-Assays, Mepacrin

++: Zusätzlich CLEC-2-Expression

+++ : Zusätzlich Podoplanin-Expression.

Zusätzliche Assays:

E: IL-6-, TPO-, GPVI-Ektodomänen-ELISA

P: Plasma-Inkubation

B: Vollblut-Inkubation

4 Diskussion

4.1 (Hem-)ITAM-Hyporeaktivität bei Sepsis - *Good or Bad Cop?*

Blutungs- und Thromboseereignisse sind häufige und potenziell lebensbedrohliche Komplikationen einer Sepsis, welche in der Maximalform in einer DIG münden können. Allerdings sind funktionale Veränderungen der Thrombozyten während der Sepsis bisher wenig untersucht. In dieser Studie konnte in einem longitudinalen Studiendesign mit sich ergänzenden Methoden gezeigt werden, dass die Thrombozytenfunktion bei Sepsis stark eingeschränkt ist, was ein potenzieller Erklärungsansatz für die bei Sepsis beobachteten Blutungsneigung sein könnte. Der Thrombozytenfunktionsdefekt war von Krankheitsbeginn an nachweisbar und wurde unabhängig von Infekt-Fokus, Bakterium, Vorerkrankungen, Therapie und Alter beobachtet.

Ein besonders stark ausgeprägter Funktionsdefekt wurde bei Stimulation des Kollagen-Rezeptors GPVI gefunden, welcher neben seiner Bedeutung für die Hämostase essenziell für die Aufrechterhaltung der vaskulären Integrität unter inflammatorischen Bedingungen ist. In dieser Studie wurde erstmalig eine systematische Analyse der GPVI-Funktion bei Sepsispatienten durchgeführt und ebenfalls eine starke Funktionseinschränkung nachgewiesen, welche von allen untersuchten Agonisten am deutlichsten ausgeprägt war.

Da Sepsispatienten häufig an einer massiven Störung der vaskulären Integrität leiden, stellt sich die Frage, ob der beobachtete GPVI-Defekt an der (Patho-)Physiologie des *Capillary Leak* beteiligt ist. Räumlich begrenzt könnte eine Extravasation vorteilhaft sein, da Entzündungsmediatoren und Immunzellen gezielt in Kontakt mit den Pathogenen im umliegenden entzündeten Gewebe kommen [97]. Allerdings führt eine überschießende systemische Ödem-Bildung zur Instabilität des Herz-Kreislauf- und Atemsystems [98]. Denkbar wäre folglich, dass ein lokaler protektiver Entzündungsprozess, sekundär zum systemischen *Capillary Leak*-Syndrom exazerbiert. Eine Analyse, welche Rolle GPVI in der Entwicklung des *Capillary Leak* hat, wäre deshalb ein vielversprechendes Ziel für zukünftige Studien.

Viele bisher durchgeführten Studien zur Rolle von GPVI bei Sepsis wurden im Mausmodell durchgeführt. Eine direkte Übertragbarkeit auf den Menschen ist deshalb nur eingeschränkt möglich. Neben der Aufrechterhaltung der vaskulären Integrität wurde im Mausmodell gezeigt, dass Thrombozyten über die (Hem-)ITAM-Rezeptor-Achse inflammatorische Prozesse regulieren. Da es bei Sepsis zur vermehrten Präsenz multipler Agonisten wie Kollagen oder Fibrin kommt, könnte die Thrombozytenhyporeaktivität von Vorteil sein, um eine überschießende Aggregation oder eine (Mikro-)Thrombusbildung zu verhindern und eine ausreichende Konzentration von Thrombozyten im Blutkreislauf zu behalten [55]. Die zirkulierenden Thrombozyten könnten die inflammatorischen Prozesse weiterhin regulieren. Dies würde allerdings voraussetzen, dass die immunregulatorische Funktion unabhängig von der bei Sepsis dysfunktionalen (Hem-)ITAM-Signalkaskade ist. In den bisherigen Arbeiten blieb offen, ob intaktes (Hem-)ITAM-Rezeptorsignaling zur Immunregulation erforderlich ist, da in allen Arbeiten mit GPVI^{-/-} und CLEC-2^{-/-} KO-Mausmodellen bzw. antikörpervermittelter Rezeptorblockade (INU-1-, JAQ-1-Antikörper) gearbeitet wurde [55, 79, 80]. Eine Inhibition der (Hem-)ITAM-Kaskade mittels SFK-Inhibitoren (z.B. Dasatinib) oder ein selektiver KO der Signaltransduktionsproteine (z.B. Syk) in Thrombozyten mittels GP1b α -Cre oder PF4-Cre-Mausmodellen wären hier mögliche Ansätze, um diese Fragestellung zu bearbeiten [99-101].

In Frage käme auch, dass Thrombozyten von Patienten mit Sepsis aufgrund der defekten GPVI-Signalkaskade nicht mehr in der Lage sind, inflammatorische Prozesse zu regulieren. Die wegfallende Regulation könnte die Exazerbation einer lokal begrenzten Immunreaktion zu einem generalisierten, ungerichteten und dysregulierten Prozess begünstigen. Es wäre möglich, dass der GPVI-Defekt so mitverursachend oder pathognomonisch für einen schweren Sepsisverlauf ist. Für eine genaue Einordnung sind allerdings weitere Arbeiten und Studien notwendig.

4.2 Was ist die Ursache des GPVI-Defekts?

In dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass der bei Sepsispatienten beobachtete GPVI-Defekt auf "normale" Thrombozyten von Gesundspendern übertragbar ist, wenn diese im Vollblut von Sepsispatienten inkubiert werden. Bereits nach 15 Minuten konnte eine signifikante Reduktion nach CRP-X_L- oder TRAP-6-Stimulation festgestellt werden (Kapitel 3.4.3). Demgegenüber war nach Inkubation in PPP dieser Patienten unter diesen Bedingungen kein Effekt zu beobachten. Dies legt nahe, dass Faktoren im Vollblut für die Vermittlung dieses Defekts notwendig sind. Plasmatische Faktoren könnten hierbei beteiligt sein, aber eine zelluläre Komponente im Blut der Patienten ist notwendig.

Tatsächlich konnten bei Sepsispatienten vermehrte Thrombozyten-Leukozyten-Interaktionen mittels Durchflusszytometrie detektiert werden (Kapitel 3.4.4, Abbildung 23). Die induzierte Hyporeaktivität war allerdings bei keinem der gesunden Probanden so stark ausgeprägt wie bei Sepsispatienten. Dies lässt den Schluss zu, dass es sich bei dem beobachteten GPVI-Defekt um ein multifaktoriell bedingtes Geschehen handeln könnte.

Auf der Oberfläche der Thrombozyten von Patienten mit Sepsis war zu allen Zeitpunkten etwas weniger GPVI exprimiert als auf Thrombozyten gesunder Probanden. Gleichzeitig konnte durch uns und andere Arbeitsgruppen in einem vergleichbaren Sepsiskollektiv ein gesteigertes *Shedding* der GPVI-Ektodomäne nachgewiesen werden [102]. Es wäre möglich, dass die Rezeptordichte auf der Oberfläche zu gering ist, um das Signal des Rezeptors zu transduzieren. Dies würde auch erklären, warum in unseren Experimenten Agonisten, welche GPVI stärker *clustern* (Convulxin, Hochdosis CRP-X_L), den Phänotyp revertieren können.

Bei Sepsis kommt es zur vermehrten Bildung, Freisetzung und Expression verschiedener thrombogener Proteine. Es wäre möglich, dass die funktionalen Thrombozyten in der Peripherie aggregieren und vermehrt dysfunktionale Thrombozyten in der Zirkulation verbleiben. Dagegen spricht allerdings, dass auf den Thrombozyten bei Sepsispatienten keine erhöhte Expression von Aktivierungsmarkern detektiert wurde (Kapitel 3.1.5, Abbildung 10). Darüber hinaus war es mit keinem der in dieser Dissertation durchgeführten Kreuzinkubationsexperimenten möglich, die Thrombozyten von gesunden Probanden zu aktivieren.

Daraus folgt, dass es entweder nicht zur (spontanen) Aktivierung von Thrombozyten in der Zirkulation kommt, oder dass voraktivierte Thrombozyten schnell aus dem System entfernt werden, sodass diese bei der Blutentnahme nicht mehr nachweisbar sind. Denkbar wäre auch, dass die untersuchten Aktivierungsmarker zu schnell von der Thrombozytenoberfläche entfernt werden. Andere Marker wie der Plasma-Spiegel des *soluble triggering receptor expressed on myeloid cells–like transcript 1* (sTLT-1) wären mögliche Zielstrukturen, um in Zukunft dieser Frage nachzugehen. In einer Arbeit von Morales-Ortiz *et al.* wurden bei Patienten mit ARDS erhöhte sTLT-1-Level detektiert [103].

In einem murinen Modell konnte nach Thrombozytendepletion gezeigt werden, dass neugebildete Thrombozyten bei Stimulation des Kollagen-Rezeptors GPVI hyporeaktiv sind [104]. Es wäre möglich, dass Thrombozyten durch vorzeitigen hepatischen Abbau aus der Zirkulation entfernt werden und lediglich die neugebildeten Thrombozyten im Blutkreislauf verbleiben. Unsere Daten legen basierend auf einem erhöhtem MPV und TPO-Spiegel sowie einer ansteigenden Zahl an retikulierten Thrombozyten im Blut eine gesteigerte Thrombopoese bei Sepsis nahe. Gegen diese These spricht, dass bereits zum Aufnahmezeitpunkt der Patienten auf die Intensivstation alle Thrombozyten in der Durchflusszytometrie homogen hyporeaktiv sind. Dies wird vor allem bei Betrachtung der Histogramme deutlich, in welchen keine bi-modale Verteilungskurve zu sehen ist (Kapitel 3.2.1, Abbildungen 11A, 12A).

Um einen vorzeitigen hepatischen Abbau der Thrombozyten bei Sepsis weiter zu untersuchen, wäre eine genaue Analyse der endständigen Zuckerketten der Glykoproteine auf der Thrombozytenoberfläche interessant. Durch erhöhte Aktivität von Sialidasen könnten diese verkürzt werden und die Thrombozyten verstärkt über den Ashwell-Morell-Rezeptor in der Leber abgebaut werden [45, 105]. In einer Studie mit 127 Patienten konnte gezeigt werden, dass sich bei thrombozytopenen Patienten mit Sepsis signifikant mehr desialysierte Glykoproteine auf der Thrombozytenoberfläche befinden als bei Patienten mit normalen Thrombozytenzahlen. Durch Gabe des Sialidase-Inhibitors Oseltamivir konnte die Thrombozytenzahl der Patienten signifikant gesteigert werden und es mussten weniger Thrombozytenkonzentrate transfundiert werden. Ein Effekt auf die 28-Tage-Mortalität konnte allerdings in dieser Studie nicht nachgewiesen werden [106].

Bei Sepsis kommt es zur gesteigerten Apoptose verschiedener Zellen [107, 108]. Eine große Anzahl apoptotischer Thrombozyten in der Zirkulation würde den hyporeaktiven Befund erklären. Verschiedene Parameter sind zur Analyse der Apoptose bei Thrombozyten etabliert. Hierzu zählen die Oberflächenexposition von Phosphatidylserin, ein erniedrigtes mitochondriales Membranpotential sowie die Degradation des anti-apoptotischen Proteins BCL-X_L [109, 110]. Wir konnten in Immunoblot-Analysen keine gesteigerte Degradation des anti-apoptotischen Proteins BCL-X_L bei Thrombozyten von Patienten mit Sepsis nachweisen (Kapitel 3.3.5, Abbildung 19), was gegen gesteigerte Apoptose als Ursache der Thrombozytenfunktionsstörung spricht. Ergänzend sollte zukünftig noch eine Analyse der Phosphatidylserin-Exposition oder des mitochondrialen Membranpotentials durchgeführt werden, um unsere Ergebnisse der konstanten BCL-X_L-Expression zu ergänzen.

Zur intensivmedizinischen Sepsis-Therapie werden verschiedene Medikamente und technische Geräte eingesetzt. In einigen Arbeiten wurde mittels Durchflusszytometrie die Thrombozytenaktivierung und Degranulierung bei Hämodialyse gezeigt [111, 112]. Auch bei veno-venöser und veno-arterieller ECMO-Therapie, welche mittlerweile etablierter Bestandteil der Intensivtherapie ist, konnte eine Thrombozytenvoraktivierung und anschließende Hyporeaktivität nach Thrombozytenstimulation gezeigt werden [113-115]. Darüber hinaus haben die häufig beim Septischen Schock verwendeten Katecholamine einen aktivatorischen Effekt auf Thrombozyten [116, 117]. Die Analyse der hier untersuchten Patientenkohorte zeigt allerdings, dass obwohl unterschiedliche Therapeutika verwendet wurden, alle Patienten einen ähnlich stark ausgeprägten Funktionsdefekt aufwiesen. Deswegen ist es unwahrscheinlich, dass Medikamente wie Katecholamine oder verschiedene Antibiotika und *Devices* wie eine Hämodialyse der alleinige Grund für die in dieser Dissertation gefundene Hyporeaktivität der Thrombozyten bei Sepsis sind. Mittels Kreuzinkubationsexperimenten der vier hauptsächlich verwendeten Antibiotika konnte darüber hinaus kein Einfluss auf die Thrombozytenfunktion von Gesundspendern beobachtet werden (Kapitel 3.6.2, Abbildung 27). Eine artifizielle Entstehung des Thrombozytenfunktionsdefekts durch die Medikation erscheint daher unwahrscheinlich.

4.3 Sind Thrombozyten bei Sepsis hypo- oder hyperreaktiv?

Die Thrombozytenfunktion bei Sepsis wurde bereits im Rahmen einiger Arbeiten analysiert, oft allerdings mit einem sehr eingeschränkten Portfolio an Agonisten und *Readouts*. Interessanterweise kamen die Autoren zu mitunter gegensätzlichen Ergebnissen. Im Folgenden soll eine kurze vergleichende Übersicht über die bisherigen Arbeiten gegeben werden. Aus Gründen der besseren Lesbarkeit werden die Studien nach erstmaliger Einführung mit einem numerischen Kürzel angeführt (Tabelle 13).

Tabelle 13: Übersicht der klinischen Studien zur Thrombozytenfunktion bei Sepsis.

Studienkürzel im Text	Studie	Fallzahl (n)
I	Gawaz <i>et al.</i> , Intensive Care Med, 1997 [118]	41
II	Russwurm <i>et al.</i> , Shock, 2002 [119]	47
III	Akinosoglou <i>et al.</i> , Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2017 [120]	71
IV	Yaguchi <i>et al.</i> , J. Thromb Haemost, 2004 [121]	10
V	Adamzik <i>et al.</i> , Crit Care, 2012 [122]	80
VI	Tunjungputri <i>et al.</i> , Platelets, 2017 [123]	32

Gawaz *et al.* (Studie I) zeigten bei 41 Patienten eine Thrombozytenvoraktivierung und eine gesteigerte Aktivierung von Gesundspender-Thrombozyten auf ADP-Stimulation nach Inkubation in Sepsis-PPP [118]. Russwurm *et al.* (Studie II) konnten eine Voraktivierung der Thrombozyten bei Patienten mit Sepsis anhand von gesteigerter CD62P-Expression unter Ruhebedingungen bei 47 intensivpflichtigen Patienten detektieren [119]. Akinosoglou und Kollegen (Studie III) haben mittels dem *Point-of-Care*-Gerät VerifyNow® 38 Patienten mit Sepsis und 33 Patienten mit Septischem Schock rekrutiert. Die Stimulation der Thrombozyten wurde mittels der Kol/ADP-Kartusche durchgeführt. Die Autoren beschreiben eine signifikant gesteigerte Thrombozytenaktivierung bei Patienten mit Sepsis und eine unauffällige Aggregation bei Septischem Schock [120].

Demgegenüber konnten Yaguchi *et al.* (Studie IV) eine reduzierte Integrin-Aktivierung nach Stimulation mit TRAP-6 bei 10 Patienten mit Sepsis beobachten [121]. Adamzik *et al.* (Studie V) haben bei 80 Probanden mit schwerer Sepsis die Thrombozytenfunktion mittels Multiplate® analysiert und beobachteten signifikant reduzierte Aggregation nach Zugabe von Kollagen [122]. Tunjungputri und Kollegen (Studie VI) haben 15 Patienten mit grampositiver und 17 mit gramnegativer Sepsis rekrutiert und detektierten signifikant reduzierte CD62P-Exposition nach Stimulation mit Hochdosis CRP-X_L bzw. ADP in der Durchflusszytometrie [123]. In unserer Studie wurde ein gemischt chirurgisch/internistisches Kollektiv intensivpflichtiger Patienten mit Sepsis rekrutiert. Von den 15 Patienten hatten 14 einen Septischen Schock. Keiner der Patienten war unmittelbar zuvor in auswärtiger intensivmedizinischer Behandlung. Die Thrombozytenfunktionsanalyse wurde mittels Aggregometrie (CRP-X_L, Rhodocytin, TRAP-6), Durchflusszytometrie (CRP-X_L, Convulxin, ADP) und Immunoblot durchgeführt. Damit ist diese Studie die erste Arbeit, in welcher eine ausführliche Untersuchung der Immunorezeptorfunktion bei Sepsis erfolgte und in welcher die Ergebnisse der Thrombozytenfunktionsanalyse mit einer Untersuchung der Signalkaskade kombiniert wurde. Um die divergierenden Ergebnisse zu analysieren, soll ein detaillierter Vergleich der einzelnen Arbeiten erfolgen. Die angeführten Studien unterscheiden sich anhand der folgenden Faktoren:

(a) Analysezeitpunkte und Follow Up: Während in unserer Studie die Thrombozytenfunktion der Patienten mit Sepsis zu insgesamt drei Zeitpunkten getestet wurde, ist in den Studien I, II, IV, V und VI keine *Follow Up*-Messung durchgeführt worden. Lediglich in Studie III wurde eine erneute Messung nach 28 Tagen bei 14 Patienten vorgenommen.

(b) Die Studien verwenden unterschiedliche Ausschlusskriterien: In unserer Arbeit wurden Patienten mit hämato-onkologischen Erkrankungen aufgrund der hämatopoetischen Pathologie ausgeschlossen. In Studie III sind keine HIV/HBV-positive-, thrombozytopen, immunsupprimierte-, Corticosteroid/Antibiotika/P2Y₁₂-Inhibitoren-einnehmende Patienten aufgenommen worden. Darüber hinaus wurden Patienten mit bekannter Thrombozytenfunktionsstörung/auffälliger Blutungsanamnese oder erhöhtem bzw. reduziertem Hämatokrit (<32%, >52%) ausgeschlossen.

In Studie IV wurden Patienten nach Heparin- oder COX-Inhibitor-Therapie und bei einem Plasma-Kreatinin-Wert von mehr als 2,5 mg/dl ausgeschlossen. In Studie VI wurden explizit keine intensivpflichtigen Patienten rekrutiert. Dialysepflichtige-, immunsupprimierte- sowie HIV/HBV-positive-Patienten wurden ebenfalls nicht eingeschlossen. Demgegenüber haben die Studien I, II und V alle Patienten, welche die Sepsis-Kriterien erfüllten, aufgenommen.

(c) Sepsis-Kriterien: In den früheren Arbeiten wurden alle Patienten nach den Sepsis I-Kriterien rekrutiert. In unserer Studie erfüllten alle Patienten sowohl die Sepsis I- als auch die Sepsis III-Kriterien. In Studie I findet sich keine Angabe des SOFA-Scores. Da einige Items des APACHE II-Scores auch Bestandteil der Sepsis III-Kriterien sind, könnte der SOFA-Score in Studie I ebenfalls erfüllt sein [124, 125]. In Studie VI gibt es keine Angabe zum SOFA- bzw. APACHE II-Score oder zum detaillierten Laborbefund der Patienten. In den anderen Studien wird der SOFA-Score angegeben. Dieser ist in Studie V am höchsten (Median: 12,0 IQR: 8,0 - 15,0) und in den Studien IV (Mittelwert \pm SD: 3 ± 2) und III (Median 1, IQR: 0 - 2,5) deutlich niedriger. Besonders bei Studie III fällt auf, dass bei einem medianen SOFA-Score von 1 ein großer Teil der Patienten die Sepsis III-Kriterien nicht erfüllen würde. Selbiges gilt für Studie IV. Da in Studie VI keine intensivpflichtigen Patienten in die Studie eingeschlossen wurden, ist ebenfalls von einem vergleichbar niedrigen SOFA-Score auszugehen. In unserer Studie beträgt der mediane SOFA-Score bei Aufnahme 9 (IQR: 8-11) und ist damit mit dem Score der Studien II und V vergleichbar. Da es Gegenstand der wissenschaftlichen Diskussion ist, wie die *Glasgow Coma Scale* (GCS) bei sedierten Patienten auf der Intensivstation erhoben werden kann, entschieden wir uns in dieser Studie für einen modifizierten SOFA-Score ohne GCS [126]. Dies führt dazu, dass der maximale SOFA-Score um bis zu vier Punkte niedriger ist als in den anderen Studien. Folglich ist die Kohorte unserer Studie am ehesten mit der Patientenkohorte aus Studie V vergleichbar.

(d) Rekrutierungszeitpunkt: In den Studien I, IV und V wurden die Patienten innerhalb von 24 Stunden nach Aufnahme auf die Intensivstation in die Studie eingeschlossen. In Studie III wurden die Patienten bereits in der Notaufnahme innerhalb von 4 Stunden nach Vorstellung rekrutiert. In Studie II wurden Intensivpatienten innerhalb von 6 Stunden nach erstmaliger Erfüllung der Sepsis-Kriterien in die Studie aufgenommen.

Demgegenüber konnten in unserer Studie 12 von 15 Patienten innerhalb des ersten Tages auf der Intensivstation rekrutiert werden. Allerdings vergingen nach Vorstellung im Krankenhaus bei der Mehrheit der Patienten bis zu 48 Stunden bis zum Einschluss in unsere Studie. Daraus folgt, dass die Patienten in unserer Kohorte zu einem späteren Zeitpunkt im Krankheitsverlauf als bei Studie III aufgenommen wurden und zu einem ähnlichen wie bei den Studien I, IV und V.

(e) Analysemethodik: Für die Analysen der Studien III und V wurden die *Point-of-Care*-Geräte VerifyNow® bzw. Multiplate® verwendet. Diese erlauben eine schnelle standardisierte Messung der Thrombozytenfunktion. Allerdings werden beide Geräte nicht zur Analyse thrombozytopenen Patienten empfohlen [82, 127]. Um in unserer Arbeit die Thrombozytenfunktion der häufig thrombozytopenen Sepsispatienten in der Aggregometrie analysieren zu können, wurde eine einheitliche Thrombozytenzahl von 500 /nl eingestellt.

(f) Denkbar wäre auch, dass eine unterschiedliche Blutentnahmemethodik die divergierenden Ergebnisse erklärt. Wir konnten beobachten, dass eine Perforation der Gefäßwand bei der Blutentnahme ausreicht, um eine Präaktivierung der Thrombozyten zu induzieren. Da bei Patienten mit septischem Schock aufgrund der Hypotonie, der Zentralisation des Kreislaufes und des *Capillary Leak* eine venöse Punktion erschwert ist, könnte dies voraktivierte Thrombozyten erklären. Deshalb wurde in unserer Studie bei Patienten das Blut nicht-invasiv aus einem zentralvenösen oder arteriellen Zugang entnommen. Ein Unterschied in der Voraktivierung zwischen arteriellem und venösem Blut war nicht zu beobachten. In den Studien II, III und V findet sich kein Verweis auf die Blutentnahmemethodik. In Studie I wurde das Blut der Patienten ebenfalls aus arteriellen Kathetern entnommen.

Es wird deutlich, dass es zwischen den Studien im Hinblick auf Studiendesign, Ein- und Ausschlusskriterien, Zeitpunkt des Studieneinschlusses und Analysemethodik große Unterschiede gibt. Dies erschwert einen Vergleich der einzelnen Studien, liefert aber eine mögliche Erklärung für die eher kontroversen Ergebnisse.

4.4 Transfusion und Inhibition von Thrombozyten in der Therapie

Der Einsatz verschiedener Thrombozytenfunktions-Inhibitoren wurde in der Sepsis-Therapie evaluiert. In Tiermodellen von Mäusen oder Menschenaffen führte der Einsatz von Eptifibatid und anderer Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Inhibitoren zu einer niedrigeren Mortalität, geringerer Apoptose und geringer Schädigung der Niere [128-131]. P2Y₁₂-Blockade erhöhte das *Survival* bei Mäusen in einem polymikrobiellen Peritonitismodell [132]. In klinischen Studien konnte der positive Effekt der Thrombozyteninhibition bei Sepsis bisher nicht einheitlich bestätigt werden. Obwohl in einigen retrospektiven Arbeiten ein positiver Effekt von COX-Inhibition oder P2Y₁₂-Blockade gefunden wurde, konnte dies in prospektiven Studien nicht reproduziert werden [133-136]. In einer Arbeit von Gross *et al.* wurde sogar ein erhöhtes Risiko für ambulant erworbene Pneumonien nach Clopidogrel-Gabe beschrieben [130, 137]. Die Ergebnisse von größeren prospektiven randomisierten kontrollierten Studien sind abzuwarten. Mit Revacept ist ein neuartiger Inhibitor der Thrombozytenadhäsion in der klinischen Erprobung [138]. Durch Fusion der GPVI-Ektodomäne mit einem Fc-Protein, soll die pathologische Thrombusbildung verhindert werden ohne signifikante Zunahme der Blutungszeit. Dies wäre ein möglicher Ansatz, die Bildung von Mikrothrombi bei Sepsis zu reduzieren, ohne dabei die gesteigerte Blutungsneigung zu aggravieren [139].

Ein etabliertes Verfahren in der Sepsis-Therapie ist die Gabe von Thrombozytenkonzentraten bei thrombozytopenen Patienten mit Blutungen [140]. In der hier vorgestellten Studie erhielt nur einer der 15 Patienten Thrombozytentransfusionen: ein Konzentrat wurde kurz vor der *Follow Up*-Untersuchung verabreicht. Wir konnten weiterhin zeigen, dass die gefundene Hyporeaktivität in Thrombozyten von Patienten auf gesunde Probanden übertragbar ist. Deshalb könnte es sein, dass transfundierte Thrombozyten nach kurzer Zeit nicht mehr oder zumindest mit einem bedeutend geringeren Potential aggregieren und damit keine funktionale Hämostase in Patienten mit Sepsis mehr vermitteln können. Nach Transfusion des Thrombozytenkonzentrates war in unserer Studie keine verbesserte Thrombozytenfunktion bei dem einen untersuchten Patienten festzustellen.

4.5 Begrenztes Material, kleine Fallzahl, gesunde Kontrollgruppe

Das unserer Studie zu Grunde liegende Ethikvotum deckte die Entnahme von 16 ml Vollblut pro Patienten pro Zeitpunkt ab. Da Sepsispatienten häufig thrombozytopen und einige Analyseverfahren (Aggregometrie) materialaufwendig sind, war es nicht möglich, alle Assays für jeden Patienten durchzuführen. Aus methodischen Gründen war darüber hinaus die Verwendung bestimmter Agonisten in manchen Analysen nicht sinnvoll. Nach Thrombozytendepletion durch Zentrifugation wurde in artifiziell thrombopenisiertem Blut von Gesundspendern eine geringere Reaktivität auf TRAP-6 festgestellt [141]. Deswegen wurde auf die routinemäßige Bestimmung dieses Parameters in der durchflusszytometrischen Analyse verzichtet. Die Aggregometrie wurde nach Zugabe von Apyrase durchgeführt. Da das Enzym die Hydrolyse von ADP zu AMP und Phosphat katalysiert, konnte ADP für diesen Assay nicht verwendet werden [142]. Die Zeit von Rhodocytin-Zugabe bis zum Beginn der Aggregation schwankte mit einem Intervall von zwei bis zehn Minuten stark. Da die Antikörperzugabe bei der Durchflusszytometrie einheitlich auf 5 Minuten festgesetzt wurde, wären die Ergebnisse bedingt durch die großen Differenzen in der Anschlagszeit nicht vergleichbar gewesen. Deswegen wurde auf die Rhodocytin-Stimulation in der Durchflusszytometrie verzichtet.

Aufgrund der geringen Fallzahl der durchgeführten Studie ist die statistische *Power* zu gering, um die prognostische Aussage (*Survival/non-Survival*) der GPVI-Hyporeaktivität bei Sepsis beurteilen zu können. Allerdings fällt auf, dass kein anderer erhobener klinischer oder experimenteller Parameter die Patienten so eindeutig nach ihrem *Outcome* stratifiziert wie die gemessene maximale Aggregation nach CRP-X_L-Stimulation. Für die Bearbeitung dieser Fragestellungen ist eine Folgestudie mit größerer Fallzahl nötig.

Alle Patienten waren zum Studieneinschluss bereits auf intensivmedizinische Therapie angewiesen. Etablierte Biomarker wie beispielsweise das Procalcitonin waren bei allen Patienten zum Zeitpunkt I ebenfalls deutlich erhöht. Um zu evaluieren, ob die Thrombozytenfunktion als zukünftiger Marker für die Sepsis-Frühdagnostik geeignet ist, sind weitere Untersuchungen erforderlich.

Notwendig wäre hierfür die Untersuchung von Patienten, die sich in einem frühen Erkrankungsstadium befinden, beispielsweise bei Vorstellung in der Notaufnahme, um zu testen, ab wann der Thrombozytenfunktionsdefekt auftritt.

In der hier durchgeführten Pilotstudie wurden Sepsispatienten mit gesunden Kontrollen verglichen und signifikante Unterschiede zwischen beiden Kohorten erfasst. Zur Beurteilung, ob die GPVI-Hyporeaktivität einen möglichen Mehrwert in der klinischen Diagnostik liefert, müsste eine andere Kontrollgruppe rekrutiert werden, welche mögliche Differentialdiagnosen der Sepsis reflektiert (SIRS, sterile Inflammation). Darüber hinaus haben Patienten mit Sepsis häufig chronische Vorerkrankungen (Tumorleiden, Hypertonie, Diabetes etc.) [143]. Deswegen wäre es interessant, die Kontrollkohorte um Personengruppen mit inflammatorischen Pathologien und chronischen Vorerkrankungen zu erweitern, damit die Spezifität der Hyporeaktivität verglichen mit anderen inflammatorischen und chronischen Pathologien beurteilt werden kann.

4.6 Ausblick

4.6.1 Etablierung eines Tiermodells zur Untersuchung der Pathophysiologie

Um den Einfluss der (Hem-)ITAM-Rezeptoren auf die Entwicklung von Sepsis, septischem Schock, *Capillary Leak* und DIG zu untersuchen, wäre die Etablierung eines Tiermodells nützlich. In der Sepsisforschung werden häufig Mausmodelle genutzt, welche sich untereinander stark unterscheiden. Grundsätzlich können sie in drei verschiedene Ansätze eingeteilt werden:

1. LPS-Infusion/-Injektion: Durch das Endotoxin LPS wird eine Entzündungsreaktion hervorgerufen. Entzündungsmarker steigen stärker und schneller an als bei der humanen Sepsis. Die Mäuse dekompensieren schnell hämodynamisch und entwickeln einen hypodynamischen Schock [144].
2. Cecal ligation and puncture (CLP): Das Caecum wird mittels einer Schlinge gefasst und durch Punktion eröffnet. Darmkeime kommen in das Peritoneum und induzieren eine Peritonitis/Sepsis. Alternativ kann auch das Colon ascendens verwendet werden (*Colon ascendens stent peritonitis (CASP)*-Modell). Eine polymikrobielle Infektion wird simuliert. Im CLP/CASP-Modell entwickeln die Mäuse keine Schädigung der Niere und der Lunge [145]. Bei adäquater Flüssigkeitsgabe kann eine kurze hyperdynamische Episode vor der hypodynamischen Schockphase beobachtet werden [146, 147].
3. Bakterielle Infusion- und Instillation: Abhängig von der Art des verwendeten Keims und der Methode, wie dieser der Maus verabreicht wird (Injektion, Inhalation), können gezielt Infektionen bestimmter Organsysteme (z.B. pneumogene Sepsis) simuliert werden [147].

Die bestehenden Arbeiten zur Rolle von GPVI und CLEC-2 bei Sepsis wurden in verschiedenen Sepsis KO-Mausmodellen durchgeführt. In den Arbeiten der niederländischen Arbeitsgruppe um Claushuis, De Stoppelaar und Kollegen wurde ein *Klebsiella pneumoniae*-Inhalationsmodell verwendet [55, 148]. Hitchcock *et al.* arbeiteten mit einem *Salmonella enterica*-Injektionsmodell [80, 149]. Rayes *et al.* nutzten ein LPS-Injektions und CLP-Modell [79].

Auffallend ist, dass die Autoren unterschiedliche, zum Teil diskrepante Beobachtungen machten: Claushuis *et al.* konnten keinen Effekt auf das *Survival* bei CLEC-2 KO-Tieren feststellen, während Hitchcock *et al.* und Rayes *et al.* bei GPVI KO keinen Unterschied zum Wildtyp beobachteten. Dies könnte auf die unterschiedlichen Sepsismodelle zurückzuführen sein. Murine Thrombozyten exprimieren an Stelle des aktivatorischen Fc γ RIIa-Rezeptors den inhibitorischen Fc γ RIIb-Rezeptor [150]. Die Arbeit von Cloutier und Kollegen hat gezeigt, dass dieser Unterschied in der Sepsis relevant ist: ohne den Fc γ RIIa-Rezeptor war keine Entstehung eines durch Serotonin vermittelten Schocks zu beobachten [151].

An ein murines Sepsismodell, welches zur Analyse der (Hem-)ITAM-Funktion genutzt wird, sollten deshalb idealerweise folgende Anforderungen gestellt werden: 1. Die Immunorezeptoren sollten identisch zu jenen auf humanen Thrombozyten sein, 2. Dosis und Virulenz der verabreichten Bakterien sollte aufgrund der Interaktion der Immunorezeptoren mit Pathogenen kontrollierbar sein. Deshalb könnte sich ein bakterielles Instillationsmodell unter Verwendung einer transgenen Fc γ RIIa-Maus eignen, um die Pathophysiologie weiter zu erforschen. Neben gentechnischen Modifikationen bietet das Mausmodell den Vorteil, mittels *in vivo*-Mikroskopie pathophysiologische Prozesse zu visualisieren. Durch die Nutzung etablierter Verfahren könnten so sepsisassoziierte Prozesse in beispielsweise Leber, Niere, Lunge und Herz dargestellt, beobachtet und *in situ* quantifiziert werden [152-155].

4.6.2 Thrombozytendysfunktion als klinischer Marker für Sepsis-Diagnose und Prognose?

Um eine frühzeitige Sepsis-Diagnose zu ermöglichen, wurden bis heute zahlreiche Biomarker entwickelt. Über 250 wurden bereits in Studien hinsichtlich ihrer diagnostischen und/oder prognostischen Aussage getestet [156]. Auch verschiedene thrombozytäre Parameter wurden als Biomarker diskutiert. Die Thrombozytenzahl ist ein etabliertes Kriterium im SOFA-Score und wurde in vielen Studien evaluiert [14, 157-159]. Ein erhöhtes Mittleres Plättchenvolumen (MPV) wurde von Kim *et al.* und von Tajarenmuang *et al.* als prognostischer Faktor bei Sepsis identifiziert [85, 160]. Muronoi und Kollegen fanden heraus, dass ein gesteigerter Anteil retikulierter Thrombozyten im Vollblut ein Indikator für ein schlechtes *Outcome* ist [161].

Erhöhte Plasma-Spiegel der löslichen GPVI-Ektodomäne sind mit einer erhöhten Mortalität bei Sepsis assoziiert [102].

Auch die Thrombozytenfunktion wurde bereits im Hinblick auf ihre diagnostische und prognostische Aussage bei Sepsis evaluiert. Adamzik und Kollegen fanden heraus, dass die Analyse der Aggregation nach Kollagen-Stimulation mittels Multiplate® ein geeigneter Parameter für Frühdiagnose und Prognose bei Sepsis darstellt [122]. Akinosoglou *et al.* beschreiben, dass eine Analyse der Thrombozytenfunktion mittels der P2Y12-Kartusche des VerifyNow® die prädiktive Aussage des SOFA-Scores verstärkt [120]. In unserer Studie konnten wir zeigen, dass die Thrombozytenhyporeaktivität bereits sehr früh im Krankheitsverlauf der Sepsis auftritt. Während bei Aufnahme noch 10 von 15 Patienten eine normale oder erhöhte Thrombozytenkonzentration im Vollblut hatten und sich eine Thrombozytopenie erst im Krankheitsverlauf entwickelte (im Mittel nach 1,6 Tagen), wiesen 14 von 15 Patienten bei Aufnahme auf die Intensivstation bereits einen ausgeprägten GPVI-Defekt in der Durchflusszytometrie auf.

Die frühe Präsenz des Thrombozytenfunktionsdefekts in fast allen Patienten macht diesen zu einem vielversprechenden zukünftigen Biomarker zur Sepsis-Frühdiagnostik. Auch aus technischer Sicht könnte die Implikation in den klinischen Alltag möglich sein. Der Assay ist in kurzer Zeit mit geringer *Hands on*-Zeit durchführbar und könnte potentiell voll automatisiert werden. Der Bedarf an Patientenmaterial ist mit lediglich 50 bis 100 µl Vollblut sowie geringen Antikörpervolumina überschaubar. Da der Funktionsdefekt bei CRP-X_L- oder ADP-Stimulation am ausgeprägtesten war, wären beide Agonisten interessant für eine weitere Erprobung. Allerdings ist ADP durch die große Anzahl an Patienten, welche mittels dualer Thrombozyteninhibition (ASS+P2Y12-Rezeptor-Antagonist) therapiert werden, potentiell störanfällig [162]. Darüber hinaus war der Funktionsdefekt nicht so stark ausgeprägt wie nach CRP-X_L-Stimulation. Um eine detaillierte Aussage über den Nutzen der GPVI-Hyporeaktivität in der Sepsis-Frühdiagnostik und die prognostische Aussage des Tests machen zu können, sind weitere Arbeiten nötig (Siehe Kapitel 4.5).

4.7 Zusammenfassende Bemerkungen

In dieser hypothesenbildenden Pilotstudie wurde die Thrombozytenfunktion bei Sepsis mit einer breiten Anzahl an Assays in engmaschiger Testung untersucht. Die Vielzahl an Methoden (Durchflusszytometrie, Aggregometrie, Immunoblot, Kreuzinkubation) ermöglichte es, die Entstehung der Thrombozytenfunktionsstörung und die Funktionalität einzelner Signalkaskaden zu untersuchen. Durch das prospektive, translationale Studiendesign konnte jeder Patientenverlauf begleitet werden sowie klinische und experimentelle Parameter damit korreliert werden. Trotz der großen Heterogenität der Studienpopulation zeigten überraschenderweise alle Patienten den gleichen homogenen Thrombozytenfunktionsdefekt, welcher nach GPVI-Stimulation am stärksten ausgeprägt war.

Wir konnten in einer Folgearbeit während der COVID-19 Pandemie zeigen, dass auch bei SARS-CoV-2-Infektion ein GPVI-Defekt auftritt. Derzeit soll in einer größeren Kohorte evaluiert werden, ob der GPVI-Defekt bereits bei einfachen Infektionserkrankungen oder erst bei einer foudroyant verlaufenden Sepsis/Septischem Schock nachweisbar ist. In zukünftigen Arbeiten sollen darüber hinaus Pathologien der neonatalen Sepsis und Effekte von Interventionen wie einer extrakorporalen Membranoxygenierung auf die Thrombozytenfunktion untersucht werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sowie der Folgestudien sollen zukünftigen Patienten mit Sepsis zugutekommen und helfen, deren Krankheit besser zu verstehen, früher zu diagnostizieren und effektiver zu therapieren.

5 Literaturverzeichnis

- 1 Fleischmann C, Thomas-Rueddel DO, Hartmann M, Hartog CS, Welte T, Heublein S *et al.* Hospital Incidence and Mortality Rates of Sepsis. *Dtsch Arztebl Int* 2016; 113: 159-166.
- 2 Hall MJ, Williams SN, DeFrances CJ, Golosinskiy A. Inpatient care for septicemia or sepsis: a challenge for patients and hospitals. *NCHS Data Brief* 2011: 1-8.
- 3 Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NK, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P *et al.* Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am J Respir Crit Care Med* 2016; 193: 259-272.
- 4 Cohen J, Vincent JL, Adhikari NK, Machado FR, Angus DC, Calandra T *et al.* Sepsis: a roadmap for future research. *Lancet Infect Dis* 2015; 15: 581-614.
- 5 Stevenson EK, Rubenstein AR, Radin GT, Wiener RS, Walkey AJ. Two decades of mortality trends among patients with severe sepsis: a comparative meta-analysis*. *Crit Care Med* 2014; 42: 625-631.
- 6 Iwashyna TJ, Ely EW, Smith DM, Langa KM. Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *JAMA* 2010; 304: 1787-1794.
- 7 Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2013; 369: 2063.
- 8 Page DB, Donnelly JP, Wang HE. Community-, Healthcare-, and Hospital-Acquired Severe Sepsis Hospitalizations in the University HealthSystem Consortium. *Crit Care Med* 2015; 43: 1945-1951.
- 9 Gotts JE, Matthay MA. Sepsis: pathophysiology and clinical management. *BMJ* 2016; 353: i1585.
- 10 Vincent JL, Opal SM, Marshall JC, Tracey KJ. Sepsis definitions: time for change. *Lancet* 2013; 381: 774-775.
- 11 Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA *et al.* Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992; 101: 1644-1655.
- 12 Kaukonen KM, Bailey M, Bellomo R. Systemic Inflammatory Response Syndrome Criteria for Severe Sepsis. *N Engl J Med* 2015; 373: 881.
- 13 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.

Appendix

- 14 Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonca 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.
- 15 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.
- 16 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.
- 17 Opal SM, Garber GE, LaRosa SP, Maki DG, Freebairn RC, Kinasewitz GT *et al.* Systemic host responses in severe sepsis analyzed by causative microorganism and treatment effects of drotrecogin alfa (activated). *Clin Infect Dis* 2003; 37: 50-58.
- 18 Wiersinga WJ, Leopold SJ, Cranendonk DR, van der Poll T. Host innate immune responses to sepsis. *Virulence* 2014; 5: 36-44.
- 19 Stearns-Kurosawa DJ, Osuchowski MF, Valentine C, Kurosawa S, Remick DG. The pathogenesis of sepsis. *Annu Rev Pathol* 2011; 6: 19-48.
- 20 Esmon CT. The interactions between inflammation and coagulation. *Br J Haematol* 2005; 131: 417-430.
- 21 Hotchkiss RS, Dunne WM, Swanson PE, Davis CG, Tinsley KW, Chang KC *et al.* Role of apoptosis in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Science* 2001; 294: 1783.
- 22 Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Schmiege RE, Jr., Hui JJ, Chang KC *et al.* Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J Immunol* 2001; 166: 6952-6963.
- 23 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.
- 24 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.
- 25 Chen AX, Simpson SQ, Pallin DJ. Sepsis Guidelines. *N Engl J Med* 2019; 380: 1369-1371.

- 26 Mebazaa A, Geven C, Hollinger A, Wittebole X, Chousterman BG, Blet A *et al.* Circulating adrenomedullin estimates survival and reversibility of organ failure in sepsis: the prospective observational multinational Adrenomedullin and Outcome in Sepsis and Septic Shock-1 (AdrenOSS-1) study. *Crit Care* 2018; 22: 354.
- 27 De Backer D, Creteur J, Silva E, Vincent JL. Effects of dopamine, norepinephrine, and epinephrine on the splanchnic circulation in septic shock: which is best? *Crit Care Med* 2003; 31: 1659-1667.
- 28 Annane D, Bellissant E, Bollaert P, *et al.* Corticosteroids in the treatment of severe sepsis and septic shock in adults: A systematic review. *JAMA* 2009; 301: 2362-2375.
- 29 Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R *et al.* Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Medicine* (journal article) 2017; 43: 304-377.
- 30 Herold G. *Innere Medizin eine vorlesungsorientierte Darstellung.* Gerd Herold: Köln, 2017.
- 31 Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis* 2013; 13: 260-268.
- 32 Gando S, Shiraishi A, Yamakawa K, Ogura H, Saitoh D, Fujishima S *et al.* Role of disseminated intravascular coagulation in severe sepsis. *Thromb Res* 2019; 178: 182-188.
- 33 Franchini M, Lippi G, Manzato F. Recent acquisitions in the pathophysiology, diagnosis and treatment of disseminated intravascular coagulation. *Thromb J* 2006; 4: 4.
- 34 Taylor FB, Jr., Toh CH, Hoots WK, Wada H, Levi M, Scientific Subcommittee on Disseminated Intravascular Coagulation of the International Society on T *et al.* Towards definition, clinical and laboratory criteria, and a scoring system for disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost* 2001; 86: 1327-1330.
- 35 Toh CH, Hoots WK, ISTH SSCoDICot. The scoring system of the Scientific and Standardisation Committee on Disseminated Intravascular Coagulation of the International Society on Thrombosis and Haemostasis: a 5-year overview. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 604-606.
- 36 Bakhtiari K, Meijers JC, de Jonge E, Levi M. Prospective validation of the International Society of Thrombosis and Haemostasis scoring system for disseminated intravascular coagulation. *Crit Care Med* 2004; 32: 2416-2421.

- 37 Marx G. Fluid therapy in sepsis with capillary leakage. *Eur J Anaesthesiol* 2003; 20: 429-442.
- 38 Marx G, Vangerow B, Burczyk C, Gratz KF, Maassen N, Cobas Meyer M *et al.* Evaluation of noninvasive determinants for capillary leakage syndrome in septic shock patients. *Intensive Care Med* 2000; 26: 1252-1258.
- 39 Kirchner THM-H, H. K.; Roessner, A. *Grundmann Kurzlehrbuch Pathologie*, vol. 12. Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag: München, 2014.
- 40 Parikh SM, Mammoto T, Schultz A, Yuan HT, Christiani D, Karumanchi SA *et al.* Excess circulating angiopoietin-2 may contribute to pulmonary vascular leak in sepsis in humans. *PLoS Med* 2006; 3: e46.
- 41 Puhlmann M, Weinreich DM, Farma JM, Carroll NM, Turner EM, Alexander HR, Jr. Interleukin-1beta induced vascular permeability is dependent on induction of endothelial tissue factor (TF) activity. *J Transl Med* 2005; 3: 37.
- 42 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.
- 43 Kaplan JE, Saba TM. Platelet removal from the circulation by the liver and spleen. *Am J Physiol* 1978; 235: H314-320.
- 44 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.
- 45 Hoffmeister KM, Falet H. Platelet clearance by the hepatic Ashwell-Morrell receptor: mechanisms and biological significance. *Thromb Res* 2016; 141 Suppl 2: S68-72.
- 46 Blair P, Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev* 2009; 23: 177-189.
- 47 Heijnen H, van der Sluijs P. Platelet secretory behaviour: as diverse as the granules ... or not? *J Thromb Haemost* 2015; 13: 2141-2151.
- 48 Morrell CN, Aggrey AA, Chapman LM, Modjeski KL. Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells. *Blood* 2014; 123: 2759-2767.
- 49 Canobbio I, Balduini C, Torti M. Signalling through the platelet glycoprotein Ib-V-IX complex. *Cell Signal* 2004; 16: 1329-1344.
- 50 Huang J, Li X, Shi X, Zhu M, Wang J, Huang S *et al.* Platelet integrin alphaIIb beta3: signal transduction, regulation, and its therapeutic targeting. *J Hematol Oncol* 2019; 12: 26.

Appendix

- 51 Nieswandt B, Varga-Szabo D, Elvers M. Integrins in platelet activation. *J Thromb Haemost* 2009; 7 Suppl 1: 206-209.
- 52 Offermanns S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ Res* 2006; 99: 1293-1304.
- 53 Watson SP, Herbert JM, Pollitt AY. GPVI and CLEC-2 in hemostasis and vascular integrity. *J Thromb Haemost* 2010; 8: 1456-1467.
- 54 Alshehri OM, Hughes CE, Montague S, Watson SK, Frampton J, Bender M *et al.* Fibrin activates GPVI in human and mouse platelets. *Blood* 2015; 126: 1601-1608.
- 55 Claushuis TAM, de Vos AF, Nieswandt B, Boon L, Roelofs J, de Boer OJ *et al.* Platelet glycoprotein VI aids in local immunity during pneumonia-derived sepsis caused by gram-negative bacteria. *Blood* 2018; 131: 864-876.
- 56 Nieswandt B, Watson SP. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood* 2003; 102: 449-461.
- 57 Watson SP, Asazuma N, Atkinson B, Berlanga O, Best D, Bobe R *et al.* The role of ITAM- and ITIM-coupled receptors in platelet activation by collagen. *Thromb Haemost* 2001; 86: 276-288.
- 58 Dutting S, Bender M, Nieswandt B. Platelet GPVI: a target for antithrombotic therapy?! *Trends Pharmacol Sci* 2012; 33: 583-590.
- 59 Bertozzi CC, Schmaier AA, Mericko P, Hess PR, Zou Z, Chen M *et al.* Platelets regulate lymphatic vascular development through CLEC-2-SLP-76 signaling. *Blood* 2010; 116: 661-670.
- 60 Meng D, Luo M, Liu B. The Role of CLEC-2 and Its Ligands in Thromboinflammation. *Front Immunol* 2021; 12: 688643.
- 61 Coxon CH, Geer MJ, Senis YA. ITIM receptors: more than just inhibitors of platelet activation. *Blood* 2017; 129: 3407-3418.
- 62 Hou Y, Carrim N, Wang Y, Gallant RC, Marshall A, Ni H. Platelets in hemostasis and thrombosis: Novel mechanisms of fibrinogen-independent platelet aggregation and fibronectin-mediated protein wave of hemostasis. *J Biomed Res* 2015; 29.
- 63 Peyvandi F, Garagiola I, Baronciani L. Role of von Willebrand factor in the haemostasis. *Blood Transfus* 2011; 9 Suppl 2: s3-8.
- 64 Michelson AD. *Platelets*, vol. 3. Academic Press: New York City, 2013.
- 65 Ruggeri ZM, Mendolicchio GL. Adhesion mechanisms in platelet function. *Circ Res* 2007; 100: 1673-1685.

- 66 Rayes J, Watson SP, Nieswandt B. Functional significance of the platelet immune receptors GPVI and CLEC-2. *J Clin Invest* 2019; 129: 12-23.
- 67 Li Z, Delaney MK, O'Brien KA, Du X. Signaling during platelet adhesion and activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30: 2341-2349.
- 68 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.
- 69 de Stoppelaar SF, van 't Veer C, Claushuis TA, Albersen BJ, Roelofs JJ, van der Poll T. Thrombocytopenia impairs host defense in gram-negative pneumonia-derived sepsis in mice. *Blood* 2014; 124: 3781-3790.
- 70 Carbo C, del Conde I, Duerschmied D. Petechial bleeding after sunburn in a patient with mild thrombocytopenia. *Am J Hematol* 2009; 84: 523.
- 71 Ho-Tin-Noe B, Boulaftali Y, Camerer E. Platelets and vascular integrity: how platelets prevent bleeding in inflammation. *Blood* 2018; 131: 277-288.
- 72 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.
- 73 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.
- 74 Duerschmied D, Bode C, Ahrens I. Immune functions of platelets. *Thromb Haemost* 2014; 112: 678-691.
- 75 Valet C, Magnen M, Qiu L, Cleary SJ, Wang KM, Ranucci S *et al.* Sepsis promotes splenic production of a protective platelet pool with high CD40 ligand expression. *J Clin Invest* 2022; 132.
- 76 McMorran BJ, Marshall VM, de Graaf C, Drysdale KE, Shabbar M, Smyth GK *et al.* Platelets kill intraerythrocytic malarial parasites and mediate survival to infection. *Science* 2009; 323: 797-800.
- 77 Gaertner F, Ahmad Z, Rosenberger G, Fan S, Nicolai L, Busch B *et al.* Migrating Platelets Are Mechano-scavengers that Collect and Bundle Bacteria. *Cell* 2017; 171: 1368-1382 e1323.
- 78 Youssefian T, Drouin A, Masse JM, Guichard J, Cramer EM. Host defense role of platelets: engulfment of HIV and Staphylococcus aureus occurs in a specific subcellular compartment and is enhanced by platelet activation. *Blood* 2002; 99: 4021-4029.
- 79 Rayes J, Lax S, Wichaiyo S, Watson SK, Di Y, Lombard S *et al.* The podoplanin-CLEC-2 axis inhibits inflammation in sepsis. *Nat Commun* 2017; 8: 2239.

- 80 Hitchcock JR, Cook CN, Bobat S, Ross EA, Flores-Langarica A, Lowe KL *et al.* Inflammation drives thrombosis after Salmonella infection via CLEC-2 on platelets. *J Clin Invest* 2015; 125: 4429-4446.
- 81 Guo L, Shen S, Rowley JW, Tolley ND, Jia W, Manne BK *et al.* Platelet MHC class I mediates CD8+ T-cell suppression during sepsis. *Blood* 2021; 138: 401-416.
- 82 Knofler 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.
- 83 Perel A. Iatrogenic hemodilution: a possible cause for avoidable blood transfusions? *Crit Care* 2017; 21: 291.
- 84 Thorup CV, Christensen S, Hvas AM. Immature Platelets As a Predictor of Disease Severity and Mortality in Sepsis and Septic Shock: A Systematic Review. *Semin Thromb Hemost* 2020; 46: 320-327.
- 85 Kim CH, Kim SJ, Lee MJ, Kwon YE, Kim YL, Park KS *et al.* An increase in mean platelet volume from baseline is associated with mortality in patients with severe sepsis or septic shock. *PLoS One* 2015; 10: e0119437.
- 86 Buttarello M, Mezzapelle G, Freguglia F, Plebani M. Reticulated platelets and immature platelet fraction: Clinical applications and method limitations. *Int J Lab Hematol* 2020; 42: 363-370.
- 87 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.
- 88 Li Z, Zhang G, Le Breton GC, Gao X, Malik AB, Du X. Two waves of platelet secretion induced by thromboxane A2 receptor and a critical role for phosphoinositide 3-kinases. *J Biol Chem* 2003; 278: 30725-30731.
- 89 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.
- 90 Rabie T, Varga-Szabo D, Bender M, Pozgaj R, Lanza F, Saito T *et al.* Diverging signaling events control the pathway of GPVI down-regulation in vivo. *Blood* 2007; 110: 529-535.
- 91 Grundler K, Angstwurm M, Hilge R, Baumann P, Annecke T, Crispin A *et al.* Platelet mitochondrial membrane depolarization reflects disease severity in patients with sepsis and correlates with clinical outcome. *Crit Care* 2014; 18: R31.

Appendix

- 92 Rodelo JR, De la Rosa G, Valencia ML, Ospina S, Arango CM, Gomez CI *et al.* D-dimer is a significant prognostic factor in patients with suspected infection and sepsis. *Am J Emerg Med* 2012; 30: 1991-1999.
- 93 Watson CN, Kerrigan SW, Cox D, Henderson IR, Watson SP, Arman M. Human platelet activation by *Escherichia coli*: roles for FcγRIIA and integrin αIIbβ3. *Platelets* 2016; 27: 535-540.
- 94 Surewaard BGJ, Thanabalasuriar A, Zeng Z, Tkaczyk C, Cohen TS, Bardoel BW *et al.* alpha-Toxin Induces Platelet Aggregation and Liver Injury during *Staphylococcus aureus* Sepsis. *Cell Host Microbe* 2018; 24: 271-284 e273.
- 95 Jockel-Schneider Y, Kobsar A, Stellzig-Eisenhauer A, Vogel U, Stork S, Frantz S *et al.* Wild-type isolates of *Porphyromonas gingivalis* derived from periodontitis patients display major variability in platelet activation. *J Clin Periodontol* 2018; 45: 693-700.
- 96 Schmidt V, Hilberg T, Franke G, Glaser D, Gabriel HH. Paraformaldehyde fixation induces a systematic activation of platelets. *Platelets* 2003; 14: 287-294.
- 97 Ono S, Egawa G, Kabashima K. Regulation of blood vascular permeability in the skin. *Inflamm Regen* 2017; 37: 11.
- 98 Siddall E, Khatri M, Radhakrishnan J. Capillary leak syndrome: etiologies, pathophysiology, and management. *Kidney Int* 2017; 92: 37-46.
- 99 Beke Debreceni I, Mezei G, Batar P, Illes A, Kappelmayer J. Dasatinib Inhibits Procoagulant and Clot Retracting Activities of Human Platelets. *Int J Mol Sci* 2019; 20.
- 100 Nagy Z, Vogtle T, Geer MJ, Mori J, Heising S, Di Nunzio G *et al.* The Gp1ba-Cre transgenic mouse: a new model to delineate platelet and leukocyte functions. *Blood* 2019; 133: 331-343.
- 101 Tiedt R, Schomber T, Hao-Shen H, Skoda RC. Pf4-Cre transgenic mice allow the generation of lineage-restricted gene knockouts for studying megakaryocyte and platelet function in vivo. *Blood* 2007; 109: 1503-1506.
- 102 Montague SJ, Delierneux C, Lecut C, Layios N, Dinsdale RJ, Lee CS *et al.* Soluble GPVI is elevated in injured patients: shedding is mediated by fibrin activation of GPVI. *Blood Adv* 2018; 2: 240-251.
- 103 Morales-Ortiz J, Rondina MT, Brown SM, Grissom C, Washington AV. High Levels of Soluble Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-Like Transcript (TLT)-1 Are Associated With Acute Respiratory Distress Syndrome. *Clin Appl Thromb Hemost* 2018; 24: 1122-1127.
- 104 Gupta S, Cherpokova D, Spindler M, Morowski M, Bender M, Nieswandt B. GPVI signaling is compromised in newly formed platelets after acute thrombocytopenia in mice. *Blood* 2018; 131: 1106-1110.

- 105 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.
- 106 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.
- 107 Oberholzer C, Oberholzer A, Clare-Salzler M, Moldawer LL. Apoptosis in sepsis: a new target for therapeutic exploration. *FASEB J* 2001; 15: 879-892.
- 108 Wang SD, Huang KJ, Lin YS, Lei HY. Sepsis-induced apoptosis of the thymocytes in mice. *J Immunol* 1994; 152: 5014-5021.
- 109 Gyulkhandanyan AV, Mutlu A, Freedman J, Leytin V. Markers of platelet apoptosis: methodology and applications. *J Thromb Thrombolysis* 2012; 33: 397-411.
- 110 Leytin V, Allen DJ, Mutlu A, Gyulkhandanyan AV, Mykhaylov S, Freedman J. Mitochondrial control of platelet apoptosis: effect of cyclosporin A, an inhibitor of the mitochondrial permeability transition pore. *Lab Invest* 2009; 89: 374-384.
- 111 Cases A, Reverter JC, Escolar G, Sanz C, Lopez-Pedret J, Revert L *et al.* Platelet activation on hemodialysis: influence of dialysis membranes. *Kidney Int Suppl* 1993; 41: S217-220.
- 112 Reverter JC, Escolar G, Sanz C, Cases A, Villamor N, Nieuwenhuis HK *et al.* Platelet activation during hemodialysis measured through exposure of p-selectin: analysis by flow cytometric and ultrastructural techniques. *J Lab Clin Med* 1994; 124: 79-85.
- 113 Nair P, Hoechter DJ, Buscher H, Venkatesh K, Whittam S, Joseph J *et al.* Prospective observational study of hemostatic alterations during adult extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) using point-of-care thromboelastometry and platelet aggregometry. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2015; 29: 288-296.
- 114 Balle CM, Jeppesen AN, Christensen S, Hvas AM. Platelet Function During Extracorporeal Membrane Oxygenation in Adult Patients. *Front Cardiovasc Med* 2019; 6: 114.
- 115 DGAI. S3-Leitlinie Invasive Beatmung und Einsatz extrakorporaler Verfahren bei akuter respiratorischer Insuffizienz. *AWMF* 2017; 1.
- 116 Tschuor C, Asmis LM, Lenzlinger PM, Tanner M, Harter L, Keel M *et al.* In vitro norepinephrine significantly activates isolated platelets from healthy volunteers and critically ill patients following severe traumatic brain injury. *Crit Care* 2008; 12: R80.

- 117 Larsson PT, Wallen NH, Hjemdahl P. Norepinephrine-induced human platelet activation in vivo is only partly counteracted by aspirin. *Circulation* 1994; 89: 1951-1957.
- 118 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.
- 119 Russwurm S, Vickers J, Meier-Hellmann A, Spangenberg P, Bredle D, Reinhart K *et al.* Platelet and leukocyte activation correlate with the severity of septic organ dysfunction. *Shock* 2002; 17: 263-268.
- 120 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.
- 121 Yaguchi A, Lobo FL, Vincent JL, Pradier O. Platelet function in sepsis. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 2096-2102.
- 122 Adamzik M, Gorlinger 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.
- 123 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.
- 124 Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med* 1985; 13: 818-829.
- 125 Knaus WA, Zimmerman JE, Wagner DP, Draper EA, Lawrence DE. APACHE-acute physiology and chronic health evaluation: a physiologically based classification system. *Crit Care Med* 1981; 9: 591-597.
- 126 Livingston BM, Mackenzie SJ, MacKirdy FN, Howie JC. Should the pre-sedation Glasgow Coma Scale value be used when calculating Acute Physiology and Chronic Health Evaluation scores for sedated patients? Scottish Intensive Care Society Audit Group. *Crit Care Med* 2000; 28: 389-394.
- 127 Gresele P, Subcommittee on Platelet Physiology of the International Society on Thrombosis and Hemostasis. Diagnosis of inherited platelet function disorders: guidance from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2015; 13: 314-322.
- 128 Pu Q, Wiel E, Corseaux D, Bordet R, Azrin MA, Ezekowitz MD *et al.* Beneficial effect of glycoprotein IIb/IIIa inhibitor (AZ-1) on endothelium in Escherichia coli endotoxin-induced shock. *Crit Care Med* 2001; 29: 1181-1188.

- 129 Taylor FB, Collier BS, Chang AC, Peer G, Jordan R, Engellener W *et al.* 7E3 F(ab')₂, a monoclonal antibody to the platelet GPIIb/IIIa receptor, protects against microangiopathic hemolytic anemia and microvascular thrombotic renal failure in baboons treated with C4b binding protein and a sublethal infusion of *Escherichia coli*. *Blood* 1997; 89: 4078-4084.
- 130 de Stoppelaar SF, van 't Veer C, van der Poll T. The role of platelets in sepsis. *Thromb Haemost* 2014; 112: 666-677.
- 131 Sharron M, Hoptay CE, Wiles AA, Garvin LM, Geha M, Benton AS *et al.* Platelets induce apoptosis during sepsis in a contact-dependent manner that is inhibited by GPIIb/IIIa blockade. *PLoS One* 2012; 7: e41549.
- 132 Seidel M, Winning J, Claus RA, Bauer M, Losche W. Beneficial effect of clopidogrel in a mouse model of polymicrobial sepsis. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 1030-1032.
- 133 Winning J, Neumann J, Kohl M, Claus RA, Reinhart K, Bauer M *et al.* Antiplatelet drugs and outcome in mixed admissions to an intensive care unit. *Crit Care Med* 2010; 38: 32-37.
- 134 Eisen DP. Manifold beneficial effects of acetyl salicylic acid and nonsteroidal anti-inflammatory drugs on sepsis. *Intensive Care Med* 2012; 38: 1249-1257.
- 135 Eisen DP, Reid D, McBryde ES. Acetyl salicylic acid usage and mortality in critically ill patients with the systemic inflammatory response syndrome and sepsis. *Crit Care Med* 2012; 40: 1761-1767.
- 136 Kor DJ, Lingineni RK, Gajic O, Park PK, Blum JM, Hou PC *et al.* Predicting risk of postoperative lung injury in high-risk surgical patients: a multicenter cohort study. *Anesthesiology* 2014; 120: 1168-1181.
- 137 Gross AK, Dunn SP, Feola DJ, Martin CA, Charnigo R, Li Z *et al.* Clopidogrel treatment and the incidence and severity of community acquired pneumonia in a cohort study and meta-analysis of antiplatelet therapy in pneumonia and critical illness. *J Thromb Thrombolysis* 2013; 35: 147-154.
- 138 Mayer K, Hein-Rothweiler R, Schupke S, Janisch M, Bernlochner I, Ndrepepa G *et al.* Efficacy and Safety of Revacept, a Novel Lesion-Directed Competitive Antagonist to Platelet Glycoprotein VI, in Patients Undergoing Elective Percutaneous Coronary Intervention for Stable Ischemic Heart Disease: The Randomized, Double-blind, Placebo-Controlled ISAR-PLASTER Phase 2 Trial. *JAMA Cardiol* 2021; 6: 753-761.
- 139 Schupke S, Hein-Rothweiler R, Mayer K, Janisch M, Sibbing D, Ndrepepa G *et al.* Revacept, a Novel Inhibitor of Platelet Adhesion, in Patients Undergoing Elective PCI-Design and Rationale of the Randomized ISAR-PLASTER Trial. *Thromb Haemost* 2019; 119: 1539-1545.

- 140 Levy MM, Artigas A, Phillips GS, Rhodes A, Beale R, Osborn T *et al.* Outcomes of the Surviving Sepsis Campaign in intensive care units in the USA and Europe: a prospective cohort study. *Lancet Infect Dis* 2012; 12: 919-924.
- 141 Andres O, Henning K, Strauss G, Pflug A, Manukjan G, Schulze H. Diagnosis of platelet function disorders: A standardized, rational, and modular flow cytometric approach. *Platelets* 2018; 29: 347-356.
- 142 Perez de Leon AA, Tabachnick WJ. Apyrase activity and adenosine diphosphate induced platelet aggregation inhibition by the salivary gland proteins of *Culicoides variipennis*, the North American vector of bluetongue viruses. *Vet Parasitol* 1996; 61: 327-338.
- 143 Wang HE, Shapiro NI, Griffin R, Safford MM, Judd S, Howard G. Chronic medical conditions and risk of sepsis. *PLoS One* 2012; 7: e48307.
- 144 Remick DG, Newcomb DE, Bolgos GL, Call DR. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. *Shock* 2000; 13: 110-116.
- 145 Ganopolsky JG, Castellino FJ. A protein C deficiency exacerbates inflammatory and hypotensive responses in mice during polymicrobial sepsis in a cecal ligation and puncture model. *Am J Pathol* 2004; 165: 1433-1446.
- 146 Hollenberg SM, Dumasius A, Easington C, Colilla SA, Neumann A, Parrillo JE. Characterization of a hyperdynamic murine model of resuscitated sepsis using echocardiography. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 891-895.
- 147 Doi K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Star RA. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. *J Clin Invest* 2009; 119: 2868-2878.
- 148 de Stoppelaar SF, Claushuis TA, Schaap MC, Hou B, van der Poll T, Nieuwland R *et al.* Toll-Like Receptor Signalling Is Not Involved in Platelet Response to *Streptococcus pneumoniae* In Vitro or In Vivo. *PLoS One* 2016; 11: e0156977.
- 149 Cunningham AF, Khan M, Ball J, Toellner KM, Serre K, Mohr E *et al.* Responses to the soluble flagellar protein FliC are Th2, while those to FliC on *Salmonella* are Th1. *Eur J Immunol* 2004; 34: 2986-2995.
- 150 Arman M, Krauel K. Human platelet IgG Fc receptor FcγRIIA in immunity and thrombosis. *J Thromb Haemost* 2015; 13: 893-908.
- 151 Cloutier N, Allaeyes I, Marcoux G, Machlus KR, Mailhot B, Zufferey A *et al.* Platelets release pathogenic serotonin and return to circulation after immune complex-mediated sequestration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018; 115: E1550-E1559.
- 152 Ueki H, Wang IH, Fukuyama S, Katsura H, da Silva Lopes TJ, Neumann G *et al.* In vivo imaging of the pathophysiological changes and neutrophil dynamics in influenza virus-infected mouse lungs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018; 115: E6622-E6629.

- 153 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.
- 154 Sedin J, Giraud A, Steiner SE, Ahl D, Persson AEG, Melican K *et al.* High Resolution Intravital Imaging of the Renal Immune Response to Injury and Infection in Mice. *Front Immunol* 2019; 10: 2744.
- 155 Lee S, Vinegoni C, Feruglio PF, Fexon L, Gorbato R, Pivoravov M *et al.* Real-time in vivo imaging of the beating mouse heart at microscopic resolution. *Nat Commun* 2012; 3: 1054.
- 156 Pierrakos C, Velissaris D, Bisdorff M, Marshall JC, Vincent JL. Biomarkers of sepsis: time for a reappraisal. *Crit Care* 2020; 24: 287.
- 157 Claushuis TA, van Vught LA, Scicluna BP, Wiewel MA, Klein Klouwenberg PM, Hoogendijk AJ *et al.* Thrombocytopenia is associated with a dysregulated host response in critically ill sepsis patients. *Blood* 2016; 127: 3062-3072.
- 158 Venkata C, Kashyap R, Farmer JC, Afessa B. Thrombocytopenia in adult patients with sepsis: incidence, risk factors, and its association with clinical outcome. *J Intensive Care* 2013; 1: 9.
- 159 Baughman RP, Lower EE, Flessa HC, Tollerud DJ. Thrombocytopenia in the intensive care unit. *Chest* 1993; 104: 1243-1247.
- 160 Tajarernduang P, Phrommintikul A, Limsukon A, Pothirat C, Chittawatanarat K. The Role of Mean Platelet Volume as a Predictor of Mortality in Critically Ill Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Crit Care Res Pract* 2016; 2016: 4370834.
- 161 Muronoi T, Koyama K, Nunomiya S, Lefor AK, Wada M, Koinuma T *et al.* Immature platelet fraction predicts coagulopathy-related platelet consumption and mortality in patients with sepsis. *Thromb Res* 2016; 144: 169-175.
- 162 Yin EB, Nguyen H, Kamat I, Bayat M, Alam M. Contemporary Prescription Patterns of Adenosine Diphosphate Receptor Inhibitors in Acute Coronary Syndrome. *P T* 2018; 43: 667-674.

6 Appendix

6.1 Abkürzungsverzeichnis

ADAM	<i>A Disintegrin and Metalloproteinase</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCL-X _L	<i>B Cell Lymphoma Extra Large</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
CASP	<i>Colon Ascendes Stent Peritonitis</i>
CCCP	Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazone
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CLEC-2	<i>C-type-lectin-like 2</i>
CLP	<i>Cecal ligation and puncture</i>
COPD	Chronische obstruktive Lungenerkrankung
COVID-19	<i>Coronavirus Disease 2019</i>
COX	Cyclooxygenase
CRP-X _L	<i>Collagen Related Peptide</i>
CVVH	Kontinuierliche veno-venöse Hämofiltration
DIG	Disseminierte Intravasale Gerinnung
ECMO	Extrakorporale Membranoxygenierung
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
Fc-Region	<i>Fragment Crystallizable Region</i>
FDA	<i>United States Food and Drug Administration</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GCS	<i>Glasgow coma scale</i>
GP	Glykoprotein
GPCR	G-Protein-gekoppelter-Rezeptor
Hb	Hämoglobin
HBV	Hepatitis-B Virus
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
ID	<i>Identification</i>
Ig	Immunglobulin
IL	<i>Interleukin</i>
IQR	Interquartilabstand
ITAM	<i>Immunoreceptor Tyrosine Activating Motif</i>
LAT	<i>Linker of Activated T cells</i>
LPS	Lipopolysaccharide
MAP	Mittlerer arterieller Druck
PAMP	<i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i>
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PFA	Paraformaldehyd
PGE ₁	Prostaglandin E1
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

Appendix

PPP	Plättchen-armes Plasma
PRP	Plättchen-reiches Plasma
RO's	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>Rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
sGPVI	lösliche GPVI Ektodomäne
SIRS	<i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i>
SOFA	<i>Sequential Organ Failure Assessment</i>
spp	<i>Species pluralis</i>
Syk	<i>Spleen tyrosine kinase</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TPO	<i>Thrombopoietin</i>
TRAP-6	<i>Thrombin Receptor Activator Peptide 6</i>
TRIS	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
Tyr	Tyrosin
v/v	<i>Volume to Volume</i>
vWF	von- Willebrand- Faktor
w/v	<i>Weight to Volume</i>

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gegenüberstellung der verschiedenen Sepsis-Kriterien.....	4
Abbildung 2: δ -Granula.....	8
Abbildung 3: Die GPVI- und CLEC-2-Signalkaskade.....	10
Abbildung 4: Algorithmus zur Studienaufnahme der Patienten.....	22
Abbildung 5: <i>Gating</i> der Thrombozytenpopulation.....	29
Abbildung 6: <i>Gating</i> der Thiazolorange-positiven Ereignisse.....	30
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Mepacrin-Assays.....	31
Abbildung 8: Thrombozytenzahl, Antigen-Oberflächenexpression und Thrombopoese.....	39
Abbildung 9: Expression des Fibrinogen- und vWF-Rezeptors.....	40
Abbildung 10: Untersuchung der Thrombozytenvoraktivierung.....	42
Abbildung 11: Durchflusszytometrische Messung der Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Aktivierung.....	44
Abbildung 12: Messung der CD62P-Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie.....	45
Abbildung 13: Thrombozytenfunktionsanalyse mittels Aggregometrie.....	47
Abbildung 14 Analyse der δ -Granula-Funktion mittels Mepacrin-Assay.....	48
Abbildung 15: Quantifizierung der (Hem-)ITAM-Rezeptorexpression und GPVI-Ektodomäne.....	50
Abbildung 16: Molekulare Analyse der (Hem-)ITAM-Rezeptor-Signaltransduktion.....	52
Abbildung 17: Molekulare Analyse der ITIM-Rezeptor-Signalkaskade.....	54
Abbildung 18: Stimulation von Thrombozyten mit erhöhter Dosis CRP-XL.....	56
Abbildung 19: Untersuchung der BCL-XL-Expression.....	57
Abbildung 20: Analyse des Einflusses von ABH-Inkompatibilität.....	58
Abbildung 21: Untersuchung des Einflusses von Sepsis-Plasma auf die Thrombozytenfunktion.....	60
Abbildung 22 Vollblut-Kreuzinkubation.....	61
Abbildung 23: Untersuchung der Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion.....	62
Abbildung 24: Fixation der Proben mittels 4% Paraformaldehyd.....	64
Abbildung 25: Vollblut-Bakterien-Co-Inkubation.....	66
Abbildung 26: Untersuchung älterer Probanden.....	67
Abbildung 27: Antibiotikainkubation.....	68
Abbildung 28 Assoziation der Thrombozytenfunktion mit <i>Outcome</i>	70

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: ISTH-DIG-Scoring-Schema	7
Tabelle 2: Liste der verwendeten Instrumente	15
Tabelle 3: Liste der verwendeten Reagenzien	15
Tabelle 4: Antikörperliste	16
Tabelle 5: Verwendete Immunoblot-Antikörper	25
Tabelle 6: Antikörpervolumina	29
Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Antibiotika in Inkubationsexperimenten	33
Tabelle 8: Übersicht über Outcome, Pathogene, Vorerkrankungen und Therapie der Patienten	34
Tabelle 9: Übersicht der isolierten Bakterienspezies und der verwendeten Antibiose	36
Tabelle 10: Laborwerte und SOFA-Score der Patienten	37
Tabelle 11: Charakterisierung der Sepsis-Pathogene.....	63
Tabelle 12: Übersicht Patienten und Assays.....	71
Tabelle 13: Übersicht der klinischen Studien zur Thrombozytenfunktion bei Sepsis	78

6.4 Publikationsliste

Teile der Doktorarbeit wurden vorab auf wissenschaftlichen Tagungen vorgestellt und als Originalarbeit veröffentlicht.

Konferenzen:

Lukas Johannes Weiss, Georgi Manukjan, Markus Kredel, Thiên-Trí Lâm, Bernhard Nieswandt, Dirk Weismann, and Harald Schulze: Altered Platelet Function in Patients with Sepsis. EUREKA International Symposium, 2018. Oral Communication.

Lukas Johannes Weiss, Georgi Manukjan, Markus Kredel, Thiên-Trí Lâm, Bernhard Nieswandt, Dirk Weismann, and Harald Schulze: Acquired Platelet GPVI Dysfunction As Possible Predictor for Early Sepsis Diagnosis and Poor Outcome. ASH Annual Meeting, 2019. Poster Presentation.

Lukas Johannes Weiss, Georgi Manukjan, Markus Kredel, Thiên-Trí Lâm, Bernhard Nieswandt, Dirk Weismann, and Harald Schulze: Acquired GPVI Deficiency Is a Biomarker for Early Diagnosis and Prognostic Assessment of Patients with Sepsis. ISTH Meeting, 2020. Poster Presentation.

Lukas Johannes Weiss, Georgi Manukjan, Mathis Weigel, Markus Kredel, Bernhard Nieswandt, Dirk Weismann, and Harald Schulze: Acquired Platelet GPVI Signaling Deficiency Occurs Early in Patients with Gram-Positive or Gram-Negative Sepsis. ISTH Meeting, 2021. Oral Communication.

Originalarbeit:

Lukas Johannes 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.

Patent:

WO2021023894; PCT/EP2020/072409; Method and means for diagnosing a human sepsis, 02/2021.

6.5 Danksagung

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Harald Schulze, für die Überlassung des Themas, die großartige Betreuung, die zahlreichen informativen Gespräche und das Vermitteln von Freude an Forschung danken. Darüber hinaus möchte ich mich bei den Mitarbeitern aus der Arbeitsgruppe bedanken. Dr. Georgi Manukjan und Nadine Winter haben mich bei Entwurf, Durchführung und Auswertung der Experimente stets unterstützt. Ein weiterer Dank gilt den vielen wissenschaftlichen und technischen Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Biomedizin, welche bei allen wissenschaftlichen Problemen stets geholfen haben.

Ich möchte mich außerdem bei PD Dr. Dirk Weismann bedanken, welcher uns bei allen klinischen Fragestellungen unterstützt hat und die Studie koordinierte. Ebenfalls gebührt den Kollegen der medizinischen Intensivstation M51 und der anästhesiologischen Intensivstation O53 Dank, ohne die unsere translationale Forschung nicht möglich gewesen wäre.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie, meiner Partnerin und meinen Freunden für die dauerhafte Unterstützung und Motivation bedanken, ohne welche die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

6.7 Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled Platelet Function Analysis in Septic Patients 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.

Würzburg, April 2022 _____.

6.8 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation Thrombozytenfunktionsanalyse bei Patienten mit 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.

Würzburg, April 2022 _____.