

Aus der Universitätsklinik für Anaesthesiologie und  
Intensivmedizin

Applikation der ENTPDase CD39 zur Inhibition der  
Aktivierung von Thrombozyten und Leukozyten  
während systemischer Inflammation

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

Glück, Christian

2019

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. A. Straub

2. Berichterstatter: Professor Dr. C.P. Berg

Tag der Disputation: 23.09.2019

**To the Mountains and my Family**

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>6</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>8</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>10</b>
1.1 Systemische Inflammation und Ihre Bedeutung im Rahmen der Sepsis.	10
1.2 Induktion systemischer Inflammation und die Rolle von Granulozyten	10
1.3 Interaktion der Immunabwehr und des Gerinnungssystems im Rahmen systemischer Inflammation	13
1.4 Klinische Definition des systemischen Inflammationssyndrom und der Sepsis	15
1.5 Epidemiologie der Sepsis	17
1.6 Rolle der Thrombozyten im Rahmen der systemischen Inflammation	18
1.6.1 Thrombozyten-Aktivierung und pharmakologische Thrombozyten-Inhibition	18
1.6.2 Thrombozyten-Inhibition	19
1.6.3 Thrombozyten-Leukozyten Interaktion	21
1.7 Ziel der vorliegenden Arbeit	21
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>23</b>
2.1 Prinzip der Durchflusszytometrie	23
2.2 Apyrase – Konzentrationsreihe	25
2.2.1 Blutentnahmen für in vitro Versuche	26
2.2.2 Durchflusszytometrie mit humanem Thrombozyten – Assay	26
2.2.3 Multiplate <sup>®</sup> Analyse	28
2.2.4 Versuchsdurchführung	29
2.3 ADP-Hydrolyse durch CD39 (targ-CD39 und nontarg-CD39)	31
2.4 Murines Sepsismodell	31
2.4.1 Anästhesie	32
2.4.2 Anlage eines zentralen Venenkatheters	32
2.4.3 Induktion eines septischen Krankheitsbildes	33
	3

2.4.4	Versuchsgruppen	33
<b>2.5</b>	<b>Intravitalmikroskopie im murinen Sepsismodell</b>	<b>35</b>
2.5.1	Versuchsaufbau	35
2.5.2	Präparation der murinen Cremastermuskulatur im Sepsismodell	38
2.5.3	Videosequenzanalyse	40
<b>2.6</b>	<b>Durchflusszytometrie murinen Blutes im Sepsismodell</b>	<b>41</b>
2.6.1	Muriner Thrombozyten – Assay	42
2.6.2	Versuchsdurchführung	43
<b>2.7</b>	<b>Organ-Untersuchungen im murinen Sepsismodell</b>	<b>44</b>
2.7.1	Histologische Untersuchungen muriner Organe	44
2.7.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	45
2.7.3	Immunhistochemische Färbungen	45
<b>2.8</b>	<b>Statistik</b>	<b>49</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>50</b>
<b>3.1</b>	<b>Apyrase Dosis-Wirkungs-Beziehung</b>	<b>50</b>
<b>3.2</b>	<b>Ergebnisse der Intravitalmikroskopie</b>	<b>51</b>
3.2.1	Thrombozyten-Endothel-Interaktion unter Applikation von Molekülen mit Apyrase-Aktivität	52
3.2.2	Inhibition leukozytärer Rollgeschwindigkeit	53
3.2.3	Inhibition der Leukozyten-Extravasation	54
3.2.4	Repräsentative Beispiele der Intravitalmikroskopie	55
<b>3.3</b>	<b>Durchflusszytometrische Analysen</b>	<b>57</b>
3.3.1	Bildung von Thrombozyten-Granulozyten bzw. Thrombozyten-Monozyten-Komplexen unter den Bedingungen LPS-induzierter Peritonitis unter Applikation von Molekülen mit Apyrase-Aktivität	57
3.3.2	Inhibition der Aktivierung von Granulozyten	58
3.3.3	Inhibition aktivierter Thrombozyten in Komplexen	59
<b>3.4</b>	<b>Histologische Untersuchungen</b>	<b>60</b>
3.4.1	Inhibition der Sequestrierung von Thrombozyten-Granulozyten-Komplexen in der peritonealen Mikrozirkulation	60
3.4.2	Inhibition der Sequestrierung von Thrombozyten-Granulozyten-Komplexen in der Leber	62

3.4.3	Inhibition der Sequestrierung von Thrombozyten-Granulozyten-Komplexen in der Niere	64
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>66</b>
4.1	Effekt von Molekülen mit Apyrase-Aktivität unter den Bedingungen systemischer Inflammation	66
4.2	Rolle der Thrombozyten im Rahmen septischer Krankheitsbilder	66
4.3	Der Effekt pharmakologischer Thrombozyten-Inhibition im Rahmen der Sepsis und systemischen Inflammation	68
4.4	Der antiinflammatorische Effekt von CD39	72
4.5	Limitationen und Ausblick	75
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>77</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>79</b>
<b>7</b>	<b>ERKLÄRUNGEN ZUM EIGENANTEIL</b>	<b>82</b>
<b>8</b>	<b>VERÖFFENTLICHUNGEN</b>	<b>83</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>84</b>

## **Abbildungsverzeichnis**

- Abb.1.: **SOFA-Score** aus Singer et al.
- Abb.2.: **Prinzip der Flusszelle in der Durchflusszytometrie**
- Abb.3.: **Differenzierungsstrategie im humanen Thrombozyten-Assay**
- Abb.4.: **Prinzip des Roche Multiplate<sup>®</sup> Analyzer**
- Abb.5.: **Verdünnung der Kartoffel-Apyrase für die Konzentrationsreihe**
- Abb.6.: **Zeitlicher Ablaufplan der Kartoffel-Apyrase Konzentrationsreihe**
- Abb.7.: **Zeitlicher Ablaufplan der Untersuchungen im Sepsismodell**
- Abb.8.: **Maushalterung für die Intravitalmikroskopie**
- Abb.9.: **Präparation der murinen Cremastermuskulatur**
- Abb.10.: **Differenzierungsstrategie im murinen Thrombozyten-Assay**
- Abb.11.: **Dosisabhängige Inhibition der Bildung von TGK in vitro, sowie des Aktivierungszustandes komplexgebundener Granulozyten durch Kartoffel-Apyrase**
- Abb.12.: **Multiplate<sup>®</sup> Messung (ADP Test) der Aktivierung von Thrombozyten durch ADP in Gegenwart von Kartoffel-Apyrase**
- Abb.13.: **Inhibition der Thrombozyten Adhärenz in vivo am Gefäßendothel nach Applikation von nontarg-CD39, Kartoffel-Apyrase und targ-CD39**
- Abb.14.: **Vergleich der in vivo Roll-Geschwindigkeit von Leukozyten**
- Abb.15.: **Inhibition der leukozytären Extravasation in umliegendes Gewebe durch Applikation von targ-CD39, nontarg-CD39 und Kartoffel-Apyrase**
- Abb.16.: **Intravitalmikroskopische Übersicht von Gefäßabschnitten der verschiedenen Behandlungsgruppen mit markierten Leukozyten und Thrombozyten**

- Abb.17.: **Intravitalmikroskopische Übersicht von Gefäßabschnitten der verschiedenen Behandlungsgruppen mit markierten Granulozyten und Thrombozyten im Optosplit**
- Abb.18.: **Inhibition der Bildung von TGK (CD42b<sup>+</sup>/ CD45<sup>+</sup>/Ly6G<sup>+</sup>) in vivo**
- Abb.19.: **Aktivierungszustand komplexgebundener Granulozyten, gemessen anhand der Mac-1 Expression (CD11b)**
- Abb.20.: **Aktivierungszustand komplexgebundener Thrombozyten, gemessen anhand der GPIIb/IIIa Expression**
- Abb.21.: **Targ-CD39 inhibiert die TGK-Extravasation in der peritonealen Mikrozirkulation**
- Abb.22.: **Übersicht repräsentativer immunhistochemischer Färbungen (CD41-CD7/4) von TGK in der peritonealen Mikrozirkulation in den verschiedenen Behandlungsgruppen**
- Abb.23.: **Inhibition der Extravasation von TGK in murines Lebergewebe durch Applikation von targ-CD39, nontarg-CD39 und Kartoffel-Apyrase**
- Abb.24.: **Übersicht repräsentativer immunhistochemischer Färbungen (CD41-CD7/4) von TGK in der hepatischen Mikrozirkulation in den verschiedenen Behandlungsgruppen**
- Abb.25.: **Inhibition der Extravasation von TGK in murines Nierengewebe durch Applikation von targ-CD39**
- Abb.26.: **Übersicht repräsentativer immunhistochemischer Färbungen (CD41-CD7/4) von TGK in der renalen Mikrozirkulation in den verschiedenen Behandlungsgruppen**



## Abkürzungsverzeichnis

ABC	–	Avidin-Biotin-Komplex
ADP	–	Adenosin-diphosphat
AK	–	Antikörper
AMP	–	Adenosin-monophosphat
ANOVA	–	Analysis of variance
ASS	–	Acetylsalicylsäure
ATP	–	Adenosin-triphosphat
CD	–	cluster of differentiation
CLP	–	cegal ligation and puncture
COX	–	Cyclooxygenase
DAMP	–	damage associated molecular pattern
DIC	–	Disseminierte Intravasale Koagulopathie
ECLS	–	Extrakorporaler Life Support
ECMO	–	Extrakorporale Membranoxygenierung
EKZ	–	Extrakorporale Blutzirkulation
GP	–	Glykoprotein
H&E	–	Hämatoxylin-Eosin
ICAM1	–	intercellular adhesion molecule 1
IQR	–	Interquartilsabstand
IL	–	Interleukin
KO	–	knock-out
LFA1	–	lymphocyte function-associated antigen 1
LPS	–	Lipopolysaccharid
NaCl	–	Natriumchlorid

NET	–	neutrophil extracellular trap
PAMP	–	pathogen associated molecular pattern
PBS	–	phosphate buffered saline
SEM	–	Standardabweichung
SIRS	–	systemisches Inflammationssyndrom
SOFA	–	Sequential Organ Failure Assessment
TGK	–	Thrombozyten-Granulozyten-Komplex
TLR	–	toll-like receptor
TNF $\alpha$	–	Tumor Nekrose Faktor $\alpha$
VCAM1	–	vascular cell-adhesion molecule 1
VLA4	–	very late antigen 4
WT	–	Wildtyp
ZNS	–	Zentrales Nervensystem

# 1 Einleitung

## 1.1 Systemische Inflammation und Ihre Bedeutung im Rahmen der Sepsis.

Akute Inflammation stellt die erste natürliche Reaktion des menschlichen Körpers auf einen schädigenden Umweltreiz (z.B.: Trauma oder Infektion) dar. Diese Reaktion wird durch das angeborene Immunsystem (innate immunity) vermittelt, verläuft unspezifisch und hat als Zweck, den schädigenden Reiz zu beseitigen. Es handelt sich dabei um eine lokale bzw. systemische Reaktion des Körpers mit Beteiligung von Immunzellen, unter anderem Granulozyten und Makrophagen, sowie Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine. Diese Zytokine vermitteln und induzieren die klinisch zu beobachtenden Zeichen einer Infektion, wie Fieber, Blutbildveränderungen, Erhöhung der Entzündungsparameter (C-reaktives Protein, Procalcitonin,...) und unterstützen so die lokale Infektabwehr. Kommt es zu einer anhaltenden und starken Stimulierung der Entzündungsreaktion durch ausgeprägte Schädigung von Gewebe, kann dies eine lebensbedrohliche systemische Inflammationsreaktion mit Organdysfunktion zur Folge haben [1].

## 1.2 Induktion systemischer Inflammation und die Rolle von Granulozyten

In der Initialphase einer Infektion oder Gewebeschädigung werden Mikroorganismen und Bestandteile beschädigter Zellen anhand ihrer charakteristischen Oberflächenstrukturen, sogenannten „pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs) bzw. „damage-associated molecular patterns“ (DAMPs), durch das angeborene Immunsystem erkannt [2, 3]. Dies führt zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine vor allem durch Makrophagen. Lipopolysaccharid (LPS), ein Bestandteil der Zellwand gram-negativer Bakterien und einer der wichtigsten PAMPs, wird durch den CD14-Rezeptor an der Oberfläche von Makrophagen gebunden und durch „toll-like 4-Rezeptoren“ (TLR4) spezifisch detektiert. Über eine Reihe von Signalkaskaden führt dies zur

Aktivierung der Makrophagen mit nachfolgender Sekretion proinflammatorischer Mediatoren. Diese Mediatoren vermitteln weiter die Rekrutierung von Leukozyten in betroffenes Gewebe während der Inflammationsreaktion [2].

Die Transmigration von Leukozyten aus postkapillären Venolen stellt dabei einen der wichtigsten Schritte in der angeborenen Immunabwehr dar [3]. Die Rekrutierung und Migration verläuft in verschiedenen Phasen. Vermittelt durch verschiedene Rezeptoren kommt es zwischen den frei im Blut fließenden Leukozyten und dem Gefäßendothel zu einer ersten leichten Interaktion. In entzündetem Gewebe exprimieren Zellen des Gefäßendothels P- und E-Selektin und verstärken diese Interaktion über „P-Selektin Glykoprotein Ligand 1“ (PSGL1) auf Leukozyten, sodass diese getrieben durch die Scherkräfte des Blutflusses am Gefäßendothel entlang „rollen“. Durch L-Selektin und PSGL1 kommt es zusätzlich zu Interaktionen zwischen den Leukozyten, die somit weitere Leukozyten aktivieren und rekrutieren können [4]. In stärker entzündetem Gewebe kommt es durch Zellen des Gefäßendothels außerdem zur Expression von „intercellular adhesion molecule 1“ (ICAM1) und „vascular cell-adhesion molecule 1“ (VCAM1), die an „lymphocyte function-associated antigen 1“ (LFA1) bzw. „very late antigen 4“ (VLA4), auf Leukozyten binden. Dadurch kommt es zu einer Verlangsamung der Leukozyten-Rollgeschwindigkeit auf unter 5  $\mu\text{m}/\text{sec}$ , bis die Leukozyten schließlich vollständig am Endothel anhaften [3, 4]. Die während einer Inflammationsreaktion sezernierten Zytokine führen bei den langsam „rollenden“ Leukozyten über ein sogenanntes „inside-out stimulatory signal“ via G-Protein gekoppelter Rezeptoren zur Aktivierung der Leukozyten. Mit Hilfe des Aktinzytoskeletts können die aktivierten und anhaftenden Leukozyten dem Gefäßendothel entlang nach passenden Transmigrationsstellen suchen, was als „crawling“ bezeichnet wird. Durch ICAM1 und VCAM1 vermittelte molekulare Veränderungen am Endothel führen schließlich zur Transmigration der Leukozyten. Diese migrieren überwiegend parazellulär (ca. 70-90%) durch Zell-Verbindungen benachbarter Endothelzellen. In bestimmten Geweben, beispielsweise dem zentralen Nervensystem (ZNS) oder z.T. in entzündetem Gewebe, ist auch eine transzelluläre Migration möglich [3]. Durch eine ICAM1

vermittelte Auflockerung der Endothelzell-Verbindungen wird den Leukozyten die parazelluläre Migration ermöglicht. Um vollständig aus dem Gefäßsystem zu transmigrieren, müssen die Leukozyten auch die Perizyten und die Basalmembran überwinden. Perizyten liegen in der Basalmembran und umhüllen die Gefäßendothelzellen. Sie haben wichtige Funktionen in Aufbau und Wachstum der Gefäße und können zusätzlich einige entscheidende Oberflächenmoleküle, wie z.B. ICAM1, VCAM1, Chemokin- und Zytokin-Rezeptoren, exprimieren. Damit fällt den Perizyten eine wichtige Funktion in der Regulation der primären Immunreaktion zu. Die exprimierten Rezeptoren unterstützen und leiten transmigrierende Leukozyten zu den Orten der Inflammation. Die Basalmembran, bestehend aus einem Proteinkomplex von Laminin und Kollagen IV, stellt eine solide, sehr wichtige Barriere gegenüber anderen Zellen dar. Es ist daher noch nicht vollständig verstanden, wie Leukozyten diese überwinden können. Die plausibelste Erklärung geht davon aus, dass es bestimmte Regionen gibt, die für Leukozyten entsprechend durchlässig sind [3, 4].

Insbesondere neutrophile Granulozyten, Hauptanteil (50-70%) der im Blut zirkulierenden Leukozyten, besitzen als Effektor-Zellen des angeborenen Immunsystems wichtige Funktionen bei der initialen Reaktion in der Inflammation [5, 6]. So können z.B. Granulozyten durch Antikörper (AK) und Komplementfaktoren „markierte“ Mikroorganismen detektieren und phagozytieren. Dabei sind zwei verschiedene Mechanismen bekannt, welche in vivo parallel ablaufen. Mit Hilfe der Oxidation von NADPH produzieren neutrophile Granulozyten Sauerstoffradikale innerhalb ihrer Phagosomen. Die phagozytierten Pathogene werden damit oxidativem Stress ausgesetzt, der diese schädigt. Darüber hinaus fusionieren Phagosomen, die phagozytierte Mikroorganismen enthalten, mit intrazellulären Lysosomen. Diese Lysosomen enthalten verschiedene Peptide, z.B. Defensine und Proteasen, wie Elastase, Cathepsin G und Proteinase 3, die in den so entstehenden Phagolysosomen eine antimikrobielle Wirkung entfalten [5, 7].

Bei schwerer systemischer Inflammation kommt es zur überschießenden Produktion von Sauerstoffradikalen und zur extrazellulären Freisetzung von Proteasen, wodurch körpereigene Gewebe geschädigt werden [5].

Zusätzlich besitzen neutrophile Granulozyten einen weiteren Mechanismus zur Bekämpfung von Mikroorganismen, sogenannte „neutrophil extracellular traps“ (NETs). Es handelt sich dabei um aus DNA-Bestandteilen (Chromatin-filamente), Histonen und verschiedenen Proteinen aus intrazellulären Lysosomen der Granulozyten gebildete, netzförmige Makromoleküle. Durch proinflammatorische Stimuli, beispielsweise durch IL-8, TNF $\alpha$  oder LPS, kommt es zur NET-Bildung (NETosis), wodurch Mikroorganismen fixiert und destruiert werden. Granulozyten, die NETs bilden gehen in der Regel dabei zugrunde. Trotz ihrer antimikrobiellen Wirkung können NETs bei unkontrollierter Bildung, wie beispielsweise in der Sepsis, körpereigenes Gewebe schädigen [5, 8].

All diese Mechanismen weisen den Granulozyten entscheidende Bedeutung als Effektorzellen der innate immunity zu.

### **1.3 Interaktion der Immunabwehr und des Gerinnungssystems im Rahmen systemischer Inflammation**

Die gleichzeitige bzw. gegenseitige Aktivierung von Blutgerinnung und angeborenem Immunsystem stellt einen der grundlegendsten Mechanismen des menschlichen Körpers dar. Infektionen entstehen in der Regel in Zusammenhang mit einer Gewebsverletzung, weshalb eine gleichzeitige Aktivierung der verschiedenen Systeme dem zusätzlichen Schutz des Organismus vor der Ausbreitung einer Infektion bzw. dem lebensbedrohlichen Blutverlust dient. Im Laufe der Evolution hat sich dies als entscheidender und wichtiger Überlebensvorteil erwiesen, solange die Entzündungsreaktion lokal und kontrolliert bleibt [9, 10].

Sauter et al. konnten 2018 zeigen, dass auf Thrombozyten die Expression von Anaphylatoxin-Rezeptor (C3aR) eine starke Korrelation mit dem aktivierten Glykoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) aufweist. Das Komplementsystem ist ein

wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems und besteht aus verschiedenen löslichen Faktoren im Blutplasma. Bei Aktivierung durch Pathogene kommt es über den klassischen Aktivierungsweg oder den Lektin-Weg zur Bildung von C3a, dem aktivierten Komplementfaktor 3. Dieser vermittelt zum einen selbst eine erste Abwehrreaktion (Komplement-vermittelte Lyse), und stellt darüber hinaus einen proinflammatorischen Mediator dar. Weiter konnten Sauter et al. eine verlängerte Blutungszeit bei Mäusen mit fehlendem C3aR nachweisen, sowie eine gesteigerte Thrombozyten-Adhärenz an Endothelzellen nach Stimulation mit C3a. Dies unterstreicht die besondere Bedeutung der engen Verbindung zwischen angeborenem Immunsystem und Blutgerinnung [11].

Im Zuge einer systemischen Entzündungsreaktion laufen prinzipiell dieselben Prozesse wie bei einer lokalen Entzündung ab. Dabei kann es bei einer systemischen Entzündungsreaktion jedoch zu einer generalisierten und diffusen Endothelschädigung mit systemischer Expression von Thromboplastin (Tissue Faktor) auf dem subendothelialen Gewebe oder auf Leukozyten kommen. Eine solch überschießende Reaktion führt zu einer systemischen Aktivierung der Blutgerinnung [2, 12]. Dabei entstehen multiple Thromben in den Blutkapillaren, Thrombozyten und Gerinnungsfaktoren werden aktiviert und konsekutiv verbraucht. In diesem Fall spricht man von einer Verbrauchskoagulopathie oder disseminierten intravasalen Koagulopathie (DIC). Die Behinderung der Mikrozirkulation durch thrombotische Gefäßverschlüsse während der Sepsis führt zum Bild einer septischen Vaskulopathie mit lokaler Mikrozirkulationsstörung und sekundärer Organ-dysfunktion bzw. Organversagen. Im Verlauf der Koagulopathie kann sich dann sekundär auch eine Hyperfibrinolyse mit generalisierter Blutungsneigung einstellen [12]. Die in der Mikrozirkulation haftenden Thrombozyten-Granulozyten-Komplexe (TGK) können die Endothelzellen durch die sezernierten proinflammatorischen Zytokine schädigen und die Endothelbarriere beeinträchtigen. Die gestörte Endothelbarriere hat wiederum eine erhöhte Gefäßpermeabilität zur Folge, was zwar die Transmigration der Granulozyten und Monozyten in das umliegende Gewebe begünstigt und so die Abwehrreaktion fördert, aber gleichzeitig die

starke Ödembildung und sekundäre Organschädigung erklärt, die während einer Sepsis häufig beobachtet werden kann [13-15].

Ein Großteil der Patienten mit SIRS bzw. Sepsis zeigt Veränderungen der Blutgerinnung in unterschiedlich schweren Ausprägungen. Dies kann von unbedeutenden Blutbildveränderungen über eine verminderte Thrombozyten-Anzahl mit verlängerter Blutungszeit bis hin zur schweren DIC mit intravasaler Thrombusbildung und ausgeprägter Mikrozirkulationsstörung reichen. Auf Grund der sehr variablen klinischen Manifestation und der noch nicht in allen Aspekten verstandenen Pathophysiologie zählt die systemische Inflammation zu den schwerwiegendsten Erkrankungen und weist trotz moderner intensivmedizinischer Behandlungsmethoden eine hohe Sterblichkeit auf [12, 16, 17].

#### **1.4 Klinische Definition des systemischen Inflammationssyndrom und der Sepsis**

Das systemische Inflammationssyndrom (Systemic Inflammatory Response Syndrome; SIRS) stellt insgesamt eine der Hauptursachen für Mortalität, Morbidität und hohen Kostenaufwand in der Intensivmedizin dar. Die Diagnose eines SIRS wird nach Singer et al. [18] anhand der klinischen Kriterien Körpertemperatur, Herzfrequenz, Atemfrequenz und Leukozytenzahl im Blut gestellt, wobei mindestens zwei der vier Kriterien für die Diagnose erfüllt sein müssen (siehe Tabelle 1).



Tab.1.: **SIRS Kriterien**

SIRS ( <u>S</u> ystemic <u>I</u> nflammatory <u>R</u> esponse <u>S</u> yndrome)
Mindestens 2 Kriterien für Diagnose erforderlich:  Körpertemperatur: > 38°C oder < 36°C Herzfrequenz: > 90 /min Atemfrequenz: > 20 /min bzw. PaCO <sub>2</sub> < 32 mmHg Leukozyten: >12.000 /mm <sup>3</sup> oder < 4.000/mm <sup>3</sup> bzw. > 10% unreife Zellen
nach Singer et al. [18]

Wird die systemische Entzündungsreaktion durch eine Infektion mit einem Mikroorganismus (Bakterium, Virus, Parasit oder Pilz) ausgelöst, so spricht man nach der Definition aus dem Jahre 1991 von einer Sepsis. Kommt es dabei zu einer Organdysfunktion, so wird dies als schwere Sepsis bzw. bei persistierender Hypotonie trotz adäquater Volumentherapie mit Notwendigkeit zur Vasopressin-Therapie als septischer Schock bezeichnet [12, 18]. Ein systemisches Inflammationssyndrom kann jedoch auch durch ein Trauma oder Blut-Fremdoberflächen-Kontakt, wie bei einer extrakorporalen Blutzirkulation (EKZ) an der Herz-Lungen-Maschine in der Herzchirurgie oder bei ECMO- (Extrakorporale Membranoxygenierung) bzw. ECLS- (Extrakorporaler Life Support) Behandlung auf Intensivstation induziert werden [19, 20].

Aktuell wurde 2016 (nach 1991 und 2001) auf der dritten Sepsis-Konsensus-Konferenz der amerikanischen Fachgesellschaften ein neuer Vorschlag zur Definition der Sepsis vorgestellt, der die Sepsis als überschießende Entzündungsreaktion auf eine Infektion mit resultierender Organdysfunktion definiert. Statt der wenig spezifischen SIRS-Kriterien wird in der neuen Sepsis-Definition der Aspekt der Organdysfunktion betont und zur Klassifikation der Erkrankungsschwere von Sepsis-Patienten mit Organdysfunktion der spezifischere SOFA- (Sequential Organ Failure Assessment) Score verwendet [18].

Table 1. Sequential [Sepsis-Related] Organ Failure Assessment Score<sup>a</sup>

System	Score				
	0	1	2	3	4
<b>Respiration</b>					
Pao <sub>2</sub> /Fio <sub>2</sub> , mm Hg (kPa)	≥400 (53.3)	<400 (53.3)	<300 (40)	<200 (26.7) with respiratory support	<100 (13.3) with respiratory support
<b>Coagulation</b>					
Platelets, ×10 <sup>3</sup> /μL	≥150	<150	<100	<50	<20
<b>Liver</b>					
Bilirubin, mg/dL (μmol/L)	<1.2 (20)	1.2-1.9 (20-32)	2.0-5.9 (33-101)	6.0-11.9 (102-204)	>12.0 (204)
<b>Cardiovascular</b>					
MAP ≥70 mm Hg	MAP <70 mm Hg	Dopamine <5 or dobutamine (any dose) <sup>b</sup>	Dopamine 5.1-15 or epinephrine ≤0.1 or norepinephrine ≤0.1 <sup>b</sup>	Dopamine >15 or epinephrine >0.1 or norepinephrine >0.1 <sup>b</sup>	
<b>Central nervous system</b>					
Glasgow Coma Scale score <sup>c</sup>	15	13-14	10-12	6-9	<6
<b>Renal</b>					
Creatinine, mg/dL (μmol/L)	<1.2 (110)	1.2-1.9 (110-170)	2.0-3.4 (171-299)	3.5-4.9 (300-440)	>5.0 (440)
Urine output, mL/d				<500	<200

Abbreviations: Fio<sub>2</sub>, fraction of inspired oxygen; MAP, mean arterial pressure; Pao<sub>2</sub>, partial pressure of oxygen.

<sup>a</sup> Adapted from Vincent et al.<sup>27</sup>

<sup>b</sup> Catecholamine doses are given as μg/kg/min for at least 1 hour.

<sup>c</sup> Glasgow Coma Scale scores range from 3-15; higher score indicates better neurological function.

Abb. 1.: **SOFA-Score** aus Singer et al. [18]

## 1.5 Epidemiologie der Sepsis

Eine Studie zur Epidemiologie der Sepsis in Deutschland aus dem Jahr 2013 zeigte einen Rückgang der Krankenhausletalität bei schwerer Sepsis, gleichzeitig dabei jedoch einen deutlichen Anstieg der Fallzahlen um durchschnittlich 5,7% pro Jahr auf 279.530 Fälle im Jahr 2013. Auch die Fallzahlen von Patienten mit septischem Schock stiegen seit dem Jahr 2010 von 22.326 auf 33.815 Patienten im Jahr 2013 deutlich an. Die Studie zeigte zudem, dass mit dem Alter die Häufigkeit der Sepsis und parallel dazu auch die Sterblichkeit zunehmen. Für das Jahr 2013 beliefen sich dadurch die Gesamtkosten für stationäre und anschließende ambulante Behandlung der Sepsis-Patienten in Deutschland auf 7,7 Milliarden Euro [21].

## **1.6 Rolle der Thrombozyten im Rahmen der systemischen Inflammation**

In der Sepsisforschung wurde zunächst der Inflammationsreaktion und den Makrophagen als Produzenten der Entzündungsmediatoren große Aufmerksamkeit geschenkt. In den vergangenen Jahren erkannte man jedoch zunehmend die große Bedeutung der Gerinnungsaktivierung während einer systemischen Entzündungsreaktion. Dabei kommt den Thrombozyten eine besondere Bedeutung zu. Heute werden Thrombozyten als Multi-Effektor Zellen angesehen, die neben ihrer wichtigen Aufgabe in der Hämostase auch eine zentrale Funktion in der Immunabwehr besitzen.

### **1.6.1 Thrombozyten-Aktivierung und pharmakologische Thrombozyten-Inhibition**

Unter Normalbedingungen sind die im Blutkreislauf zirkulierenden Thrombozyten inaktiv. CD41, auch bekannt als Integrin alpha-IIb (ITGA2B), Teil des GPIIb/IIIa Rezeptors für Fibrinogen auf Thrombozyten, befindet sich in normalem Zustand in seiner inaktiven Form auf der Thrombozytenoberfläche. Wird ein Thrombozyt durch eine Gefäßverletzung oder durch eine Entzündungsreaktion aktiviert, führt dies zu einer Konformationsänderung des GPIIb/IIIa-Rezeptors auf der Thrombozyten-Oberfläche, wobei sich der Rezeptor aus den Integrinen alpha-IIb (CD41) und beta-III (CD61) über Disulfidbrücken zusammensetzt. GPIIb/IIIa wird hierbei in einer Calcium-abhängigen Reaktion in seinen aktivierten Zustand überführt und bindet im Weiteren Fibrinogen aus dem Blutplasma. Die Bindung weiterer Thrombozyten aus der Blutzirkulation mittels GPIIb/IIIa an Fibrinogen führt zur Quervernetzung und Stabilisierung von Thrombozyten in Aggregaten und schließlich zur Thrombusbildung [22]. Zur Aktivierung umliegender Thrombozyten und Leukozyten im Rahmen der Koagulation und des Entzündungsgeschehens setzen Thrombozyten als Reaktion auf eine Aktivierung prothrombotische und proinflammatorische Mediatoren aus intrazellulären Granula frei. Die löslichen Thrombozyten-Agonisten Adenosin-diphosphat (ADP), Serotonin und

Thromboxan A<sub>2</sub> dienen hierbei einer autokrinen Verstärkung der Thrombozyten-Aktivierung [13, 14, 22, 23]. Proinflammatorische Chemokine und Zytokine, wie beispielsweise Interleukin 1 $\beta$  dienen hierbei einer Aktivierung und Rekrutierung weiterer Inflammationszellen [13, 14]. Um ihrer Rolle in der Gerinnung, aber auch bei Inflammationsreaktionen gerecht zu werden, besitzen Thrombozyten eine Vielzahl von Rezeptoren auf der Zelloberfläche. So können Thrombozyten nicht nur durch klassische Thrombozyten-Agonisten wie z.B. ADP über den P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub>-Rezeptor aktiviert werden, sondern ebenso wie Makrophagen auch „direkt“ durch LPS über den TLR-4 [22, 23].

### **1.6.2 Thrombozyten-Inhibition**

Auch bei kardiovaskulären Erkrankungen spielt die Aktivierung von Thrombozyten eine entscheidende Rolle [24]. Thrombozytenaggregationshemmer werden bereits seit längerem zur Prävention und Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen eingesetzt und gehören damit wohl zu den am häufigsten verschriebenen Medikamenten weltweit [25-28].

Acetylsalicylsäure (ASS), der bekannteste Thrombozytenaggregationshemmer, inhibiert die Cyclooxygenase (COX), was eine Thrombozyten-Aktivierung durch die verminderte Bildung des Thrombozyten-Agonisten Thromboxan A<sub>2</sub> verhindert. Auch wird durch ASS die Bildung einiger proinflammatorischer Mediatoren verhindert.

P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub>-Inhibitoren (z.B. Clopidogrel, Ticagrelor) blockieren die ADP Bindungsstelle, den P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub>-Rezeptor, auf der Thrombozytenoberfläche und vermitteln ihre antithrombotische Wirkung durch das Verhindern einer ADP vermittelten Thrombozyten-Aktivierung. Klassischerweise werden beide Medikamente (ASS plus P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub>-Blocker) bei kardiovaskulären Erkrankungen als sogenannte „duale Plättchenhemmung“ eingesetzt, da mit dieser Therapiestrategie ein signifikanter Überlebensvorteil nach Myokardinfarkt oder koronarer Revaskularisierung gezeigt werden konnte [28].

Andere Thrombozyten-Inhibitoren, wie die GPIIb/IIIa Antagonisten (z.B. Abiciximab), binden an den GPIIb/IIIa Rezeptor auf der Oberfläche von Thrombozyten und vermitteln ihre Wirkung durch „direkte“ Inhibition der Fibrinogenbindung und damit der Thrombozytenaggregation.

Es ist naheliegend, dass diese bereits bekannten Pharmaka in verschiedenen Studien zur Sepsis bereits eingesetzt und untersucht wurden [26, 27]. Im Darüberhinaus finden sich in der aktuellen Forschung auch einige experimentelle Substanzen zur Thrombozyten-Inhibition, welche unter Anderem auch in der hier vorliegenden Arbeit eingesetzt wurden. Dabei handelt es sich beispielsweise um Kartoffel-Apyrase und targ-CD39 [29, 30].

CD39 (Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolase-1; NTPDase-1) ist ein Enzym, das beim Menschen auf Endothelzellen exprimiert wird. Die ENTPDase-1 ist in der Lage ATP und ADP zu spalten und in AMP umzuwandeln. Da ADP einer der Hauptmediatoren der Thrombozyten-Aktivierung ist, besitzt CD39 eine antithrombotische Wirkung [31].

Die Arbeitsgruppe von Prof. K. Peter (Baker IDI Heart&Diabetes Institut, Melbourne, Australien) hat CD39 mit dem gegen den thrombozytären GPIIb/IIIa – Rezeptor in aktivierter Konformation gerichteten „single-chain antibody“ SCE5 (scFvSCE5-Antikörper) gekoppelt. Es wurde gezeigt, dass der über ein Phagen-Display selektierte scFvSCE5-AK spezifisch an den aktivierten GPIIb/IIIa Rezeptor auf Thrombozyten bindet. Für das Fusionsprotein wurde das CD39-Molekül gentechnisch durch Entfernung von zwei, für seine Funktion nicht relevanten Transmembrandomänen verkleinert und damit löslich gemacht (solCD39). Abschließend wurden die Gensequenzen des scFvSCE5-AK in einem Vektor mit solCD39 zusammengefügt und in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293F) exprimiert. Das auf diese Weise mit dem für den aktiven GPIIb/IIIa Rezeptor spezifischen scFvSCE5-AK verbundene CD39 wird als Target CD39 bezeichnet.

Ein analog hergestelltes CD39 Konstrukt mit dem nicht GPIIb/IIIa bindenden scFv-Antikörper mutMA2 anstelle des scFvSCE5-AK dient als Kontrollsubstanz und wird als nontarg-CD39 bezeichnet.

Um die beiden bivalenten Moleküle targ-CD39 und nontarg-CD39 vergleichen zu können, konnte in Enzymaktivitätsmessungen (Biolumineszenz-, Malachite Green Assay) die Enzymaktivität ermittelt, mit kommerziell erhältlichem CD39 (Abcam, UK) verglichen und so die Konzentration eingestellt werden [32].

### **1.6.3 Thrombozyten-Leukozyten Interaktion**

Eine weitere wichtige Funktion der Thrombozyten im Rahmen der Entzündungsreaktion ist die Interaktion mit Leukozyten. Hierbei spielt P-Selektin, das bei der Thrombozyten-Aktivierung auf der Zelloberfläche exprimiert wird, eine wichtige Rolle. P-Selektin vermittelt über PSGL1 die Interaktion von Thrombozyten mit Leukozyten bzw. dem Endothel [13, 23, 33]. Thrombozyten besitzen noch weitere Rezeptoren, wie beispielsweise EMMPRIN (CD147) und GPVI, die eine Interaktion mit dem Endothel bzw. mit Zellen des Immunsystems vermitteln [33, 34]. Eine Aktivierung von Thrombozyten während einer systemischen Entzündungsreaktion führt also zu einer Induktion der Blutgerinnung mit Formierung von Thrombozyten-Aggregaten, sowie zu weiteren Zellinteraktionen mit Bildung von Thrombozyten-Granulozyten-Komplexen [13, 15, 33].

### **1.7 Ziel der vorliegenden Arbeit**

Bedingt durch die Erkenntnisse über die zentrale Rolle der Thrombozyten während der systemischen Entzündungsreaktion und Sepsis ist es nur folgerichtig, zur therapeutischen Inhibition der systemischen Inflammation neue Therapieansätze zu entwickeln [14, 23]. Trotz intensiver Forschung der letzten Jahre gibt es aktuell bei der Behandlung von SIRS bzw. Sepsis, außer der Gabe von Antibiotika, der chirurgischen Sanierung eines infektiösen Fokus und supportiver intensivmedizinischer Maßnahmen leider keine weiteren, gesichert wirksamen Therapieansätze [13, 14].

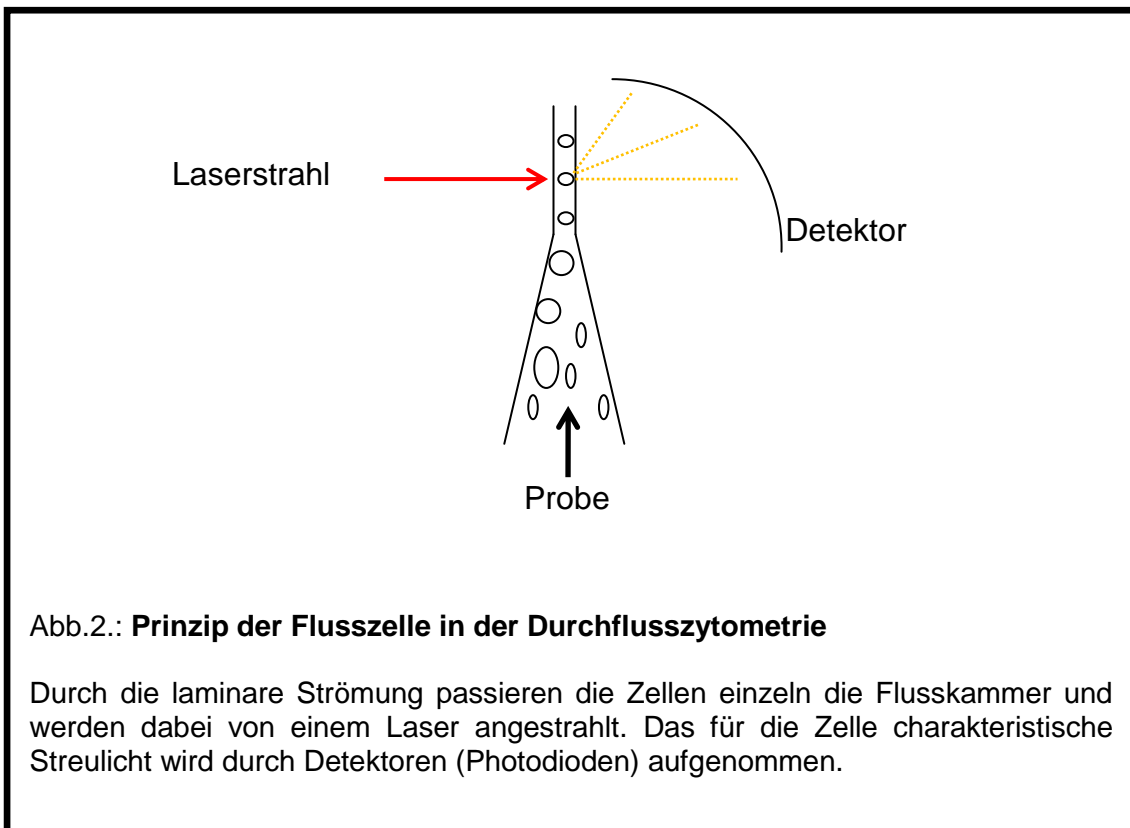
In Anbetracht der dargelegten essentiellen Rolle von Thrombozyten im Rahmen der systemischen Inflammation ist deshalb die grundlegende Idee dieser Arbeit, durch Inhibition der Thrombozyten-Aktivierung die durch Thrombozyten bzw. TKG's vermittelte septische Vaskulopathie und daraus resultierende

Organschädigungen zu vermindern oder zu vermeiden. Eine systemische Thrombozyten-Inhibition während einer systemischen Inflammationsreaktion ist jedoch aufgrund der resultierenden, generalisierten Blutungsneigung für einen potentiellen klinischen Einsatz kritisch zu sehen. Daher wurde in den hier beschriebenen Untersuchungen unter Anderem die Substanz targ-CD39 eingesetzt. Targ-CD39 ist ein Fusionsprotein, bestehend aus einem Antikörper gegen die aktivierte Form des GPIIb/IIIa Rezeptors auf Thrombozyten und dem ADP-spaltenden Enzym CD39 (NTPDase 1), welches durch Metabolisierung von ADP eine ADP-abhängige Thrombozyten-Aktivierung verhindert. Wie bereits in Vorpublikationen gezeigt, ist der Vorteil von targ-CD39 gegenüber einer generalisierten CD39 Applikation bzw. anderen, klassisch zur Thrombozytenaggregationshemmung eingesetzten Pharmaka, eine Vermeidung einer generalisierten Blutungsneigung, da durch die Koppelung von CD39 mit dem scFvSCE5-Antikörper die CD39-Wirkung gezielt an aktivierte Thrombozyten fokussiert wird [32]. In Anbetracht des reduzierten Blutungsrisiko und des Potentials zur Inhibition der Thrombozyten-Aktivierung könnte die Substanz targ-CD39 daher einen neuen, innovativen und vielversprechenden Ansatz zur Verhinderung einer Thrombozyten-vermittelten Vaskulopathie und damit verbundenen Organschädigung während systemischer Inflammation bzw. Sepsis darstellen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie stellt eine Messmethode dar, bei der sich mit Hilfe eines Lasers Zellsuspensionen analysieren lassen. Die Aufnahme der zu untersuchenden Zellen in das Durchflusszytometer erfolgt durch eine Kapillare aus einer Trägerflüssigkeit, wodurch eine hydrodynamische Strömung erzeugt wird. Diese laminare Strömung bewirkt, dass während der Messung die zu untersuchenden Zellen einzeln durch die Flusszelle fließen. Bei der Passage der Flusszelle werden die Zellen durch einen Laser angestrahlt. Dabei erzeugt jede Zelle ein charakteristisches Streulicht hinter bzw. seitlich der angestrahlten Zelle, das mit dem Volumen bzw. der intrazellulären Beschaffenheit (Granularität) der untersuchten Zelle korreliert.





Das Volumen der Zelle korreliert mit dem Vorwärts-Streulicht, dem sog. „Forward-Scatter = FSC“. Das Seitwärts-Streulicht, der sog. „Side-Scatter = SSC“ spiegelt dabei die Granularität und intrazelluläre Struktur der untersuchten Zelle wieder. Die Detektion des charakteristischen Streulichts einer Zelle erfolgt durch eine Photodiode, die das aufgezeichnete Signal in eine quantitative Information umwandelt. Die aufgezeichneten Informationen können in einem Dot-Plot (Punktdiagramm) mit FSC und SSC als Achsparameter aufgetragen und somit visualisiert werden. Mit dieser Methode lassen sich in sehr kurzer Zeit viele Zellen (> 1000 Zellen/sec) vermessen, sowie Aussagen über die Menge und Verteilung der Zellen verschiedener Zellpopulationen einer Probe treffen. Zudem können im Durchflusszytometer mit Hilfe von Fluoreszenz-markierten Antikörpern Oberflächenstrukturen, wie beispielsweise Rezeptorexpressionen quantitativ analysiert werden. Hierbei werden die an der Zelloberfläche gebundenen Fluoreszenz-Antikörper in der Flusszelle durch den Laserstrahl angeregt und das in Folge emittierte, charakteristische Fluoreszenzlicht über optische Filter ebenfalls auf Photodioden geleitet und in quantitative Informationen umgewandelt.

Das in der vorliegenden Arbeit in sämtlichen Experimenten verwendete Durchflusszytometer, FACS Canto II der Firma Becton Dickinson (BD, Franklin Lakes, NJ, USA), arbeitet mit drei Lasern unterschiedlicher Emissionsspektren (Violett = 405 nm; Blau = 488 nm; Rot = 633 nm). Dies ermöglichte in den Messungen die Verwendung von bis zu sechs Fluoreszenz-markierten Antikörpern zur Detektion von Oberflächenantigenen auf den untersuchten Zellen. Die Bedienung und Steuerung des verwendeten BD FACS Canto II erfolgte mit der BD FACS Diva™ Software (Version 6, BD, Heidelberg). Vor jeder durchgeführten Messung wurde das Gerät nach Herstellerangaben routinemäßig im Zytometer-Setup mit Standard-Partikeln (# 655051, BD, Heidelberg) kalibriert und für jede Messung optimiert. Hierbei wurde der FSC-Schwellenwert definiert, um bereits bei der Messung mögliche Störsignale durch kleine Partikel auszuschließen. Der Messbereich wurde dabei auch bereits auf die gesuchten Zellpopulationen von Thrombozyten und Leukozyten eingegrenzt. Des Weiteren wurden die aufzuzeichnende „Anzahl von

Ereignissen“ (= Anzahl aufgezeichneter Zellen im definierten Messbereich) festgelegt. Nach Beendigung der einzelnen Experimente wurden die aufgezeichneten Informationen als .fcs- Dateien abgespeichert und zur weiteren Analyse exportiert.

Durch die Verwendung von mehreren Antikörpern mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarben, kommt es zu einer partiellen Überlappung der verschiedenen Emissionsspektren (sog. „Spill-over“) der Fluoreszenzsignale, was zu einer Verfälschung der Messdaten führen kann. Daher wurde vor den durchgeführten Messungen eine Kompensationsreihe erstellt. Hierzu wurde die Fluoreszenz jedes der verwendeten Antikörper einzeln gemessen und das genaue Emissionsspektrum ermittelt. In der Auswertung war es nun möglich, jedem Fluoreszenzsignal den entsprechenden Antikörper mit der genauen Fluoreszenzintensität und Anzahl aufgezeichneter Ereignisse zuzuordnen.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Software Flow-Jo (Ver. 9.3.2, Ashlan-Oregon, USA). Hierbei wurden die aufgezeichneten Zellpopulationen nach Größe, intrazellulärer Struktur und Fluoreszenz definiert und in der Software markiert. Die anhand von FSC und SSC grob eingegrenzten Zellpopulationen wurden weiter durch gegen spezifische Oberflächenstrukturen gerichtete Fluoreszenz-markierte Antikörper charakterisiert, was die genaue Zuordnung der Zellen ermöglichte. Die so differenzierten Zellpopulationen wurden in der Software dann als positiv markiert und anschließend der prozentuale Anteil von Zellen mit positivem Fluoreszenzsignal eines Antikörpers gegen ein speziell angefarbtes Antigen innerhalb der ursprünglichen Zellpopulation berechnet.

## **2.2 Apyrase – Konzentrationsreihe**

Zur Identifizierung einer optimalen Konzentration von Kartoffel-Apyrase (A 6535, Sigma Aldrich, München) zur Thrombozyten-Inhibition in weiteren Experimenten, wurde zunächst die Thrombozyten-Aktivierung in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen der Kartoffel-Apyrase gemessen. Kartoffel-

Apyrase ist ein aus Kartoffeln isoliertes Enzym, das Adenosintriphosphat (ATP) bzw. ADP spaltet und zu Adenosinmonophosphat (AMP) umwandelt.

### **2.2.1 Blutentnahmen für in vitro Versuche**

Nach Aufklärung und Einverständniserklärung wurde freiwilligen Probanden mit Hilfe einer 21-Gauge Butterfly-Kanüle (Safety Multifly Kanüle 21G 200mm lang, Sarstedt, Nümbrecht) mit Multiadapter Blut in vorbereitete Citrat-Blutröhrchen (S-Monovette<sup>®</sup> 3.0 ml 9NC, Sarstedt, Nümbrecht) abgenommen. Bei der Abnahme wurde vor allem darauf geachtet, eine Thrombozyten-Aktivierung durch Scherkräfte oder starke venöse Stauung zu vermeiden. Freiwillige Probanden hatten für mindestens zwei Wochen keine gerinnungshemmenden Medikamente, insbesondere keine Acetylsalicylsäure (ASS) eingenommen. Des Weiteren wurden Nikotin-, und Drogenkonsum, sowie akute Infektionserkrankungen wie virale Hepatitiden oder eine HIV-Infektion als Ausschlusskriterium definiert. Sämtliche Blutentnahmen waren durch die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen, nach Projektnummer 168/2013BO2, genehmigt.

### **2.2.2 Durchflusszytometrie mit humanem Thrombozyten – Assay**

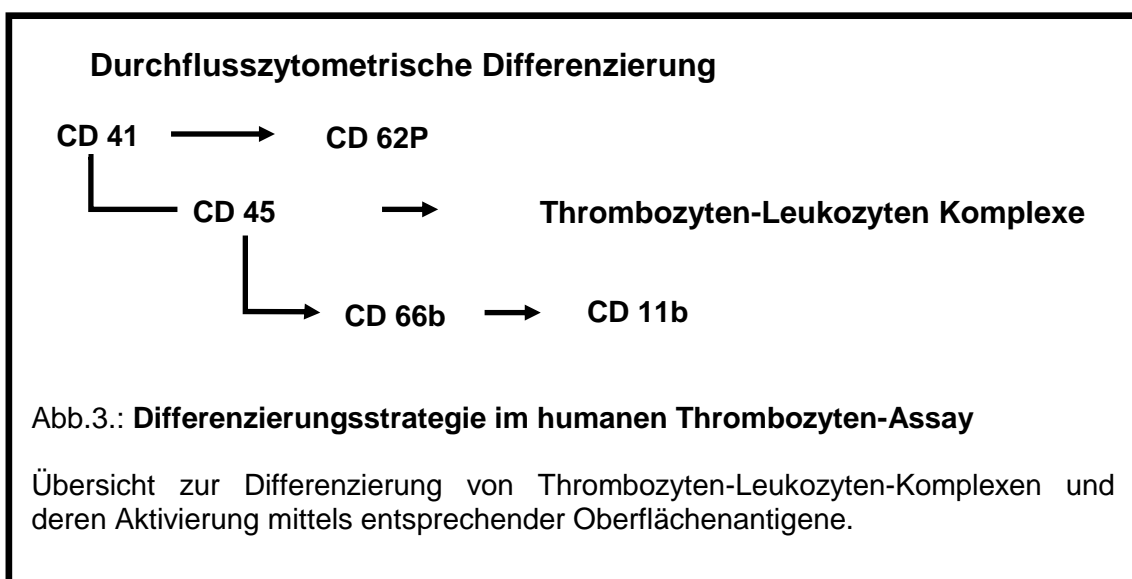
Zur Analyse der Thrombozyten-Inhibition durch Kartoffel-Apyrase wurde ein humaner Thrombozyten-Assay verwendet. [35]

Für die Detektion und Differenzierung der verschiedenen Zellen im Thrombozyten-Assay wurden folgende Fluoreszenz-Antikörper verwendet:

- 2,5 µl anti CD41-FITC AK (BeckmanCoulter GmbH, Krefeld)
- 1,5 µl anti CD62P-PE AK (BD, Heidelberg)
- 1,5 µl anti CD11b-BV421 (Biolegend, Fell)
- 1,5 µl anti CD45-PerCP (BeckmanCoulter GmbH, Krefeld)
- 2,5 µl anti CD66b-PECy7 (ebioscience, Frankfurt)
- 1,5 µl anti CD14-APC (Biolegend, Fell)

Die benutzten Antikörpermengen wurden in Vorversuchen mittels Titrationskurven bestimmt [35].

In der untersuchten Blutprobe wurden zunächst die Thrombozyten in einem FSC-SSC Dot-Plot eingegrenzt und mit dem anti CD41-AK positiv markiert. Der anti CD62P-AK erkennt und bindet P-Selektin, einen Rezeptor auf Thrombozyten, der für die Bindung von Leukozyten eine wichtige Rolle spielt. Mit diesem Antikörper lässt sich somit auch eine Aussage über den Aktivierungszustand der Thrombozyten treffen. Aktivierte Thrombozyten wurden so im Diagramm als CD41<sup>+</sup> / CD62P<sup>+</sup> Zellen differenziert. Die weiteren verwendeten Antikörper dienten der Untersuchung der Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten. Dazu wurden die Leukozyten zunächst mit anti CD45-AK gefärbt. Als Thrombozyten-Leukozyten-Komplexe wurden anschließend sämtliche CD41<sup>+</sup> / CD45<sup>+</sup> Ereignisse definiert. Zur weiteren Unterscheidung der Leukozyten-Populationen wurden die Granulozyten spezifisch mit dem anti CD66b-Ak detektiert (CD41<sup>+</sup> / CD45<sup>+</sup> / CD66b<sup>+</sup>). Für die Identifizierung von Monozyten und Makrophagen in der Leukozyten-Population wurde ein anti CD14-AK verwendet (CD41<sup>+</sup> / CD45<sup>+</sup> / CD14<sup>+</sup>). Nach Differenzierung der Leukozyten-Populationen wurde der Aktivierungsmarker Mac-1 in den CD66b<sup>+</sup> bzw. CD14<sup>+</sup> Subpopulationen mit Hilfe des anti CD11b-AK untersucht (CD41<sup>+</sup> / CD45<sup>+</sup> / CD14<sup>+</sup> / CD11b<sup>+</sup> bzw. CD41<sup>+</sup> / CD45<sup>+</sup> / CD66b<sup>+</sup> / CD11b<sup>+</sup>).



### 2.2.3 Multiplate® Analyse

Bei der Multiplate Analyse handelt es sich um einen klinischen Schnell-Test („point of care“ – Diagnostik) zur Untersuchung der Funktion von Thrombozyten bzw. der Identifikation der Wirkung potentiell applizierter Thrombozytenaggregationshemmer. Zur Thrombozytenfunktionsdiagnostik sind mehrere Testverfahren verfügbar, welche verschiedene physiologische Wege der Thrombozyten-Aktivierung überprüfen.

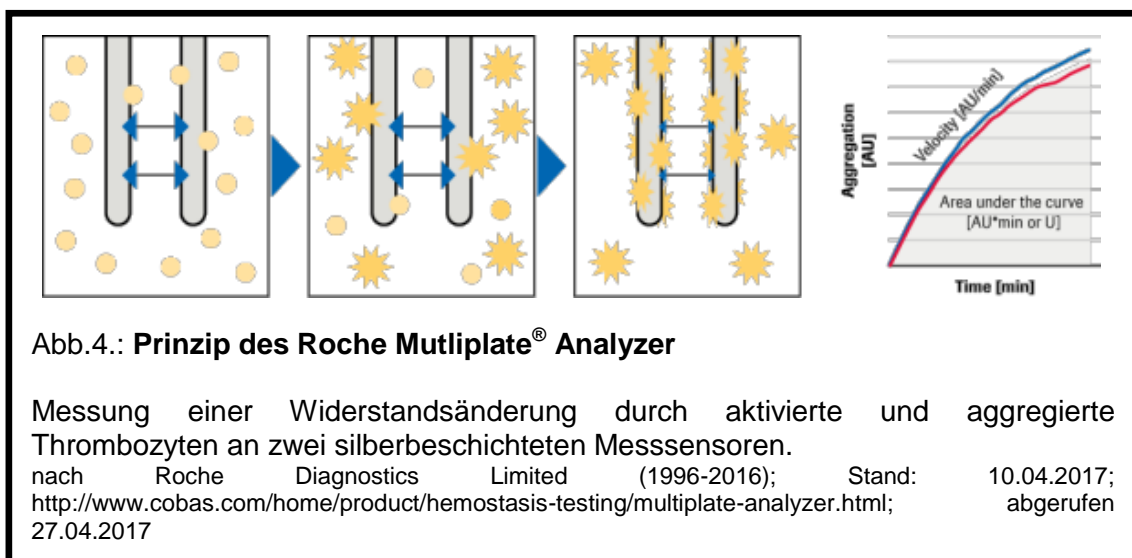
Tab. 2.: Übersicht der wichtigsten Multiplate-Testverfahren

Testverfahren	Beschreibung
ADP-Test	Thrombozyten-Aktivierung über den P <sub>2</sub> Y <sub>12</sub> - Rezeptor
ASPI-Test	Thrombozyten-Aktivierung durch Arachidonsäure
TRAP-Test	Thrombozyten-Aktivierung durch TRAP-6 über den Thrombin Rezeptor
RISTO-Test	Induktion der Thrombozytenaggregation durch Ristocetin
COL-Test	Thrombozyten-Aktivierung durch Kollagen

nach Roche Diagnostics Limited (1996-2016); Stand: 10.04.2017; <http://www.cobas.com/home/product/hemostasis-testing/multiplate-analyzer.html>; abgerufen 27.04.2017

Die Messungen wurden nach Anleitung der Firma Roche mit dem Multiplate® Analyser (Multiplate Deutschland GmbH, Grenzach-Wyhlen) durchgeführt. Dabei wurde eine Multiplate® Testzelle angeschlossen, mit 0,9% NaCl und humanem Blut, welches zuvor direkt bei Entnahme mit Hirudin (S-Monovette® 2.7 ml r-Hirudin, Sarstedt, Nümbrecht) antikoaguliert wurde, befüllt und für drei Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Testreagenz, hinzugegeben, welches eine „physiologische“ Aktivierung von Thrombozyten induziert und die Messung gestartet. In der vorliegenden Arbeit wurde lediglich der ADP-Test zur Überprüfung der Thrombozytenfunktion verwendet.

In den Testzellen befinden sich zwei silberbeschichtete Messsensoren, an welche sich aktivierte Thrombozyten anheften. Durch die während der Messung an den Sensoren aggregierten Thrombozyten kommt es zu einer Widerstandsänderung zwischen den Sensoren. Diese Widerstandsänderung wird aufgezeichnet, anschließend ausgewertet und in Diagrammform dargestellt. Mit Hilfe dieses Testverfahrens, lässt sich die Thrombozytenfunktion effizient untersuchen. [36]



## 2.2.4 Versuchsdurchführung

Kommt ADP in Kontakt mit humanem Blut, so erfolgt eine Aktivierung der Thrombozyten (Thrombus-Bildung) sowie die Interaktion von Thrombozyten mit anderen Blutzellen, wie z.B. Leukozyten.

Um den Effekt der Thrombozyten-Inhibition durch Kartoffel-Apyrase zu untersuchen wurde das Blut freiwilliger Probanden zunächst mit Apyrase inkubiert und anschließend mit ADP stimuliert. Anschließend wurde die Thrombozytenaktivität und die Bildung von Thrombozyten-Leukozyten-Komplexen in der Durchflusszytometrie gemessen, sowie die Thrombozytenfunktion mittels Multiplate untersucht.

Für das Erstellen der Apyrase-Konzentrationsreihe wurden in Eppendorf-Cups verschiedene Konzentrationen von Apyrase vorverdünnt. Folgende

Endkonzentrationen wurden in Ansätzen zu jeweils 5 µl für die Versuche vorbereitet: 2 U/ml (= Max.); 0,2 U/ml; 0,02 U/ml; 0,002 U/ml; als Kontrolle wurde ein Ansatz mit 0,9% Natrium-Chlorid Lösung (NaCl) ohne Apyrase vorbereitet und als 0 U/ml (= Min.) definiert. Für die verschiedenen Konzentrationen musste die vorrätige Apyrase (274 U/ml) weiter verdünnt werden. Dafür wurde nach Herstellerangaben ein HEPES Puffer (pH 7,5; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM DTT; 1mM EDTA; 1 mg/ml Rinder-Albumin) angefertigt.

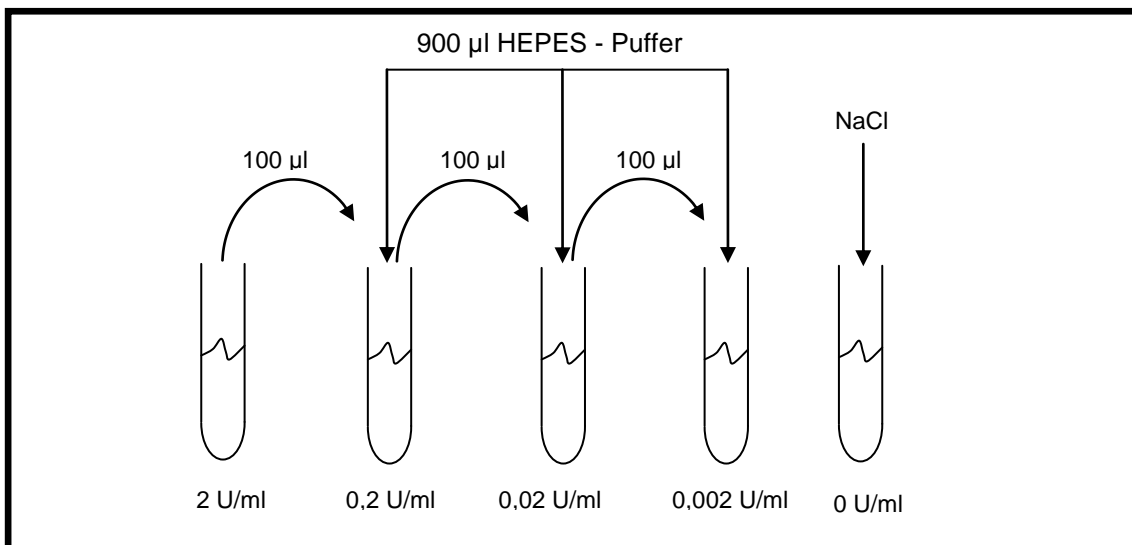


Abb.5.: **Verdünnung der Karoffel-Apyrase für die Konzentrationsreihe**

Jedem Ansatz wurden 90 µl humanes, mit Citrat antikoaguliertes Vollblut zugefügt und für fünf Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Nach abgelaufener Inkubationszeit wurde eine Thrombozyten-Aktivierung mit 10 µl 20µM ADP induziert und der Ansatz weiter für zehn Minuten bei 37°C inkubiert.

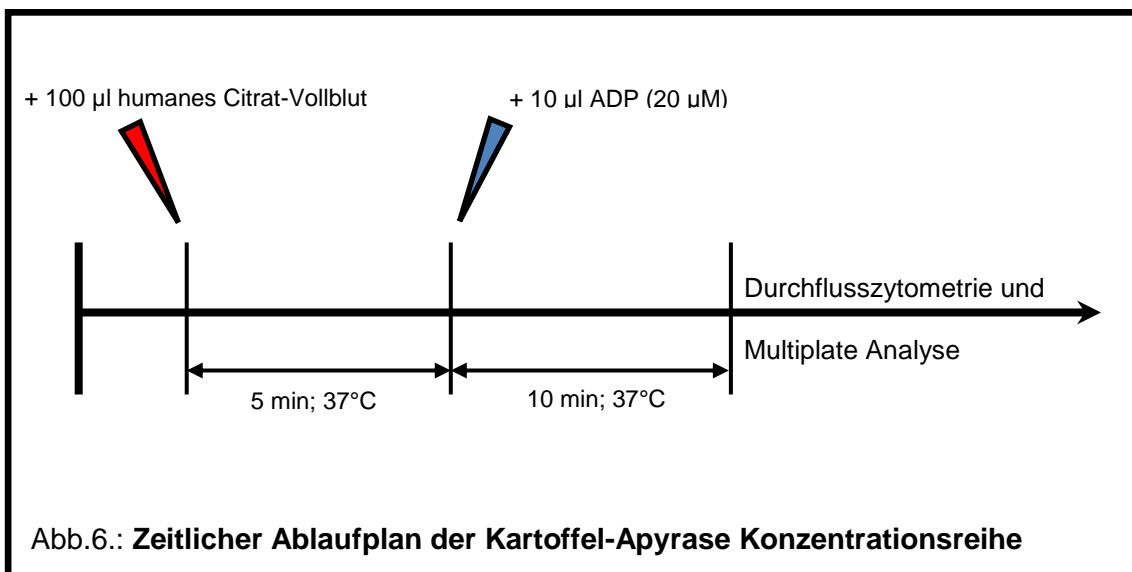


Abb.6.: **Zeitlicher Ablaufplan der Kartoffel-Apyrase Konzentrationsreihe**

Für die durchflusszytometrische Analyse der Kartoffel-Apyrase Konzentrationsreihe wurde der unter 2.2.2 beschriebene Assay verwendet. Für die Messung wurden dem bereits vorbereiteten Antikörpergemisch 3 µl der inkubierten Blutprobe zugegeben. Nach einer letzten Inkubation von 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad wurden 3 µl des Antikörper-Blutgemisches in 500µl 1x Cell-Fix fixiert und innerhalb von 3 Stunden im Durchflusszytometer (BD FACS Canto II) gemessen.

Die Analyse der Thrombozytenfunktion erfolgte am Mutliplate<sup>®</sup> Analyzer und wurde mittels des oben beschriebenen ADP-Tests durchgeführt.

### **2.3 ADP-Hydrolyse durch CD39 (targ-CD39 und nontarg-CD39)**

Die beiden in 1.6.2 beschriebenen Fusionsproteine targ-CD39 und nontarg-CD39 wurden im Baker IDI Heart & Diabetes Institut in Melbourne (Australien) produziert und freundlicherweise von Prof. K. Peter für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zur Verfügung gestellt. Die Fusionsproteine wurden Stickstoff- bzw. Trockeneis-gekühlt von Australien nach Deutschland transportiert, um die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen zur Inhibition der Thrombozyten-Aktivierung während systemischer Inflammation im murinen Sepsismodell durchführen zu können.

### **2.4 Murines Sepsismodell**

Wegen der Komplexität der während SIRS bzw. Sepsis ablaufenden Entzündungsprozesse können entsprechende Untersuchungen hinsichtlich eines potentiellen klinischen Einsatzes antiinflammatorischer Pharmaka nicht sinnvoll in vitro durchgeführt werden. Daher wurde ein Sepsis-Tiermodell mit Induktion einer systemischen Inflammationsreaktion durch LPS-Injektion gewählt.

Zur Durchführung des murinen Sepsismodells mit anschließender Intravitalmikroskopie, sowie Organ- und Blutentnahmen wurden männliche



C57BL/6 Mäuse (Charles River Laboratories Inc., Massachusettes, USA) mit einem Alter von fünf bis zehn Wochen und einem Gewicht von 20-25 Gramm verwendet. Die Tiere wurden gleichgeschlechtlich und in Käfigen mit maximal fünf Mäusen im Tierstall des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie bei 24°C Raumtemperatur, 60% Luftfeuchte und einem 12h-12h Hell-Dunkel Rhythmus gehalten. Wasser und Nahrung waren im Käfig stets ausreichend vorhanden.

Alle Tierexperimente wurden nach deutschen Tierschutzrichtlinien und Bestimmungen des Regierungspräsidiums Tübingen durchgeführt. Eine Genehmigung zur Durchführung dieser Versuche wurde zuvor durch das Regierungspräsidium Tübingen erteilt. (Tierversuchsantrag Nr.: A3/12). Der zeitliche Ablauf der Experimente kann auch Abbildung 8 entnommen werden.

#### **2.4.1 Anästhesie**

Zu Beginn des Experimentes erfolgte zur Induktion der Narkose die intraperitoneale Injektion einer Mischung aus Fentanyl (Fentadon<sup>®</sup>, Zul-Nr. 401495.00.00, Albrecht, Aulendorf, 0,05 mg/kg), Midazolam (Dormicum<sup>®</sup>, Zul-Nr. 47046.02.00, hameln pharma, Hameln, 5 mg/kg) und Medetomidin (Dormitat<sup>®</sup>, Zul-Nr. 32457.00.00, Orion Pharma, Hamburg, 0,5 mg/kg). Während der so etablierten Kombinationsnarkose ließen sich weder Kornealreflex noch Zehenreflex auslösen. Während des gesamten Versuchsablaufs wurde die Körpertemperatur der Tiere durch Lagerung auf einer Wärmematte bzw. unter einer Wärmelampe bei 37,0°C gehalten. Die Narkosetiefe der Mäuse wurde während des gesamten Experimentes wiederholt überprüft und gegebenenfalls durch weitere Injektionen aufrecht erhalten bzw. vertieft.

#### **2.4.2 Anlage eines zentralen Venenkatheters**

Den anästhesierten Tieren wurde im Weiteren ein zentraler Venenkatheter in die rechte Vena jugularis gelegt. Dazu wurde vor der Durchführung der Experimente ein Katheter vorbereitet: eine 23G-Kanüle (Mikrolance 3, BD, Heidelberg) wurde mit einer Feile stumpf geschliffen und anschließend ein Polyethylen-Schlauch (Intramedic<sup>®</sup>, BD, Heidelberg) übergezogen. An die

Kanüle wurde eine 1ml-Spritze (Injekt F, B.Braun, Melsungen) angeschlossen und der Katheter vollständig mit isotonischer Kochsalzlösung (Fresenius Kabi, Bad Homburg) entlüftet. Für die chirurgische Anlage des Venenkatheters wurde die Maus in Rückenlage auf einen 37°C warmen Präparationstisch (Thermo Scientific, Rockford, Illinois, USA) gelagert und an den Extremitäten mit Klebeband atraumatisch fixiert. Der Kopf zeigte während der Anlage in Richtung des Experimentators.

Auf der rechten Halsseite wurde im Bereich der Clavicula ein oberflächlicher Längsschnitt der Haut durchgeführt. Das darunterliegende Gewebe wurde mit Hilfe einer Schere stumpf präpariert, bis die Vena jugularis gut erkennbar und mobilisierbar war. Mit einem Knoten aus einem 4.0 Seide-Faden (Johnson & Johnson Medical GmbH, Ethicon, Norderstedt), wurde im kranialen Teil der Vene der Blutrückfluss zum Herzen verhindert. Ein zweiter Knoten, der im kaudalen Bereich der Vene nur locker um die Vene gelegt wurde, diente später zur Fixierung des Katheters und gleichzeitig dem Abbinden der Vene.

Mit einer Mikro-Schere wurde nun die Vene eröffnet und der entlüftete Katheter über das Loch eingeführt. Die Spitze des Katheters wurde bis in den Eingangsbereich des rechten Vorhofs vorgeschoben und der zuvor locker geschlungenen Knoten zugezogen, um den Katheter in der rechten Vena jugularis zu fixieren. Abschließend wurde die Stelle mit einem befeuchteten Tupfer abgedeckt.

### **2.4.3 Induktion eines septischen Krankheitsbildes**

Zur Induktion eines septischen Krankheitsbildes wurden im Weiteren den Tieren (bis auf die Tiere, die als Negativkontrolle dienten) LPS (0,15 µg/g KG) aus *Escherichia coli* Bakterien (Sigma Aldrich, München) mit einer 1 ml-Spritze (Injekt F, B.Braun, Melsungen) und einer 27G-Kanüle (Mikrolance 3, BD, Heidelberg), intraperitoneal appliziert.

### **2.4.4 Versuchsgruppen**

Wie in Tabelle 3 dargestellt, wurden verschiedene Versuchsgruppen gebildet, um die Auswirkung einer Applikation von CD39 während Sepsis bzw.

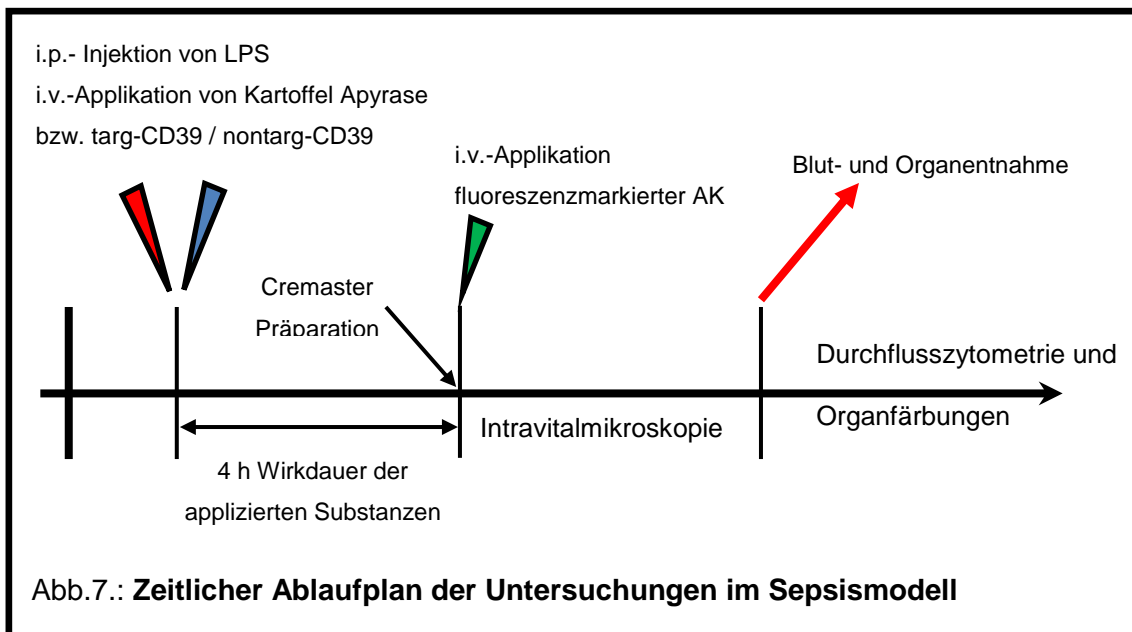
systemischer Inflammation zu untersuchen. Zeitgleich mit der intraperitonealen LPS Injektion wurde der jeweilige experimentelle Medikationsansatz (Kartoffel-Apyrase, targ-CD39 bzw. nontarg-CD39) den Tieren gemäß Versuchsgruppe intravenös über den zuvor gelegten zentralen Venenkatheter verabreicht. Anschließend wurde die Wirkung der applizierten Pharmaka im Rahmen der LPS-induzierten systemischen Inflammation abgewartet und die Tiere vier Stunden nach Applikation der Pharmaka gemäß Behandlungsgruppe und Applikation von LPS der intravitalmikroskopischen Analyse zugeführt. Als Positivkontrolle dienten Mäuse, welche über vier Stunden mittels i.p. LPS behandelt worden waren jedoch keine thrombozyteninhibierende Medikation erhalten hatten. Als Negativkontrolle dienten Mäuse, welche weder LPS-Injektion noch Thrombozyten-Inhibition erhalten hatten.

Tab. 3.: **Übersicht der CD 39 Versuchsgruppen im Sepsismodell**

Gruppe	Medikation
Gruppe 1 (Kontrolle)	Isotonische Kochsalzlösung i.v. (0,9%)
Gruppe 2	LPS i.p. (0,15 µg/g KG)
Gruppe 3	LPS i.p. (0,15 µg/g KG) + targ-CD39 i.v. (0,4 µg/g KG)
Gruppe 4	LPS i.p. (0,15 µg/g KG) + nontarg-CD39 i.v. (0,4 µg/g KG)
Gruppe 5	LPS i.p. (0,15 µg/g KG) + Kartoffel-Apyrase i.v. (0,04 U/g KG)

Aus den bereits publizierten Versuchen des Baker IDI Institut Melbourne [32] wurde die Konzentrationen der Fusionsproteine targ-CD39 und nontarg-CD39 für die Versuche übernommen. Es wird für targ-CD39 eine optimale Konzentration von 0,4 µg/g KG beschrieben. Analog zur targ-CD39 Gruppe wurde für nontarg-CD39 eine äquimolare Dosierung von 0,4 µg/g KG nontarg-CD39 gewählt (Gruppe: 4). Für Kartoffel-Apyrase wurde eine Dosierung von

0,04 U/g KG [37] verwandt, um einen Dosisbereich zu erreichen, der sicher eine adäquate Thrombozyten-Inhibition etabliert.



## 2.5 Intravitalmikroskopie im murinen Sepsismodell

Die Intravitalmikroskopie erlaubt es, Interaktionen zwischen Zellen und Gefäßendothel in vivo zu beobachten und zu analysieren.

### 2.5.1 Versuchsaufbau

Für die Intravitalmikroskopie wurde das Mikroskop Eclipse Ci-L (Nikon, Japan) verwendet. Das Mikroskop war mit CFI Plan Fluor Objektiven (Nikon, Japan) in verschiedenen Vergrößerungen (u.A. 10x, 20x) ausgerüstet. Für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurden verschiedene Farbfilter (Grün = F 26-514 HC-Set FITC; Rot = F26-518 HC-Set TxRed; Gemischt = Alexa488/TxRed Filterset Exciter and Beamsplitter; Nikon, Japan) in das Mikroskop integriert. Als Lichtquelle diente die Intensilight C-HGFIE Lampe (Nikon, Japan). Zusätzlich wurde der Kanalsplitter Optosplit II LS (Cairn Research, UK) angebaut, der es ermöglichte, gleichzeitig zwei verschiedene Fluoreszenz-Antikörper zu detektieren.

Durch eine digitale schwarz/weiß CCD-Kamera, Orca R<sup>2</sup> (Hamamatsu, Japan) wurden mit Hilfe eines Computers und der Nikon NIS Elements AR Software (Ver. 4.30.00, Nikon, Japan) Videos mit einer Länge von 30 Sekunden sowie digitale Fotos aufgenommen. Die Fotos und Videos wurden digital archiviert und später mit Hilfe der Nikon NIS Elements AR Software ausgewertet. Die Auswertung der Videos erfolgte nach festgelegten Kriterien (s. Kapitel: 2.5.3).

Für die digitale Bearbeitung der aufgezeichneten Videos bzw. Fotos wurde ein leistungsstarker Computer mit Intel<sup>®</sup>Core<sup>™</sup> i5-4670 Prozessor, 16,0 Gigabyte Arbeitsspeicher, NVIDIA NVS 300 Grafikkarte (Nvidia, Santa Clara, USA) und einem Windows 7 Professional 64 bit-Betriebssystem (Service Pack 1, © 2009 Microsoft Corp., USA) verwendet.

Zu Beginn des Experiments wurde dem Versuchstier über den zentralen Venenkatheter 50 µl des anti GPIIb/IIIa-Dylight 488 Antikörpers („in vivo platelet labeling Ig“, Emfret, Eibelstadt) verabreicht und für circa zehn Minuten inkubiert. Mit Hilfe des Antikörpers werden die murinen Thrombozyten angefärbt und so in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie sichtbar gemacht. Nachdem die Thrombozyten-Videos vollständig aufgenommen waren, wurde der Maus 50 µl 0,05% Rhodamin (Sigma Aldrich, München) injiziert um Leukozyten und andere Blutzellen für weitere Videoaufnahmen anzufärben. Da Rhodamin Leukozyten-unspezifisch färbt, wurde im Verlauf der vorliegenden Arbeit auch ein anti Ly6G-PE FACS-Antikörper (Biolegend, Fell) für spezifisches Färben von Granulozyten in der Intravitalmikroskopie verwandt. Bei diesen Versuchen wurden den Tieren 50 µl des anti Ly6G-Antikörpers gemeinsam mit 50 µl des antiGPIIb/IIIa Antikörpers intravenös injiziert. Der verwendete Mikroskopaufbau mit Kanalsplitter ermöglichte in Kombination mit den injizierten Fluoreszenzantikörpern die gleichzeitige Betrachtung von Thrombozyten und Leukozyten in der Immunfluoreszenzmikroskopie.

Für die Videoaufzeichnungen wurden postkapilläre Venolen mit einem Ziel-Durchmesser zwischen 25 bis 40µm in verschiedenen Bereichen der Cremastermuskulatur mit dem Mikroskop aufgesucht und am Computer mit Hilfe der Nikon AR Software digital aufgezeichnet. Der angestrebte

Durchmesser der in den Experimenten aufgezeichneten Venolen wurde auf 30-40  $\mu\text{m}$  definiert.

Um eine Maus mit präpariertem Cremastermuskel für die Intravitalmikroskopie auf dem Mikroskopisch lagern zu können, wurde eine spezielle Vorrichtung hergestellt. Die angefertigte Maus-Halterung wurde aus Plexiglas gebaut und verfügt als Auflagefläche für die Maus über eine Heizplatte, welche über ein externes Modul (Eigenbau) und eine Temperatursonde konstant auf 37°C erwärmt wird. In leicht erhöhter Position wurde eine Aufnahme für einen Glas-Objektträger (Langenbrick, Emmendingen) in die Plexiglasplatte gefräst. Auf dem Objektträger wird im Versuch die präparierte Cremastermuskulatur aufgespannt. Seitlich wurden in die Plexiglas-Maus-Halterung zwei Schrauben integriert, um die Vorrichtung stabil mit dem Mikroskopisch verbinden zu können.



### **2.5.2 Präparation der murinen Cremastermuskulatur im Sepsismodell**

Der Musculus cremaster gehört zur Bauchmuskulatur und besteht aus Fasern des Musculus obliquus internus abdominis und des Musculus transversus abdominis. Er umhüllt den Samenstrang und zieht gemeinsam mit diesem durch den Leistenkanal bis zum Hoden. Die Cremastermuskulatur umschließt den Hodensack und zieht den Hoden bei Kontraktion nach kranial. Der Muskel ist für die Temperaturregulierung der Hoden und damit für die Regulierung der Spermienproduktion verantwortlich. Außerdem kann er die Hoden zum Schutz in die Bauchhöhle ziehen. Der Musculus cremaster eignet sich gut für die Intravitalmikroskopie, da er sehr dünn und transparent ist. Mit einer guten Präparation lässt sich so eine sehr hohe Auflösung der Gefäßdarstellung erreichen. Das Kapillarsystem der Muskulatur verzweigt sich sehr fein und bietet die ideale Voraussetzung, um Interaktionen von Zellen mit dem Endothel dazustellen.

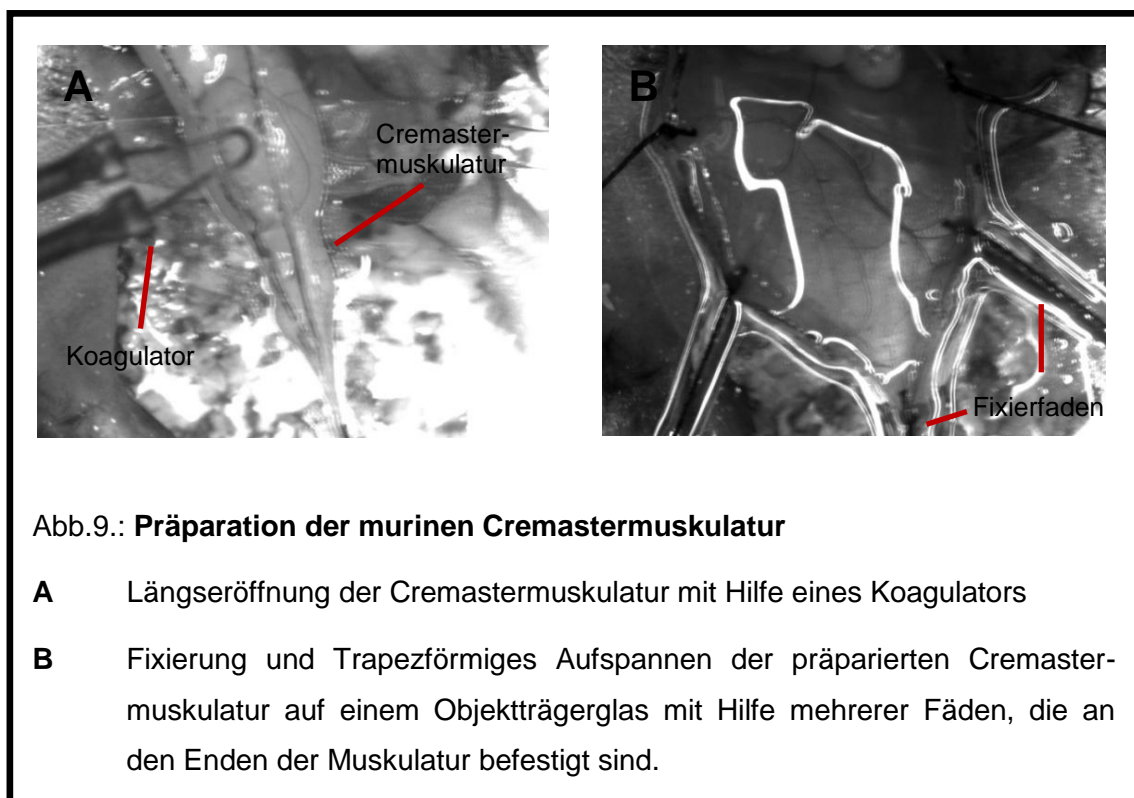
Um den Cremastermuskel für die Intravitalmikroskopie präparieren zu können, wurde die anästhesierte Maus entsprechend gelagert und die Extremitäten atraumatisch fixiert. Für ein freies Arbeitsfeld während der Präparation wurde die Maus im linken Genitalbereich mit Balea Enthaarungscreme (dm-GmbH & Co. KG, Karlsruhe) enthaart.

Ein erster Längsschnitt der Haut wurde direkt über dem Skrotum der Maus durchgeführt. Mit Hilfe einer Schere wurde dann stumpf unter der Haut weiter nach kranial präpariert und der Hautschnitt nach kranial verlängert. Waren die Hoden durch den Musculus cremaster in die Bauchhöhle gezogen, so konnten diese mit leichtem Druck auf das Abdomen der Maus wieder zurück in den Hodensack verlagert werden. Nun ließ sich der Hodensack mit der Cremastermuskulatur leicht identifizieren und wurde mit „Dulbecco's Phosphat buffered Saline“ (PBS, Sigma Aldrich, München) befeuchtet. Durch wiederholte Gaben von PBS wurde das Gewebe so während der gesamten Präparation feucht gehalten. Das den Hodensack umgebende Bindegewebe wurde vorsichtig abgetrennt und damit der Hodensack frei mobilisierbar gemacht. Dies

ist einer der wichtigsten Schritte in der Präparation, da verbliebenes Bindegewebe später die Qualität der Intravitalmikroskopie negativ beeinflusst.

Für die weiteren Präparationsschritte wurde die Maus nun vom Präparationstisch auf die vorbereitete Vorrichtung für den Mikroskopisch umgelagert.

Am distalen Ende des Cremastersacks wurde ein Knoten aus einem 4.0 Seide-Faden angebracht. Mit dem Faden ließ sich der Cremastermuskel straff halten und konnte so fixiert werden. Mit einem batteriebetriebenen Koagulator (Kauterset Type Standard, Servopax, Wesel) wurde der Cremastermuskel von kranial nach distal längs aufgespalten. Durch die Verwendung des Koagulators wurden Blutungen der Cremastermuskulatur während der Präparation verhindert.



Der eröffnete Cremastermuskel wurde nun auf dem in die Maus-Halterung integrierten Glas-Objektträger trapezförmig aufgespannt. Dazu wurden an den Cremasterseiten rechts und links jeweils zwei weitere Fäden angeknüpft und



straff fixiert, wobei darauf zu achten war, dass die Fixierung die Blutversorgung und Mikrozirkulation der Muskulatur nicht einschränkte.

Für die Präparation und Versuchsdurchführung musste die Cremastermuskulatur gegen Austrocknung geschützt werden. Dazu wurde eine Perfusorpumpe mit einer Laufrate von 80 ml/h installiert, die durch eine Kanüle mit Polyethylen-Schlauch, PBS direkt auf die präparierte Muskulatur aufbrachte. Schließlich wurde die Maus mit präpariertem Cremastermuskel in der dafür vorgesehenen Halterung auf dem Mikroskoptisch fixiert und mit der Intravitalmikroskopie begonnen.

### **2.5.3 Videosequenzanalyse**

Die Auswertung wurde in den beschriebenen Versuchsgruppen und in allen Videosequenzen identisch durchgeführt. Für jede Messung wurde am Computer zuvor ein 100 µm langer Gefäßabschnitt definiert. Folgende Parameter wurden für die Analyse definiert:

- Adhärenente Thrombozyten wurden als Zellen definiert, die während der Zeit von 30 Sekunden stationär an der Gefäßwand verblieben. Die Zellen wurden im definierten 100 µm Abschnitt markiert und als Zellen/mm<sup>2</sup> angegeben.
- Die Geschwindigkeit am Gefäßendothel rollender Leukozyten wurde in µm/sec gemessen. Dafür wurden Leukozyten mit Hilfe der Nikon AR Software markiert und über die gesamte Dauer (30 Sekunden) der Videosequenz verfolgt.
- Aus dem Gefäßsystem migrierte Leukozyten wurden in lichtmikroskopischen Bildern markiert, ausgezählt und als Zellen/mm<sup>2</sup> dargestellt.

## 2.6 Durchflusszytometrie murinen Blutes im Sepsismodell

Nach Abschluss der Intravitalmikroskopie wurde den anästhesierten Mäusen in tiefer Narkose insgesamt circa 1 ml Blut entnommen. Die Blutentnahme erfolgte nach Thorakotomie per Punktion mit einer 21G-Kanüle und einer 1ml-Spritze aus dem rechten Herzen. In die Spritze war zuvor 0,1ml Citrat aus einer S-Monovette<sup>®</sup> (Sarstedt, Nümbrecht) zur Antikoagulation aufgezogen worden. Mit dieser ersten Spritze wurde circa 0,6 ml murinen Blutes entnommen. Durch die zweite Spritze mit einer 21G-Kanüle ohne Citrat wurden circa 0,4 ml Blut abgenommen.

Durch die entnommene Blutmenge wurde ein hypovolämischer Schock induziert, der einen sofortigen Herzkreislaufstillstand und den Tod der Versuchstiere zur Folge hatte.

Unmittelbar nach der Blutabnahme wurden 14 µl der Citrat-Blutprobe für durchflusszytometrische Messungen zu einem Antikörpergemisch gegeben und mit dem unter 2.5.1 beschriebenen Thrombozyten Assay analysiert. Das verbliebene Citrat-Blut wurde in einem Eppendorf-Cup mit einer Zentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5415 R, Eppendorf, Hamburg) bei Raumtemperatur mit 2,5 G für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend mit einer Pipette abgenommen und als Plasma-Probe in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dem nicht mit Citrat antikoagulierten Blut wurde in einem Eppendorf-Cup ein Holzstückchen zugegeben, um die Gerinnungsreaktion zu induzieren. Nach circa zehn Minuten wurde das an dem Holzstückchen anhaftende Blutkoagel entfernt und die Probe in der Zentrifuge bei 4°C mit 15.682 G für 15 Minuten zentrifugiert. Analog dem Citrat-Blut wurde nach der Zentrifugation der Überstand mit einer Pipette abgenommen und als Serum-Probe eingefroren. Die gewonnenen Plasma- und Serum-Proben wurden bei minus 80°C für weitere Analysen eingelagert.

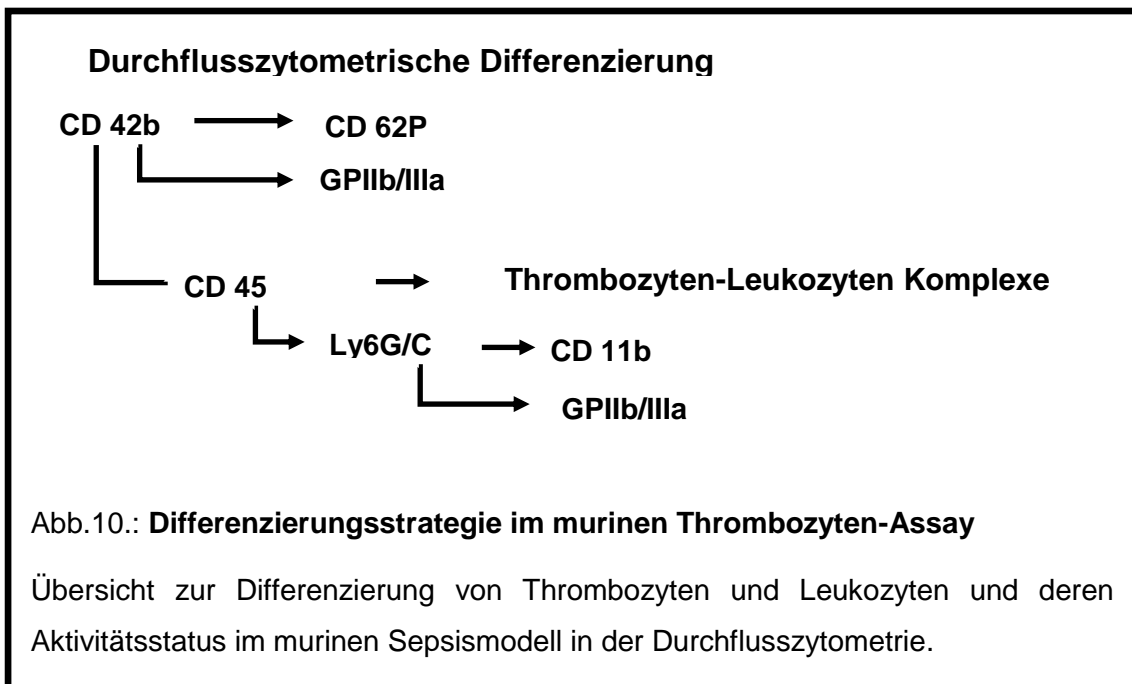
### 2.6.1 Muriner Thrombozyten – Assay

Analog zur durchgeführten Durchflusszytometrie humaner Blutproben wurde die Interaktion und Aktivierung von Thrombozyten und Leukozyten in den murinen Blutproben analysiert. Die Messungen erfolgten mit einem ebenfalls in der Arbeitsgruppe etablierten murinen Thrombozyten-Assay. In diesem Assay wurden die folgenden Fluoreszenz-Antikörper zur Detektion der verschiedenen Zellen verwendet:

- 2,5µl anti CD42b FITC-AK(Emfret, Eibelstadt)
- 2,0µl anti CD11b BV421-AK(Biolegend, Fell)
- 1,5µl anti CD45 PerCP-AK (Biolegend, Fell)
- 2,0µl anti Ly6G/C PECy7-AK (Biolegend, Fell)
- 1,5µl anti CD62P APC-AK (BD, Heidelberg)
- 1,5µl anti GPIIb/IIIa PE-AK (Emfret, Eibelstadt)

CD42b (= GPIb) ist auf der Oberfläche von Thrombozyten vorhanden und bindet von-Willebrand Faktor. Im durchgeführten Thrombozyten Assay wurde zur Identifizierung von Thrombozyten ein anti CD42b-AK verwendet. Sämtliche Zellen im Dot-Plot (CD42b / FSC) wurden positiv als Thrombozyten definiert. Der Aktivitätszustand der Thrombozyten konnte dann mit Hilfe der anti GPIIb/IIIa- und anti CD62P- Antikörper analysiert werden. Hierbei ist zu betonen, dass der verwendete anti-GPIIb/IIIa-Antikörper „JON-A“ nur den aktivierten GPIIb/IIIa-Rezeptor bindet. Die Zellen wurden als CD42b/GPIIb/IIIa<sup>+</sup> bzw. CD42b/CD62P<sup>+</sup> dargestellt. Für die Untersuchung von Thrombozyten-Leukozyten-Komplexen wurden zunächst in einem weiteren Schritt die Leukozyten mittels anti CD45-AK markiert. Als Komplexe wurden CD42b<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>-Ereignisse im Dot-Plot identifiziert. Zur weiteren Differenzierung der Komplex-gebundenen Leukozyten wurde der anti Ly6G/C-AK eingesetzt. Ly6G/C (= Gr-1) ist ein myeloischer Differenzierungsmarker, der hier zur spezifischen Identifizierung von Granulozyten diente. Der Aktivierungszustand von Leukozyten in gebildeten Komplexen wurde anhand deren Mac-1

Expression mit Hilfe von anti CD11b-AK untersucht. Außerdem wurde durch den anti GPIIb/IIIa-AK die Aktivierung von Komplex-gebundenen Thrombozyten untersucht. Da in den murinen Blutanalysen andere Antikörper als für die Messungen in menschlichem Blut verwendet werden mussten, wurde für den murinen Thrombozyten-Assay eine eigene Kompensationsreihe erstellt.



### 2.6.2 Versuchsdurchführung

Für die durchflusszytometrischen Messungen wurden 14 µl murines Citrat-Blut und 13 µl vorbereitete Antikörpermischung gemischt. Die verwendeten Antikörpermengen waren in Vorversuchen durch Titration ermittelt worden.

Die gesamte Probe (30 µl) wurde anschließend für 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Für die Messung im Durchflusszytometer wurden abschließend 3 µl der inkubierten Probe in 500µl 1x Cell Fix (BD, Heidelberg) fixiert und innerhalb von 3 Stunden gemessen. Alle Messungen wurden analog zu den Messungen in 2.1 mit dem FACS Canto II Durchflusszytometer (BD, Heidelberg) durchgeführt und als .fcs-Dateien digital gespeichert. Mit Hilfe der Flow-Jo Software Ver. 9.3.2 (Flow Jo LLC, Ashlan-Oregon) wurden die fcs-Daten später ausgewertet.

## **2.7 Organ-Untersuchungen im murinen Sepsismodell**

Unmittelbar nach der Blutabnahme und dem Tod des Tieres wurden Niere, Leber und Peritoneum der Tiere entnommen. Nach der Entnahme wurden die Organe sofort geteilt, um sie für PCR- wie auch für histologische Analysen verwenden zu können. Dazu wurde jeweils ein Teil der Organe in speziellen Organkäfigen (R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen) für histologische Analysen mit 17% Formaldehyd (AppliChem GmbH, Darmstadt) fixiert und der jeweils andere Teil in Eppendorf-Cups in flüssigem Stickstoff eingefroren und für PCR-Analysen bei -80°C eingelagert.

Mit der Blut- und Organentnahme war das Tier-Experiment beendet.

### **2.7.1 Histologische Untersuchungen muriner Organe**

Zur Fixierung wurden die entnommenen Tierorgane in 17% Formaldehyd für 24 Stunden eingelegt. Zur Entwässerung wurden die Präparate dann in eine Alkoholreihe aufsteigender Konzentration für 24 Stunden überführt und anschließend in Paraffin-Blöcke eingegossen. Dabei wurden die Tierorgane in 60°C warmes flüssiges Paraffin eingelegt, in Metallformen eingebracht und mit warmem flüssigem Paraffin bedeckt. Für die späteren Organschnitte wurde beim Einbringen des Paraffins in die Metallschalen speziell darauf geachtet, dass die Schnittflächen der Organe zum Boden der Schalen orientiert waren. Zum Festigen der Paraffinblöcke wurden die Metallschalen für einige Zeit auf einer Platte gekühlt. Anschließend wurden die Paraffinblöcke aus den Schalen gelöst und kühl und trocken eingelagert.

Für die histologischen Untersuchungen wurden am Mikrotom (Leica RM 2235, Leica Biosystems, Wetzlar) aus den Paraffin-Organblöcken 3 µm dicke Organschnitte angefertigt.

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden jeweils drei der angefertigten Schnitte parallel nebeneinander auf einem Objektträger positioniert.

### **2.7.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Für eine histopathologische Übersichtsanalyse der angefertigten Organschnitte wurde als erstes eine Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Färbung der Organe angefertigt. Hämatoxylin stellt einen natürlichen Farbstoff dar, mit welchem saure bzw. basophile Zellstrukturen, wie beispielsweise Zellkern, Ribosomen oder DNA, blau angefärbt werden. Im Gegensatz dazu ist Eosin ein künstlich hergestellter Farbstoff, der basische Strukturen, wie z.B. Mitochondrien, Zellplasma, oder Kollagen, rötlich anfärbt.

Für die Färbung wurden die angefertigten Organschnitte auf den Objektträgern zunächst in einer Xylol-Reihe entparaffiniert. Anschließend wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (jeweils 2 Minuten in 100% - 96% - 70% Ethanol) gewässert und dann kurz in destilliertem Wasser (Aqua dest.) geschwenkt. Nach 10 Minuten Färbung in Meyers Hämalaun wurden die Organschnitte wiederum in Aqua dest. gespült und kurz in 1% Alkohol auf und ab bewegt. Im nächsten Schritt folgte das Bläuen mittels Blueing Reagenz für 1 Minute. Anschließend wurden die Schnitte unter fließendem Wasser gewaschen. Zur Gegenfärbung wurden die Schnitte für 1 Minute in Eosin (Eosin G Lösung 0,5%, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) gelegt. Nach der Färbung in Eosin-, wurden die Schnitte ein weiteres Mal in Aqua dest. gewaschen. In einer aufsteigenden Alkoholreihe (jeweils 2 Minuten in 70% - 96% - 100% Ethanol) und Xylol-Reihe wurden die Schnitte zum Entwässern ein weiteres Mal geschwenkt. Abschließend wurden die gefärbten, noch leicht feuchten Organschnitte mit Eukitt (Sigma Aldrich, München) und Deckgläsern eingedeckt und in Dunkelheit getrocknet.

### **2.7.3 Immunhistochemische Färbungen**

Zur genauen Untersuchung der Extravasation von Thrombozyten-Leukozyten-Komplexen in das umliegende Gewebe während systemischer Inflammation wurden mit den zuvor angefertigten Organschnitten (Peritoneum, Leber, Niere) immunhistochemische Analysen durchgeführt. Die Färbung erfolgte mit Hilfe der Avidin-Biotin-Komplex (ABC) Methode. Avidin ist ein Glykoprotein, welches natürlicherweise in Hühnereiweiß vorkommt und mit seinen vier Untereinheiten

sehr spezifisch an Biotin bindet. Das Prinzip der ABC-Methode besteht darin, dass der Primärantikörper zunächst das gesuchte Antigen nur bindet. Ein Sekundärantikörper welcher mit Biotin konjugiert ist, richtet sich gegen die artspezifische Region des Primärantikörpers und bindet diesen. Durch die Zugabe von Avidin, welches wiederum an das Biotin des Sekundärantikörpers bindet, bildet sich ein stabiler Komplex aus Avidin und Biotin (ABC). Mit Hilfe einer Peroxidase-Reaktion kann man dann abschließend den Komplex im Präparat sichtbar machen.

Analog zur Vorbereitung der H&E – Färbung, wurden die Schnitte zunächst in einer Xylol-Reihe (je 7 Minuten) entparaffiniert und anschließend in einer Alkoholreihe absteigender Konzentration (je 5 Minuten 100% - 100% - 96% - 70% Ethanol) rehydriert und in Aqua dest. für 5 Minuten gewaschen. In Folge der durchgeführten Formalin-Fixierung kann es zu einer Vernetzungsreaktion von Proteinen und damit zu einer sogenannten „Maskierung“ der gesuchten Antigene kommen. Um eine solche „Maskierung“ gesuchter Epitope aufzubrechen, wurde ein Demaskierungsschritt eingefügt. Hierzu wurden die Schnitte mit AG-Demaskierungspuffer bedeckt und für 6 Minuten in der Mikrowelle bei 700-800 Watt belassen. Danach kühlten die Schnitte für 20 Minuten bei Raumtemperatur ab. Anschließend wurde ein endogener Peroxidase-Block durchgeführt, um falsch positiven Ergebnissen vorzubeugen. Hierzu wurden die Schnitte für 30 Minuten mit einem Methanol-Wasserstoffperoxid-Gemisch, bestehend aus 100 ml Methanol und 1,5 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%, AppliChem, Darmstadt), inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte in Aqua dest. und PBS gewaschen und mit einem Fettstift (ImmEdge Hydrophobic Barrier Stift, Vector labs, Burlingame, USA) die anzufärbenden Organschnitte auf dem Objektträger eingekreist.

Als nächster Schritt wurde ein Avidin Block durchgeführt, um eine unspezifische Bindung von Proteinen zu verhindern. Hierzu wurde eine Avidin-Block-Lösung aus 2,5 ml PBS verdünntem FSGO (0,5%), 250 µl normal-goat Serum (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA) und 10 Tropfen Avidin Blocking Solution (Vector labs, Burlingame, USA) hergestellt und die Organschnitte für eine Stunde damit inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS erfolgte der erste

Färbeschritt mit dem anti-CD41 Primärantikörper (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA) zur Färbung der Thrombozyten. Der Primärantikörper wurde in einem Biotin-Block aus 2,5 ml PBS verdünntem FSGO (0,5%), 250 µl normal-goat Serum, und 10 Tropfen Biotin Blocking Solution, 1:750 verdünnt. Als Kontrolle wurden eine Negativkontrolle, sowie eine IgG-Kontrolle erstellt, die jeweils auf die zwei weiteren Organschnitte auf dem Objektträger aufgebracht wurden. Somit ergab sich für sämtliche Färbungen das gleiche Schema auf den Objektträgern:

#### Negativkontrolle - IgG-Kontrolle – Primär-Antikörper

Analog zum Primärantikörper wurde die IgG-Kontrolle mit dem Biotin Block 1:400 verdünnt. Als Negativkontrolle diente die vorbereitete Blockierungslösung gegen Biotin. Nach dem Auftragen wurden die Organschnitte mit den Antikörpern bei 4°C in einer feuchten Kammer über Nacht inkubiert.

Am folgenden Tag wurden die Schnitte mit PBS gewaschen und anschließend der biotinylierte goat anti-rabbit Sekundärantikörper (BA-1000, Vector labs, Burlingame, USA) aufgebracht. Hierzu wurden 2,8 ml PBS-verdünntes FSGO (0,5%), 280 µl normal-goat Serum und 28 µl des Sekundärantikörpers vorsichtig vermischt und die Schnitte nach dem Auftragen für 35 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS wurde nun die ABC – Solution (Vector labs, Burlingame, USA) aufgebracht, die Schnitte für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert und anschließend abgewaschen. Um den so entstandenen Avidin-Biotin-Komplex sichtbar zu machen wurde eine Peroxidase Reaktion mit 3,3'-Diaminobenzidine (DAB, Vector labs, Burlingame, USA) durchgeführt. Dafür wurde nach Protokoll des Herstellers ein Gemisch aus destilliertem Wasser, Puffer, DAB, Wasserstoffperoxid und Nickel hergestellt. Nach sechs-minütiger Färbezeit wurde das DAB-Gemisch mit Aqua dest. und PBS abgewaschen.

Im zweiten Teil der immunhistochemischen Färbung wurden nun analog zu der oben beschriebenen Färbung der Thrombozyten die Granulozyten gefärbt. Zunächst wurde wieder ein Avidin Block mit 2,5 ml PBS verdünntem FSGO



(0,5%), 250 µl normal-rabbit Serum und 10 Tropfen Avidin-Blocking-Solution, für 30 Minuten durchgeführt. Anschließend wurde mit PBS gewaschen und der zweite anti-CD7/4 (anti-Ly6b) Primärantikörper zur Färbung von Granulozyten mit einem Biotin Block aufgetragen. Dazu wurden 2,5 ml PBS verdünntes FSGO (0,5%), 250 µl normal-rabbit Serum und 10 Tropfen Biotin-Blocking Solution vermischt. Der Primärantikörper wurde damit 1:1000 und die IgG-Kontrolle 1:400 verdünnt und aufgetragen. Als Negativkontrolle diente wieder die Blockierungslösung gegen Biotin allein. Der Ansatz mit dem Primärantikörper wurde wieder über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte zunächst mit PBS gewaschen, anschließend der biotinylierte rabbit anti-rat Sekundärantikörper (BA-4000, Vector labs, Burlingame, USA) aufgetragen und für 35 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurde die ABC-Solution aufgetragen und die Schnitte für 30 Minuten im Dunklen belassen. Um den gebildeten Komplex wiederum sichtbar zu machen, wurde nun Histogreen (Histoprime, Linaris, Dossenheim) verwendet. Nach Protokoll des Herstellers wurden 3 ml Histogreen-Puffer mit 2 Tropfen Histogreen-Chromogen und 2 Tropfen Wasserstoffperoxid vermischt und auf die Organschnitte aufgetragen. Nach einer Färbezeit von 1,5 Minuten wurden die Schnitte mit PBS gewaschen und kurz in Aqua dest. geschwenkt. Zur Gegenfärbung wurden die Schnitte für 5 Minuten mit Fast NuclearRed (Linaris, Dossenheim) gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte mit Leitungswasser gewaschen und zur Dehydrierung des gefärbten Gewebes in 100% Ethanol und Xylol geschwenkt. Abschließend wurden die noch feuchten Organschnitte mittels Eukitt und einem Deckglas konserviert.

Die Auswertung der angefertigten Präparate erfolgte mittels manueller Auszählung der sequestrierten Thrombozyten-Leukozyten-Komplexe an drei verschiedenen Bereichen der Organgewebe. Dazu wurden die untersuchten Bereiche in 20-facher Vergrößerung mikroskopisch (Mikroskop: Leica DM IRB, Bensheim) mit Hilfe der ImageJ Software (National Institutes of Health, USA) ausgewertet.

## 2.8 Statistik

Im Folgenden sind die Daten je nach Verteilung mit Mittelwerten und Standardabweichung (SEM) oder Median und Interquartilsabstand (IQR) dargestellt.

Für die statistische Auswertung wurde zunächst mittels Histogrammen, Quantil-Quantil-Diagrammen und Kurtosis-Testung eine Normalverteilung der Daten überprüft. Konnte keine Normalverteilung gefunden werden, wurden die Daten logarithmisch transformiert und erneut auf Normalverteilung geprüft. Normalverteilte Daten wurden mittels einfacher Varianzanalyse („one-way analysis of variance“; ANOVA) und post hoc Holm-Sidak's test auf statistische Signifikanz getestet und sind mit Mittelwert und Standardabweichung dargestellt.

Konnte dagegen keine Normalverteilung der Daten gefunden werden, wurden diese mit Hilfe des Kruskal Wallis test, einem nichtparametrischen Test, und Dunn's post hoc test analysiert. Hier erfolgt die Darstellung mit Median und Interquartilsabstand. Die Analysen wurden immer im Vergleich zur LPS-behandelten Kontrollgruppe (Positivkontrolle - Gruppe 2) durchgeführt, wobei ein p-Wert von  $p < 0,05$  als signifikant festgelegt wurde.

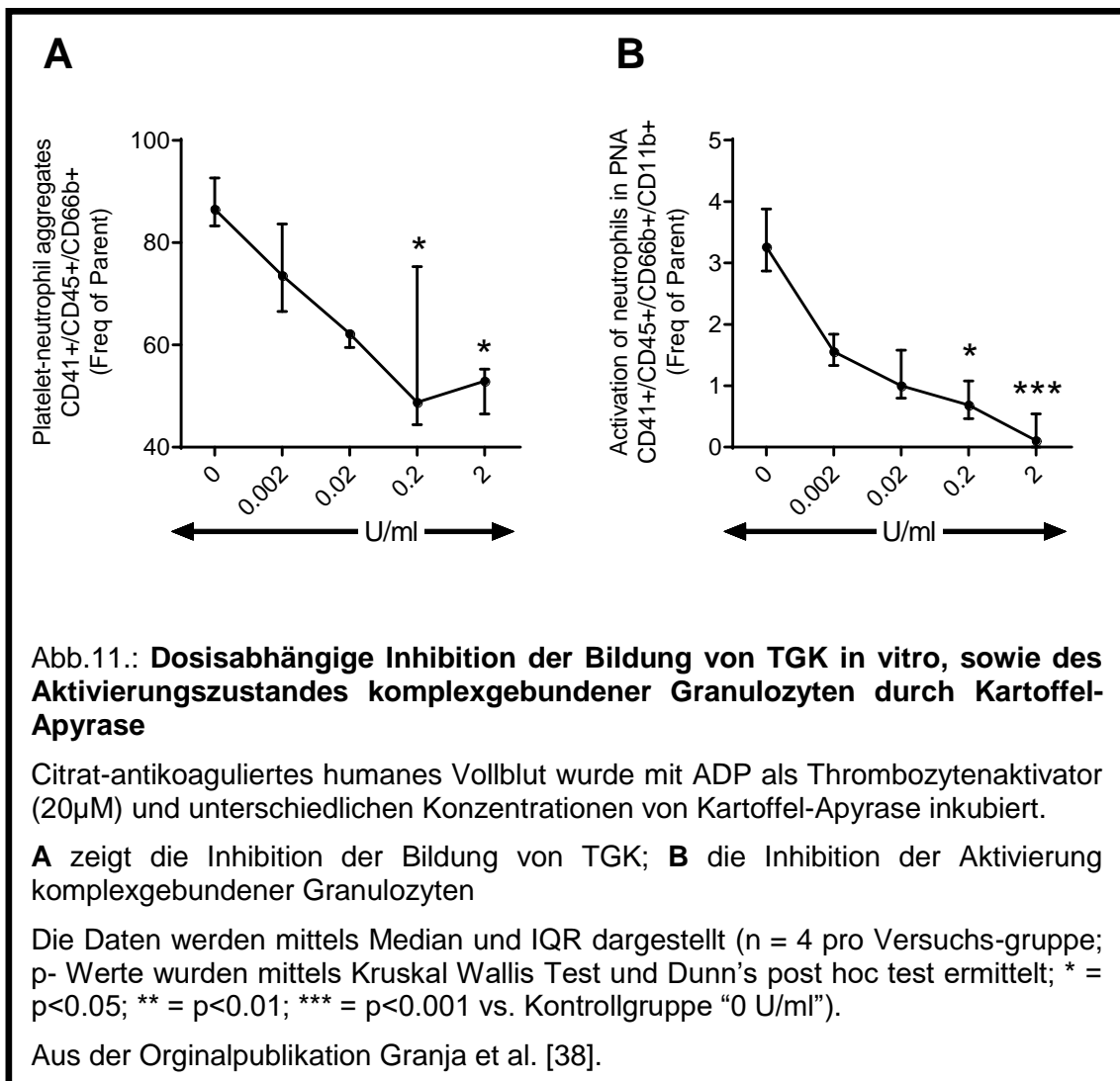
Bei dieser Arbeit wurde die methodische Beratung des Instituts für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie der Universität Tübingen in Anspruch genommen. Für die Unterstützung möchte ich mich bei Frau Serna-Higuera herzlich bedanken.

Die Darstellung und Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe der Software Graph Pad Prism (Ver. 8., San Diego, USA).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Apyrase Dosis-Wirkungs-Beziehung

Zunächst wurde in initialen in vitro Versuchen der Effekt der Kartoffel-Apyrase auf die Bildung proinflammatorischer Thrombozyten-Granulozyten-Komplexe und auf den Aktivierungszustand der Granulozyten untersucht. Dazu wurde unter ADP-Stimulation humanen Blutproben Apyrase in verschiedenen Konzentrationen zugegeben. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Kartoffel-Apyrase die Bildung von TGK inhibiert und dass bei einer Konzentration von 2 U/ml die maximale Inhibition erreicht wird.



Um eine Aussage über die Thrombozytenfunktion in Gegenwart von Kartoffel-Apyrase treffen zu können, wurde mittels Multiplate<sup>®</sup>-Analyzer die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation untersucht. Hierbei zeigte sich eine konzentrationsabhängige Inhibition der Thrombozytenaggregation, die bei einer Apyrase Dosierung von 2 U/ml maximal war.

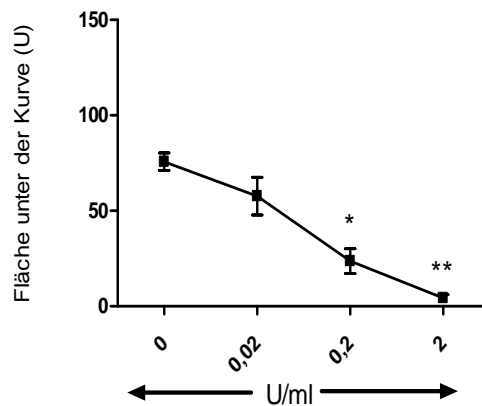


Abb.12.: Multiplate<sup>®</sup> Messung (ADP Test) der Aktivierung von Thrombozyten durch ADP in Gegenwart von Kartoffel-Apyrase

Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Inhibition, die bei einer Apyrase-Konzentration von 2 U/ml am effektivsten war.

Die Daten werden mittels Median und IQR dargestellt (n = 3 pro Versuchs-gruppe; p-Werte wurden mittels Kruskal Wallis test und Dunn's post hoc test ermittelt; \* = p<0.05 vs. Kontrollgruppe "0 U/ml").

### 3.2 Ergebnisse der Intravitalmikroskopie

Die aufgezeichneten Videosequenzen wurden nach den in 2.5.3 beschriebenen Kriterien ausgewertet. Sämtliche Ergebnisse wurden immer in Bezug auf die mit LPS stimulierte Kontrollgruppe dargestellt und ausgewertet.

### 3.2.1 Thrombozyten-Endothel-Interaktion unter Applikation von Molekülen mit Apyrase-Aktivität

Analog zu den in 2.5 aufgestellten und beschriebenen Methoden wurden die Substanzen targ-CD39 (Thrombozyten-spezifisches CD39) und nontarg-CD39 (unspezifische CD39 Kontrollsubstanz) in äquimolarer Dosierung (0,4 µg/kg KG) appliziert, sowie Kartoffel-Apyrase mit einer Dosierung von 2 U/ml intravenös appliziert.

Die Thrombozyten-Adhärenz, definiert als Thrombozyten welche länger als 30 Sekunden am Gefäßendothel anhaften, wurde bei LPS-induzierter Peritonitis sowohl durch Kartoffel-Apyrase, als auch durch targ-CD39 und nontarg-CD39 inhibiert.

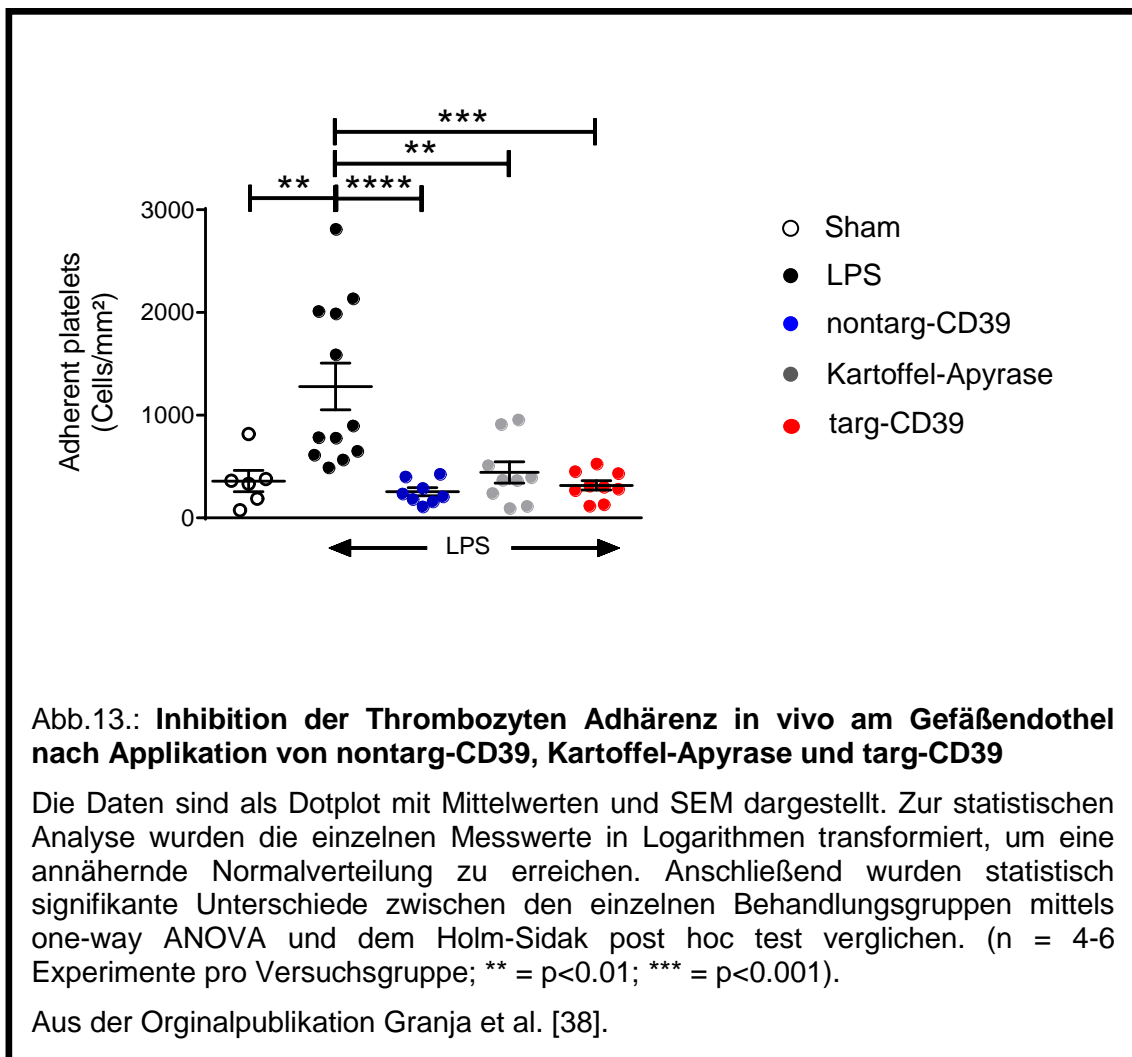


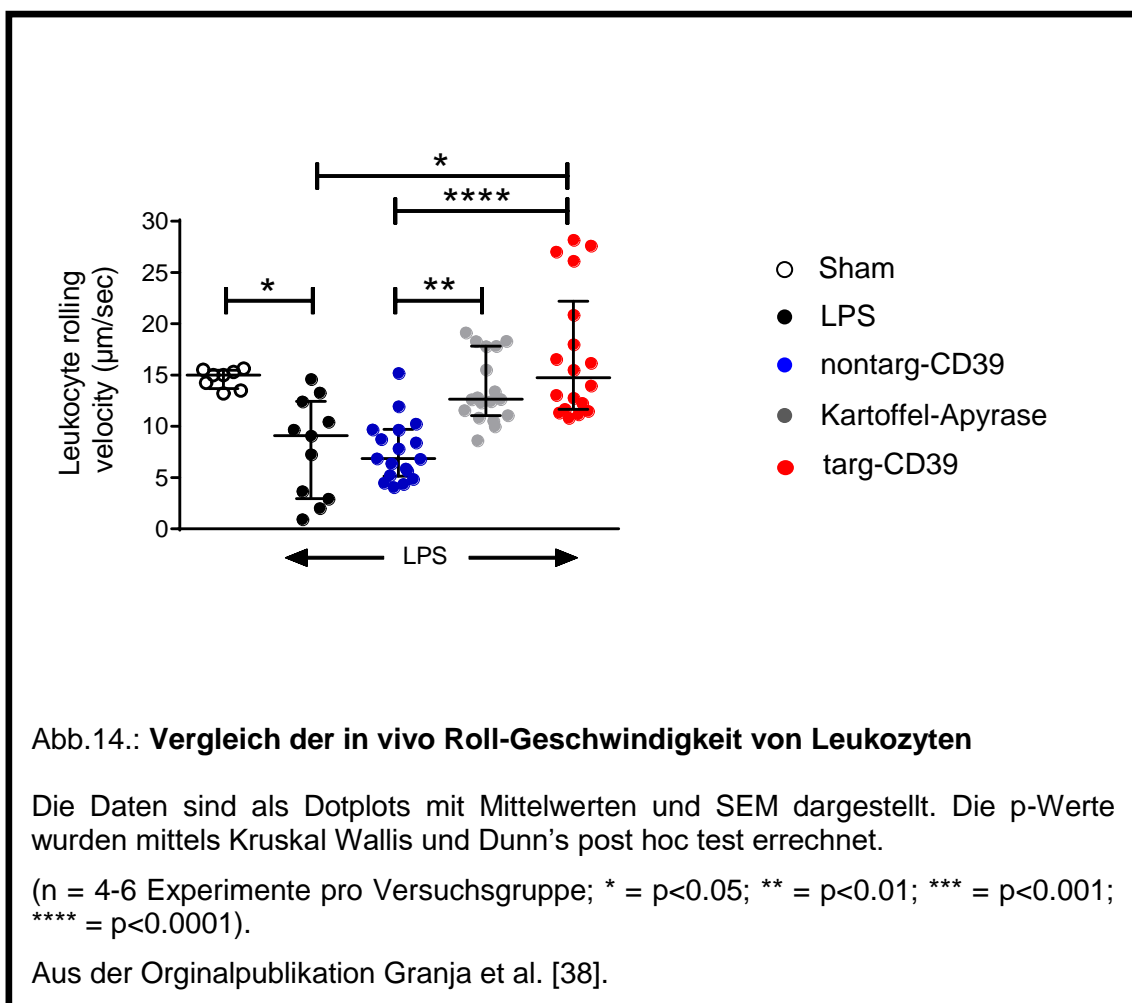
Abb.13.: Inhibition der Thrombozyten Adhärenz in vivo am Gefäßendothel nach Applikation von nontarg-CD39, Kartoffel-Apyrase und targ-CD39

Die Daten sind als Dotplot mit Mittelwerten und SEM dargestellt. Zur statistischen Analyse wurden die einzelnen Messwerte in Logarithmen transformiert, um eine annähernde Normalverteilung zu erreichen. Anschließend wurden statistisch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen mittels one-way ANOVA und dem Holm-Sidak post hoc test verglichen. (n = 4-6 Experimente pro Versuchsgruppe; \*\* = p<0.01; \*\*\* = p<0.001).

Aus der Originalpublikation Granja et al. [38].

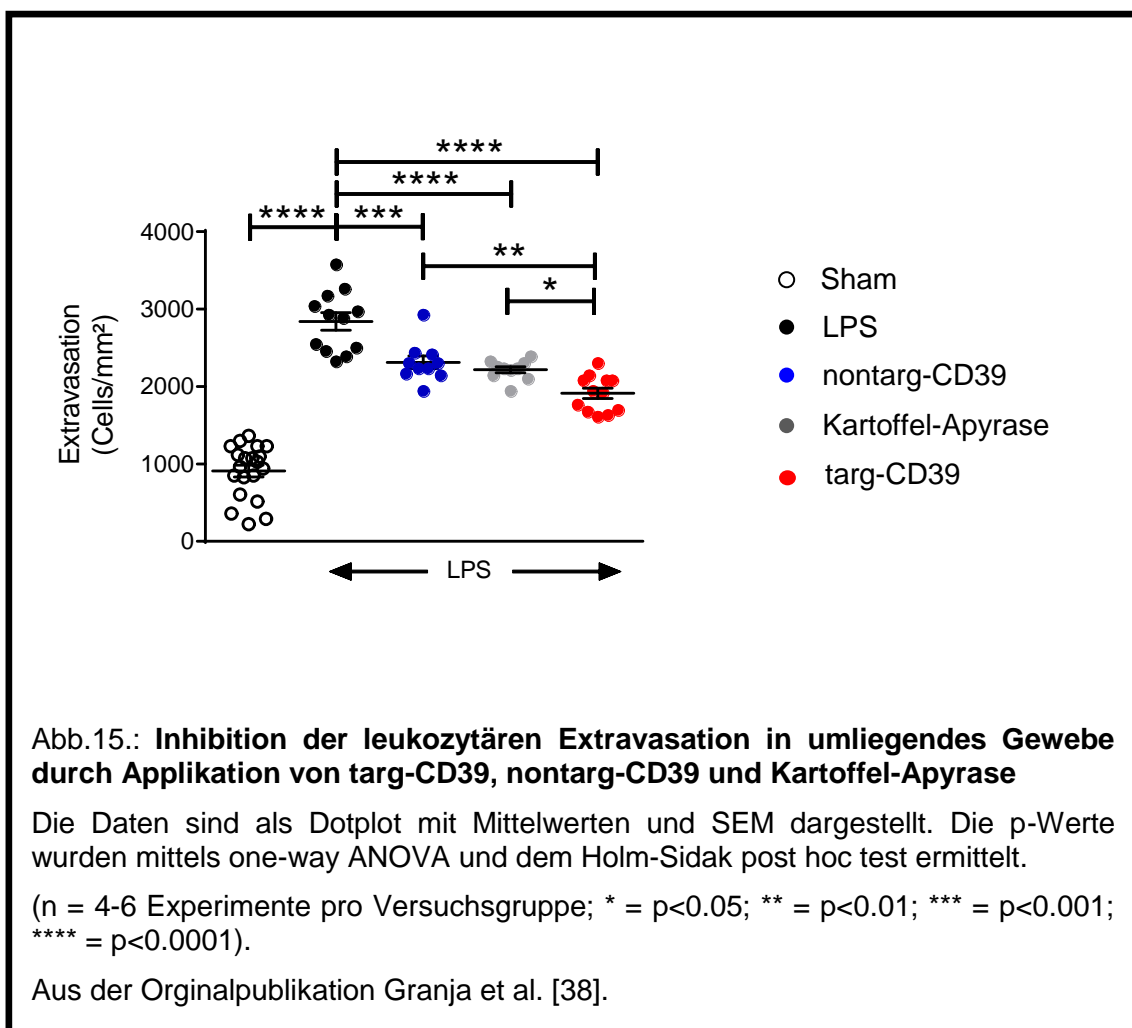
### 3.2.2 Inhibition leukozytärer Rollgeschwindigkeit

Mittels der Nikon Software wurde in den intravitalmikroskopischen Filmen die Geschwindigkeit rollender Leukozyten an der Gefäßwand ermittelt. Es zeigte sich, dass die Roll-Geschwindigkeit der Leukozyten in den mit targ-CD39 behandelten Tieren im Vergleich zur nur mit LPS behandelten Kontrollgruppe signifikant gesteigert war. In der mit nontarg-CD39 und Kartoffel-Apyrase behandelten Gruppe konnte kein signifikanter Effekt auf die Roll-Geschwindigkeit von Leukozyten erzielt werden.

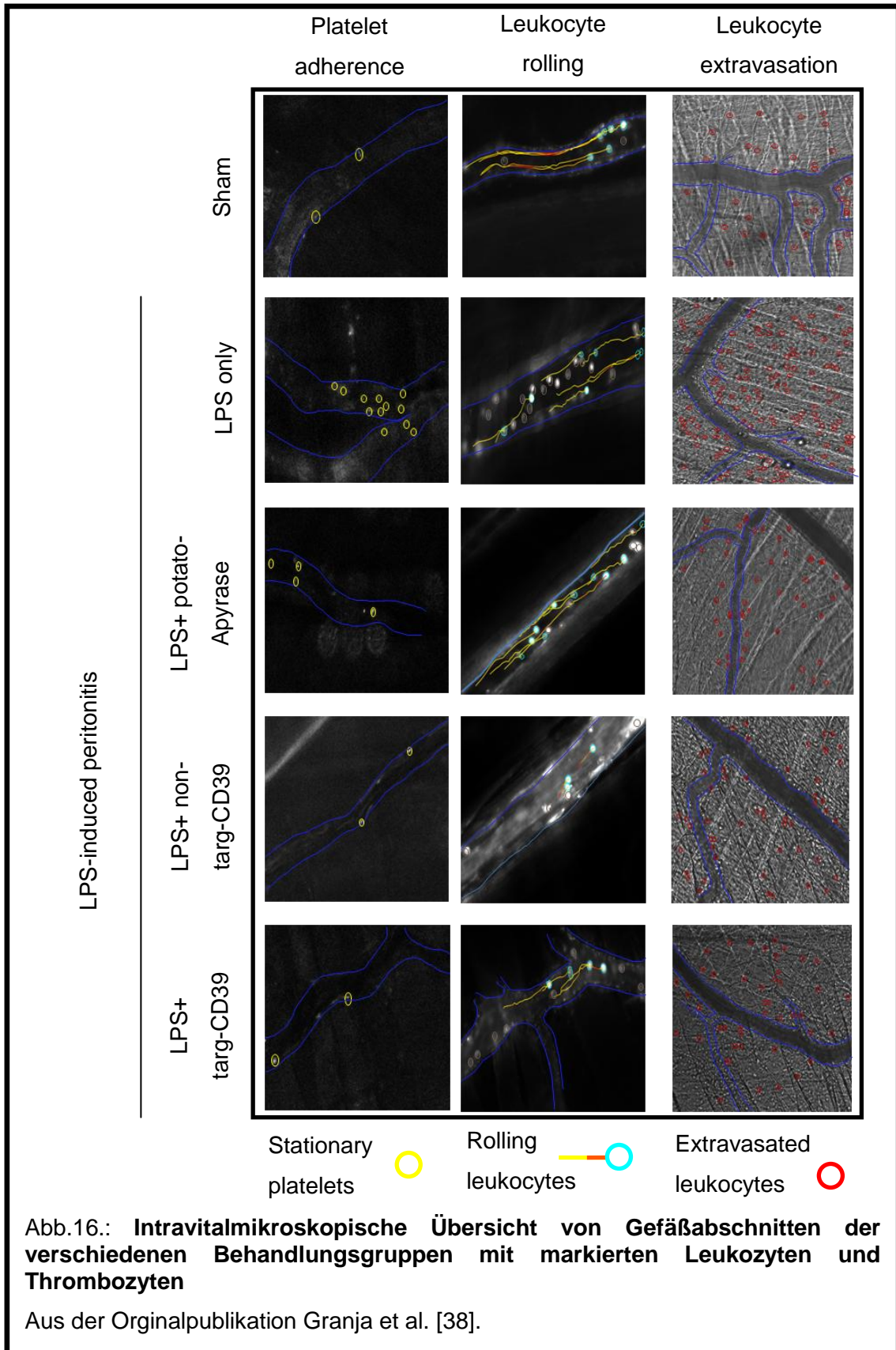


### 3.2.3 Inhibition der Leukozyten-Extravasation

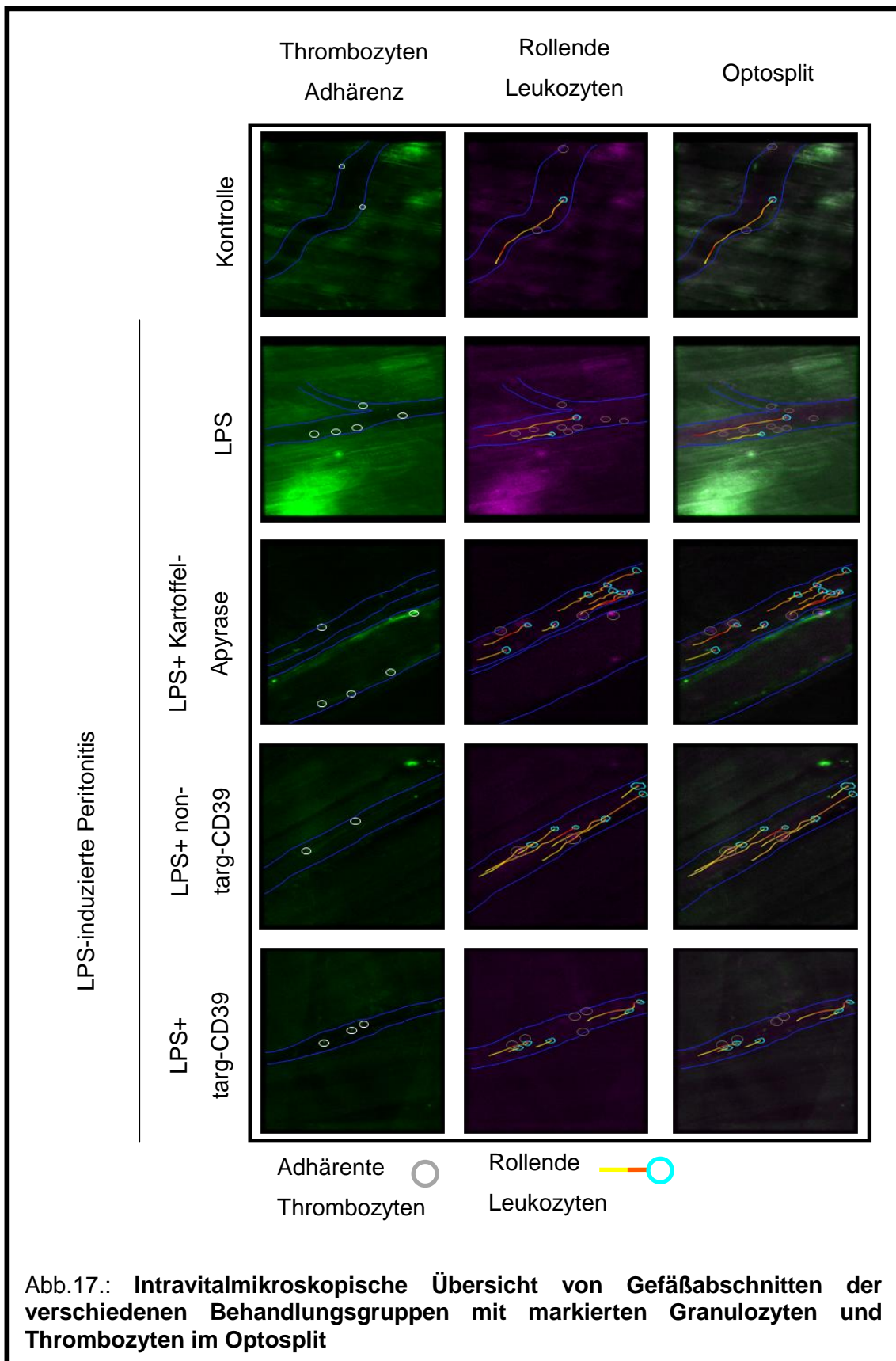
Die Transmigration und damit Extravasation von Leukozyten in umliegendes Gewebe wurde sowohl durch targ-CD39, nontarg-CD39, als auch durch Kartoffel-Apyrase effektiv verhindert. Targ-CD39 zeigte dabei eine stärkere Inhibition im Vergleich zur nontarg-CD39- und Kartoffel-Apyrase Behandlungsgruppe. Zwischen den Behandlungsgruppen mit nontarg-CD39 und Kartoffel-Apyrase konnte dagegen kein signifikanter Unterschied ermittelt werden.



### 3.2.4 Repräsentative Beispiele der Intravitalmikroskopie





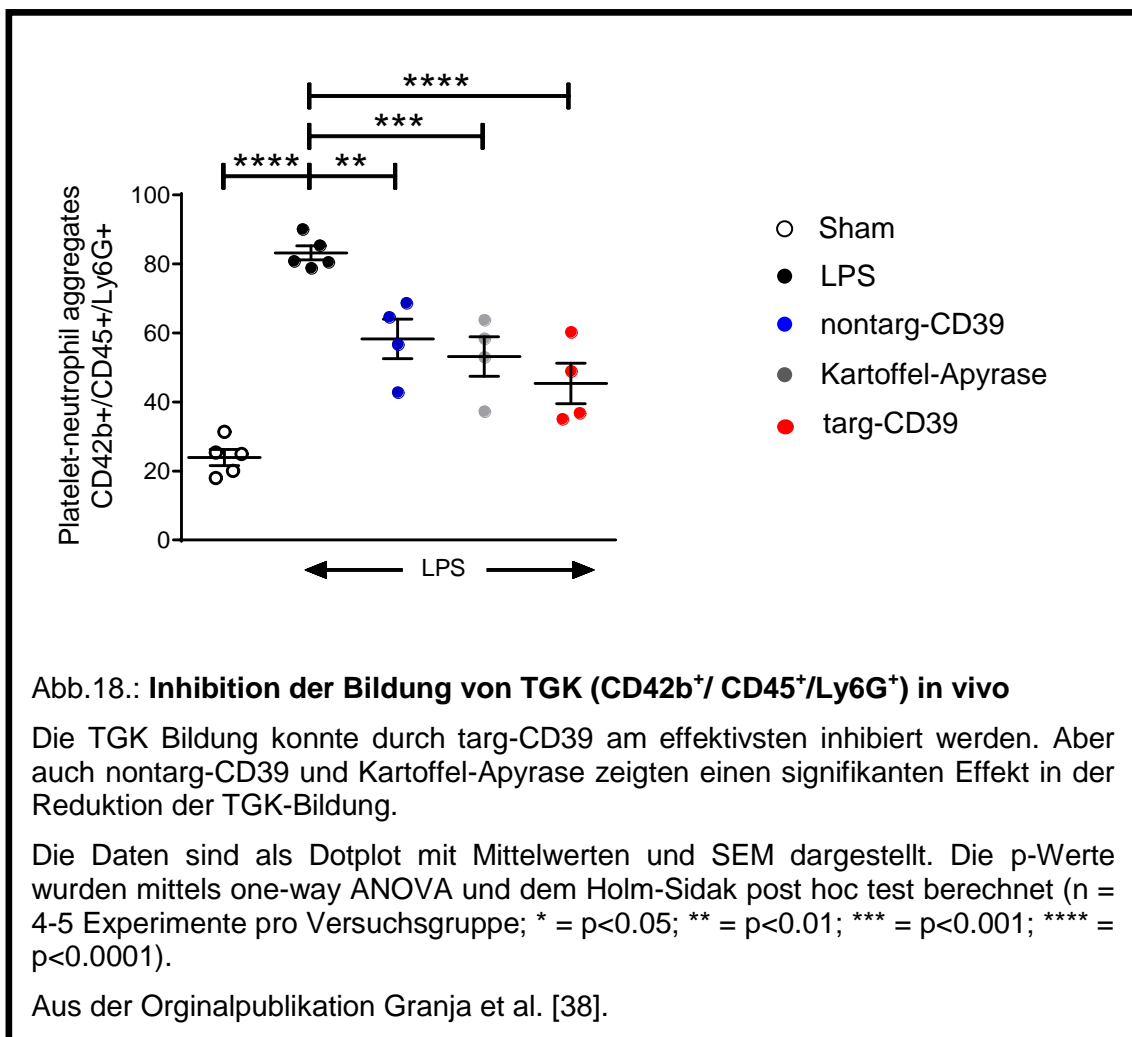


### 3.3 Durchflusszytometrische Analysen

#### 3.3.1 Bildung von Thrombozyten-Granulozyten bzw. Thrombozyten-Monozyten-Komplexen unter den Bedingungen LPS-induzierter Peritonitis unter Applikation von Molekülen mit Apyrase-Aktivität

Thrombozyten-Leukozyten-Komplexe wurden in der Durchflusszytometrie als CD42b<sup>+</sup> und CD45<sup>+</sup> Komplexe erfasst. Eine weitere Differenzierung der Komplexe erfolgte anschließend mit Hilfe des Ly6G Antikörpers für Granulozyten.

In den Untersuchungen zeigte sich, dass durch die Behandlung mit targ-CD39, nontarg-CD39, sowie durch Kartoffel-Apyrase die Bildung von Thrombozyten-Granulozyten-Komplexen im murinen Blut signifikant vermindert wurde.



### 3.3.2 Inhibition der Aktivierung von Granulozyten

Um den Aktivierungszustand der in TKG gebundenen Granulozyten festzustellen, wurde die CD11b (Mac-1) Expression gemessen. Hierbei zeigte sich, dass in den TKG der Aktivierungszustand der gebundenen Granulozyten weder durch die Applikation von targ-CD39 noch durch nontarg-CD39 oder Kartoffel-Apyrase reduziert werden konnte.

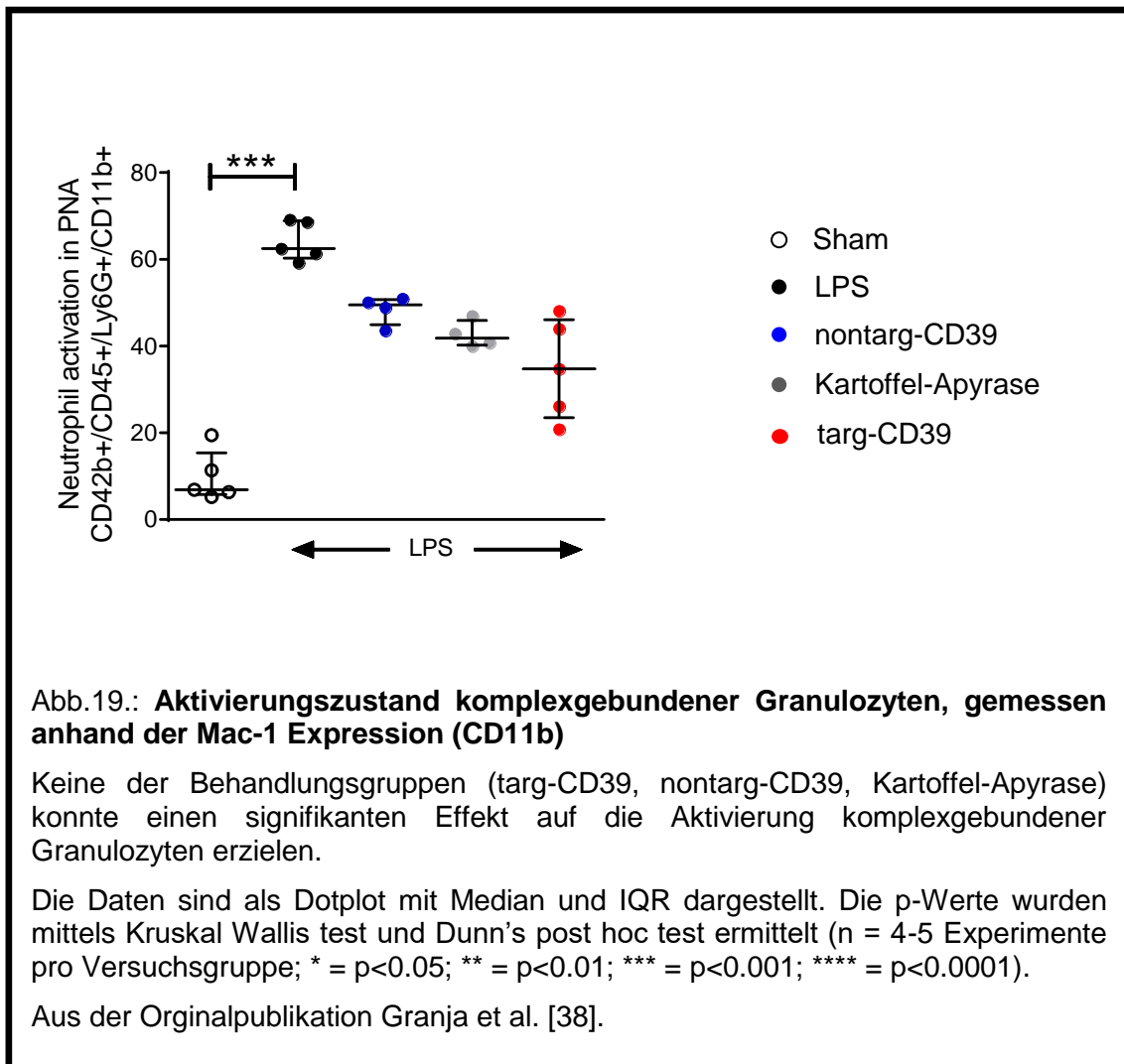


Abb.19.: **Aktivierungszustand komplexgebundener Granulozyten, gemessen anhand der Mac-1 Expression (CD11b)**

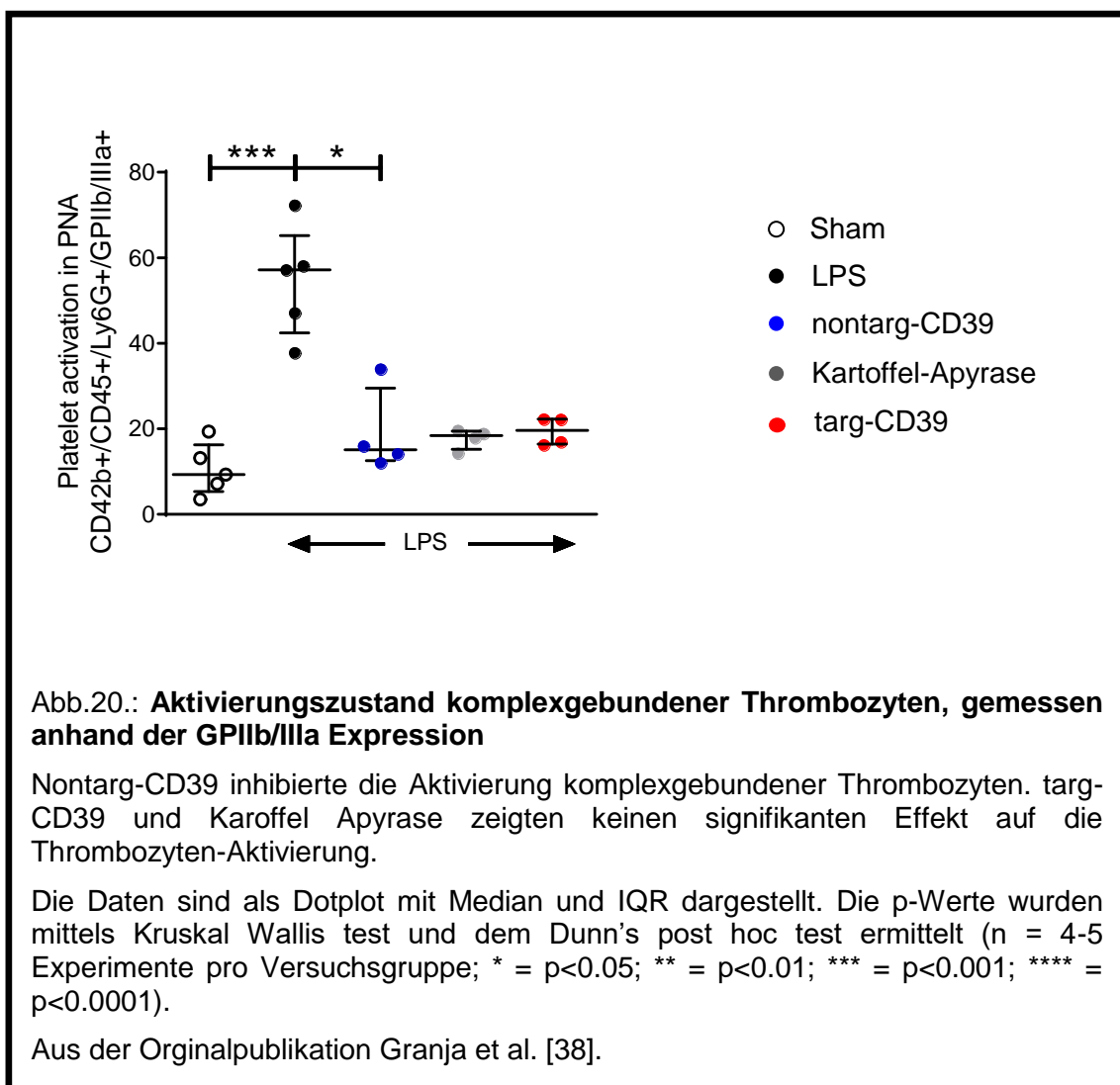
Keine der Behandlungsgruppen (targ-CD39, nontarg-CD39, Kartoffel-Apyrase) konnte einen signifikanten Effekt auf die Aktivierung komplexgebundener Granulozyten erzielen.

Die Daten sind als Dotplot mit Median und IQR dargestellt. Die p-Werte wurden mittels Kruskal Wallis test und Dunn's post hoc test ermittelt (n = 4-5 Experimente pro Versuchsgruppe; \* = p<0.05; \*\* = p<0.01; \*\*\* = p<0.001; \*\*\*\* = p<0.0001).

Aus der Originalpublikation Granja et al. [38].

### 3.3.3 Inhibition aktivierter Thrombozyten in Komplexen

Der Aktivierungszustand von Thrombozyten in den TGK wurde mit Hilfe eines GPIIb/IIIa Antikörpers untersucht, welcher nur an den aktivierten GPIIb/IIIa-Rezeptor bindet (JON-A). Dabei zeigte sich, dass lediglich bei den mit nontarg-CD39 behandelten Tieren eine signifikante Inhibition der Thrombozyten-Aktivierung erzielt werden konnte. Eine Behandlung mit targ-CD39 oder Kartoffel-Apyrase zeigte keine signifikante Reduktion des Aktivierungszustands komplex-gebundener Thrombozyten.



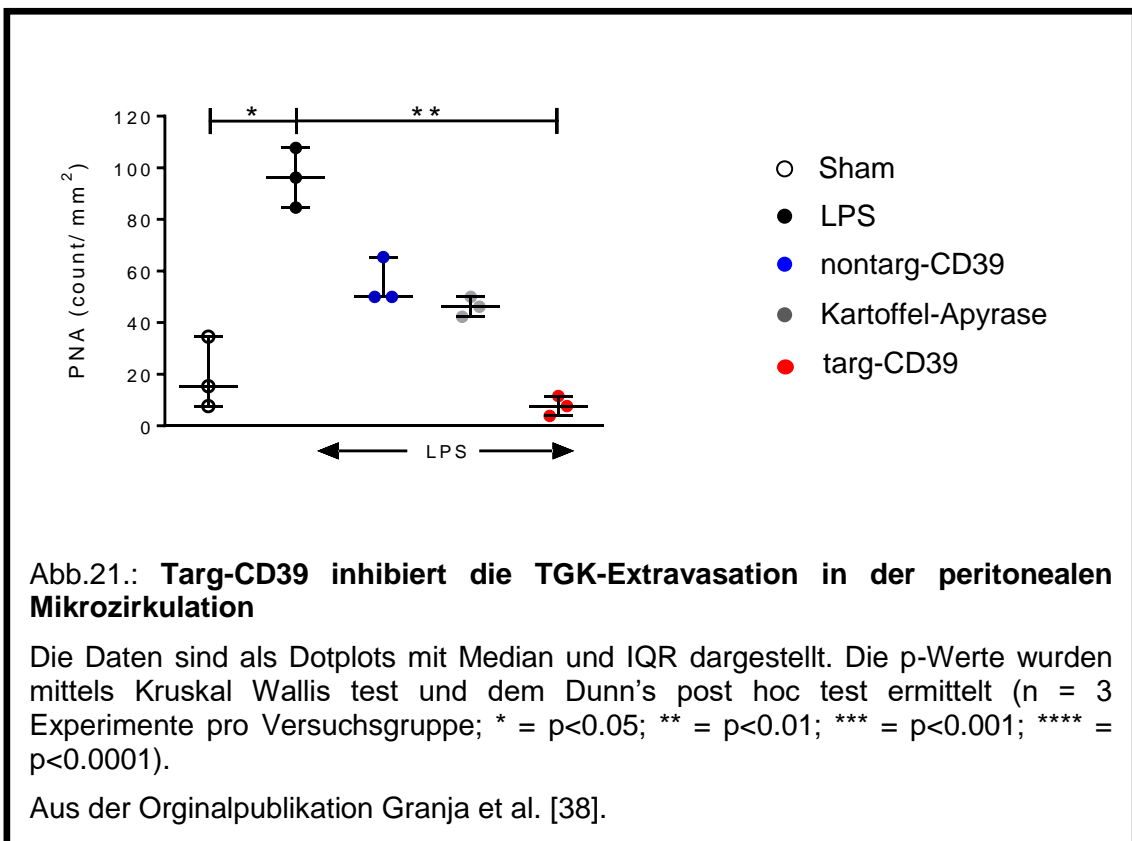
### 3.4 Histologische Untersuchungen

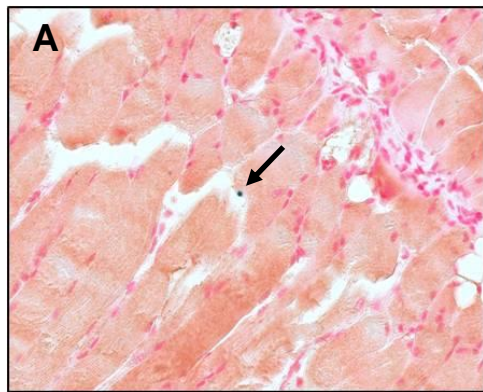
Die angefertigten H&E-Präparate dienen dazu, den Effekt der verschiedenen Therapieansätze auf die mikrovaskuläre Sequestrierung von TGK unter Bedingungen der LPS-induzierter Peritonitis zu erfassen. Hierzu wurden entsprechende immunhistochemische Färbungen durchgeführt.

#### 3.4.1 Inhibition der Sequestrierung von Thrombozyten-Granulozyten-Komplexen in der peritonealen Mikrozirkulation

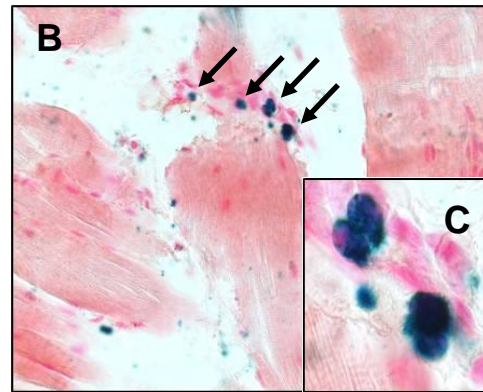
Durch die immunhistochemische Färbung wurden die sequestrierten Thrombozyten-Granulozyten-Komplexe braun bzw. grün in den Peritoneumschnitten angefärbt und in 40-facher Vergrößerung analysiert.

Dabei konnte gezeigt werden, dass es bei mit targ-CD39 behandelten Tieren zu einer signifikant verminderten Sequestrierung von Thrombozyten-Granulozyten-Komplexen kam. Im Gegensatz dazu konnten bei den mit nontarg-CD39 bzw. mit Kartoffel-Apyrase behandelten Tieren keine signifikante Reduktion gefunden werden.

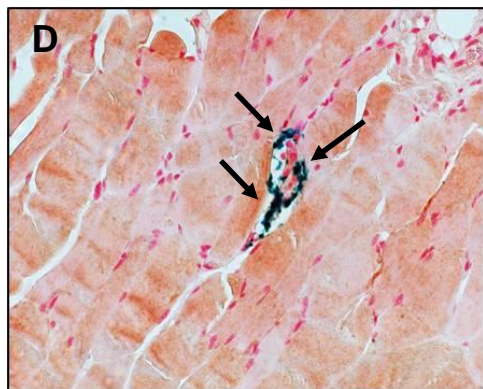




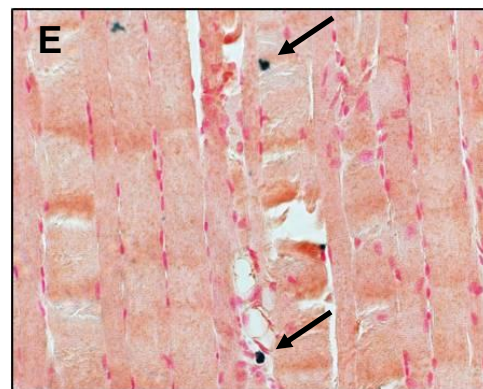
○ Sham



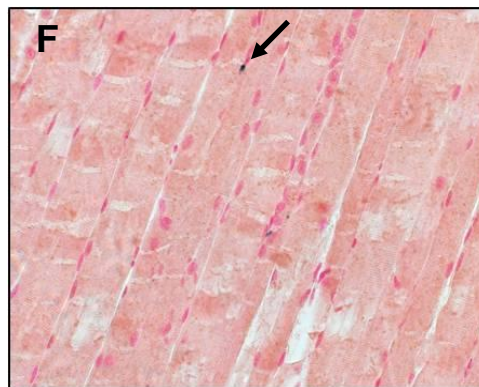
● LPS



● Kartoffel-Apyrase



● nontarg-CD39



● targ-CD39

**Abb.22.: Übersicht repräsentativer immunhistochemischer Färbungen (CD41-CD7/4) von TGK in der peritonealen Mikrozirkulation in den verschiedenen Behandlungsgruppen**

Die schwarzen Pfeile markieren TGK. Die Bilder A; B; D-F; entsprechen repräsentativen Aufnahmen in 40-facher Vergrößerung. Bild C zeigt beispielhaft TGK in 100-facher Vergrößerung.

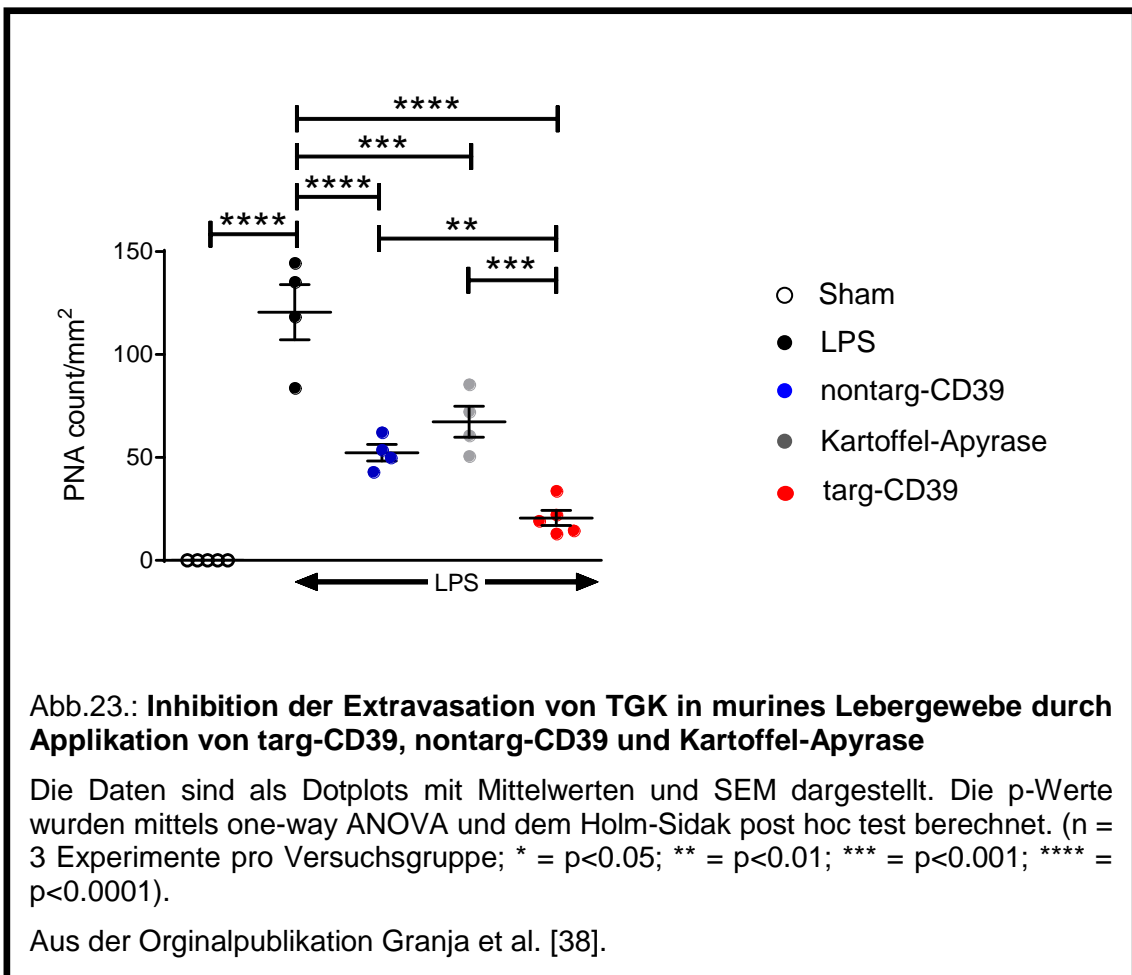
Aus der Originalpublikation Granja et al. [38].

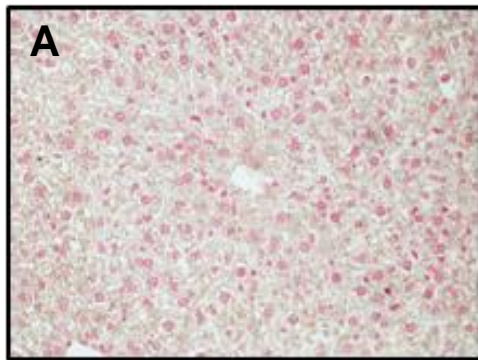


### 3.4.2 Inhibition der Sequestrierung von Thrombozyten-Granulozyten-Komplexen in der Leber

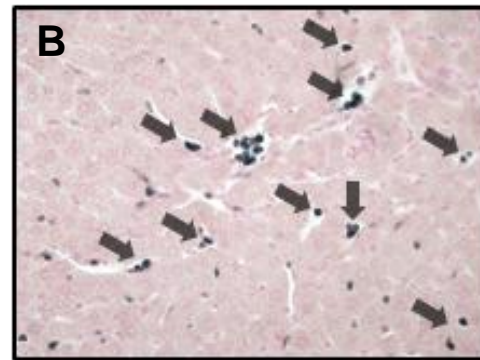
In Organschnitten der murinen Leber wurden analog zum Peritoneum auch H&E-, sowie IHC-Färbungen zur Analyse der Sequestrierung von Thrombozyten-Granulozyten-Komplexen in der Mikrozirkulation durchgeführt.

Hierbei wurde gezeigt, dass eine Behandlung mit targ-CD39, nontarg-CD39, sowie Kartoffel-Apyrase zu einer signifikanten Inhibition der Extravasation von TGK in das murine Lebergewebe führt. In der Behandlungsgruppe mit targ-CD39 wurde der größte Effekt nachgewiesen.

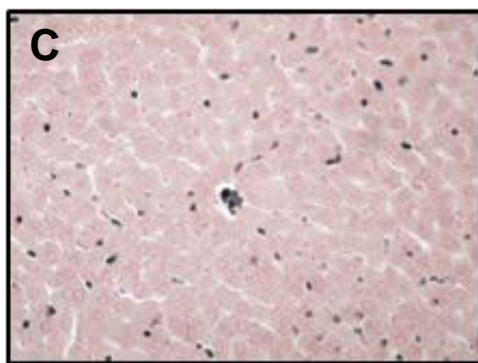




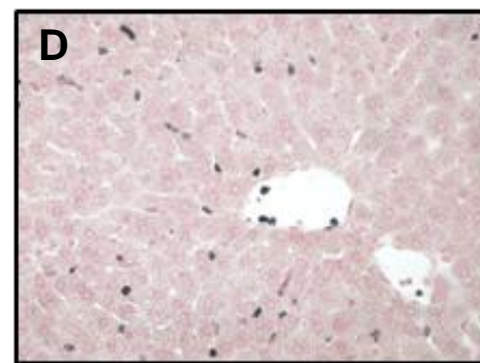
○ Sham



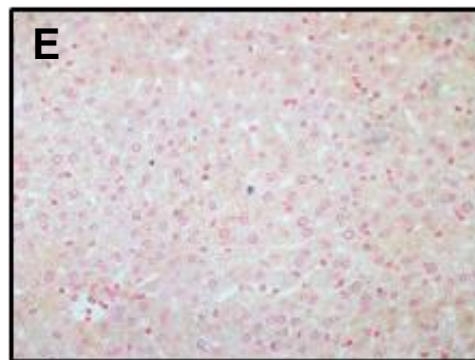
● LPS



● Kartoffel-Apyrase



● nontarg-CD39



● targ-CD39

**Abb.24.: Übersicht repräsentativer immunhistochemischer Färbungen (CD41-CD74) von TGK in der hepatischen Mikrozirkulation in den verschiedenen Behandlungsgruppen**

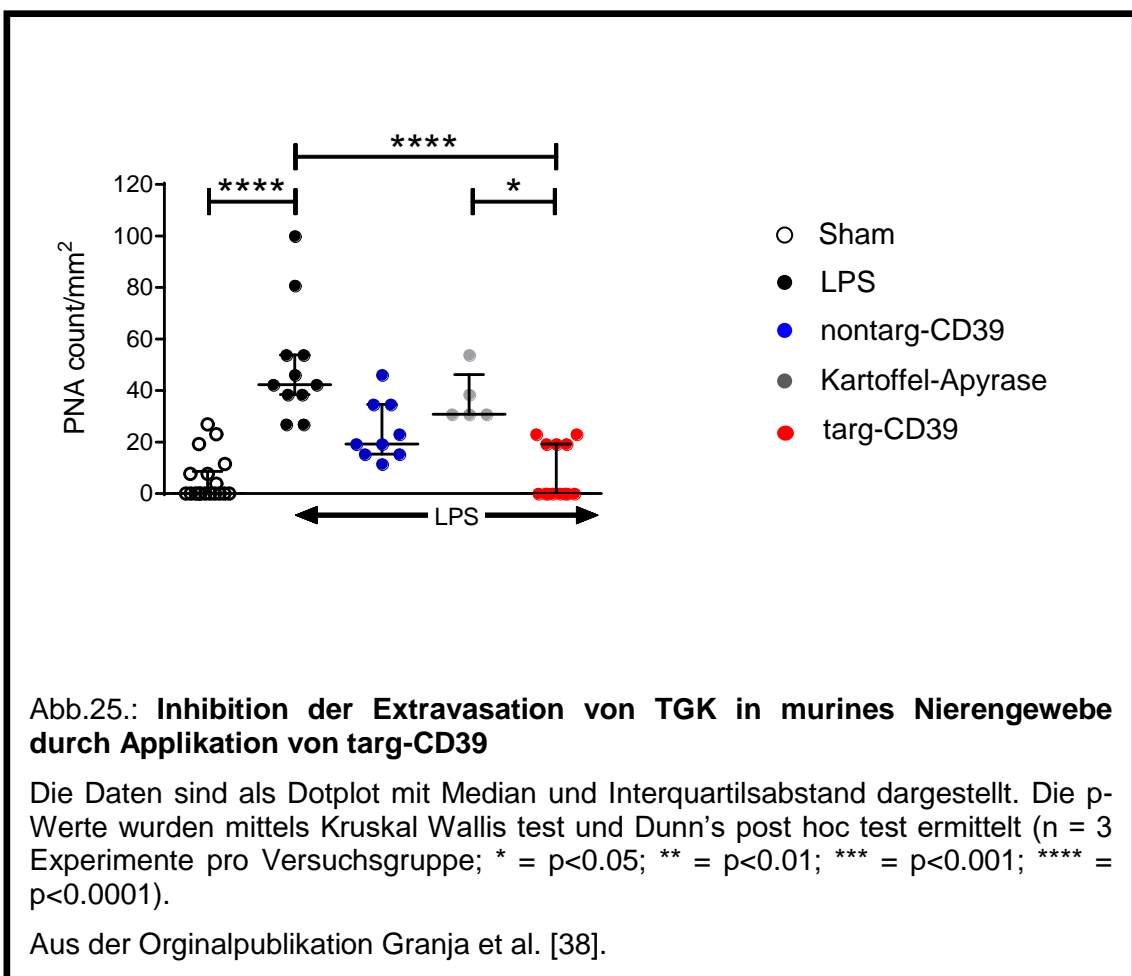
Die schwarzen Pfeile in Aufnahme B markieren TGK. Alle Aufnahmen wurden in 40-facher Vergrößerung angefertigt.

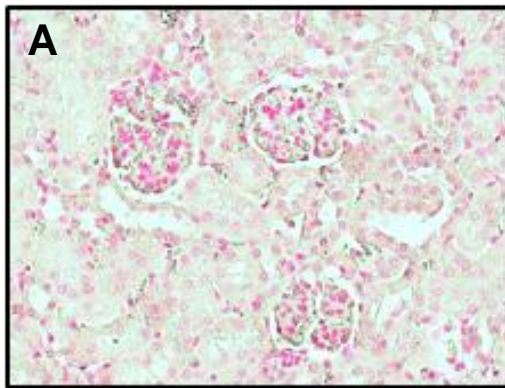
Aus der Originalpublikation Granja et al. [38].



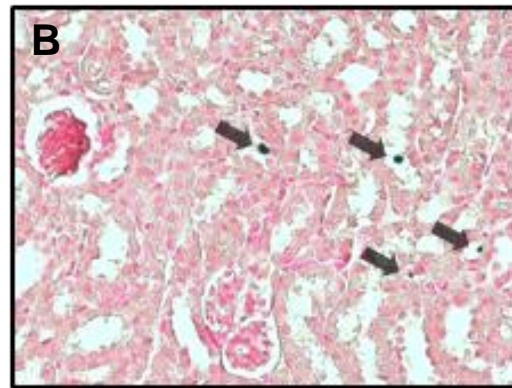
### 3.4.3 Inhibition der Sequestrierung von Thrombozyten-Granulozyten-Komplexen in der Niere

Mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen von murinem Nierengewebe wurde gezeigt, dass die Sequestrierung von TGK durch eine Behandlung mit targ-CD39 signifikant verhindert wird. In den mit der Kontrollsubstanz nontarg-CD39 behandelten Tieren konnte ebenfalls eine Reduktion der TGK-Sequestrierung gegenüber der LPS-Gruppe erreicht werden. Diese erreichte jedoch keine statistische Signifikanz.

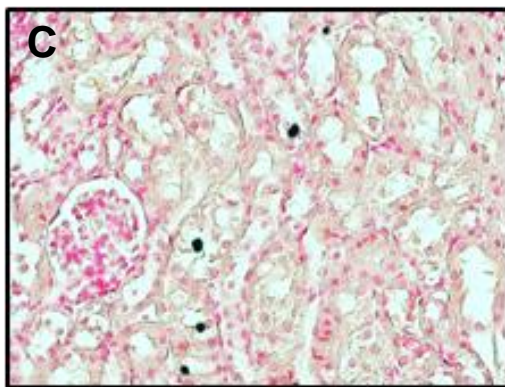




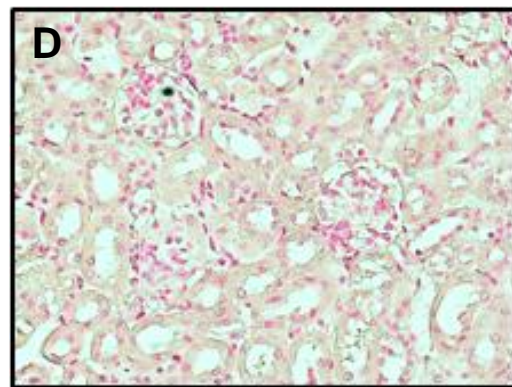
○ Sham



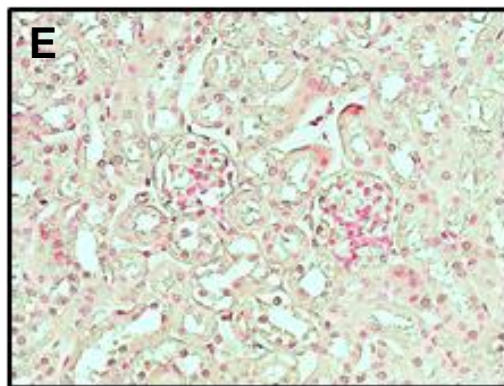
● LPS



● Kartoffel-Apyrase



● nontarg-CD39



● targ-CD39

**Abb.26.: Übersicht repräsentativer immunhistochemischer Färbungen (CD41-CD74) von TGK in der renalen Mikrozirkulation in den verschiedenen Behandlungsgruppen**

Die schwarzen Pfeile in Aufnahme B markieren TGK. Alle Aufnahmen wurden in 40-facher Vergrößerung angefertigt.

Aus der Originalpublikation Granja et al. [38].

## **4 Diskussion**

### **4.1 Effekt von Molekülen mit Apyrase-Aktivität unter den Bedingungen systemischer Inflammation**

In der vorliegenden Arbeit werden erste Untersuchungen zur fokussierten Inhibition aktivierter Thrombozyten mittels CD39 während einer systemischen Inflammationsreaktion beschrieben.

Die Ergebnisse belegen einen anti-inflammatorischen Effekt für Moleküle mit Apyrase-Aktivität auf die ADP-induzierte Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion und Leukozyten-Aktivierung *in vitro* sowie auf die LPS-induzierte Inflammationsreaktion *in vivo*. Durch Applikation von CD39 wurde *in vivo* die Thrombozyten-Aktivierung und die Interaktion von Thrombozyten mit Leukozyten und Endothelzellen deutlich reduziert. Außerdem konnte durch CD39 die Bildung von Thrombozyten-Leukozyten-Komplexen sowie die Transmigration von Leukozyten in umliegendes Organgewebe vermindert werden. Die in den vorliegenden Untersuchungen eingesetzte Substanz „targ-CD39“ wurde durch das Baker IDI Heart and Diabetes Institute in Melbourne ursprünglich zur Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen entwickelt. Untersuchungen von Hohmann et al. [30, 32] zeigten bereits, dass die fokussierte Metabolisierung von ATP bzw. ADP durch targ-CD39 im Bereich aktivierter Thrombozyten lokal effektiv antithrombotisch wirksam ist ohne die Blutungszeit zu verlängern. Insgesamt zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass eine Behandlung mit targ-CD39 im Vergleich zu den übrigen eingesetzten Substanzen insgesamt den stärksten anti-inflammatorischen Effekt erzielt.

### **4.2 Rolle der Thrombozyten im Rahmen septischer Krankheitsbilder**

In der Sepsis-Forschung der vergangenen Jahre hat sich herausgestellt, dass die Aktivierung der Hämostase und dabei insbesondere die Thrombozyten-Aktivierung eine zentrale Rolle bei Entzündungsreaktionen einnimmt [13]. So spielen vor allem Thrombozyten-Aggregate und Thrombozyten-Leukozyten-

Komplexe eine wichtige Rolle in der Entstehung der septischen Vaskulopathie, sowie in der Vermittlung Sepsis-assoziiierter Organschäden [13]. Mit der Applikation von LPS in vivo wird durch Induktion der mikrozirkulären Thrombozytenaggregation eine Thrombozytopenie induziert [13]. Traumata oder schwere Blutungen können nicht nur Auslöser einer systemischen Entzündungsreaktion sein, sondern sind oft auch mit einer Thrombozytopenie assoziiert. Fällt die Thrombozytenzahl unter 20.000/µl, kann es vor allem in entzündetem Gewebe zu Spontanblutungen kommen [39]. Weiterhin besitzen Thrombozyten eine entscheidende Funktion im Erhalt der Endothelbarriere. Während einer systemischen Entzündungsreaktion mit Thrombozytopenie zeigt sich eine erhöhte Endothelpermeabilität mit entsprechenden Symptomen wie Blutungsneigung, Extravasation von Leukozyten und Bildung von Ödemen [13]. Durch Transfusion von Thrombozyten konnten in Untersuchungen an septischen Mäusen Spontanblutungen innerhalb von entzündetem Gewebe verhindert werden. George et al. zeigte, dass Thrombozytenzahlen von 10 bis 15% des Normalwerts bereits einen suffizienten Schutz bieten [40].

Eine verminderte Thrombozytenzahl lässt sich bei vielen Patienten mit SIRS bzw. Sepsis beobachten. Studien ergaben eine Inzidenz der Thrombozytopenie bei Sepsis-Patienten von 15 bis 58%. Des Weiteren zeigte sich ein Zusammenhang zwischen einer Thrombozytopenie und dem Auftreten von Organdysfunktion, Organversagen und Mortalität [14, 15]. Wie beispielsweise die retrospektive Studie von Brotfain et al. zur Thrombozytopenie bei Sepsis-Patienten auf Intensivstation zeigt, stellt die Thrombozytopenie einen Parameter dar, der signifikant mit der Mortalität bei Sepsis korreliert. In dieser Studie wiesen Patienten mit Sepsis und Thrombozytopenie eine Mortalitätsrate von 22% auf [41]. In anderen Studien betrug die Mortalitätsrate bei Patienten mit manifester Thrombozytopenie sogar fast 40% [39].

Die hier beschriebenen Untersuchungen, lassen einen positiven Effekt von Molekülen mit Apyrase-Aktivität bei systemischer Inflammationsreaktion erkennen. Durch Inhibition der Aktivierung von Thrombozyten wurde unter anderem die Extravasation von Leukozyten in umliegendes Gewebe reduziert. Vor allem das Molekül targ-CD39 zeigt hier einen besonders günstigen Effekt.

Auf Grund der durch targ-CD39 inhibierten Thrombozyten-Aktivierung kommt es in Folge auch zu einer Reduktion an Interaktionen zwischen Thrombozyten und Leukozyten. In den hier vorgestellten Untersuchungen wurden keine Thrombozytenzahlen bestimmt. Es kann jedoch aufgrund der unter Apyrase / CD39 Therapie verminderten Thrombozytenaggregation bzw. TKG - Bildung stark vermutet werden, dass die Thrombozytopenie bei SIRS bzw. Sepsis unter Behandlung durch Substanzen mit Apyrase / CD39-Aktivität milder verläuft oder gar verhindert wird.

### **4.3 Der Effekt pharmakologischer Thrombozyten-Inhibition im Rahmen der Sepsis und systemischen Inflammation**

Wie bereits in 1.6.1 beschrieben, wurden bereits Pharmaka wie Acetylsalicylsäure oder P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub>-Rezeptorantagonisten zur Thrombozyten-inhibition in verschiedenen Studien zur Sepsis untersucht [26, 27].

Eisen et al. analysierten die Mortalität von SIRS Patienten unter Gabe von ASS. In der in Australien durchgeführten retrospektiven Kohortenstudie wurden 5.523 Patienten mit mindestens zwei der vier SIRS Kriterien (s.1.4) in die Studie eingeschlossen. 2.082 Patienten erhielten innerhalb von 24 Stunden nach SIRS-Diagnose mindestens 150mg ASS. Beim Vergleich der Gruppen ergab sich eine Krankenhausmortalität von 10,9% in der mit ASS behandelten Patientengruppe, in der nicht mit ASS behandelten Gruppe dagegen betrug diese 17,2 %. Eine Subgruppe mit 1.020 Patienten erfüllte die Kriterien einer Sepsis, wobei 135 dieser Patienten eine Therapie mit ASS erhielten. Beim Vergleich mit bezüglich Alter, Geschlecht, Begleitmedikation und Vorerkrankungen vergleichbaren Patienten ohne ASS-Therapie zeigte sich die Mortalität mit 27,4% signifikant niedriger als ohne ASS Gabe mit 42,2% [25].

In weiteren Studien wurden neben ASS noch andere Thrombozyten-aggregationshemmer auf ihre Auswirkungen in der Sepsis untersucht. Tsai et al. erfassten in ihrer Studie insgesamt 683.421 Patienten mit Sepsis, wovon 229.792 Patienten während des Krankenhausaufenthalts starben (33,6%). In der Fall-Kontroll-Studie wurden jeweils 186.374 Patienten mit bzw. ohne

Thrombozytenaggregationshemmer miteinander verglichen. Dabei konnte gezeigt werden, dass Sepsis Patienten unter Therapie mit Thrombozytenaggregationshemmern eine um 12% verminderte Mortalität aufweisen (angepasste OR 0.88) [42].

Osthoff et al. untersuchten in ihrer Studie den Einfluss niedrig-dosierter Acetylsalicylsäure auf die Mortalität von Blutstrominfektionen mit *Staphylococcus aureus*, einem der häufigsten Erreger einer Sepsis beim Menschen. Insgesamt konnten 314 Patienten (157 pro Gruppe) miteinander verglichen werden. Ähnlich wie in anderen Untersuchungen konnte auch in dieser Studie gezeigt werden, dass die 30-Tage Mortalität in der mit ASS behandelten Patientengruppe mit 12,1% gegenüber 27,4% bei der Gruppe ohne ASS-Therapie signifikant niedriger lag [43].

Die retrospektiven Untersuchungen von Gross et al. zeigten, dass Patienten unter Therapie mit Thrombozytenaggregationshemmern eine signifikant höhere Rate an ambulant erworbenen Pneumonien aufweisen (OR 3.39). Nach der Anpassung an Risikofaktoren für Pneumonien betrug die OR 1.48. Zusätzlich wiesen Patienten der Clopidogrel-Gruppe ein höheres Risiko auf, eine Sepsis zu entwickeln als Patienten ohne Thrombozytenaggregationshemmer (OR 1.62). Die Pneumonie-bedingte Mortalität fand sich dabei unter Clopidogrel numerisch vermindert. Nach Kontrolle möglicher Störfaktoren erreichte dies aber keine statistische Signifikanz [44].

Auch in anderen Studien konnte durch Thrombozyten-Inhibition kein signifikanter Unterschied bei der Mortalität systemischer Inflammation festgestellt werden. Valerio-Rojas et al. analysierten in einer retrospektiven Studie mit 651 eingeschlossenen Patienten die Auswirkungen von Thrombozytenaggregationshemmern in der schweren Sepsis bzw. im septischen Schock. Dabei wurden u.a. 180 Patienten mit ähnlicher Erkrankungsschwere gegeneinander verglichen, wobei sich keine signifikante verminderte Mortalität unter Thrombozytenaggregationshemmern zeigte (OR 0.73) [45].

Al Harbi et al. untersuchte in einer Kohortenstudie den Effekt von ASS bei kritisch kranken Patienten auf Intensivstation. Es wurden 763 Patienten in der Studie eingeschlossen, wovon 154 Patienten Aspirin mit einer Tagesdosis von durchschnittlich 81mg erhielten. Auch diese Studie konnte keine signifikante Reduktion der Krankenhausmortalität durch eine Thrombozyten-inhibition mittels ASS nachweisen (OR 0.95). Es zeigte sich im Gegensatz sogar eine höhere Inzidenz für eine schwere Sepsis (OR 1.70), sowie eine verlängerter Aufenthalt auf Intensivstation (durchschnittlich 2,67 Tage) bei Patienten unter ASS - Therapie [46].

Trotz dieser unterschiedlichen Ergebnisse konnte Mohananey et al in der einer Meta-Analyse aus dem Jahr 2016 mit 17 eingeschlossenen Studien zur Thrombozyten-Inhibition bei Patienten mit Sepsis bzw. systemischer Inflammation eine signifikant erniedrigte Mortalität nachweisen (OR 0.83). Auch die Inzidenz der akuten Lungenschädigung, wie sie oft bei SIRS bzw. Sepsis beobachtet werden kann, zeigte sich bei Einnahme eines Thrombozytenaggregationshemmers vermindert (OR 0.67) [47]. Des Weiteren fand sich eine verminderte Häufigkeit von Intubation und maschinelle Beatmung (OR 0.74) während SIRS bzw. Sepsis bei Patienten unter Thrombozyten-inhibition. Außerdem konnte die Meta-Analyse einen nicht signifikanten Trend zu verkürztem Krankenhausaufenthalt bei Patienten mit Thrombozyten-aggregationshemmer-Therapie feststellen. Mohananey et al. verglichen außerdem die in den Studien verwendeten unterschiedlichen Thrombozyten-aggregationshemmer und konnten feststellen, dass die günstigen Ergebnisse unabhängig von der verwendeten Medikation waren [27].

Eine aktuelle Meta-Analyse von Ouyang et al. aus dem Jahr 2019 mit zehn eingeschlossenen Kohortenstudien und insgesamt 689.897 Patienten konnte den positiven Effekt einer Thrombozytenaggregationshemmung bei septischen Patienten bestätigen. Es zeigte sich eine deutliche Reduktion der Sepsis-Mortalität bei Patienten unter Thrombozytenaggregationshemmer (OR 0.82). Die meisten der eingeschlossenen Studien verwendeten ASS zur

Thrombozyten-Inhibition, wobei eine signifikant verminderte Verweildauer auf Intensivstation und eine verminderte Krankenhausmortalität der septischen Patienten festgestellt werden konnte (OR 0.60). Die Meta-Analyse beschäftigte sich zudem mit dem Zeitpunkt der Applikation einer antithrombotischen Medikation. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl eine vorhergehende (OR 0.78) als auch die anschließende (OR 0.59) Applikation eines Thrombozytenaggregationshemmers eine Reduktion der Mortalität zur Folge hatte [48].

Insgesamt lässt sich daraus ableiten, dass die Thrombozyten-Inhibition bei Patienten mit SIRS bzw. Sepsis einen vielversprechenden Therapieansatz darstellen könnte.

Es gilt dabei jedoch grundsätzlich zu beachten, dass es sich bei den vorgenannten Studien lediglich um retrospektive Untersuchungen handelt. Zudem wurde die Behandlung mit den jeweiligen Thrombozytenaggregationshemmern in der Regel im Rahmen von Begleiterkrankungen, vor Aufnahme der Patienten auf die Intensivstation wegen systemischer Inflammation begonnen. Es zeigte sich dabei, dass die Patienten mit Thrombozyten-Inhibition im Durchschnitt älter waren und auch entsprechend mehr Begleiterkrankungen aufwiesen. Im Zuge dieser Komorbiditäten erhielten einige der Patienten zusätzlich noch andere Medikationen, wie beispielsweise Statine oder nichtsteroidale Antirheumatika, die möglicherweise ebenfalls Einflüsse auf Entzündungsprozesse während SIRS bzw. Sepsis haben können [42]. Es ist dennoch bemerkenswert, dass etliche Studien einen signifikanten Überlebensvorteil für Patienten mit antithrombotischer Medikation während SIRS bzw. Sepsis belegen können.

Sehr interessant ist hier die ASPREE Studie, eine seit 2012 laufende randomisierte Doppelblindstudie aus Australien und USA, die den Einsatz von niedrig dosierter Acetylsalicylsäure (< 150 mg/Tag) bei älteren Menschen (> 70 Jahre) untersucht. Ein Teil dieser Studie (ANTISEPSIS) beschäftigt sich dabei mit der Hypothese, dass eine längerfristige Einnahme von niedrig dosiertem ASS die Mortalität der Sepsis, sowie die Verweildauer von septischen Patienten



auf Intensivstation reduzieren kann. In der ASPREE Studie wurden fast nur gesunde Patienten über 70 Jahren eingeschlossen, die randomisiert täglich 100 mg ASS oder Placebo einnehmen. Die Veröffentlichung der Ergebnisse wird für 2019 erwartet. Sollte sich die Hypothese der Studie bestätigen, wären weiterführende Untersuchungen zur Thrombozytenaggregationshemmung während systemischer Inflammation die logische Konsequenz [49].

#### **4.4 Der antiinflammatorische Effekt von CD39**

Wie bereits bekannt, kann CD39 ATP bzw. ADP zu AMP hydrolysieren, welches durch CD73 weiter zu Adenosin verstoffwechselt wird. Adenosin selbst kann über  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  und  $A_3$  – Rezeptoren, die auf verschiedenen Zellen des menschlichen Organismus inklusive der Immunzellen exprimiert werden, eine anti-inflammatorische Wirkung vermitteln [31]. Damit ist es möglich, aus einem prothrombotischem Milieu durch den Enzymkomplex CD39 / CD73 einen anti-inflammatorischen Stimulus zu generieren. Daher analysierten Csóka et al. einen möglichen anti-inflammatorischen Effekt auf Makrophagen durch CD39 / CD73. Makrophagen, die Hauptproduzenten proinflammatorischer Zytokine, wurden in vitro in Gegenwart von ATP durch LPS stimuliert. Dabei produziertes Adenosin bewirkte eine Reduktion der IL-12 Freisetzung und eine gesteigerte Produktion von anti-inflammatorischem IL-10 in den Makrophagen. Isolierte CD73 „Knock-Out“ (KO) Makrophagen zeigten im Gegensatz zu normalen „Wildtyp“ (WT) Makrophagen keine Reduktion der Produktion und Freisetzung von IL-12 [50].

Cohen et al. zeigten, dass es durch Stimulierung der TLR auf Makrophagen in vitro zu einer Freisetzung von ATP kommt, welches eine proinflammatorische Wirkung vermittelt. Eine umgehende ATP-Hydrolyse durch CD39 und ein damit verminderter ATP Spiegel weisen auf eine anti-inflammatorische Wirkung von CD39 hin. Die alleinige Stimulation der Makrophagen mit LPS in vitro hatte die gesteigerte Produktion und Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie  $TNF-\alpha$  und IL-12 zur Folge. Erfolgte die Stimulierung mit LPS dagegen in Gegenwart von ATP, konnte eine Unterdrückung der Zytokin-Produktion und -

Freisetzung beobachtet und eine gesteigerte Freisetzung anti-inflammatorisch wirkender Mediatoren (IL-10, IL-33, Hb-egf und Sphk1) gemessen werden. Die Zugabe des selektiven CD39-Inhibitors POM-1 machte die induzierte anti-inflammatorische Wirkung jedoch wieder vollständig rückgängig. Wurden isolierte Makrophagen mit bzw. ohne POM-1 durch LPS stimuliert und das LPS anschließend wieder entfernt, ließen sich im Gegensatz zur Gruppe der nicht mit POM-1 behandelten Makrophagen weiterhin gesteigerte proinflammatorische Zytokin-Spiegel messen. Cohen et al. belegten somit die zentrale Rolle von CD39 zur Regulation von Entzündungsreaktionen und auch die CD39-vermittelte anti-inflammatorische Wirkung [51].

Csóka et al. untersuchten den Effekt von CD39 auf das Überleben der Sepsis. In einem „Cecal ligation and puncture“ (CLP) – Tiermodell konnte für die CD39 Behandlung ein klarer Überlebensvorteil für die so induzierte Sepsis gezeigt werden. Weitere Bestätigung für die wichtige Rolle von CD39 konnten Csóka et al. in Untersuchungen mit CD39-KO Mäuse finden. Diese Tiere zeigten im Vergleich zu WT-Tieren eine deutlich erhöhte Mortalität im CLP-Modell. In weiterführenden Experimenten analysierten Csóka et al. die bakterielle Belastung im Peritoneum und in der Blutbahn septischer Tiere nach CLP. In der Gruppe der CD39-KO Tiere zeigte sich im Peritoneum eine deutlich höhere Bakterien-Belastung als in der Gruppe der WT-Tiere, wohingegen in der Blutbahn die ermittelten Bakterienzahlen vergleichbar waren. Csóka et al. zeigten außerdem erniedrigte Spiegel proinflammatorischer Zytokine (wie TNF- $\alpha$  und IL-6) in Blut und peritonealer Lavage bei Tieren, die nach Induktion einer Sepsis im CLP-Modell eine Behandlung mit CD39 erhielten. In der Gruppe der CD39-KO Tiere ließen sich dagegen erhöhte Zytokin-Spiegel messen und analog in entnommenen Organen höhere Spiegel proinflammatorischer Mediatoren, sowie im Lungengewebe eine erhöhte Infiltration von Granulozyten nachweisen. Auch war die Nierenfunktion gemessen am Harnstoff-Spiegel im Blutplasma bei den CD39-KO Tieren im Vergleich zur Gruppe der WT-Tiere verschlechtert und damit Hinweis auf eine akute septische Organdysfunktion im Sinne eines akuten Nierenversagens. Dies wird oft auch im klinischen Setting bei SIRS- bzw. Sepsis-Patienten beobachtet. Umgekehrt konnte Csóka et al.

ebenfalls nachweisen, dass die CD39-Transkriptionsrate in Lunge und Leber während der CLP-induzierten Sepsis erhöht ist. Ein weiterer Hinweis auf die zentrale Bedeutung von CD39 während der Sepsis kommt von der Beobachtung, dass Exposition von Makrophagen mit *E.coli* Bakterien in vitro die Expression von CD39 auf Makrophagen durch Veränderung der Promotor-Aktivität steigern kann [50]. Eine mögliche Interpretation dieser Beobachtung ist, dass der Organismus selbstständig versucht, durch vermehrte CD39-Aktivität einen protektiven Effekt während SIRS bzw. Sepsis zu induzieren.

Diese Daten aus der Literatur passen sehr gut zu den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnissen, denn auch für die Behandlung mit targ-CD39 konnte während LPS-induzierter systemischer Inflammation eine effektive Reduktion der Bildung von TGKs sowie der Transmigration der Thrombozyten-Leukozyten-Komplexe in umliegendes Gewebe vermieden werden.

In weiterführenden Untersuchungen zu targ-CD39 konnten Granja et al. außerdem mittels PCR-Analyse verschiedener muriner Geweben (Peritoneum, Niere, Leber) eine deutliche Reduktion der Transkription proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-6 und Keratinozyten-Chemokin (KC) durch die Behandlung mit targ-CD39 bzw. Molekülen mit CD39 Aktivität zeigen. Weiter war auch die Transkription inflammatorischer Rezeptoren wie TLR4 oder CD11b durch die Applikation von targ-CD39 signifikant inhibiert. Darüber hinaus wurde durch targ-CD39 eine LPS-assoziierte Nierenschädigung vermindert [38].

Ein potentieller Nachteil beim Einsatz von Thrombozyten-Inhibitoren in der Therapie der Sepsis ist die Induktion von Blutungskomplikationen. Durch den Einsatz von klassischen Thrombozytenaggregationshemmern oder systemischer CD39 Applikation würde jedoch nicht nur die Aktivierung der Thrombozyten mit Hinblick auf eine Vermeidung der Sepsis-assoziierten Komplikationen verhindert, sondern auch die natürliche Hämostase beeinflusst. Damit ergäbe sich bei einer klinischen Behandlung ein Nebenwirkungsprofil mit erhöhter Blutungsneigung und ggf. sogar spontanen Blutungen. Ein entscheidender Vorteil von targ-CD39 in der Therapie einer systemischen Entzündungsreaktion während SIRS bzw. Sepsis ist die Fokussierung der

antithrombotischen Wirkung von CD39 durch den scFV<sub>SCE5</sub>-Antikörper auf aktivierte Thrombozyten. Diese Fokussierung ermöglicht die lokale Wirkung mit hoher CD39-Konzentration im Bereich aktivierter Thrombozyten, was damit die generalisierte Thrombozyten-Inhibition und das damit verbundene Blutungsrisiko reduziert. Hohmann et al. konnten zeigen, dass die Applikation von Target CD39 keine verlängerte Blutungszeit mit sich bringt [29, 32].

Das verminderte Blutungsrisiko bzw. die nicht verlängerte Blutungszeit unter targ-CD39 konnte auch durch Granja et al. [38] in weiterführenden Untersuchungen zu den hier beschriebenen Experimenten bestätigt werden. Zusätzlich wurde in den weiterführenden Untersuchungen auch die Auswirkungen einer Behandlung mit targ-CD39, nontarg-CD39 bzw. Kartoffel-Apyrase auf das Überleben untersucht. Hierfür wurden in einem murinen CLP-Modell nach Induktion einer abdominalen Sepsis die entsprechenden Testsubstanzen targ-CD39, nontarg-CD39 bzw. Kartoffel-Apyrase verabreicht. Im Anschluss wurden Überleben, Körpergewicht, sowie Körpertemperatur der Tiere untersucht. Das in diesen weiterführenden Untersuchungen eingesetzte CLP-Modell stellt heute den Goldstandard der Sepsisforschung dar, wobei hier nach Längslaparotomie mittels Perforation des Caecum eine Sepsis induziert wird, welche am ehesten einer humanen Sepsis gleicht [52].

Hierbei konnte ein signifikanter Überlebensvorteil in der targ-CD39 Versuchsgruppe gegenüber den unbehandelten Tieren gezeigt werden. Auch das Körpergewicht und die Körpertemperatur der Tiere war in der targ-CD39-Behandlungsgruppe signifikant höher als in der unbehandelten Gruppe [38]. Damit lässt sich der positive Effekt von targ-CD39 in der Therapie systemischer Inflammation bestätigen.

#### **4.5 Limitationen und Ausblick**

Es muss selbstverständlich eingeräumt werden, dass sich der Einsatz von targ-CD39 als spezifisches Sepsis-Therapeutikum noch in der Entwicklung befindet. Die begünstigenden Effekte wurden in der vorliegenden Arbeit nur im LPS-induzierten Sepsismodell gezeigt, bei dem schlagartig eine massive

Entzündungsreaktion induziert wird. Im klinischen Setting dagegen entwickelt sich ein SIRS oder eine Sepsis meist langsamer, beispielsweise als Folge einer lokalen Infektion. Weiterhin weist die Sepsis im klinischen Setting eine große Variabilität auf. Betroffen sind meist Patienten höheren Alters mit in der Regel diversen Begleiterkrankungen und Komedikationen, die u.a. auch auf das Gerinnungssystem wirken können [18]. All diese unterschiedlichen Parameter, welche die Prognose von Patienten erheblich beeinflussen können, lassen sich jedoch nur sehr schwierig in einem Tierexperiment berücksichtigen bzw. darstellen [18].

Schließlich wurde das in den in vivo Untersuchungen eingesetzte targ-CD39 zeitgleich mit der intraperitonealen LPS-Injektion intravenös verabreicht. Dies stimmt jedoch nur bedingt mit der klinischen Praxis überein, in der sich Patienten in der Regel erst zu einem späteren Zeitpunkt zur Behandlung vorstellen, wenn bereits Sepsis-assoziierte Symptome bzw. Komplikationen eingetreten sind. Inwiefern eine Behandlung mit targ-CD39 auch bei späterer Gabe im Verlauf einer Sepsis noch positive Effekte erzielen kann, sollte in zukünftigen Experimenten untersucht werden.

Dennoch könnte die Applikation von Substanzen mit Apyrase-Aktivität und insbesondere targ-CD39 durch die spezifische Verminderung einer septischen Vaskulopathie bei SIRS bzw. Sepsis ein neuartiger und erfolgsversprechender Ansatz einer Sepsis-Therapie sein. Das klinische Potential dieser neuen Therapiestrategie zur Inhibition der systemischen Inflammation sollte in weiterführenden Studien überprüft werden.

## 5 Zusammenfassung

Die systemische Inflammation (SIRS) bzw. Sepsis stellt eine der Hauptursachen für Morbidität und Mortalität in der Intensivmedizin dar. Während systemischer Inflammation kommt es zur Ausschüttung proinflammatorischer Mediatorsubstanzen, die nachfolgend eine generalisierte Aktivierung und Interaktion zwischen Thrombozyten, Leukozyten und dem Gefäßendothel induzieren. Im Rahmen einer septischen Vaskulopathie bleiben Thrombozyten-Granulozyten-Komplexe (TGK) in der Mikrozirkulation haften und können diese okkludieren. Im Weiteren wird die transendotheliale Migration von Leukozyten in entzündetes bzw. infiziertes Gewebe vermittelt. Auf diese Weise wird somit ein inflammatorischer Organschaden vermittelt.

Auf Basis dieser Vorgänge wurde als Ziel dieser Arbeit die Inhibition Sepsis-assoziiierter Komplikationen durch Applikation von Molekülen mit Apyrase-Aktivität, inklusive CD39 (NTPDase-1) entwickelt. CD39 metabolisiert den Thrombozyten-Agonisten Adenosindiphosphat (ADP) und begünstigt damit die Bildung von anti-inflammatorischem Adenosin. Das in den Untersuchungen unter anderem eingesetzte Fusionsprotein targ-CD39, bestehend aus CD39 und einem Antikörper gegen den aktivierten thrombozytären GPIIb/IIIa-Rezeptor, ermöglicht die CD39-Wirkung gezielt in den Bereich aktivierter Thrombozyten zu fokussieren. Durch diesen spezifischen Effekt von targ-CD39 lassen sich – wie bereits in Vorarbeiten in einem Thrombosemodell gezeigt – Nebenwirkungen von Thrombozyteninhibitoren wie z.B. ein erhöhtes Blutungsrisiko vermeiden. Als Kontrollsubstanzen dienten in den Untersuchungen das unspezifische Fusionsprotein nontarg-CD39, sowie Kartoffel-Apyrase, welche beide ebenfalls ADP spalten, jedoch eine generalisierte CD39 Wirkung mit erhöhter Blutungsgefahr entfalten.

In initialen in vitro Experimenten wurde der Effekt von Kartoffel-Apyrase auf die Aktivierung und Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten analysiert. Weiter wurden in einem durch intraperitoneale LPS-Injektion induzierten Sepsismodell mit C57BL/6 Mäusen Kartoffel-Apyrase, targ-CD39, sowie

nontarg-CD39 als unspezifische Kontrollsubstanz in äquimolarer Dosierung (0,4 µg/g) intravenös appliziert.

Mittels Intravitalmikroskopie wurden in postkapillären Venolen der Cremastermuskulatur Thrombozyten-Leukozyten-Endothel Interaktionen und die Extravasation von Leukozyten untersucht. In murinem Vollblut wurde durchflusszytometrisch die Bildung von TGK, sowie der Aktivierungszustand komplexgebundener Granulozyten und Thrombozyten analysiert. In Organewebe (Peritoneum, Leber und Niere) wurde mit immunhistochemischen Färbungen die Extravasation von Leukozyten untersucht.

Aus den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ergab sich, dass die Behandlung mit targ-CD39, nontarg-CD39 bzw. Kartoffel-Apyrase die Thrombozyten-Endothel-Interaktion sowie die Extravasation von Leukozyten reduziert. Gleichzeitig wurde die Leukozyten-Rollgeschwindigkeit durch die Applikation von targ-CD39 gesteigert. Die Bildung von TGK wurde effektiv durch die Testsubstanzen verhindert. In immunhistochemischen Färbungen des Peritoneums, der Niere und der Leber zeigten sich nach Behandlung mit targ-CD39 signifikant weniger migrierte TGK.

Diese günstigen Effekte der Applikation von spezifisch auf aktivierte Thrombozyten wirkendes targ-CD39 mit Reduktion Inflammations-assoziiierter Komplikationen im murinen Sepsismodell lassen targ-CD39 als einen vielversprechenden Ansatz in der Therapie systemischer Inflammation erscheinen. Daher sollte die Behandlung mit targ-CD39 in weiterführenden Studien (klinisch sowie experimentell) bei Patienten mit SIRS bzw. Sepsis weiterentwickelt und untersucht werden.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Kumar, R., et al., *The dynamics of acute inflammation*. J Theor Biol, 2004. **230**(2): p. 145-155.
2. Cohen, J., *The immunopathogenesis of sepsis*. Nature, 2002. **420**: p. 885-891.
3. Nourshargh, S. and R. Alon, *Leukocyte migration into inflamed tissues*. Immunity, 2014. **41**(5): p. 694-707.
4. Ley, K., et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(9): p. 678-689.
5. Leliefeld, P.H., et al., *The role of neutrophils in immune dysfunction during severe inflammation*. Crit Care, 2016. **20**: p. 73.
6. de Oliveira, S., E.E. Rosowski, and A. Huttenlocher, *Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse*. Nat Rev Immunol, 2016. **16**(6): p. 378-391.
7. Dale, D.C., *The phagocytes neutrophils and monocytes*. Blood, 2008. **112**(4): p. 935-945.
8. Arthur, J., R. Andrews, and E. Gardiner, *Neutrophil extracellular traps (NETs) and the role of platelets in infection*. Thrombosis and Haemostasis, 2017. **112**(10): p. 659-665.
9. Levi, M. and T. van der Poll, *Inflammation and coagulation*. Crit Care Med, 2010. **38**(2 Suppl): p. 26-34.
10. Opal, S.M. and C.T. Esmon, *Bench-to-bedside review: Functional relationships between coagulation and the innate immune response and their respective roles in the pathogenesis of sepsis*. Critical Care 2002. **7**(1): p. 23-38.
11. Sauter, R.J., et al., *Functional Relevance of the Anaphylatoxin Receptor C3aR for Platelet Function and Arterial Thrombus Formation Marks an Intersection Point Between Innate Immunity and Thrombosis*. Circulation, 2018. **138**(16): p. 1720-1735.
12. Angus, D.C. and T. van der Poll, *Severe sepsis and septic shock*. N Engl J Med, 2013. **369**(9): p. 840-851.
13. Rondina, M.T., A.S. Weyrich, and G.A. Zimmerman, *Platelets as cellular effectors of inflammation in vascular diseases*. Circ Res, 2013. **112**(11): p. 1506-1519.
14. Li, Z., et al., *Platelets as immune mediators: their role in host defense responses and sepsis*. Thromb Res, 2011. **127**(3): p. 184-188.
15. de Stoppelaar, S.F., C. van 't Veer, and T. van der Poll, *The role of platelets in sepsis*. Thromb Haemost, 2014. **112**(4): p. 666-677.
16. Hotchkiss, R.S., *The Pathophysiology and Treatment of Sepsis*. The New England Journal of Medicine, 2003. **348**: p. 138-150.
17. Engel, C., et al., *Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study*. Intensive Care Med, 2007. **33**(4): p. 606-618.
18. Singer, M., et al., *The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)*. JAMA, 2016. **315**(8): p. 801-810.
19. Baehner, T., et al., *[Cardiopulmonary bypass in cardiac surgery]*. Anaesthesist, 2012. **61**(10): p. 846-856.



20. Wan, S., J.-L. LeClerc, and J.-L. Vincent, *Inflammatory Response to Cardiopulmonary Bypass*. Chest, 1997. **112**(3): p. 676-692.
21. Fleischmann, C., et al., *Hospital Incidence and Mortality Rates of Sepsis*. Dtsch Arztebl Int, 2016. **113**(10): p. 159-166.
22. Jurk, K. and B.E. Kehrel, *Pathophysiologie und Biochemie der Thrombozyten*. Der Internist, 2010. **51**(9): p. 1086-1094.
23. Vieira-de-Abreu, A., et al., *Platelets: versatile effector cells in hemostasis, inflammation, and the immune continuum*. Semin Immunopathol, 2012. **34**(1): p. 5-30.
24. Ruggeri, Z.M., *Platelets in atherothrombosis*. Nature Medicine, 2002. **8**: p. 1227-1234.
25. Eisen, D.P., D. Reid, and E.S. McBryde, *Acetyl salicylic acid usage and mortality in critically ill patients with the systemic inflammatory response syndrome and sepsis*. Crit Care Med, 2012. **40**(6): p. 1761-1767.
26. Akinosoglou, K. and D. Alexopoulos, *Use of antiplatelet agents in sepsis: a glimpse into the future*. Thromb Res, 2014. **133**(2): p. 131-138.
27. Mohananey, D., et al., *Effect of antiplatelet therapy on mortality and acute lung injury in critically ill patients: A systematic review and meta-analysis*. Ann Card Anaesth, 2016. **19**(4): p. 626-637.
28. Chen, Z.M., *Addition of clopidogrel to aspirin in 45 852 patients with acute myocardial infarction: randomised placebo-controlled trial*. The Lancet, 2005. **366**(9497): p. 1607-1621.
29. Hohmann, J.D. and K. Peter, *Activated-platelet targeting of CD39 as a potential way forward. The quest for efficient antithrombotic therapy without associated bleeding complications*. Hamostaseologie, 2016. **36**(1): p. 17-25.
30. Ziegler, M., et al., *A single-chain antibody-CD39 fusion protein targeting activated platelets protects from cardiac ischaemia/reperfusion injury*. Eur Heart J, 2018. **39**(2): p. 111-116.
31. Antonioli, L., et al., *CD39 and CD73 in immunity and inflammation*. Trends Mol Med, 2013. **19**(6): p. 355-367.
32. Hohmann, J.D., et al., *Delayed targeting of CD39 to activated platelet GPIIb/IIIa via a single-chain antibody: breaking the link between antithrombotic potency and bleeding?* Blood, 2013. **121**(16): p. 3067-3075.
33. May, A.E., P. Seizer, and M. Gawaz, *Platelets: inflammatory firebugs of vascular walls*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(3): p. 5-10.
34. Gawaz, M., et al., *EMMPRIN (CD147) is a novel receptor for platelet GPVI and mediates platelet rolling via GPVI-EMMPRIN interaction*. Thrombosis and Haemostasis, 2017. **101**(04): p. 682-686.
35. Granja, T., et al., *Using six-colour flow cytometry to analyse the activation and interaction of platelets and leukocytes--A new assay suitable for bench and bedside conditions*. Thromb Res, 2015. **136**(4): p. 786-796.
36. Tóth, O., et al., *Multiple electrode aggregometry: A new device to measure platelet aggregation in whole blood*. Thrombosis and Haemostasis, 2006. **96**: p. 782-788.

37. Hyman, M.C., et al., *Self-regulation of inflammatory cell trafficking in mice by the leukocyte surface apyrase CD39*. J Clin Invest, 2009. **119**(5): p. 1136-1149.
38. Granja, T., et al., *Targeting CD39 Toward Activated Platelets Reduces Systemic Inflammation and Improves Survival in Sepsis*. Critical Care Medicine, 2019. **47**(5): p. e420-e427.
39. Jean-Louis, V., *Platelet function in sepsis*. Crit Care Med, 2002. **30**: p. 313-317.
40. George, T., *Inflammation induces hemorrhage in thrombocytopenia*. Blood, 2008. **111**: p. 4958-4964.
41. Evgeni, B., *Clinical outcome of critically ill patients with thrombocytopenia*. Anaesthesiology Intensive Therapy, 2016. **48**(5): p. 294-299.
42. Tsai, M.J., et al., *Association of prior antiplatelet agents with mortality in sepsis patients: a nationwide population-based cohort study*. Intensive Care Med, 2015. **41**(5): p. 806-813.
43. Osthoff, M., et al., *Low-Dose Acetylsalicylic Acid Treatment and Impact on Short-Term Mortality in Staphylococcus aureus Bloodstream Infection: A Propensity Score-Matched Cohort Study*. Crit Care Med, 2016. **44**(4): p. 773-781.
44. Gross, A.K., 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**(2): p. 147-154.
45. Valerio-Rojas, J.C., et al., *Outcomes of severe sepsis and septic shock patients on chronic antiplatelet treatment: a historical cohort study*. Crit Care Res Pract, 2013. **2013**: p. 782573.
46. Al Harbi, S.A., et al., *Association between aspirin therapy and the outcome in critically ill patients: a nested cohort study*. BMC Pharmacol Toxicol, 2016. **17**: p. 5.
47. Zarbock, A., K. Singbartl, and K. Ley, *Complete reversal of acid-induced acute lung injury by blocking of platelet-neutrophil aggregation*. J Clin Invest, 2006. **116**(12): p. 3211-3219.
48. Ouyang, Y., et al., *Effects of antiplatelet therapy on the mortality rate of patients with sepsis: A meta-analysis*. J Crit Care, 2019. **50**: p. 162-168.
49. Eisen, D.P., et al., *Aspirin To Inhibit SEPSIS (ANTISEPSIS) randomised controlled trial protocol*. BMJ Open, 2017. **7**(1): p. e013636.
50. Csoka, B., et al., *CD39 improves survival in microbial sepsis by attenuating systemic inflammation*. FASEB J, 2015. **29**(1): p. 25-36.
51. Cohen, H.B., et al., *TLR stimulation initiates a CD39-based autoregulatory mechanism that limits macrophage inflammatory responses*. Blood, 2013. **122**(11): p. 1935-1945.
52. Dejager, L., et al., *Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis?* Trends Microbiol, 2011. **19**(4): p. 198-208.

## **7 Erklärungen zum Eigenanteil**

Die Konzeption und Arbeit der Studie wurde in der Universitätsklinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin der Universität Tübingen unter Betreuung durch Herrn PD Dr. med. A. Straub (Arbeitsgruppenleiter) durchgeführt.

Sämtliche intravitalmikroskopischen und durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden nach Einarbeitung von mir eigenständig durchgeführt. Die gesammelten Daten wurden eigenständig durch mich ausgewertet.

Das in den Experimenten verwendete Fusionsprotein targ-CD39 und die Kontrollsubstanz nontarg-CD39 wurden in unserem Partnerlabor, dem Baker IDI Heart and Diabetes Institute in Melbourne, Australien hergestellt und freundlicherweise für die Versuche zur Verfügung gestellt.

Die histologischen Untersuchungen der entnommenen Organe mit Anfertigung von Paraffinschnitten, H&E- bzw. Immunhistochemischen Färbungen wurden nach Etablierung durch Frau A. Streißenberger (MTA) vervollständigt.

Die statistische Auswertung erfolgte durch mich, unter der Anleitung von Herrn PD Dr. med. A. Straub. Zudem erfolgte eine Beratung durch das Institut für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie der Universität Tübingen.

Die hier dargestellten Daten sind gemeinsam mit den weiterführenden Untersuchungen zu targ-CD39 während systemischer Inflammation in der Zeitschrift „Critical Care Medicine“ im Februar 2019 veröffentlicht worden, wobei ich mit einer Koautorenschaft beteiligt bin.

Ich versichere, das Manuskript selbständig unter Anleitung durch Herrn PD Dr. med. A. Straub verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 18.04.2019

Christian Glück

## 8 Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Granja, T; Körner, A; Glück, C; Hohmann, J; Wang, X; Köhler, D; Streißenberger, A; Nandurkar, H; Mirakaj, V; Rosenberger, P; Peter, K; Straub, A; Targeting CD39 toward activated platelets reduces systemic inflammation and improves survival in sepsis – a preclinical pilot study. *Critical Care Medicine*, 2019. Volume 47(5): p. e420-e427.

Weiter wurden die Daten auf dem Deutschen Anästhesie Kongress 2016 (DAC) und dem Deutschen Intensiv und Notfallmedizin Kongress 2016 (DIVI) vorgestellt:

Glück, C. (2016): Thrombozyten-spezifische Applikation der ENTPDase1 CD39 inhibiert die Aktivierung und Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten im murinen Sepsis Modell. Deutscher Anästhesie Kongress. Leipzig: 15.04.2016.

Glück, C. (2016): Thrombozyten-spezifische Applikation der Ecto-Apyrase CD39 inhibiert die Aktivierung und Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten unter Bedingungen LPS-induzierter Sepsis. Deutscher Intensiv- und Notfallmedizin Kongress. Hamburg: 02.12.2016.

## 9 Danksagung

Herrn PD Dr. med. Andreas Straub danke ich, für das Überlassen dieses spannenden Themas und die hervorragende Betreuung meiner Arbeit.

Herrn Dr. rer. nat. Tiago Granja danke ich, für die Unterstützung bei den Experimenten und die Einarbeitung im Labor mit vielen Stunden vor dem Intravitalmikroskop.

Frau Arianne Streißenberger bin ich für das Vervollständigen der Organfärbungen zu Dank verpflichtet.

Frau Serna-Higuita aus dem Institut für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie der Universität Tübingen hat mich bei der Erstellung der Statistik hervorragend beraten.

Die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. K. Peter, aus dem Baker IDI Heart & Diabetes Institut in Melbourne (Australien), hat die Fusionsmoleküle targ-CD39 und nontarg-CD39 unentgeltlich zur Verfügung gestellt, dafür herzlichen Dank.

Dem IZKF-Promotionskolleg der Universität Tübingen möchte ich für die Unterstützung danken, die es mir möglich gemacht hat, mich vollständig auf die Erstellung dieser Arbeit zu konzentrieren, sowie die Daten auf zwei Kongressen vorzustellen.

Meinem Vater, Herrn Prof. Dr. med. Thomas Glück, danke ich für die fachlichen Diskussionen zum Thema Sepsis und SIRS.

Meine Familie hat mich mit viel Geduld während der Durchführung der Experimente und dem Schreiben dieser Arbeit unterstützt.