

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Abteilung für Experimentelle und Klinische Hämostaseologie  
Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h. c. Hugo van Aken)

**Untersuchungen zum Einfluss von Thrombospondin-1 auf den  
Aktivierungsstatus und die funktionelle Kapazität von  
Thrombozyten und Leukozyten im Großtiermodell des  
*Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)***

**INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des  
doctor medicinae  
der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster**

vorgelegt von

Timo Pauli  
aus Osnabrück

2008

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Volker Arolt  
Erste Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. Beate Kehrel  
Zweite Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. med. Wiebke Gogarten  
Tag der mündlichen Prüfung: 20.06.2008

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Abteilung für Experimentelle und Klinische Hämostaseologie  
Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h. c. Hugo van Aken)  
Referentin: Prof. Dr. rer. nat. Beate Kehrel  
Koreferentin: Priv.-Doz. Dr. med. Wiebke Gogarten

## ZUSAMMENFASSUNG

### **Untersuchungen zum Einfluss von Thrombospondin-1 auf den Aktivierungsstatus und die funktionelle Kapazität von Thrombozyten und Leukozyten im Großtiermodell des *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS)**

Timo Pauli

Die zelluläre Abwehrreaktion durch Thrombozyten und Leukozyten spielt in der Pathophysiologie und bei den Komplikationen des SIRS und der Sepsis eine zentrale Rolle. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob Thrombospondin-1, welches die Funktion von Thrombozyten und Leukozyten modulieren kann, neue Behandlungsoptionen für ein SIRS bieten könnte. Es wurden dabei zwei unterschiedliche Thrombospondinchargen (A und B) getestet, die sich durch ihren Konformationszustand definiert unterscheiden. In einer prospektiven, kontrollierten, randomisierten, verblindeten tierexperimentellen Vorstudie am chronisch instrumentierten Schaf (genehmigt durch das Regierungspräsidium Münster am 24.06.1999 unter dem Aktenzeichen 23.0835.1.0 [G57/99]) wurden zu acht Messzeitpunkten über 24 Stunden Aktivierungsparameter von Thrombozyten und Leukozyten im Durchflusszytometer gemessen, nachdem durch Dauerinfusion von Lipopolysaccharid ein SIRS ausgelöst wurde. Untersucht wurde die Bindung von Faktor VIIa, Thrombospondin-1, Faktor XIII, von-Willebrand-Faktor und Annexin V an Thrombozyten *ex vivo* und nach *in vitro*-Aktivierung durch Kollagen, TRAP und Ristocetin, außerdem die Bindung von endogenem und exogenem Fibrinogen und die CD11b-Expression auf Granulozyten und Monozyten und die Bildung von Thrombozyten-Monozyten-Assoziaten *ex vivo*. Es konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von Thrombospondin-1 der Charge A bewirkt hat, dass die Thrombozyten und Leukozyten durch das SIRS weniger stark aktiviert wurden und eine besser erhaltene funktionelle Kapazität aufwiesen. In dieser Versuchsgruppe starben keine Tiere vor Ende des Versuchszeitraumes. Die geringe Gruppenstärke lässt aber eine eindeutige Aussage zur Mortalität nicht zu. Eine andere Gruppe der Versuchstiere erhielt Thrombospondin-1 der Charge B. Bei diesen Tieren fand sich nur eine sehr geringe Absenkung der Thrombozyten- und Leukozyten-Aktivierung im Rahmen des SIRS. Einige der gemessenen Parameter zeigten signifikante Unterschiede bei Tieren der Placebogruppe, welche die Sepsis überlebten, im Vergleich zu vorzeitig verstorbenen Tieren der Placebogruppe. Diese Messparameter könnten als frühe Prognoseparameter eines SIRS bzw. einer Sepsis in Frage kommen. Sie könnten Hinweise auf eine individuell unterschiedlich starke systemische Entzündungsreaktion sein oder für einen individuellen Unterschied in der Reaktionsweise der zellulären Abwehr sprechen.

Tag der mündlichen Prüfung: 20.06.2008

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einführung</b> .....	1
1.1. Sepsis und SIRS .....	1
1.1.1. Epidemiologie .....	1
1.1.2. Definitionen .....	1
1.1.3. Klinik .....	2
1.1.4. Pathophysiologie .....	3
1.1.4.1. Eindringen von Mikroorganismen und innate Immunität .....	3
1.1.4.2. Aktivierung des inflammatorischen Systems .....	4
1.1.4.3. Aktivierung des Gerinnungssystems und der Thrombozyten ....	5
1.1.4.4. Septischer Schock und Multiorganversagen .....	10
1.1.5. Therapie der Sepsis .....	11
1.1.6. Das Schaf als Sepsismodell .....	11
1.2. Thrombospondin-1 .....	12
1.3. Thrombozyten .....	16
1.3.1. Morphologie der Thrombozyten .....	16
1.3.2. Parameter der Thrombozyten-Aktivierung .....	19
1.3.2.1. Thrombospondin-1-Bindung an Thrombozyten .....	19
1.3.2.2. Faktor VIIa-Bindung an Thrombozyten .....	20
1.3.2.3. Faktor XIII-Bindung an Thrombozyten .....	20
1.3.2.4. von-Willebrand-Faktor-Bindung an Thrombozyten .....	21
1.3.2.5. Annexin V-Bindung an Thrombozyten .....	22
1.3.2.6. Aktivierung der Thrombozyten <i>in vitro</i> durch Kollagen, TRAP und Ristocetin .....	22
1.4. Leukozyten .....	23
1.4.1. Morphologie der Leukozyten .....	23
1.4.2. Entzündungsreaktion .....	24
1.4.3. Parameter der Leukozyten-Aktivierung .....	27
1.4.3.1. Fibrinogen-Bindung an Leukozyten .....	27
1.4.3.2. Fibrinogen-Antikörper-Bindung an Leukozyten .....	28
1.4.3.3. CD11b-Antikörper-Bindung an Leukozyten .....	28

---

1.5. Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion .....	29
1.5.1. Interaktion zwischen Thrombozyten und Leukozyten .....	29
1.5.2. Assoziat aus Thrombozyten und Leukozyten .....	29
1.6. Zielsetzung dieser Arbeit .....	32
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>33</b>
2.1. Geräte .....	33
2.2. Chemikalien .....	34
2.3. Antikörper .....	34
2.4. Tiere .....	35
2.4.1. Genehmigung der Tierversuche .....	35
2.4.2. Tiere und Tierhaltung .....	35
2.5. Durchführung des Versuchs .....	35
2.6. Thrombospondin-1 .....	38
2.6.1. Aufreinigung des Thrombospondins-1 .....	38
2.6.2. Markierung des Thrombospondins-1 mit Fluoresceinisothiocyanat ...	42
2.7. von-Willebrand-Faktor .....	43
2.7.1. Aufreinigung des von-Willebrand-Faktors .....	43
2.7.2. Markierung des von-Willebrand-Faktors mit Fluoresceiniso-	
thiocyanat .....	45
2.8. Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	46
2.8.1. Durchführung der SDS-PAGE .....	46
2.8.2. Silberfärbung der SDS-PAGE .....	50
2.9. Gewinnung des Gerinnungsfaktors VIIa und dessen Markierung mit	
Fluoresceinisothiocyanat .....	51
2.10. Gewinnung des Gerinnungsfaktors XIII und dessen Markierung mit	
Fluoresceinisothiocyanat .....	53
2.11. Markierung von Fibrinogen mit Fluoresceinisothiocyanat .....	54
2.12. Markierung des CD11b-Antikörpers und des CD41/61-Antikörpers mit	
Biotin .....	55
2.13. Proteinkonzentrationsbestimmung .....	56
2.14. Durchflusszytometrie .....	57
2.14.1. Untersuchung von Thrombozyten .....	59
2.14.1.1. Gewinnung von Thrombozyten .....	59
2.14.1.2. Bestimmung der Thrombozyten-Konzentration .....	60

---

2.14.1.3. Detektion von Thrombozyten im Durchflusszytometer .....	60
2.14.1.4. Bindung von Thrombospondin-1, Gerinnungsfaktor VIIa, Gerinnungsfaktor XIII und von-Willebrand-Faktor an Thrombozyten <i>ex vivo</i> .....	61
2.14.1.5. Bindung von Thrombospondin-1, Gerinnungsfaktor VIIa, Gerinnungsfaktor XIII und von-Willebrand-Faktor an Thrombozyten nach Aktivierung <i>in vitro</i> .....	62
2.14.1.6. Bindung von Annexin V an Thrombozyten <i>ex vivo</i> und nach Aktivierung <i>in vitro</i> .....	63
2.14.2. Untersuchung von Monozyten und PMNL .....	64
2.14.2.1. Gewinnung von Monozyten, PMNL und Thrombozyten .....	64
2.14.2.2. Detektion von Monozyten und PMNL im Durchflusszytometer	65
2.14.2.3. Bindung von Fibrinogen an Monozyten und PMNL <i>ex vivo</i> .....	66
2.14.2.4. Beurteilung der Fibrinogen-Bindung an Monozyten und PMNL <i>in vivo</i> .....	67
2.14.2.5. CD11b-Expression auf Monozyten und PMNL .....	68
2.14.2.6. Assoziate zwischen Thrombozyten und Monozyten .....	69
2.15. Als Verum eingesetztes Thrombospondin-1 .....	71
2.16. Auswertung und Statistik .....	71
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>72</b>
3.1. Innergruppenvergleich: Placebo.....	72
3.1.1. Thrombospondin-1-Bindung an Thrombozyten .....	72
3.1.2. Gerinnungsfaktor VIIa-Bindung an Thrombozyten .....	76
3.1.3. von-Willebrand-Faktor-Bindung an Thrombozyten .....	78
3.1.4. Gerinnungsfaktor XIII-Bindung an Thrombozyten .....	80
3.1.5. Fibrinogen-Bindung an Thrombozyten .....	82
3.1.6. Monozyten .....	84
3.1.7. PMNL .....	86
3.2. Intergruppenvergleich: Thrombozyten .....	88
3.2.1. Thrombospondin-1-Bindung .....	88
3.2.2. Gerinnungsfaktor VIIa-Bindung.....	90
3.2.3. Annexin V-Bindung.....	91
3.2.4. Gerinnungsfaktor XIII-Bindung.....	93
3.2.5. von-Willebrand-Faktor-Bindung.....	94

---

3.2.6. Aktivierbarkeit <i>in vitro</i> .....	96
3.2.6.1. Aktivierung durch Kollagen .....	96
3.2.6.2. Aktivierung durch TRAP .....	106
3.2.6.3. Aktivierung durch Ristocetin A .....	109
3.3. Intergruppenvergleich: Monozyten .....	111
3.3.1. Fibrinogen-Bindung .....	111
3.3.2. Fibrinogen-Antikörper-Bindung .....	113
3.3.3. CD11b-Expression .....	114
3.3.4. Monozyten-Thrombozyten-Assoziat .....	116
3.4. Intergruppenvergleich: PMNL .....	117
3.4.1. Fibrinogen-Bindung .....	117
3.4.2. Fibrinogen-Antikörper-Bindung .....	119
3.4.3. CD11b-Expression .....	120
3.5. Intergruppenvergleich: Überleben .....	122
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>123</b>
4.1. Sepsismodell am endotoxinämischen Schaf .....	124
4.2. Das Verum Thrombospondin-1 .....	125
4.3. Innergruppenvergleich: Placebo .....	125
4.3.1. Thrombozyten .....	126
4.3.2. Monozyten .....	127
4.3.3. PMNL .....	127
4.4. Intergruppenvergleich: Thrombozyten .....	128
4.4.1. Baseline und Baseline ‚Verumeffekt‘ .....	128
4.4.2. Thrombospondin-1-Bindung .....	129
4.4.3. Annexin V-Bindung .....	130
4.4.4. Gerinnungsfaktor VIIa-Bindung .....	130
4.4.5. Gerinnungsfaktor XIII-Bindung .....	131
4.4.6. von-Willebrand-Faktor-Bindung .....	132
4.4.7. Aktivierbarkeit <i>in vitro</i> .....	132
4.4.7.1. Aktivierung durch Kollagen .....	132
4.4.7.2. Aktivierung durch TRAP .....	133
4.4.7.3. Aktivierung durch Ristocetin .....	134

---

4.4.8. Zusammenfassung Thrombozyten .....	134
4.5. Intergruppenvergleich: Leukozyten .....	137
4.5.1. Bindung von exogenem Fibrinogen .....	137
4.5.2. Bindung von endogenem Fibrinogen (Anti-Fibrinogen-Antikörper) ....	138
4.5.3. CD11b-Expression .....	138
4.5.4. Monozyten-Thrombozyten-Assoziat .....	139
4.5.5. Zusammenfassung Leukozyten .....	140
4.6. Intergruppenvergleich: Überleben .....	142
<b>5. Ausblick .....</b>	<b>143</b>
<b>6. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>144</b>
<b>7. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>148</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>162</b>
<b>Lebenslauf .....</b>	<b>163</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>164</b>

# 1. Einführung

## 1.1. Sepsis und SIRS

### 1.1.1. Epidemiologie

Jedes Jahr erkranken in Deutschland etwa 88.000 Patienten an einer schweren Sepsis, 31.000 von ihnen versterben daran. Durchschnittlich 8,6% aller Patienten auf Intensivstationen in Deutschland haben oder entwickeln eine schwere Sepsis (DAVIES, 2001). Die Letalität der schweren Sepsis liegt bei etwa 40%, die Letalität des septischen Schocks liegt trotz aller intensivmedizinischen Maßnahmen bei 70-80% (BRUN-BOUISSON, 1995; LE GALL, 1995). Mit zunehmendem Alter der Patienten steigt die Inzidenz der schweren Sepsis exponentiell an und auch die Letalität nimmt mit höherem Alter deutlich zu. Damit stellt die Sepsis im Rahmen der Überalterung der Gesellschaft ein wachsendes Problem dar, was sich in den letzten Jahren in einer stetig steigenden Inzidenz der Sepsis widerspiegelt. Neben dem Alter des Patienten sind auch eine Immunsuppression, bösartige Tumore und deren Chemotherapie, große chirurgische Eingriffe, sowie schwere Verbrennungen und Traumata für eine Sepsis prädisponierende Faktoren (ANGUS, 2001). Die schwere Sepsis und der septische Schock sind nach wie vor die häufigste Todesursache auf der nicht-kardiologischen Intensivstation (SANDS, 1997).

### 1.1.2. Definitionen

Eine Sepsis entsteht durch pathophysiologische Veränderungen bei Anwesenheit von Mikroorganismen oder deren Produkten im Blutstrom, die von einem Infektionsherd ausgehen. Als Folge der Infektion zeigt sich eine komplexe systemische inflammatorische Wirtsreaktion. In etwa 30% der Erkrankungsfälle lässt sich kein gesicherter Zusammenhang zu einer mikrobiellen Infektion herstellen, so dass das Erkrankungsbild als *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS) bezeichnet wird. Die Erkrankung wird in die drei Ausprägungen Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock eingeteilt, welche kontinuierlich ineinander übergehen (HARRIS, 1987; REINHART, 2006). Schwere Beeinträchtigungen des Körpers, z.B. ein Polytrauma, eine schwere Pankreatitis oder ein großer chirurgischen Eingriff, können

die selben Mediator- und Reaktionskaskaden auch ohne die Anwesenheit von Mikroorganismen auslösen, und führen so klinisch zu einem identischen Krankheitsbild (GORIS, 1985).

### **1.1.3. Klinik**

Im Beginn einer Sepsis bzw. eines SIRS kommt es in der Regel zu einer Verschlechterung des Allgemeinzustandes des Patienten, begleitet von lang anhaltendem Fieber. Im Blutbild zeigt sich eine Leukozytose. Es kommen aber auch Verläufe mit normalen oder erniedrigten Temperatur- und Leukozytenwerten vor.

Im weiteren Verlauf werden dann verschiedene Mediatorkaskaden ausgelöst. Diese bewirken Veränderungen in unterschiedlichen Organsystemen des Körpers. Es kommt zu Tachypnoe und Hyperventilation mit nachfolgender Hypoxämie. Unter Atmung von Raumluft sinken die arteriellen Partialdrücke für CO<sub>2</sub> und O<sub>2</sub>. Die Herzfrequenz steigt an und die Blutdruckwerte beginnen zu schwanken. Es zeigt sich eine erste Tendenz zur Hypotonie. Des Weiteren kommt es zu einer Aktivierung der Gerinnungs- und Fibrinolyseaktivität. Fibrinmonomere und Fibrinogenspaltprodukte treten im peripheren Blut vermehrt auf, Antithrombin III und die Thrombozytenzahl beginnen zu fallen. Eine Thrombozytenfunktionsstörung ist ebenfalls nachweisbar. Im weiteren Verlauf kommt es zu einem Rückgang der Diurese und der Kreatininclearance sowie zum Anstieg des Serumkreatinins als Ausdruck einer beginnenden Niereninsuffizienz. Durch die so genannte septische Enzephalopathie kann der Patient somnolent, verwirrt oder unruhig werden (SCHUSTER, 2000). Die Schädigung des Lungengewebes kann zu einem Lungenödem und zu einer pulmonalen Minderbelüftung führen. Es droht ein Lungenversagen (ARDS). Das relativ verminderte zirkulierende Blutvolumen, gepaart mit dem verringerten Sauerstoffangebot, kann ein Herz-Kreislauf-Versagen zur Folge haben. Auch die Nieren können durch ähnliche Mechanismen in ihrer Funktion eingeschränkt sein, so dass sich ein akutes Nierenversagen manifestieren kann. Weitere Organe können nacheinander in diesen Prozess eingeschlossen werden, so dass sich das klinische Bild des Multiorganversagens ausprägen kann, welches mit einer um so höheren Letalität behaftet ist, je mehr Organe betroffen sind (AWAD, 2003). Eine Zusammenfassung der Diagnosekriterien der Sepsis gibt Tabelle 1.1 wieder.

<b>I Nachweis der Infektion</b>
Klinische Diagnose einer Infektion
<b>II Severe inflammatory host response</b> (mind. 2 Kriterien)
Fieber (rektal >38 °C) oder Hypothermie (rektal <36 °C) Tachykardie (Frequenz >90/min) Tachypnoe (Frequenz >20/min) oder Hypokapnie ( $p_a\text{CO}_2 < 4,3\text{kPa}$ ) Leukozytose (>12.000/ $\mu\text{l}$ ) oder Leukopenie (<4.000/ $\mu\text{l}$ ) oder >10% unreife Neutrophile
<b>III Akute Organdysfunktion</b> (mind. 1 Kriterium)
Akute Enzephalopathie (Verwirrtheit, Somnolenz, Unruhe) Thrombozytopenie (<100.000/ $\mu\text{l}$ ) oder Thrombozytenabfall in 24h (>30% des Ausgangswertes) Arterielle Hypoxämie ( $p_a\text{O}_2 < 10\text{kPa}$ unter Raumluft oder $p_a\text{O}_2/F_i\text{O}_2 < 33\text{kPa}$ unter $\text{O}_2$ -Applikation) Renale Dysfunktion (Diurese <0,5ml/kgKG/h über 2h oder Kreatinin-Anstieg über 2xGrenzwert) Metabolische Azidose ( $\text{BE} < 5\text{mmol/l}$ oder Laktat >1,5xGrenzwert)
<b>Sepsis:</b> Kriterien I und II <b>Schwere Sepsis:</b> Kriterien I, II und III <b>Septischer Schock:</b> Kriterien I und II sowie systolischer Blutdruck <90mmHg über 1h oder mittlerer Blutdruck <65mmHg über 1h trotz Volumengabe

**Tab. 1.1.** Diagnosekriterien der Sepsis (REINHART, 2006).

#### 1.1.4. Pathophysiologie

##### 1.1.4.1. Eindringen von Mikroorganismen und innate Immunität

Jeder Organismus muss sich ständig gegen eine große Anzahl an eindringenden Mikroorganismen zur Wehr setzen. Eine wichtige Rolle spielt dabei die innate Immunität, welche angeboren ist und nicht erst erworben werden muss. Sie stellt eine entwicklungsgeschichtlich frühe und einfache Form der Erregerabwehr dar. Der Organismus hält eine geringe Anzahl spezifischer Rezeptoren bereit, die charakteristische Strukturen von eindringenden Mikroorganismen erkennen. Zu diesen gehören zum Beispiel das Lipopolysaccharid der gram-negativen Bakterien, die Peptidoglykane der gram-positiven Bakterien, Glykolipide von Mykobakterien, die Mannose-Polymere der Hefepilze sowie die Doppelstrang-RNA von Viren. Diese Strukturen sind bei nahezu allen Mikroorganismen einer Gruppe zu finden. Aus diesem Grund erfassen die Rezeptoren der innaten Immunität einen Großteil der eindringenden Organismen.

Nachdem die Strukturen der eindringenden Mikroorganismen an die spezifischen Rezeptoren gebunden haben, aktivieren diese intrazelluläre Signalwege. Über diese wird die Freisetzung von zahlreichen Mediatoren ausgelöst und eine Entzündungsreaktion initiiert. Gleichzeitig werden zahlreiche proteolytische Kaskaden in Gang

gesetzt, welche unter anderem das Gerinnungssystem aktivieren. Kommt es zu einer unkontrollierten systemischen Aktivierung dieser Kaskaden, entwickelt sich das Krankheitsbild der Sepsis bzw. des SIRS (GLAUSER, 2000).

Der am besten bekannte Mechanismus, wie eindringende Mikroorganismen eine Entzündungsreaktion auslösen können, ist der des Lipopolysaccharid (LPS) der gram-negativen Bakterien. Die Zellwand dieser Bakterien besitzt einen dreischichtigen Aufbau. Die innere Schicht besteht aus Mukopolysaccharid-Peptidoglykanen, die mittlere aus Phospholipidproteinen und die äußere Schicht aus Lipopolysaccharid. Die physiologische Aufgabe des LPS für das Bakterium ist die Ausbildung einer selektive Permeabilitätsbarriere, der Molekültransport durch die Zellwand und die Interaktion der Zelle mit der Umgebung (WATSON, 1994). Gelangt das Bakterium in den menschlichen Organismus, bindet das LPS an ein Plasmaprotein des Wirtsorganismus, das so genannte *LPS-Binding Protein* (LBP). Der dabei entstehende Komplex aus LPS und LBP bindet an den CD14-Rezeptor auf Makrophagen und Monozyten. Der CD14-Rezeptor präsentiert seinerseits das LPS an ebenfalls membranständige Proteine, darunter die *Toll-like Receptors* (TLR-2 und TLR-4). Diese sind die wichtigsten Rezeptoren für die Vermittlung der zellulären Immunantwort (ARMSTRONG, 2004). Nach Aktivierung werden die TLR durch das intrazelluläre Protein MyD88 vernetzt. Anschließend kommt es unter Beteiligung verschiedener signaltransduzierender Moleküle (IRAK-1, TRAF-6, TAK-1, NIK und IKK) zu einer Freisetzung von *Nuclear Factor kappa B* (NF- $\kappa$ B), welcher in den Zellkern der Zielzelle gelangt. Dort erreicht NF- $\kappa$ B die Promotorregionen verschiedener Gene und fördert so die Proteinbiosynthese von proinflammatorischen Zytokinen. Damit wird eine Aktivierung der zellulären Abwehr eingeleitet (PATERSON, 2000; LLEWELYN, 2001; GUHA, 2001).

#### 1.1.4.2. Aktivierung des inflammatorischen Systems

Durch die Bindung des LPS an die zellulären Rezeptoren werden Makrophagen und Monozyten aktiviert. Diese beginnen daraufhin Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) auszuschütten, welcher einer der ersten Mediatoren der Entzündungsreaktion ist. Binnen weniger Minuten lassen sich erhöhte TNF-Spiegel im Blut nachweisen. TNF wirkt proinflammatorisch und verstärkt die Entzündungsreaktion, indem er weitere Entzündungsmediatoren freisetzt, darunter Interleukin-1, Interleukin-6, Eicosanoide,

*Platelet Activating Factor* (PAF) und *Plasminogen Activator Inhibitor-1* (PAI-1). Gleichzeitig bewirkt TNF eine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen und Granulozyten. Zusätzlich werden die Granulozyten aktiviert, welche dadurch verstärkt an der Entzündungsreaktion teilnehmen. Schließlich werden weitere proinflammatorische Kaskaden angeregt, indem unter anderem die Phospholipase A<sub>2</sub>, die Cyclooxygenase und die NO-Synthase durch TNF aktiviert werden. Einige Stunden nach der initialen Ausschüttung von TNF kommt es dann zu einer vermehrten Freisetzung von Interleukin-1. Interleukin-1 bewirkt eine weitere Aktivierung von Endothelzellen und eine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen. Zusätzlich löst es seinerseits die Ausschüttung von TNF, Interleukin-6 und PAF aus (AWAD, 2003).

Neben den proinflammatorischen Mechanismen werden auch hemmende Signalwege aktiviert. Insbesondere Interleukin-10 führt als antiinflammatorisches Zytokin zu einer Downregulation von TNF, Interleukin-1, Interleukin-6 und Interleukin-8. Bei der schweren Sepsis kommt es dann jedoch zu einer überschießenden Reaktion der proinflammatorischen Zytokine. Dies spiegelt sich in erhöhten Interleukin-6- und erniedrigten Interleukin-10-Spiegeln wider. Je größer das Verhältnis von Interleukin-6 zu Interleukin-10 ist, desto ausgeprägter ist das Ungleichgewicht zwischen den beiden Systemen und umso schlechter ist die Prognose des Patienten (LOISA, 2003).

#### 1.1.4.3. Aktivierung des Gerinnungssystems und der Thrombozyten

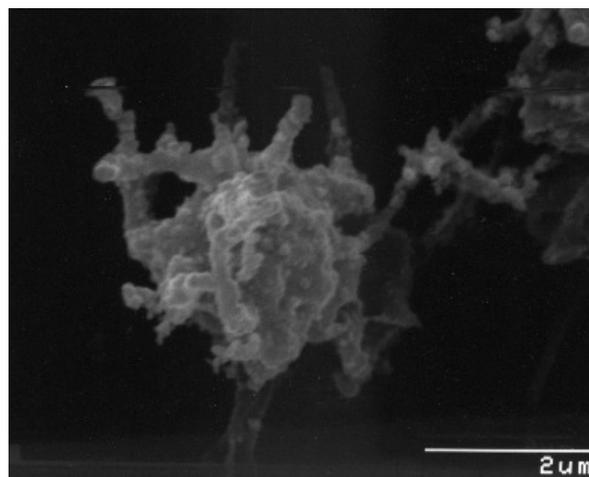
An der Aktivierung des extrinsischen Gerinnungssystems ist maßgeblich der *Tissue Factor* (TF) beteiligt. Dabei handelt es sich um ein membranständiges Protein, das vor allem im perivaskulären Gewebe vorkommt. Endothelzellen und periphere Blutzellen produzieren normalerweise keinen *Tissue Factor*. Zur Aktivierung des extrinsischen Gerinnungssystems kommt es, wenn der *Tissue Factor* in Kontakt mit dem Gerinnungsfaktor VII kommt (Abb. 1.1.). Das Endotoxin gram-negativer Bakterien kann über TNF- $\alpha$ , Interleukin-1 und Interleukin-6 bewirken, dass auch Endothelzellen und Monozyten *Tissue Factor* produzieren und dieser so in Kontakt mit dem Gerinnungsfaktor VII kommt. Auch gram-positive Bakterien können über zahlreiche Zytokine indirekt die *Tissue Factor*-Expression steigern und so ebenfalls zu einer Aktivierung des extrinsischen Gerinnungssystems im Rahmen einer Sepsis bzw. eines SIRS führen. Der physiologische Regulator dieses Aktivierungsweges ist der *Tissue*



Durch die Bindung des auf der Endstrecke der Gerinnungskaskaden gebildeten Faktor Xa im Inhibitionskomplex aus *Tissue Factor Pathway Inhibitor*, Faktor VIIa und Faktor Xa kann am Ort der Inflammation zunächst nur eine sehr geringe Menge von Thrombin gebildet werden. Diese reicht noch nicht aus, um eine für einen stabilen Thrombus ausreichende Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin zu bewirken. Sie ist jedoch in der Lage, in das Geschehen rekrutierte Thrombozyten zu aktivieren. Im Rahmen des Aktivierungsvorganges gelangen Komplexe aus von-Willebrand-Faktor (vWF) und Faktor XIII auf die Plättchenoberfläche. Das Thrombin aktiviert dort den Faktor XIII zu Faktor XIIIa, welcher sich darauf hin aus dem vWF-Komplex löst und mit hoher Affinität an die Faktoren IXa und X auf der Plättchenoberfläche bindet. Unter optimaler Zusammenlagerung auf der Thrombozytenmembran und unter Schutz vor Inhibitoren können so auf der Plättchenoberfläche große Mengen an Faktor Xa und IXa und somit von Thrombin generiert werden. Diese explosionsartig auf der Thrombozyten-Oberfläche entstehende große Menge an Thrombin reicht jetzt aus, um ausreichende Mengen an Fibrinogen zu Fibrin zu spalten, um ein stabiles Fibrinnetz zu bilden. Außerdem kann dieses Thrombin weitere Plättchen und die Gerinnungsfaktoren V und VIII aktivieren (JURK, 2005; BOUCHARD, 2001). Zusätzlich ändert sich die Membranzusammensetzung der Thrombozyten und bietet so zusätzlich Bindungsstellen für weitere Gerinnungsfaktoren auf die Oberfläche, wodurch die Thrombozyten weitere Möglichkeiten haben, auf die Steuerung der Hämostase Einfluss zu nehmen. Nach der Stabilisierung des Blutgerinnsels durch die Mechanismen der Hämostase, beginnt das Zytoskelett der Thrombozyten durch aktive Kontraktion das Gerinnsel zusammenzuziehen. Diese Retraktion verleiht dem Thrombozytenpfropf noch mehr Festigkeit. An die Thrombozytenoberfläche gelangendes P-Selektin vermittelt die Adhäsion von Monozyten und Granulozyten. Entzündungsreaktion und Immunantwort werden so in die Prozesse der Hämostase integriert (KEHREL, 2003).

Die Thrombozyten werden aber auch bereits in der frühen Phase der Inflammation aktiviert. Im Rahmen der systemischen Entzündungsreaktion kommt es zu erhöhten Plasmaspiegeln von Katecholaminen und zu Endothelschädigungen (MAVROMMATIS, 2000). Durch diese Endothelschädigung kommt wie bei einer direkten Gewebeerletzung subendotheliales Gewebe in Kontakt mit dem Blut. Dadurch werden zahlreiche Mechanismen der Hämostase angestoßen. Der in der subendothelialen Matrix exprimierte von-Willebrand-Faktor hat eine hohe Affinität zum thrombozytären Rezeptor GPIIb/IIIa, wodurch Thrombozyten selbst bei hohem Scherstress adhären.

Auch das Thrombosponin-1 der extrazellulären Matrix kann an GPIb/V/IX binden. Werden die Rezeptoren GPIb durch vWF-Multimere quervernetzt, kommt es zu einer Aktivierung der Plättchen. Zusätzlich können bei niedrigem Scherstress die thrombozytären Integrine  $\alpha_{IIb}\beta_3$ ,  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$  und  $\alpha_6\beta_1$  eine Bindung an die subendotheliale Matrix aufbauen. Die Interaktion der drei thrombozytären Rezeptoren GPIa/IIa (Integrin  $\alpha_2\beta_1$ ), GPIIb/GPIV (CD36) und GPVI (p62) mit Kollagen bewirkt zunächst eine Adhäsion, später auch Aktivierung, Sekretion und Aggregation der Thrombozyten. Vor allem der Kollagen-Rezeptor GPVI vermittelt die Plättchen-Aktivierung (JURK, 2005; KEHREL, 1998; JACKSON, 2001). Durch intrazelluläre Signaltransduktion werden unter anderem am Fibrinogenrezeptor Glykoprotein IIb/IIIa Bindungsstellen freigelegt, so dass der bisher inaktive Rezeptor jetzt gelöstes Fibrinogen binden kann (HARBRECHT, 1999). Außerdem bewirkt die Aktivierung die Verschmelzung der  $\alpha$ -Granula und der *dense bodies* mit der Zellmembran, so dass sich deren Inhaltsstoffe durch Exozytose in den Extrazellulärraum entleeren. Darunter befinden sich zahlreiche prothrombotische Substanzen (z.B. ADP und Serotonin), welche die initiale Thrombozytenaktivierung verstärken und weitere Plättchen immobilisieren und rekrutieren (REED, 2000; JURK, 2005). Nach Aktivierung verliert der Thrombozyt seine diskoide Form, wird kugelförmig und bildet unter erhöhter intrazellulärer Calcium-Konzentration Ausstülpungen der Zellmembran, die Pseudopodien (Abb. 1.2.) (JEN, 1996).



**Abb. 1.2.** Aktivierte Thrombozyten nach dem Formwandel mit Ausbildung von Pseudopodien. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme (B. KEHREL, Münster).

Außerdem spielen Blutplättchen auch in der innate Immunabwehr eine zentrale Rolle. Nach dem Eindringen von Mikroorganismen kommt es zu einer Bindung an Thrombozyten über Oberflächenproteine der Bakterien oder überbrückende Plasmaproteine. Diese direkte Interaktion führt bereits bei erstem Kontakt mit dem eindringenden Organismus zu einer Thrombozytenadhäsion und/oder einer Thrombozytenaggregation. So bindet beispielsweise *Staphylococcus aureus* über Fibrinogen und Thrombospondin-1 an Blutplättchen, welche durch die Freisetzung von so genannten *Platelet Microbicidal Proteins* (PMP) zu einem raschen Abtöten der Staphylokokken führen können (FITZGERALD, 2006; NIEMANN 2004). Protozoen, pathogene Pilze und Viren können im Blutgerinnsel eingefangen und so unschädlich gemacht werden. Von Thrombozyten sezerniertes Thrombospondin-1 kann nach Kontakt mit HIV-1 an HIV.GP120 binden und die Adhäsion des Virus an CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten verhindern (JURK, 2005).

Ausdruck der im Rahmen des SIRS über diese zahlreichen Mechanismen ausgelösten Stimulation von Thrombozyten ist die durch den Verbrauch absinkende Thrombozyten-Zahl im Blut. Im weiteren Verlauf haben die Blutplättchen dann ihr gesamtes Aktivierungspotential verbraucht und zirkulieren dann als „erschöpfte“ Thrombozyten, die nur unzureichend auf Stimulation reagieren können (VINCENT, 2002). Aktivierte Thrombozyten und vermehrt auftretenden Thrombozyten-Leukozyten-Assoziate finden sich bei jedem Sepsis-Patienten. Bei Patienten mit Multiorganversagen tritt zusätzlich eine signifikante Degranulation der Blutplättchen auf (GAWAZ, 1997). Es kommt im Verlauf der Sepsis bzw. eines SIRS zu einer disseminierte intravasalen Gerinnung (DIC), und im gesamten Kreislauf bilden sich Thromben und Fibrinablagerungen. Durch die andauernde ubiquitäre Aktivierung des Gerinnungssystems werden Thrombozyten und Gerinnungsfaktoren verbraucht, so dass es neben den thrombotischen Ereignissen auch zu schweren Blutungskomplikationen kommen kann. Diese Erscheinung wird auch als Verbrauchskoagulopathie bezeichnet (LEVI, 2000).

Das nach Aktivierung des Hämostasesystems gebildete Thrombin kann seinerseits wieder auf die Entzündungsreaktion modulierend Einfluss nehmen. Thrombin kann mit dem *Toll-like Receptor-1* (TLR-1) reagieren und so die Freisetzung von proinflammatorischem Interleukin-1 und Interleukin-6 fördern, aber auch die des antiinflammatorischen Interleukin-10 (NALDINI, 2005). Die auf die Plättchenoberfläche gelangenden Adhäsionsmoleküle CD62P und CD40L sind essentiell, um die Interaktion zwischen Thrombozyten und Leukozyten zu steuern. Nach ihrer Spaltung gelangen sie

als lösliche Fragmente (sCD62P, sCD40L) in den Blutstrom und stimulieren dort Monozyten, Lymphozyten und Endothelzellen. Zahlreiche von den Plättchen sezernierte Chemokine wirken direkt proinflammatorisch, darunter RANTES (*regulated upon normal T-cell expressed and secreted*), MIP-1 $\alpha$  (*macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$* ) und Interleukin-8 (JURK, 2005).

#### 1.1.4.4. Septischer Schock und Multiorganversagen

Bei einer Sepsis kommt es durch Bakterien und deren Produkte zu einer Stimulation der innate Immunabwehr. Makrophagen und Granulozyten schütten proinflammatorische Mediatoren und Zytokine aus, welche zur Adhäsion von Granulozyten an Endothelien führen und das Gerinnungssystem aktivieren. Multiple Mediator-Kaskaden werden ausgelöst und verstärken den Prozess. Thrombin wird freigesetzt und bewirkt einerseits die Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten, andererseits kann es selbst proinflammatorische Wirkung entfalten. Die körpereigenen Mechanismen der Fibrinolyse werden durch die Freisetzung von *Plasminogen Activator Inhibitor-1* (PAI-1) und *Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor* (TAFI) gehemmt.

Die proinflammatorischen Mediatoren bewirken die vermehrte Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) aus Endothelzellen, welches eine periphere Vasodilatation mit relativ vermindertem Blutvolumen bewirkt. Dies ist der Hauptmechanismus, über den es bei der Sepsis bzw. SIRS zu Blutdruckabfällen und zum Kreislaufschock kommt. Verstärkt wird dieser Vorgang durch eine ebenfalls von Mediatoren ausgelöste diffuse Endothelschädigung mit Übertritt von intravasaler Flüssigkeit in das extravasale Gewebe (HINDER, 1999). In der Frühphase des septischen Schocks kommt es so zu einer hypotensiven und hyperdynamen Kreislaufsituation: Der periphere Gefäßwiderstand nimmt ab und der mittlere arterielle Blutdruck (MAD) sinkt, während es kompensatorisch zu einer Zunahme von Herzfrequenz und Herzminutenvolumen kommt (WESTPHAL, 2003).

Durch die disseminierte Aktivierung des Gerinnungssystems kommt es zur Bildung von intravasalen Mikrothromben, welche die Endstrombahnen in den Organen verschließen. Zusätzlich können sich auch extrazelluläre Ablagerungen von Fibrin ausbilden, welche die Organfunktion weiter beeinträchtigen. Durch den Verbrauch der Gerinnungsfaktoren und der Thrombozyten, gepaart mit der Endothelschädigung kann

es zusätzlich zu Parenchymlutungen kommen. Gleichzeitig wird die bedarfsgerechte Steuerung der Organdurchblutung durch überschießende Vasodilatation und Vasokonstriktion verhindert. Im Verlauf der Sepsis bzw. des SIRS kommt es so zu Ischämien und Funktionsverlusten in den Endorganen, welche zum Multiorganversagen führen können (SHARMA, 2003; IDELL, 2001).

### **1.1.5. Therapie der Sepsis**

Die schwere Sepsis und der septische Schock sind lebensbedrohliche Erkrankungen mit einer hohen Letalität. Der Sepsis-Patient muss daher intensiv überwacht werden, und es müssen optimale Bedingungen für den Patienten geschaffen werden, insbesondere bei der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung, welche an die veränderte Stoffwechsellage angepasst werden muss. Um die Ausbreitung der bakteriellen Infektion einzudämmen, sollte der Patient frühzeitig eine intravenöse Antibiotika-Therapie erhalten, welche sich am vermuteten Erregerspektrum und an erwarteten Resistenzen orientiert (AWAD, 2003). Um eine langfristige Hypotension und ein resultierendes Organversagen zu verhindern, muss der Blutdruck und damit der Perfusionsdruck im Gewebe so hoch wie möglich gehalten werden. Die aggressive Flüssigkeitszufuhr ist gemeinsam mit der Gabe von Katecholaminen eine wichtige Säule der Sepsis-Therapie. Allerdings verlieren die Katecholamine im Verlauf der Erkrankung ihre Wirksamkeit (BOOKE, 1999).

Neben diesen Allgemeinmaßnahmen gibt es nur wenige spezifische Therapieansätze. Die Applikation von aktiviertem Protein C (APC) und die Gabe von niedrigdosierten Steroiden in den ersten 7 Tagen der Erkrankung können einen positiven Einfluss auf das Überleben der Sepsis-Patienten haben. Alle anderen aus der Pathophysiologie der Sepsis abgeleiteten Therapie-Ansätze konnten bisher keinen Effekt auf den Verlauf einer Sepsis oder eines SIRS zeigen (BERNARD, 2001; AWAD, 2003; REINHARDT, 2006).

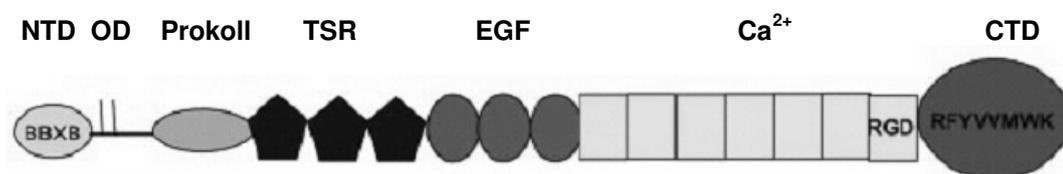
### **1.1.6. Das Schaf als Sepsis-Modell**

Die Untersuchung erfolgte am wachen, chronisch instrumentierten Schaf. Um in diesem Modell ein SIRS auszulösen, wurde die etablierte Methode der kontinuierlichen Infusion von Lipopolysaccharid (Endotoxin) verwendet. Das Schaf als Sepsis-Modell wurde aus mehreren Gründen gewählt. Die Organ- und Kreislaufverhältnisse beim

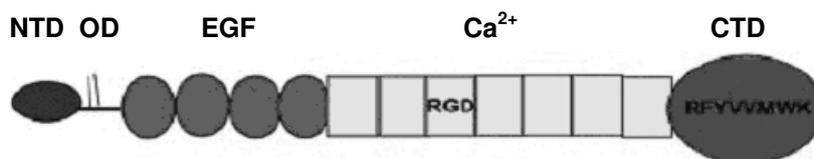
Schaf entsprechen in etwa denen des Menschen. Die Schafe wurden daher in gleicher Weise wie Menschen auf einer Intensivstation instrumentiert, überwacht und behandelt. Die Reaktionen auf die Endotoxin-Gabe und die dafür nötige Dosierung sind bei Schaf und Mensch sehr ähnlich. Der Versuchsaufbau dieser Untersuchung ist daher so nah wie möglich an der Situation eines Sepsis-Patienten, was die Übertragung der Ergebnisse auf klinische Anwendungen erleichtert (BONE, 1998; VAN DEVENTER, 1990; TRABER, 2000; PARKER, 2001).

## 1.2. Thrombospondin-1

Zur Familie der Thrombospondine (TSP) gehören fünf oligomere Glykoproteine, die an Zell-Zell-Interaktionen und an Interaktionen zwischen Zellen und extrazellulärer Matrix beteiligt sind. Die Monomere von TSP-1 und TSP-2 haben ein Molekulargewicht von 150kDa und besitzen eine globuläre Domäne am N-terminalen Ende. Dort findet sich eine heparinbindende Domäne und eine Oligomerisationsdomäne, an der sich über Disulfidbrücken die Oligomere der Thrombospondine ausbilden. Des Weiteren findet sich eine Prokollagendomäne, welche ebenfalls an der Ausbildung stabiler Oligomere beteiligt ist, gefolgt von drei so genannten thrombospondin-typischen *repeats* (TSR, Typ-1-*repeats*), die auch als Properdin-Domäne bezeichnet werden. Daneben finden sich drei EGF-ähnliche Domänen (Typ-2-*repeats*) und zahlreiche calcium-bindende Domänen. Abschließend weist das Monomer eine globuläre C-terminale Domäne auf (Abb. 1.3.a, Tabelle 1.2.) (HOFSTEENGE, 2001).



**Abb. 1.3.a** Schematische Darstellung der Struktur eines TSP-1-Monomers. NTD= N-terminale Domäne, OD= Oligomerisations-Domäne, Prokoll= Prokollagen-Domäne, TSR= thrombospondin-typische *repeats* (Typ 1), EGF= EGF-ähnliche Domäne (Typ 2), Ca<sup>2+</sup>= calcium-bindende Domäne (Typ 3), CTD= C-terminale Domäne (aus: ADAMS, 2001).



**Abb. 1.3.b** Schematische Darstellung der Struktur eines TSP-3-Monomers. NTD= N-terminale Domäne, OD= Oligomerisations-Domäne, EGF= EGF-ähnliche Domäne (Typ 2),  $\text{Ca}^{2+}$ = calcium-bindende Domäne (Typ 3), CTD= C-terminale Domäne (aus: ADAMS, 2001).

Domäne	Peptid-Sequenz	Bindende Struktur für
N-terminale Domäne (NTD)		Fibrinogen
	RKGSRR/KKTR	Heparin/HSPG
	MKKTRG	Decorin
	FQGLQNVRVF	Aktiviertes Integrin $\alpha_3\beta_1$
Oligomerisations-Domäne		TSP-1-Monomere
Prokollagen-Domäne		TSP-1-Monomere
Typ-1-repeats (TSR)	CSVTCG	GPIV (CD36)
	GGWSHW	Fibronectin
	KRFK/WSHWSPW	TGF- $\beta$
	WSHWSPWS	Heparin/HSPG
	EWSPCSVTCGNGIQVRIK	Heparin/HSPG
Typ-2-repeats (EGF)		Plasminogen
		Fibrinogen
		$\beta_1$ -Integrine
Typ-3-repeats ( $\text{Ca}^{2+}$ )		Calcium-Ionen
	RGDA	Integrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa), $\alpha_v\beta_3$
	NCPFHYNP	Cathepsin G, Elastase
	NCQYVYNV	Elastase
C-terminale Domäne (CTD)	RFYVMWK	IAP (CD47)

**Tab. 1.2.** Domänen und Peptid-Sequenzen von TSP-1 und deren Liganden (modifiziert nach ADAMS, 2001).

Nach der Translation bilden sich im Falle von TSP-1 und TSP-2 an der Oligomerisationsdomäne über Disulfidbrücken Trimere aus drei identischen Untereinheiten, wobei sich eine dreisträngige  $\alpha$ helikale Struktur ausbildet. Die Thrombospondine 3, 4 und 5 dagegen haben eine andere Molekülstruktur. In den Monomeren findet sich ein anders strukturiertes N-terminales Ende. Außerdem fehlen die Prokollagen-Domäne und die Typ-1-repeats. Von den Typ-2-repeats liegen dagegen vier vor (Abb. 1.3.b). Bei der Oligomerisation bilden TSP-3, TSP-4 und TSP-5 Pentamere aus fünf gleichen Untereinheiten (ADAMS, 2001). Durch die Ausbildung von Trimeren erhalten zumindest TSP-1 und TSP-2 zusätzliche Funktionen der Zelladhäsion und Zellausbreitung, die die Monomere allein nicht übernehmen können (ANILKUMAR, 2002).

TSP-1 wird während der Embryogenese von zahlreichen Geweben exprimiert. Beim Erwachsenen kommt es unter anderem noch in Thrombozyten, Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen, Haut- und Muskelzellen, sowie Zellen des Nervensystems vor. Es kann außerdem in die extrazelluläre Matrix eingebaut werden (ADAMS, 2001). TSP-1 wurde zunächst als Protein entdeckt, das in den  $\alpha$ -Granula von Thrombozyten enthalten ist und bei Stimulation der Thrombozyten durch Thrombin freigesetzt wird. Es wurde daher als thrombin-sensitives Protein (TSP) beschrieben, der Name Thrombospondin wurde aus den Begriffen *thrombin* und *response* abgeleitet (BORNSTEIN, 2001). TSP-1 macht etwa 20%-30% des gesamten Proteingehaltes der  $\alpha$ -Granula aus (BONNEFOY, 2001). Der größte Anteil des aus aktivierten Thrombozyten freigesetzten TSP-1 bindet auf die Oberfläche der Plättchen und auf thrombozytäre Mikropartikel zurück, aber auch an andere Zellen des Blutes. Das Ausmaß der TSP-1-Bindung an Thrombozyten und deren Mikropartikel ist vom Aktivierungszustand abhängig und kann so als Marker der Thrombozyten-Aktivierung dienen (KEHREL, 1996).

Während es an die Thrombozyten bindet, interagiert das TSP-1 mit dem Kollagen-Rezeptor Glykoprotein IV (CD36) und dem Integrin-assoziierten Protein (IAP, CD47), über das es an der Aktivierung des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (GPIIb/IIIa) beteiligt ist. Außerdem kann es über die RGD-Seqenz in der calcium-bindenden Domäne direkt an die Integrine  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (GPIIb/IIIa) und  $\alpha_v\beta_3$  binden. TSP-1 ist in der Lage, oberflächengebundenes Fibrinogen zu binden, und so eine überbrückende Verbindung zwischen zwei fibrinbedeckten Flächen herzustellen, zum Beispiel zwischen zwei Thrombozyten, um so die Thrombozyten-Aggregation zu verstärken. Auch direkte Verbindungen zwischen zwei TSP-1-Molekülen wirken an der Aggregation verschiedener Zellen mit, wobei die TSP-1-Moleküle direkt oberflächengebunden sein können oder an oberflächengebundenes Fibrinogen gekoppelt sind (BONNEFOY, 2001). Vor allem bei niedrigen Scherkräften spielt TSP-1 eine wichtige Rolle, um die Bindung von Thrombozyten über CD47 an entzündlich verändertes Gefäßendothel zu vermitteln (LAGADEC, 2003). Aber auch bei hohen Scherkräften kann TSP-1 unabhängig von von-Willebrand-Faktor über den Rezeptor GPIb $\alpha$  zu einer stabilen Adhäsion an geschädigtes Endothel führen (JURK, 2003). Außerdem ist TSP-1 an der Umstrukturierung des Zytoskeletts des aktivierten Thrombozyten beteiligt (SAUMET, 2002). Nukleotidsequenzen der C-terminalen Domäne haben zudem die Fähigkeit, über

weitere bisher nicht näher bekannte Rezeptoren an Thrombozyten zu binden und so über signaltransduzierende Mechanismen zu einer starken Aktivierung des Thrombozyten zu führen, und das unabhängig von CD47 und den Glykoproteinen IIb/IIIa und Ib $\alpha$ . Auf diesem Weg unterstützt TSP-1 nicht nur die Adhäsions- und Aggregationsvorgänge, sondern beteiligt sich auch an der Aktivierung ruhender Thrombozyten (TULASNE, 2001).

In seiner heparinbindenden Domäne und in den Typ-3-*repeats* besitzt TSP-1 Bindungsstellen, mit denen es unter Anwesenheit von Calcium-Ionen an Granulozyten binden kann. Über einen G-Protein-gekoppelten Mechanismus kann TSP-1 dann die Adhäsion und Chemotaxis der Granulozyten bewirken und die Produktion von bakteriziden Substanzen steigern (MAJLUF-CRUZ, 2000).

In der N-terminalen Domäne besitzt TSP-1 Bindungsstellen, um die Adhäsion an zahlreiche Zellen zu ermöglichen, darunter zum Beispiel Endothelzellen, glatte Muskelzellen, aber auch Zellen von malignen Melanomen oder Mamma-Karzinomen (CLEZARDIN, 1997). Dabei fördert TSP-1 die Proliferation von glatten Muskelzellen und hemmt die Proliferation von Endothelzellen. Zusätzlich vermag TSP-1 die Struktur der extrazellulären Matrix und die Aktivität von extrazellulären Proteasen zu beeinflussen. Außerdem steuert es die Expression des *Transforming Growth Factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ). Über diese Mechanismen ist TSP-1 maßgeblich an Umbauvorgängen im Rahmen der Wundheilung, der Angiogenese und des Wachstums von Tumoren beteiligt (LAWLER, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass bei Mäusen mit einer Null-Mutation auf dem Gen des TGF- $\beta$ 1 („TGF- $\beta$ 1-knock-out-Mäuse“) bereits nach wenigen Wochen multiple disseminierte Entzündungsreaktionen auftreten, welche rasch zum Tod führen. Offenbar ist TGF- $\beta$  ein wichtiger Immunsuppressor, welche die proinflammatorischen Reaktionskaskaden inhibiert und moduliert. Patienten mit schweren Verbrennungen, welche eine verminderte Ausschüttung von TGF- $\beta$  aufwiesen, verstarben häufiger an einer Sepsis als vergleichbare Patienten mit normaler TGF- $\beta$ -Expression. Da die TGF- $\beta$ -Expression durch Thrombospondin-1 gesteuert wird, hat dieses auch hier einen wichtigen Einfluss auf Immunität, Erregerabwehr und SIRS (KULKARNI, 1993; YEH, 2002).

Bei Mäusen mit einer Null-Mutation auf dem Gen für Thrombospondin-1 („TSP-1-knock-out-Mäuse“) zeigte sich eine vermehrte Einwanderung von Granulozyten und Monozyten insbesondere in das Lungengewebe, welches eine ausgeprägte akute und

chronische Entzündungsreaktion entwickelte. Die entzündlichen Lungenveränderungen waren rasch progredient. Bei der Entzündungsreaktion und der Regulation des Immunsystems des Lungengewebes spielt TSP-1 eine entscheidende Rolle, was sich auch in der Tatsache widerspiegelt, dass TSP-1 bei einer organisierenden Pneumonie auch beim Menschen exprimiert wird (LAWLER, 1998).

Es finden sich auch Hinweise auf antikoagulatorische Wirkungen von TSP-1. Werden Thrombozyten aktiviert, bindet Fibrinogen an die Fibrinogenrezeptoren GPIIb/IIIa. Möglicherweise können TSP-1-Moleküle durch Anlagerung bewirken, dass sich weniger Plättchen über die Fibrinogenrezeptoren in den Aggregationsprozess rekrutieren lassen (BONNEFOY, 2001).

TSP-1 ist außerdem in der Lage, mit seiner Properdin-Domäne an zirkulierende Multimere des von-Willebrand-Faktor zu binden und als Reduktase ihrer Disulfidbrücken zu wirken. Daher verkleinert TSP-1 die Größe der von-Willebrand-Faktor-Multimere (XIE, 2001). Neben TSP-1 reguliert die Metalloproteinase ADAMTS13 (*a disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif*) die Größe der vWF-Multimere. Bei Mäusen mit einer Null-Mutation auf dem Gen für Thombospondin-1 zeigten sich kleinere vWF-Multimere, da möglicherweise das TSP-1 seinerseits das ADAMTS13 inhibiert. Bei der Plättchenaggregation in großen Mengen freigesetztes TSP-1 kann so über diesen Mechanismus auch die Thrombusformation regulieren (PIMANDA, 2004). Der Mechanismus dieser Interaktion scheint die kompetitive Hemmung der Bindung von ADAMTS13 an vWF durch TSP-1 zu sein (BONNEFOY, 2006).

## **1.3. Thrombozyten**

### **1.3.1. Morphologie der Thrombozyten**

Thrombozyten, auch Blutplättchen genannt, sind kernlose, etwa 2-4µm große Zellen des peripheren Blutes. Sie sind dort die kleinsten korpuskulären Bestandteile und kommen in einer Konzentration von 150.000–450.000/µl vor (HANDIN, 2001 b). Sind sie unstimuliert, zirkulieren sie in ihrer diskoiden Ruheform (Abb. 1.4.). Thrombozyten werden im Knochenmark aus den polyploiden Megakaryozyten gebildet. Jeder Megakaryozyt bildet etwa 10 bis 20 Ausstülpungen, die so genannten *proplatelets*. In den Spitzen dieser Ausstülpungen formieren sich aus spezifischen Mikrotubuli- und

Aktin-Strukturen die Thrombozyten. Diese Zytoskelettstrukturen sind auch für die typische diskoidale Form der reifen Thrombozyten verantwortlich (HARTWIG, 2003). Nach dem Austreten aus dem Knochenmark wird etwa ein Drittel der Thrombozyten in der Milz sequestriert. Zwei Drittel der ausgetretenen Thrombozyten zirkulieren für sieben bis zehn Tage im peripheren Blut. Nach dieser Zeit werden auch sie im retikuloendothelialen System von Leber und Milz abgebaut (HANDIN, 2001 b).



**Abb. 1.4.** Ruhende Thrombozyten in diskoider Form. An der Oberfläche sind die Öffnungen des offenen kanalikulären Membransystems (OCS) sichtbar. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme (B. KEHREL, Münster).

Die Plasmamembran von Thrombozyten besteht aus einer Doppelschicht aus Phospholipiden, welche von außen durch einen Kohlenhydratsaum, der Glykokalyx, bedeckt wird. Die Glykokalyx ist an der Bindung von Kollagen und von-Willebrand-Faktor, sowie an der Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion beteiligt. Außerdem wird über die Zusammensetzung der Phospholipidmembran die Bindung von Gerinnungsfaktoren und die oberflächennahe Thrombinbildung gesteuert (JURK, 2005). In die Zellmembran integriert sind zahlreiche Glykoproteine. Einige von ihnen sind Rezeptoren für thrombozytenaktivierende Substanzen, wie zum Beispiel Thrombin oder ADP. Andere dieser Rezeptoren vermitteln die Adhäsion an Subendothel oder sind an Zell-Zell-Interaktionen beteiligt, wie etwa das Glykoprotein IIb/IIIa, welches unter anderem Fibrinogen bindet (MORGENSTERN, 1999). Einen Überblick über die thrombozytären Membranrezeptoren und ihre Funktion gibt Tabelle 1.3.

Charakteristisch für unstimulierte Thrombozyten des Menschen ist das offene kanalikuläre Membransystem (*surface connected system* [SCS]). Dabei handelt es sich

um mit Plasmamembran umhüllte Kanäle, welche sich von der Zelloberfläche weit in das Innere des Thrombozyten ziehen und über Poren mit dem Extrazellulärraum in Kontakt stehen (Abb. 1.4.). Die Eigenschaften ihrer Membran entsprechen etwa denen der übrigen Zellmembran. Das offene kanalikuläre Membransystem dient unter anderem als Membranreservoir für den schnellen Formwandel der Thrombozyten nach Aktivierung (GAWAZ, 1999).

Des Weiteren verfügen Thrombozyten über ein abgeschlossenes Membransystem (*dense tubular system*), welches keinen Anschluss an den Extrazellulärraum besitzt. Es durchzieht die gesamte Zelle und besteht aus verzweigten Tubuli und bläschenartigen Erweiterungen. Das abgeschlossene Membransystem entspricht in Form und Funktion etwa dem sarkoplasmatischen Retikulum der Skelettmuskelzelle und ist vor allem an der Speicherung und Sekretion von Calciumionen beteiligt.

Glykoprotein (GP)	Struktur	Rezeptor für	Funktion
<b>Integrine</b>			
GPIIb/IIIa	$\alpha_{IIb}\beta_3$	Fibrinogen, vWF, Vitronectin, Fibronectin, Thrombospondin	Adhäsion und Aggregation bei hoher Strömungsgeschwindigkeit
Vitronectinrezeptor	$\alpha_v\beta_3$	Vitronectin	unbekannt
GPIa/IIa (VLA-2)	$\alpha_2\beta_1$	Kollagen I, III, IV	Adhäsion und Aktivierung
GPIc/IIa (VLA-5)	$\alpha_5\beta_1$	Fibronectin	Adhäsion
GPIc*/IIa (VLA-6)	$\alpha_6\beta_1$	Laminin	Adhäsion
<b>Leucinreiche Glykoproteine</b>			
GPIb/V/IX	Ib $\alpha$ .Ib $\beta$ /V/IX	vWF, Thrombin	Adhäsion, Aktivierung
GPV			unbekannt
<b>Selektine</b>			
P-Selektin	sc	Kohlenhydrate	Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion
<b>Immunglobulinfamilie</b>			
PECAM-1	sc	?	Zelladhäsion, Inhibition der Aktivierung
<b>Unterschiedliche transmembrane Rezeptoren</b>			
Thrombinrezeptor	sc	Thrombin	Thrombozytenaktivierung
$\alpha_2$ -Adrenorezeptor	sc	ADP	Thrombozytenaktivierung
Na <sup>+</sup> -H <sup>+</sup> -Pumpe	sc	H <sup>+</sup>	Thrombozytenaktivierung
CD9	sc	unbekannt	Thrombozytenaktivierung
CD63	sc	unbekannt	unbekannt
<b>Andere Rezeptoren</b>			
GPIV	sc	Kollagen	
GPVI	sc	Kollagen	Aktivierung, Signaltransduktion
MG76.000-Protein	sc	Elastin ?	unbekannt

**Tab.1.3.** Glykoproteine der Thrombozytenmembran. sc= *single chain*, VLA= *very late antigen*, PECAM= *platelet-endothelial cell adhesion molecule*, CD= *cluster of differentiation*, MG= Molekulargewicht, vWF= von-Willebrand-Faktor (aus: DE GROOT, 1999; modifiziert).

Etwa 15% des Thrombozytenvolumens nehmen die  $\alpha$ -Granula ein. Dabei handelt es sich um kleine kugelförmige Zellorganellen, die sich vor allem im Zentrum des Thrombozyten befinden und keinen Kontakt untereinander oder zu anderen Organellen haben. Die  $\alpha$ -Granula speichern zahlreiche Proteine, welche nach Aktivierung des Thrombozyten in den Extrazellulärraum abgegeben werden und dort an zahlreichen Reaktionen beteiligt sind. Dazu zählt die Aggregation der Thrombozyten und die Interaktion mit anderen Zellen oder Strukturen (durch die Freisetzung von Fibrinogen, Fibronectin, Thrombospondin-1, Vitronectin, von-Willebrand-Faktor,  $\beta$ -Thrombomodulin und Plättchenfaktor 4). Die Inhaltsstoffe der  $\alpha$ -Granula sind außerdem an der Gerinnung und Fibrinolyse beteiligt (Faktor V, Faktor VIII, Fibrinogen, Plasminogen, PAI-1). Gleichzeitig sind in den  $\alpha$ -Granula Immunglobuline A, G und M, Komplementfaktoren und andere Modulatoren der Entzündungs- und Immunantwort enthalten, unter anderem Zytokine und Wachstumsfaktoren (z.B. Interleukin-1 und TGF- $\beta$ ).

Jeder Thrombozyt besitzt etwa 5 bis 6 *dense bodies*. Sie enthalten neben Serotonin große Mengen an ADP und ATP, außerdem Calcium- und Phosphationen. Das Serotonin fördert zahlreiche Vorgänge der Blutgerinnung und hat lokal einen vasokonstriktorischen Effekt. Freigesetztes ADP wirkt als sekundärer Agonist und führt zu Formwandel und Aggregation der Thrombozyten (MORGENSTERN, 1999).

### **1.3.2. Parameter der Thrombozyten-Aktivierung**

In dieser Arbeit wurden Untersuchungen zum Aktivierungszustand der Thrombozyten durchgeführt. Dazu wurde die Bindung von Thrombospondin-1, von-Willebrand-Faktor, Annexin-V und der Gerinnungsfaktoren VIIa und XIII an die gewonnenen Blutplättchen im Durchflusszytometer untersucht.

#### **1.3.2.1. Thrombospondin-1-Bindung an Thrombozyten**

Thrombospondin-1 ist ein homotrimeres Glykoprotein, das an zahlreichen Zell-Zell-Interaktionen und an Interaktionen von Zellen mit der extrazellulären Matrix beteiligt ist (HOFSTEENGE, 2001) (vgl. Kapitel 1.2.). Thrombospondin-1 kann über die Rezeptoren Glykoprotein IV (CD36), IAP (CD47) und Glykoprotein IIb/IIIa, sowie Heparansulfat,

sulfatierte Glykolipide, das Integrin  $\alpha_v\beta_3$  und Glykoprotein Ib an Thrombozyten binden (BONNEFOY, 2001). Das Ausmaß der Bindung von Thrombospondin-1 an Thrombozyten ist von deren Aktivierungszustand abhängig und kann so als Marker für die Aktivierung der Blutplättchen verwendet werden (KEHREL, 1996).

#### 1.3.2.2. Faktor VIIa-Bindung an Thrombozyten

Der Gerinnungsfaktor VII (FVII) wird in der Leber synthetisiert und nach der Translation durch eine Vitamin-K-abhängige Carboxylase so modifiziert, dass sich  $\gamma$ -Carboxyglutamat-Reste (Gla) ausbilden. Diese können Calciumionen binden und so über Konformationsänderungen die Proteinfunktion und die Bindung an Zelloberflächen beeinflussen (HANDIN, 2001 a). Der FVII kann durch verschiedene Proteasen in seine aktive Form überführt werden. Diese wird als Gerinnungsfaktor VIIa bezeichnet (FVIIa). Der FVIIa besteht aus einer leichten Kette mit ihren drei Domänen EGF-1, EGF-2 und Gla, welche an der Bindung an Zellmembranen beteiligt sind. Über eine Disulfidbrücke besteht eine Verbindung zur schweren Kette, welche die Domänen mit Proteaseaktivität enthält (EIGENBROT, 2002). Bei einer Schädigung des Gefäßendothels kommt subendothelialer *Tissue Factor* in Kontakt mit dem zirkulierenden FVII. Beide bilden einen Komplex, der den FVII in den aktivierten FVIIa überführt und so die Aktivierung des intrinsischen Gerinnungssystems einleitet (vgl. Abb. 2.1.) (LAU, 2003). FVIIa ist in der Lage, direkt an aktivierte Thrombozyten zu binden und an deren Oberfläche die Bildung von Thrombin zu bewirken. Voraussetzung für diese Bindung ist die Anwesenheit von Calciumionen. An ruhende Blutplättchen kann FVIIa jedoch nicht binden (LISMEN, 2003; LAU, 2003). Die Anbindung von FVIIa an Thrombozyten kann daher auch als Marker für den Aktivierungszustand der Blutplättchen dienen.

#### 1.3.2.3. Faktor XIII-Bindung an Thrombozyten

Der Gerinnungsfaktor XIII ist ein Tetramer und besteht aus jeweils zwei Untereinheiten FXIII-A und zwei Untereinheiten FXIII-B. Die Einheiten FXIII-A werden im Knochenmark produziert, während die Einheiten FXIII-B in der Leber synthetisiert werden. Erst im Plasma lagern sie sich zum vollständigen Faktor XIII

zusammen. Im Zuge der Gerinnungsaktivierung wird der ruhende Faktor XIII in eine aktive Transglutaminase überführt, welche dann als aktivierter Faktor XIII (Faktor XIIIa) bezeichnet wird. Dies geschieht, indem Thrombin ein 37 Aminosäuren langes Peptid vom N-terminalen Ende der FXIII-A-Einheit abspaltet. Unter Anwesenheit von Calcium-Ionen dissoziiert die als Träger fungierende Untereinheit XIII-B von der Enzymstruktur, so dass dann die aktivierten Einheiten XIII-A als Faktor XIIIa vorliegen (BERECZKY, 2003/2004). Der aktivierte Faktor XIIIa ist in der Lage, überbrückende Bindungen zwischen den  $\gamma$ -Glutamyl- $\epsilon$ -Lysin-Strukturen der Fibrin-Monomere auszubilden und so das Fibrin-Gerinnsel zu stabilisieren. Außerdem kann FXIIIa an das GPIIb/IIIa der aktivierten Thrombozyten und an das Integrin  $\alpha_v\beta_3$  der Endothelzellen binden und ist damit auch an der Steuerung der Thrombozytenfunktion und der Angiogenese beteiligt. Doch auch die inaktive Form des Faktor XIII kann über GPIIb/IIIa an die Oberfläche von Blutplättchen binden, so dass die Anbindung von inaktivem FXIII an Thrombozyten als Marker für deren Aktivitätszustand verwendet werden kann (DARDIK, 2002).

#### 1.3.2.4. von-Willebrand-Faktor-Bindung an Thrombozyten

Der von-Willebrand-Faktor besteht aus 2050 Aminosäuren langen Untereinheiten, welche sich zu Multimeren zusammenlagern. Die Multimere können etwa 500kDa große Dimere sein, aber auch sehr große Polymere mit über 10.000kDa ausbilden. Dabei können die Polymere die Größe von Thrombozyten erreichen. Der von-Willebrand-Faktor wird sowohl in Megakaryozyten und Thrombozyten gebildet, wo er in den  $\alpha$ -Granula gespeichert ist, als auch in Endothelzellen synthetisiert, in denen er sich in den Weibel-Palade-Körperchen findet. Neben zahlreichen anderen Bindungsdomänen besitzt jeder vWF-Monomer die Domäne A1. Diese weist eine Kombination aus  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblattstruktur auf und ist die Bindungsstelle für das Glykoprotein Iba, welches Teil des thrombozytären vWF-Rezeptors ist (RUGGERI, 2003). Über diesen Rezeptor ist der von-Willebrand-Faktor entscheidend an der Aktivierung der Hämostase und der Thrombozytenfunktion beteiligt. Die Domäne C2, welche sich dicht am C-terminalen Ende des vWF-Monomers befindet, ist in der Lage, an den aktivierten Rezeptor GPIIb/IIIa der Thrombozyten zu binden. Darüber kann eine aktivierungsabhängige Anbindung von exogenem von-Willebrand-Faktor als Marker für deren Aktivierungszustand dienen (SCHMUGGE, 2003).

### 1.3.2.5. Annexin V-Bindung an Thrombozyten

Zur Familie der Annexine gehören bisher 13 Proteine, die in verschiedenen Organismen gefunden wurden. Annexine weisen eine 70 Aminosäuren umfassende Annexin-Sequenz auf, die vier- oder achtmal wiederholt wird. Zusätzlich besitzen Annexine die Eigenschaft, unter Anwesenheit von Calciumionen mit hoher Affinität an Phospholipide auf Zelloberflächen zu binden. Diese Bindung ist besonders stark, wenn die Phospholipide negativ geladen sind, wie etwa das Phosphatidylserin. Die genaue Funktion der Annexine *in vivo* ist bisher nicht bekannt. In Thrombozyten findet sich vor allem Annexin V. Es liegt intrazellulär und bindet nach Aktivierung calciumabhängig an die Zellmembran und ist vermutlich an der Signaltransduktion beteiligt. Zusätzlich bindet Annexin V bei Aktivierung an das Zytoskelett und spielt wahrscheinlich so auch beim Formwandel der Blutplättchen eine wichtige Rolle (TZIMA, 2000).

Bei Aktivierung von Blutplättchen gelangen negativ geladene Phospholipid-Moleküle an die Thrombozyten-Oberfläche und bilden eine prokoagulatorische Oberfläche aus, auf der sich Gerinnungsfaktoren anlagern und dort die Bildung von Thrombin bewirken. Den größten Anteil an diesen Phospholipiden hat Phosphatidylserin. Um das Ausmaß der Präsentation von Phosphatidylserin an der Thrombozyten-Oberfläche festzustellen und damit einen Indikator für den Aktivierungszustand der Thrombozyten zu haben, wurde die Bindung von *in vitro* zugesetztem Annexin V an das präsentierte Phosphatidylserin gemessen. Je stärker die Aktivierung der Blutplättchen, desto größer ist die Anbindung des Annexin V. Das gilt jedoch nur bis ein Niveau erreicht ist, auf dem die Thrombozyten nicht weiter aktiviert werden können (DÖRMANN, 1998).

### 1.3.2.6. Aktivierung der Thrombozyten *in vitro* durch Kollagen, TRAP und Ristocetin

Um weitergehende Aussagen über den Zustand der Thrombozyten und ihre funktionelle Kapazität treffen zu können, erfolgte die *in vitro*-Aktivierung durch Plättchenagonisten. Anschließend wurde über die Anbindung von Thrombospondin-1, Faktor VIIa, Faktor XIII, Annexin V und von-Willebrand-Faktor untersucht, in wie weit sich die Thrombozyten *in vitro* noch weiter aktivieren lassen. Als Plättchenagonisten wurden methyliertes Kollagen Typ I, *Thrombin Receptor Activating Peptide* (TRAP) und Ristocetin A verwendet.

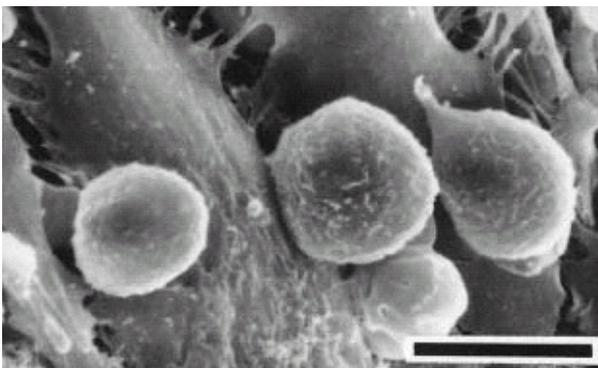
## 1.4. Leukozyten

### 1.4.1. Morphologie der Leukozyten

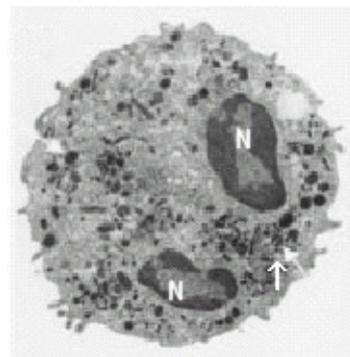
Leukozyten, welche auch als weiße Blutzellen bezeichnet werden, sind Bestandteil der zellulären und humoralen Abwehr. Sie können Fremdstoffe phagozytieren. Außerdem haben sie die Fähigkeit, den Blutstrom zu verlassen und sich im Gewebe amöboid fortzubewegen. Im Blut liegen die Leukozyten in einer Konzentration von 4.000–11.000/μl vor. Die Leukozyten werden unterteilt in Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten.

Granulozyten, welche etwa 90% der Leukozyten stellen, werden aufgrund ihrer Kernform auch als Polymorphnukleäre Leukozyten (PMNL) bezeichnet. Sie lassen sich in drei Gruppen gliedern, welche sich durch die Anfärbbarkeit in der Lichtmikroskopie unterscheiden: neutrophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten und basophile Granulozyten, wobei die Neutrophilen den Hauptanteil der zirkulierenden Granulozyten bilden.

Die PMNL haben einen Durchmesser von etwa 10–12μm und eine relativ kurze Lebensdauer von wenigen Stunden bis einigen Tagen. Sie weisen in der Regel einen unterschiedlich stark segmentierten Kern auf. Monozyten sind mit 12–20μm etwas größer als PMNL und haben einen exzentrischen, nicht segmentierten Kern. Monozyten können ebenfalls die Blutbahn verlassen und differenzieren sich dann im Gewebe in ortsständige Makrophagen aus (JUNQUEIRA, 1996).



**Abb. 1.5.** Neutrophile Granulozyten, die an Zellen des Gefäßendothels adhäreren. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme, Ratte (aus: SUZUKI, 2001).



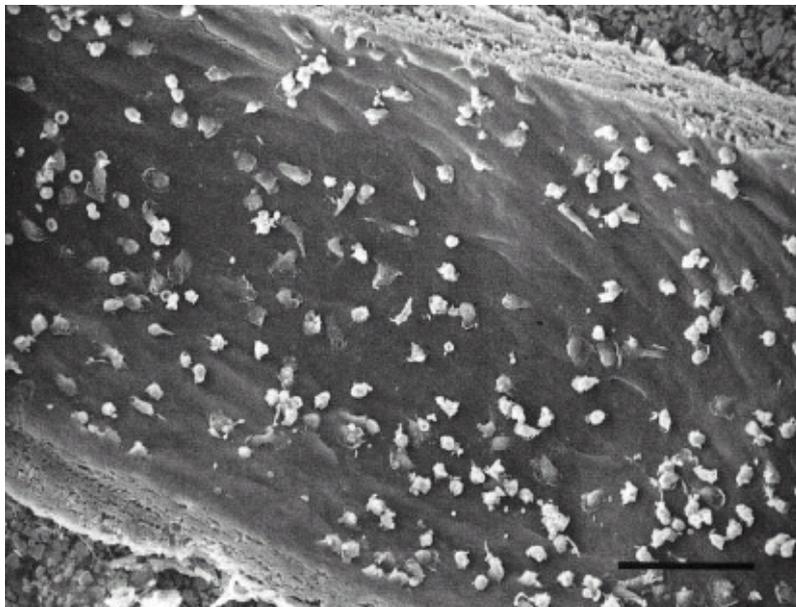
**Abb. 1.6.** Neutrophiler Granulozyt. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme. N= Nukleus, ↑= Granula (aus: LECKIE, 2000).

Im Plasma der PMNL finden sich zahlreiche membranumhüllte Speichergranula, welche für die Bezeichnung Granulozyt verantwortlich sind (Abb. 1.6.). Man unterscheidet vier Arten von Granula. Erstens lassen sich azurophile Granula abgrenzen, welche unter anderem Myeloperoxidase, *Bactericidal Permeability-increasing Protein*, Defensine, Azurocidin/CAP37, Elastase, Proteinase-3 und Cathepsine enthalten. Zweitens finden sich Spezifische Granula, die unter anderem Lactoferrin, Lysozyme, Properdin und Vitamin B<sub>12</sub>-bindendes Protein aufweisen (CHERTOV, 2000). Drittens findet man Gelatinase-Granula. Sie zeichnen sich durch einen hohen Gehalt an Gelatinase aus. Diese richtet sich gegen subendotheliales Kollagen und kann so die Migration der PMNL in das Gewebe ermöglichen. Viertens besitzen PMNL Sekretorische Vesikel, die lediglich Plasma enthalten. Allerdings ist ihre Membran besonders reich an Rezeptoren, welche an die Zelloberfläche transloziert werden können. Dazu zählt das leukozytenspezifische Oberflächenantigen CD45, das  $\beta_2$ -Integrin Mac-1 ( $\alpha_{III}\beta_2$ , CD11b/CD18) und das Flavocytochrom b<sub>558</sub> (gp91<sup>phox</sup>/p22<sup>phox</sup>), welches Teil des bakteriziden radikalbildenden NADPH-Oxidase-Komplexes ist. Nach Aktivierung von Monozyten und PMNL gelangen diese Rezeptoren durch Fusion der Granula mit der Membran an die Zelloberfläche und ermöglichen so eine Interaktion der Leukozyten mit der Umgebung. Gleichzeitig werden die Inhaltsstoffe der Granula in den Extrazellulärraum abgegeben, um dort gegen eine Infektion mit Erregern vorzugehen. Die Granula können auch mit intrazellulären Phagosomen verschmelzen, in die der Leukozyt zuvor Erreger aufgenommen hat (BORREGAARD, 1997).

#### 1.4.2. Entzündungsreaktion

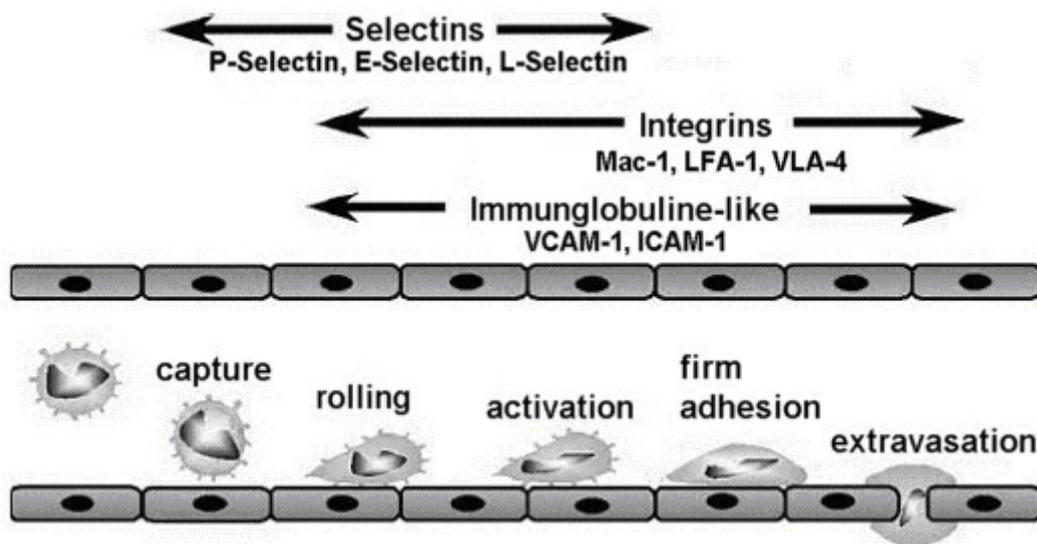
Leukozyten haben als Zellen der Immunabwehr die Fähigkeit, die Blutbahn zu verlassen und aktiv in das Gewebe zu wandern, um sich dort an einer Entzündungsreaktion und gegebenenfalls an der Abwehr von eindringenden Erregern zu beteiligen. Im Falle eines Gewebeschadens beginnen die Leukozyten innerhalb weniger Minuten, das Gewebe zu infiltrieren. Obwohl nach etwa 1–4 Stunden das Einwandern weiterer Entzündungszellen stoppt, lassen sich die aktivierten Leukozyten länger als 24 Stunden im Entzündungsherd nachweisen (YAMASHIRO, 2001). Auch auf der Gefäßoberfläche abgelagertes Fibrin, Fibrinogen und Gerinnungsfaktoren sind in der Lage, eine akute Entzündungsreaktion über die Aktivierung von Leukozyten einzuleiten (WETTERÖ, 2003).

Durch eine mechanische Schädigung des Endothels in der Gefäßwand, aber auch durch Entzündungsmediatoren wie  $\text{TNF-}\alpha$ , Interleukin- $1\beta$  und Toxine von Bakterien oder durch den Kontakt mit aktivierten Thrombozyten beginnen die Endothelzellen Adhäsionsmoleküle wie P-Selektin, E-Selektin und L-Selektin auf der Zelloberfläche zu präsentieren. P-Selektin stammt dabei aus den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen. Auf den Leukozyten findet sich der P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1 (PSGL-1). Dieser Rezeptor kann sowohl an P-Selektin als auch an E-Selektin binden und bewirkt, dass Leukozyten durch eine schwache Adhäsion an das aktivierte Endothel binden. Auch L-Selektin kann neben anderen an PSGL-1 binden, spielt aber eher bei der sekundären Anbindung von Abwehrzellen an bereits am Endothel haftende Leukozyten eine Rolle. Da es sich nur um eine schwache Adhäsion der Leukozyten an das aktivierte Endothel handelt, rollen die Leukozyten durch sich ständig lösende und neu bildende Bindungen langsam im Blutstrom an der Gefäßwand entlang. Während des Rollens kommt es zu einer weiteren Aktivierung der Leukozyten. (DAVIS, 2003)



**Abb. 1.7.** Längsschnitt durch ein Blutgefäß. Zahlreiche kugelförmige Granulozyten und amöboid ausgebreitete Monozyten, sowie wenige Thrombozyten adhären an geschädigtes Endothel. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme, Ratte (aus: SUZUKI, 2001).

Zahlreiche Zytokine aus beiden Zellarten und chemotaktisch aktive Substanzen wirken über verschiedene Rezeptoren aktivierend auf die Leukozyten. Beispielsweise führt Interleukin-8 zu einer Freisetzung der Granulainhaltsstoffe und zu einer vermehrten Expression des Integrins Mac-1. Mac-1 kann seinerseits an zahlreiche Liganden der subendothelialen Matrix binden und ist dann ein starker Aktivator für die Leukozyten. Kommt es zum so genannten *cross-linking* von Mac-1-Molekülen zweier Leukozyten, wird wiederum eine Freisetzung von Interleukin-8 und Interleukin-1 $\beta$  ausgelöst (Ley, 2002). Dabei scheint die Freisetzung von Interleukin-8 in ungewöhnlich hohen Konzentrationen eine zentrale Antwort des Leukozyten auf den Kontakt mit unzähligen verschiedenen Liganden oder Fremdstoffen zu sein. Interleukin-8 kann dann sowohl weiter Leukozyten in das Geschehen rekrutieren, als auch bereits im Gewebe befindliche Leukozyten durch Down-Regulation der Rezeptoren immobilisieren (SCAPINI, 2000). Die Aktivierung der Integrine LFA-1 (CD11a/CD18) und Mac-1 (CD11b/CD18) führt zu einer festen Bindung des Leukozyten an das Endothel, so dass der Vorgang des Rollens beendet wird. Die feste Adhäsion wird durch Bindungen des *Intracellular Adhesion Molecule-1* (ICAM-1) verstärkt (LEY, 2002).



**Abb. 1.8.** Schematische Darstellung der Rekrutierung und Transmigration eines Leukozyten aus dem Blutstrom: Adhäsion, Rollen, Aktivierung, feste Anbindung und Extravasation. Oben sind die in den einzelnen Phasen beteiligten Rezeptoren dargestellt (aus: DAVIS, 2003).

Schließlich muss der Leukozyt zwischen den Endothelzellen hindurchtreten, um in das subendotheliale Gewebe zu gelangen. Die genauen Vorgänge sind im Detail noch

nicht bekannt. Sobald der Leukozyt den Blutstrom verlassen hat, beginnt er im Rahmen der Chemotaxis durch das Gewebe zu wandern. Dabei wandert er über Rezeptoren gesteuert an einem Gradienten entlang zum Ort der Entzündung. Dabei spielen Leukotrien B<sub>4</sub>, Interleukin-8, Komplementfaktoren und Produkte von Bakterien als Zielsubstanz eine Rolle. Über intrazelluläre Signaltransduktion bewirkt die Bindung dieser Substanzen an die Rezeptoren auf den Leukozyten, dass sich deren Zytoskelett so verändert, dass sich die Zelle aktiv auf den Ort des Entzündungsgeschehens zubewegt (Cicchetti, 2002).

### 1.4.3. Parameter der Leukozyten-Aktivierung

Um den Aktivierungszustand der Leukozyten während des SIRS darstellen zu können, wurde in dieser Arbeit die Bindung von *in vitro* zugesetztem Fibrinogen, eines Fibrinogen-Antikörpers und eines CD11b-Antikörpers an Monozyten und PMNL untersucht.

#### 1.4.3.1. Fibrinogen-Bindung an Leukozyten

Fibrinogen wird ausschließlich in der Leber synthetisiert und gehört zu den Akutphaseproteinen, weshalb dessen Produktion durch TNF- $\alpha$ , Interleukin-1 und Interleukin-6 gesteigert wird. Fibrinogen besteht aus 6 Polypeptidketten. Jeweils zwei der Polypeptidketten A $\alpha$ , B $\beta$  und  $\gamma$  sind antiparallel angeordnet, wobei die N-terminalen Enden aller 6 Ketten in der zentralen globulären E-Domäne verbunden sind. Sobald das Fibrinogenmolekül in Kontakt mit Thrombin kommt, werden die Fibrinopeptide A und B von den Ketten A $\alpha$  und B $\beta$  abgespalten. Dadurch werden Bindungsstellen freigelegt, über die das jetzt als Fibrin bezeichnete Molekül Vernetzungen mit anderen Fibrin-Molekülen eingehen kann (MOSESSON, 1999).

Monozyten und PMNL exprimieren auf ihrer Oberfläche unter anderem die  $\beta_2$ -Integrine CD11b/CD18 (Mac-1) und CD11c, wobei letzteres jedoch eine untergeordnete Rolle spielt. Diese Integrine können als Rezeptoren für Fibrinogen fungieren, so dass Fibrinogen an Leukozyten binden kann. Da die CD11b-Expression vom Aktivierungszustand des Leukozyten abhängt, kann die Fibrinogen-Bindung an Monozyten und PMNL als Indikator dienen. Das gebundene Fibrinogen kann

seinerseits über CD11b-abhängige signaltransduzierende Mechanismen zu einer Aktivierung des Leukozyten führen. Außerdem ist Fibrinogen auf diesem Wege an der Ausbildung von Thrombozyten-Leukozyten-Assoziaten beteiligt (RUBEL, 2002; LÖSCHE, 2001).

#### 1.4.3.2. Fibrinogen-Antikörper-Bindung an Leukozyten

Im Gegensatz zur Beurteilung der Bindung von *in vitro* zugesetztem Fibrinogen an Leukozyten, erlaubt die Messung mittels eines Fibrinogen-Antikörpers Aussagen über die Menge an Fibrinogen, das bereits *in vivo* an Monozyten und PMNL gebunden hat. Auch hierüber lässt sich der Aktivierungszustand der Leukozyten beurteilen.

#### 1.4.3.3. CD11b-Antikörper-Bindung an Leukozyten

Der in dieser Arbeit verwendete CD11b-Antikörper richtet sich gegen die  $\alpha$ -Untereinheit des Integrins Mac-1 (CD11b/CD18), welches nach Aktivierung auf der Oberfläche von Monozyten und PMNL präsentiert wird. CD11b wird in der frühen Phase der Entzündungsreaktion exprimiert und vermittelt unter anderem die Migration von Leukozyten in das entzündete Gewebe und deren Interaktion mit anderen Zellen (MONNERET, 2003). Die Expression von CD11b auf Monozyten und PMNL ist bei der Sepsis gesteigert und ist ein guter Indikator für den *in vivo*-Aktivierungszustand der Leukozyten. Dabei besteht eine gewisse Korrelation zwischen dem Ausmaß der CD11b-Expression und der Schwere der Sepsis (RUSSWURM, 2002). In einigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einem Multiorganversagen eine weniger ausgeprägte CD11b-Expression aufwiesen als Patienten mit einer Sepsis ohne Multiorganversagen. Als Ursache hierfür kann entweder die schnelle Migration der besonders stark aktivierten Leukozyten über Adhäsionsmoleküle aus dem Blutstrom in Betracht gezogen werden, oder aber eine Funktionsstörung der Leukozyten bei besonders schwer erkrankten Patienten (MULLER KOBOLD, 2000).

## 1.5. Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion

### 1.5.1. Interaktion zwischen Thrombozyten und Leukozyten

Zwischen den Prozessen der Blutgerinnung und der Entzündungsreaktion besteht eine enge Beziehung, die sich in zahlreichen Interaktionen zwischen Thrombozyten, Leukozyten und Endothelzellen widerspiegelt. Aktivierte Thrombozyten sind in der Lage, über freigesetzte Substanzen die Degranulation, Chemotaxis und Phagozytose der Leukozyten zu fördern. Zu diesen Substanzen zählen zum Beispiel ADP, *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF), *Platelet Factor 4* und Thromboxan  $A_2$ . Zusätzlich können sie die Adhäsion und das Rollen von Leukozyten am Endothel verstärken. Auch aktivierte Leukozyten können über die Freisetzung von *Platelet-Activating Factor* (PAF),  $O_2^-$ , NO, ADP, Elastase und Cathepsin G bei ruhenden Thrombozyten eine Aggregation und Sekretion bewirken (LI, 2000).

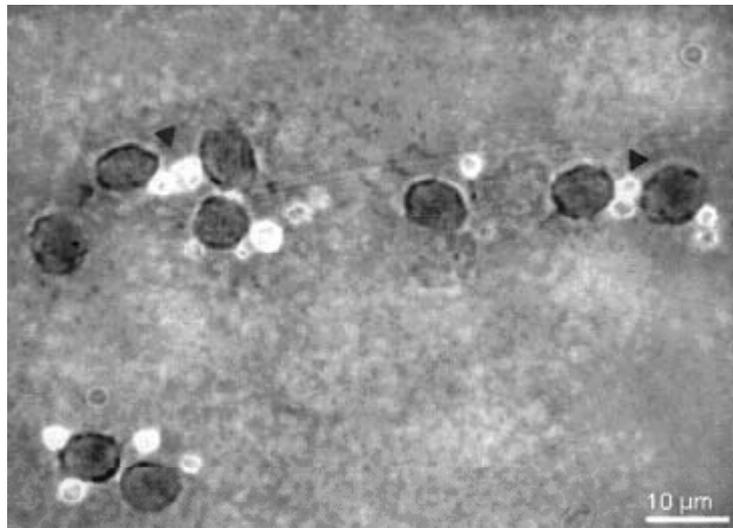
Zwischen Thrombozyten und Leukozyten findet ein transzellulärer Arachidonsäure-Metabolismus statt. Aus Thrombozyten stammende freie Arachidonsäuren werden von Leukozyten aufgenommen und zu Leukotrien  $B_4$  verstoffwechselt. Die Plättchen selbst sind zu diesem Schritt nicht in der Lage, denn sie besitzen die dafür nötige 5-Lipoxygenase nicht. Andererseits wird von den Leukozyten Leukotrien  $A_4$  synthetisiert, welches von Thrombozyten zu Leukotrien  $C_4$  und Lipoxin  $A_4$  weiterverarbeitet wird (DE GAETANO, 1999; LI, 2000).

Auch bei der Adhäsion und dem Rollen von Leukozyten auf geschädigtem Endothel sind Thrombozyten beteiligt, insbesondere wenn am Ort des Endothelschadens bereits aktivierte Plättchen gebunden sind. Über das thrombozytäre P-Selektin kommt es zu einer ersten Adhäsion, die anschließend durch die Bindung des leukozytären Integrins  $\alpha_M\beta_2$  (Mac-1, CD11b/CD18) an das thrombozytäre Glykoprotein  $Ib\alpha$  gefestigt wird. Vermittelt durch diese Rezeptoren wandern die Leukozyten anschließend weiter durch die Schicht aus Blutplättchen in das subendotheliale Gewebe ein (EHLERS, 2003).

### 1.5.2. Assoziat aus Thrombozyten und Leukozyten

Neben der oben beschriebenen Interaktion kommt es auch zu direkten zellulären Bindungen zwischen Thrombozyten und Leukozyten, welche als Assoziat bezeichnet

werden. Dabei binden in der Regel mehrere aktivierte Thrombozyten an einen aktivierten Leukozyten (Abb. 1.9.).



**Abb. 1.9.** Thrombozyten-Monozyten-Assoziat. Monozyten erscheinen als dunkle Zellen, Thrombozyten als helle FITC-markierte Zellen. Konfokalmikroskopische Aufnahme (aus: DA COSTA MARTINS, 2004).

Die Ausbildung der Thrombozyten-Leukozyten-Assoziat wird in erster Linie durch die Bindung des thrombozytären P-Selektin an den P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1 (PSGL-1) der Leukozyten vermittelt. Durch die Bindung an PSGL-1 werden zusätzlich intrazelluläre Signalkaskaden ausgelöst, die unter anderem durch Src-Kinasen eine Phosphorylierung von Thyrosinen bewirken. Als Folge wird die Adhäsion an Thrombozyten über das Integrin  $\alpha_M\beta_2$  (Mac-1, CD11b/CD18) gesteigert, welches an das Glykoprotein Ib $\alpha$  bindet (EVANGELISTA, 2003). Es kommt aber auch eine Assoziatbildung über Proteinbrücken vor. Fibrinogen kann über das Glykoprotein IIb/IIIa an Blutplättchen binden und gleichzeitig über  $\alpha_M\beta_2$  (Mac-1, CD11b/CD18) einen Leukozyten festhalten. Auch Thrombospondin-1 kann über das Glykoprotein IV (CD36) sowohl Thrombozyten als auch Leukozyten binden und so ebenfalls an der Ausbildung von Assoziaten beteiligt sein. Der enge Kontakt, der so zwischen den Zellen entsteht, erleichtert die Interaktion und den transzellulären Stoffwechsel der Zellen. Außerdem fördert die Ausbildung der Assoziat die Adhäsion und Migration der Leukozyten am geschädigten Endothel der Gefäßwand (HU, 2003). Die Bildung von Assoziaten ist vor allem vom Aktivierungszustand der Thrombozyten abhängig. Je stärker die Thrombozyten aktiviert sind, desto mehr kommt es zur Bildung von Assoziaten mit

Leukozyten, da das verantwortliche P-Selektin nur von aktivierten Plättchen präsentiert wird. Der Aktivierungszustand der Leukozyten spielt dagegen nur eine untergeordnete Rolle, da diese den Rezeptor PSGL-1 ständig auf ihrer Oberfläche präsentieren (LI, 2000).

Monozyten sind an der frühen Entzündungsreaktion beteiligt und spielen bei der Entstehung von arteriosklerotischen Plaques eine entscheidende Rolle. Thrombozyten-Monozyten-Assoziate fördern über P-Selektin und PSGL-1 die Bindung vieler Monozyten aneinander, so dass sich die so genannten Monozyten-Cluster ausbilden. Zusätzlich vermitteln die Assoziate die Adhäsion von Monozyten an das geschädigte Endothel (DA COSTA MARTINS, 2004). Bei Untersuchungen von Neutrophilen Granulozyten zeigte sich, dass sowohl die Thrombozyten als auch die Granulozyten, die an Assoziaten beteiligt sind, stärker aktiviert sind, als einzeln vorliegende Zellen. Die Ausbildung der Assoziate führt zu funktionellen und phänotypischen Veränderungen der beteiligten Zellen. *Platelet Activating Factor* (PAF),  $\beta$ -Thromboglobulin, Interleukin-1 und andere Substanzen der Thrombozyten führen zu einer Aktivierung der Leukozyten, während leukozytäre Substanzen zu einer Plättchen-Aktivierung führen. Als Folge aktivieren sich die Thrombozyten und die Leukozyten gegenseitig maximal, und es kommt zu einer starken Adhäsion an das Gefäßendothel. Gleichzeitig steigert sich die Phagozytoseaktivität der Leukozyten (PETERS, 1999).

Im Rahmen einer Sepsis bzw. eines SIRS kommt es zu einer Aktivierung von Gerinnungs- und Entzündungssystemen. Daher ist auch bei septischen Patienten die Anzahl an zirkulierenden Thrombozyten-Leukozyten-Assoziaten deutlich erhöht. Dies kann im Verlauf der Sepsis zu einer Obstruktion von Kapillaren führen und so die Mikrozirkulation in den Endorganen beeinträchtigen. Dieser Vorgang spiegelt sich in der Tatsache wieder, dass bei Patienten mit manifestem Multiorganversagen die Anzahl der Thrombozyten-Leukozyten-Assoziate signifikant verringert ist. Offensichtlich werden die Assoziate in den Kapillaren festgehalten und verschließen diese (KIRSCHENBAUM, 2000). Es zeigt sich eine gute Korrelation zwischen der verringerten Anzahl von Thrombozyten-Leukozyten-Assoziaten und der Prognose des einzelnen Patienten (PETERS, 1999).

## 1.6. Zielsetzung dieser Arbeit

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob die Gabe von gerinnungs- und inflammationsmodulierendem Thrombospondin-1 eine neue Option in der Therapie der Sepsis bzw. des SIRS sein könnte. Da verschiedene bekannte Funktionen vom Konformationszustand des Thrombospondins abhängen, wurden zwei Thrombospondine eingesetzt, welche sich in ihrer Konformation unterscheiden. Während einer prospektiven, kontrollierten, randomisierten, verblindeten tierexperimentellen Studie am chronisch instrumentierten Schaf wurden Aktivierungs- und Funktionsparameter von Thrombozyten und Leukozyten im Durchflusszytometer gemessen, nachdem durch die Dauerinfusion von Lipopolysaccharid ein SIRS ausgelöst wurde. Dabei wurde untersucht, ob die Gabe von Thrombospondin-1 in 2 Chargen bei einem LPS-induzierten SIRS diese Parameter positiv beeinflussen kann. Die gemessenen Parameter sollen zusätzlich Informationen über den Funktionszustand von Thrombozyten und Leukozyten, sowie die Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion im Rahmen des LPS-induzierten SIRS liefern, um daraus eventuell neue Verlaufs- und Prognoseparameter abzuleiten.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Geräte

#### Durchflusszytometrie

Durchflusszytometer FACScan (Becton Dickinson, Heidelberg)

Computersystem PowerMac 7600/132 (Apple, U.S.A.)

Steuer- und Auswerteprogramm CellQuest 3.1f (Becton Dickinson, Heidelberg)

Drucker Phaser750N (Tektronix, Köln)

#### Säulenchromatographie

Chromatographie-Säulen 30ml und 177ml (BioRad, München)

Peristaltische Pumpe P1 (Pharmacia, Freiburg)

Photometer und optische Einheit UV1 (Pharmacia, Freiburg)

Zwei-Kanal-Schreiber REC 102 (Pharmacia, Freiburg)

Fraktionssammler FRAC-100 (Pharmacia, Freiburg)

Fraktionssammler Model 2119 (BioRad, München)

#### Gelelektrophorese

Vertikalelektrophoresekammer SE600 (Hofer, U.S.A.)

Netzgeräte LKB197, LKB2103 (Pharmacia, Schweden)

Geltrockner Model 543 (BioRad, München)

#### Photometrie

Photometer Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech, Calbiochem, Bad Soden)

ELISA-Reader Photometer MRX (Dynatech, Denkendorf)

Drucker HP Deskjet 520 (Hewlett-Packard, Böblingen)

#### Zentrifugen

Zentrifuge B4i (Jouan, Frankreich)

Zentrifuge 301K (Sigma, Osterode)

Zentrifuge Biofuge A (Heraeus, Hanau)

Ultrazentrifuge Avanti HP-30 I (Beckman, München)

### Sonstige Geräte

Zellzählgerät CellCounter 9000 (Serono Baker Diagnostics, U.S.A.)

Analysenwaage AE50 (Mettler-Toledo, Schweiz)

Waage 2355 (Sartorius, Göttingen)

pH-Meter STH600 (WTB, Weilheim)

Brutschrank T 6060 (Heraeus, Hanau)

Eismaschine Scotsman AF10 (Fisher Scientific, Nidderau)

Wasseraufbereitungsanlage Elix10 und Milli-Q-biocel (Millipore, Eschborn)

### Geräte im Tierstall

HZV-Computer 9520 A CO (Edward Lifescience, U.S.A.)

Monitor Hellige Servomed (Hellige, Freiburg)

Perfusor Secura (B. Braun, Melsungen)

Tropfenregler Regu-Flo II (Smiths Medical, Kirchseeon)

Thermistor Durchflussgehäuse (Baxter, Unterschleißheim)

Druckwandler-Set 3DT-XX BD (Ohmeda, Erlangen)

## 2.2. Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von folgenden Firmen bezogen:

BioRad (München), Sigma (Deisenhofen), Kraft (Duisburg), Riedel-de-Haën (Seelze), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), B. Braun (Melsungen).

## 2.3. Antikörper

Antigen	Spezifität	Herkunft	Klon	Konjugation	Bezugsquelle
Integrin $\alpha$ M-Chain C3bi (CD11b)	Rind, Schaf	Maus	CC126	-	DPC Biermann, Bad Neuheim
GP1Ib/IIIa Complex (CD41/61)	Schaf	Maus	35E4	-	DPC Biermann, Bad Neuheim
Fibrinogen	Mensch, Schaf	Kaninchen	<i>polyklonal</i>	FITC	DAKO, Dänemark

**Tab. 2.1.** In dieser Arbeit verwendete Antikörper

## **2.4. Tiere**

### **2.4.1. Genehmigung der Tierversuche**

Die Tierversuche waren gemäß §8 des Tierschutzgesetzes durch das Regierungspräsidium Münster unter dem Aktenzeichen 23.0835.1.0 (G57/99) genehmigt. Alle Versuche wurden unter Einhaltung der deutschen Tierschutzverordnung durchgeführt.

### **2.4.2. Tiere und Tierhaltung**

Die Untersuchungen für diese Arbeit erfolgten an weiblichen Schwarzköpfigen Fleischschafen, die aus einem landwirtschaftlichen Betrieb in der Region Münster stammten. Die Schafe waren etwa 9 bis 12 Monaten alt und hatten ein durchschnittliches Körpergewicht von 35kg (29–53kg). Vor Beginn der Untersuchung wurden die Schafe in der Gruppe im Tierstall der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung des Universitätsklinikums Münster in Laufstallhaltung mit Auftriebslüftung gehalten. Die Lauffläche betrug etwa 18m<sup>2</sup> und war mit Stroheinstreu bedeckt. Die Fütterung erfolgte mit Heu und einer Kraftfuttermischung. In diesem Stall verbrachten die Tiere mindestens eine Woche vor Beginn der Versuche. Die Betreuung und Fütterung der Tiere erfolgte durch die Tierpfleger der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung. Während der eigentlichen Untersuchung wurden die Schafe in einem Spezialkäfig gehalten, dem so genannten Stoffwechsellkäfig. In ihm konnten die Tiere stehen oder sitzen und hatten jederzeit freien Zugang zu Futter und Wasser. Kot und Urin fielen durch einen Gitterrost in ein Auffangbehältnis. Vor und während der Versuche wurden die Schafe durchgehend durch eine Tierärztin betreut.

## **2.5. Durchführung des Versuchs**

Am Tag vor der Untersuchung wurden die Schafe in ihrem Gehege eingefangen. Sie erhielten eine Narkose mit intramuskulär applizierten 1000mg Ketamin (Ketanest<sup>®</sup> S, Pfizer, Karlsruhe). Nach der Messung des Gewichts wurde den Schafen in die rechte

Vena jugularis externa unter sterilen Bedingungen in Seldinger-Technik eine Einführschleuse (9F Schleuseneinführbesteck, Arrow, Erding) gelegt und dort mit Ethicon Vicryl 2/0-Fäden (Johnson&Johnson, Belgien) vernäht. Über die Schleuse erhielten die Schafe dann für die restliche Dauer der Instrumentierung eine Narkose mit in regelmäßigen Abständen intravenös appliziertem Propofol (Disoprivan<sup>®</sup>, Astra Zeneca, Wedel). Über die Einführschleuse in der Vena jugularis externa wurde ein venöser Swan-Ganz Thermodilutionskatheter (Edwards Lifesciences, U.S.A.) vorgeschoben und in die Lungenstrombahn eingeschwenkt. Über eine Arteria femoralis wurde ein arterieller Katheter (18G-Leader-Cath, Vygon, Aachen) unter sterilen Bedingungen in Seldinger-Technik in die Aorta abdominalis eingebracht und ebenfalls mit Ethicon Vicryl 2/0-Fäden vernäht. Über die eingebrachten Katheter konnten für die Tiere schonend Blutproben gewonnen und ein kontinuierliches Monitoring der hämodynamischen Parameter durchgeführt werden. Um einer iatrogenen Infektion während der Instrumentierung vorzubeugen, erhielten die Schafe nach der Instrumentierung einmalig 2000mg Cefotaxim (Cefotaxim Abbott<sup>®</sup>, Abbott, Wiesbaden) intravenös. Die Propofol-Narkose wurde jetzt beendet und die Schafe bis zum Ende der Untersuchung in die Stoffwechsellkäfige verbracht. Etwa 10 Minuten nach der letzten Propofol-Injektion waren die Tiere vollständig wach und begannen kurze Zeit später bereits wieder zu fressen.

Nach etwa 12 Stunden Erholungsphase erfolgte der Beginn der Untersuchung. Während des gesamten Versuchs erhielten die Schafe eine Dauertropfinfusion mit Substitutionslösung zur Hämodilution SH 27 (Braun Schiwa, Glandorf) mit einer Flussgeschwindigkeit von 3ml/kgKG/h. Über den Katheter in der Arteria pulmonalis wurde den Schafen vor Beginn der Untersuchung gemischt-venöses Blut in einer 10ml-Citrat-Monovette (Becton Dickinson, Heidelberg) abgenommen und durchflusszytometrisch untersucht (siehe Kapitel 2.14.). Dieser Wert diente als Nullwert (Baseline). Jedes Schaf wurde danach randomisiert und einfach-blind einer der Versuchsgruppen zugeteilt.

Die erste Gruppe (Verum-Gruppe, n=5) erhielt 150ml einer 0,9%-NaCl-Lösung, welche die jeweilige zu untersuchende Substanz enthält, intravenös appliziert. Dabei erhielten drei Schafe das Verum der Charge A, zwei Schafe das Verum der Charge B. Der Inhalt

der infundierten Lösung war den Untersuchern nicht bekannt. Nach 30 Minuten erfolgte eine weitere Blutentnahme analog zur ersten, um einen Effekt des Verums allein auszuschließen. Direkt im Anschluss an diese Blutentnahme erhielten die Schafe über einen Perfusor eine i.v.-Dauerinfusion mit Lipopolysaccharid (LPS) von *Salmonella typhimurium* (Sigma, Deisenhofen) mit einer Dosierung von 10ng/kgKG/min, um ein SIRS auszulösen. Danach erfolgten Blutentnahmen wie oben beschrieben nach 1 Stunde, 2 Stunden, 4 Stunden, 8 Stunden, 12 Stunden und 24 Stunden (Tab. 2.2.).

Die zweite Gruppe (Placebo-Gruppe, n=9) erhielt 150ml einer 0,9%-NaCl-Lösung ohne weitere Zusätze intravenös appliziert. Den Untersuchern war der Inhalt der Lösung nicht bekannt. Auch bei diesen Tieren wurde nach 30 Minuten eine Blutentnahme durchgeführt. Danach erfolgte ebenfalls die i.v.-Dauerinfusion mit Lipopolysaccharid und weitere 6 Blutentnahmen wie oben für die Verum-Gruppe beschrieben (Tab. 2.2.).

<b>Zeitpunkt</b>	<b>Verumgruppen</b>	<b>Placebogruppe</b>
- 30 min.	Blutentnahme Baseline	Blutentnahme Baseline
- 29 min.	150ml NaCl-Lösung mit Verum i.v.	150ml NaCl-Lösung i.v.
± 0 min.	Blutentnahme ‚Verumeffekt‘	Blutentnahme ‚Verumeffekt‘
+ 1 min.	Start der LPS-Infusion (10ng/kgKG/min)	Start der LPS-Infusion (10ng/kgKG/min)
+ 1 h	Blutentnahme 1. Stunde	Blutentnahme 1. Stunde
+ 2 h	Blutentnahme 2. Stunde	Blutentnahme 2. Stunde
+ 4 h	Blutentnahme 4. Stunde	Blutentnahme 4. Stunde
+ 8 h	Blutentnahme 8. Stunde	Blutentnahme 8. Stunde
+ 12 h	Blutentnahme 12. Stunde	Blutentnahme 12. Stunde
+ 24 h	Blutentnahme 24. Stunde	Blutentnahme 24. Stunde

**Tab. 2.2.** Übersicht über den Versuchsablauf für die Versuchsgruppen.

Nach der letzten Blutentnahme erfolgte eine schmerzlose Euthanasie der Schafe in tiefer Propofol-Narkose mit 100ml intravenös applizierter 7,45%-Kaliumchloridlösung (B. Braun, Melsungen), welche einen Herzstillstand auslöst.

## 2.6. Thrombospondin-1

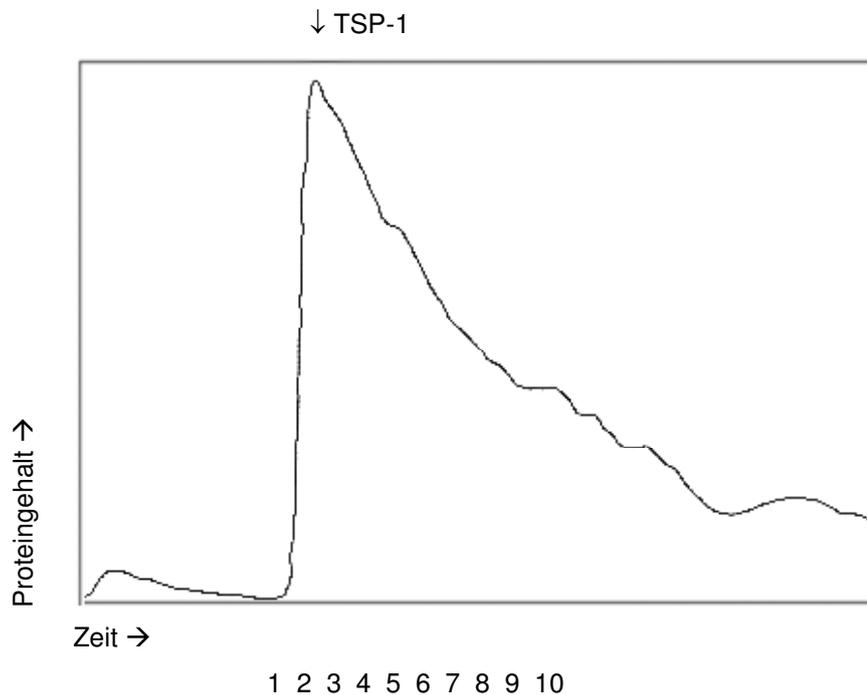
### 2.6.1. Aufreinigung des Thrombospondins-1

Thrombospondin-1 (TSP-1) ist ein Protein, das in den  $\alpha$ -Granula von Thrombozyten enthalten ist. Aufkonzentrierte Thrombozyten wurden mit Thrombin aktiviert, woraufhin diese den Inhalt Ihrer  $\alpha$ -Granula ausschütteten. Das so freigesetzte Thrombospondin-1 wurde anschließend aus der Lösung präpariert.

Die Thrombozyten wurden aus Buffy Coats gewonnen, die vom Deutschen Roten Kreuz Münster zur Verfügung gestellt wurden. Ein Buffy Coat ist die Restmenge einer Vollblutspende, der nach Zentrifugation die sedimentierten Erythrozyten und das Plasma entnommen wurden. In der Restmenge verbleiben vor allem Leukozyten und Thrombozyten. Jeweils zehn Buffy Coats wurden mit 300ml Buffy Coat-Waschpuffer vorsichtig vermischt, dann in 40ml-Falcon-Röhrchen (Saerstedt, Ingelheim) gefüllt und anschließend für 10 Minuten mit 1400rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert, um die verbleibenden Erythrozyten vom Plättchenreichen Plasma (PRP) zu trennen. Das PRP wurde abgenommen und dann für 10 Minuten mit 2200rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der aus plättchenarmem Plasma (PPP) bestehende Überstand abgenommen und verworfen. Im Röhrchen verblieben sedimentierte Thrombozyten und Leukozyten, welche vorsichtig in CGSE-Puffer resuspendiert wurden. Die so entstandene Suspension wurde für 5 Minuten mit 1400rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Während der Überstand mit den enthaltenen Thrombozyten abgenommen und weiterverwendet wurde, konnten die abzentrifugierten Leukozyten verworfen werden. Durch diese Vorgehensweise wurden die Thrombozyten der Buffy Coats von Plasma, Erythrozyten und Leukozyten getrennt. Die thrombozytenreiche Suspension wurde ihrerseits für 10 Minuten mit 2200rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der jetzt thrombozytenfreie Überstand wurde verworfen, während die verbleibenden Thrombozyten-Pellets vorsichtig in wenigen Millilitern Aggregationspuffer resuspendiert und anschließend vereinigt wurden. Der pH-Wert der entstandenen Thrombozyten-Suspension wurde mit NaOH auf pH7,6 eingestellt.

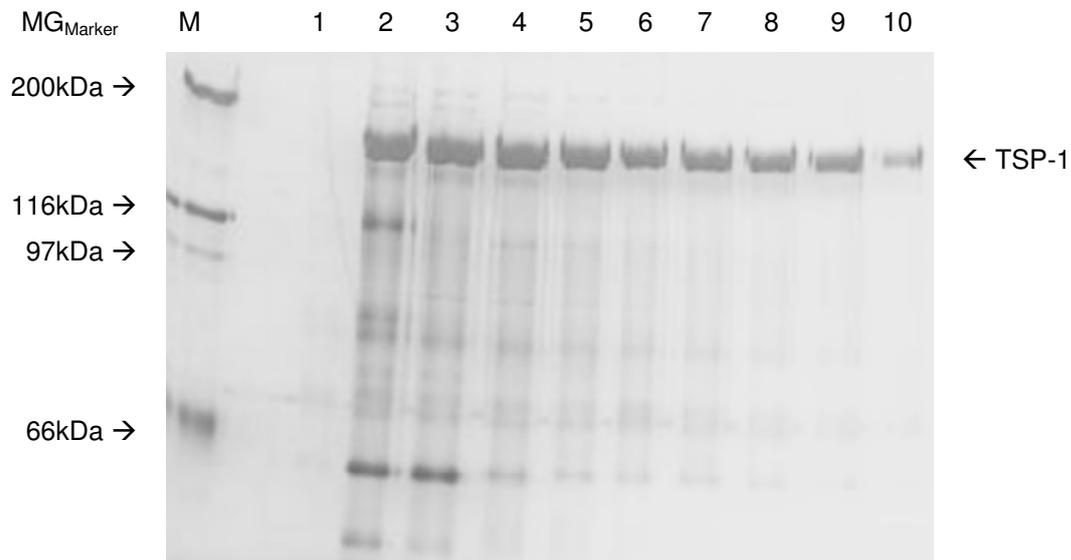
Nun erfolgte die Aktivierung der in hoher Konzentration vorliegenden Blutplättchen, um eine Degranulation und damit die Freisetzung des Thrombospondins-1 aus den  $\alpha$ -Granula zu bewirken. Ausgelöst wurde die Thrombozyten-Aggregation, indem die Suspension mit 2U/ml Rinder-Thrombin (Sigma, Deisenhofen) versetzt wurde. Nach

mittelstarker Gerinnselformung wurde die Aktivierung der Thrombozyten mit 11U/ml Hirudin (Loxo, Dossenheim) beendet, welches als spezifischer Thrombin-Inaktivator wirkt. Um alle Zellen und Zellreste zu entfernen, wurde die Suspension nun für 20 Minuten mit 3200rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der zellfreie Überstand wurde abgenommen und mit Protease-Inhibitoren versetzt (48µM Leupeptin und 250µM PMSF), damit die enthaltenen Proteine nicht vorzeitig abgebaut wurden. Über Nacht wurde die Lösung bei -80°C eingefroren. Am nächsten Tag wurde die Lösung nach raschem Auftauen mit 80.000g bei 4-8°C für 60 Minuten zentrifugiert, um Fibrinfäden zu entfernen. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Lösungsbestandteile über eine Affinitäts-Chromatographie-Säule (BioRad, München). Sie wies einen Innendurchmesser von 1,8cm auf, war mit 30ml Heparin-Sepharose-Gel (Amersham, Schweden) befüllt und wurde zunächst mit Äquilibriumspuffer äquilibriert. Nachdem die Lösung vollständig in die Säule eingelaufen war, wurden die verschiedenen Proteinbestandteile nacheinander mit Äquilibriumspuffer mit einem von 150mM über 250mM und 350mM bis auf 600mM steigenden Natriumchlorid-Gradienten ausgewaschen. Erst wenn das angeschlossene Photometer anzeigte, dass mit dem aktuellen Puffer keine Proteine mehr aus der Säule gewaschen wurden, erfolgte der Wechsel auf den Puffer mit der nächsthöheren NaCl-Konzentration. Das Thrombospondin-1 bleibt bei niedrigen NaCl-Konzentrationen an das Gel der Säule gebunden, während andere Proteine sich von der Säule lösen und mit dem Puffer ausgespült werden. Erst bei einer NaCl-Konzentration von 600mM wird die Bindung von Thrombospondin-1 an das Gel getrennt und es wird aus der Säule gewaschen. Das Eluat wurde mit einem Fraktionssammler (BioRad, München) fraktioniert aufgefangen (Abb. 2.1.).



**Abb. 2.1.** Proteingehalt des fraktioniert aufgefangenen Eluats bei einer NaCl-Konzentration von 600mM mit einem Photometer gemessen und einem Zwei-Kanal-Schreiber aufgezeichnet. TSP-1= Thrombospondin-1. 1-10: aufgefangene Fraktionen.

Anschließend wurde die Reinheit des aufgefangenen Thrombospondins-1 in einer Gelelektrophorese (SDS-PAGE) für kleine Gele (siehe Kapitel 2.8.) nachgewiesen (Abb. 2.2.). Nach festgestellter Reinheit erfolgte die Aufkonzentrierung und Entsalzung der Thrombospondin-1-Lösung mit dem Vivaspin-System (Vivascience, Göttingen). Die Filtrationsgröße des verwendeten Filters betrug dabei 30.000Da. 20ml der Thrombospondin-1-Lösung wurden dafür in ein Vivaspin-Gefäß gegeben und für 30 Minuten mit 3200rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Dabei wurde die salzhaltige Lösung abfiltriert, während die Proteine durch den Filter im Gefäß zurückgehalten wurden. Das abfiltrierte Volumen wurde durch  $\text{Ca}^{2+}$ -TBS-Puffer wieder aufgefüllt und erneut für 30 Minuten mit 3200rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt, so dass die NaCl-Konzentration der Thrombospondin-1-Lösung auf etwa 150mM verringert wurde. Die Endkonzentration der aufgereinigten Thrombospondin-1-Lösung wurde mit einem BCA-Test ermittelt. Der Unterschied zwischen den Chargen A und B kann aus Schutzgründen hier nicht genannt werden.



**Abb. 2.2.** Gelelektrophorese (SDS-PAGE) des aufgereinigten Thrombospondins-1 in reduzierter Form.  $MG_{\text{Marker}}$ = Molekülgewicht der Markerbanden, M= Marker, 1-10= Fraktioniert aufgefangenes Eluat, TSP-1= Thrombospondin-1-Monomere.

⇒ Verwendete Puffer und Lösungen:

- Buffy Coat-Waschpuffer (pH6,5):
  - 30mM Natriumcitrat
  - 100mM Natriumchlorid
  - 3mM Kaliumchlorid
  - 9,6mM Glucose
  - 2mM EDTA
- CGSE-Puffer (pH 6,5):
  - 29mM Natriumcitrat
  - 120mM Natriumchlorid
  - 30mM Glucose
  - 5mM EDTA
- Aggregationspuffer (pH 7,8):
  - 150mM Natriumchlorid
  - 20mM Tris
  - 5mM Glucose
  - 10mM Calciumchlorid
  - 1mM Magnesiumchlorid

- Äquilibrierungspuffer (pH 7,4):
  - 10mM HEPES
  - 2mM Calciumchlorid
  - 1mM Magnesiumchlorid
  - 150mM (250mM, 350mM, 600mM) Natriumchlorid
  - 100µM PMSF
  - 2µM Leupeptin
- $\text{Ca}^{2+}$ -TBS-Puffer (pH 7,4):
  - 10mM Tris
  - 150mM Natriumchlorid
  - 2mM Calciumchlorid

### 2.6.2. Markierung des Thrombospondins-1 mit Fluoresceinisothiocyanat

Um die Thrombospondin-1-Bindung an Thrombozyten und Leukozyten im Durchflusszytometer nachweisen zu können, wurde es mit dem Farbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markiert. Dazu wurde in der aufgereinigten Thrombospondin-1-Lösung FITC an Celite 10% (Calbiochem, Bad Soden) gelöst, wobei das Konzentrationsverhältnis zwischen FITC und Thrombospondin-1 1:1 gewählt wurde. Für 48 Stunden wurde die Lösung in Dunkelheit bei 4°C unter leichter Bewegung inkubiert. Um die nicht gelösten FITC-Bestandteile zu entfernen, wurde die Lösung für 5 Minuten mit 13.000rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Danach wurde der Überstand auf Sephadex G-25M PD-10 Gelfiltrationssäulen (Amersham, Schweden) aufgetragen, die vorher mit  $\text{Ca}^{2+}$ -TBS-Puffer äquilibriert wurden. Die Eluation der FITC-TSP-1-Komplexe unter Retention der freien FITC-Moleküle in der Säule erfolgte nach Herstellerangaben mit  $\text{Ca}^{2+}$ -TBS-Puffer. Um festzustellen, wie viele FITC-Moleküle an ein Thrombospondin-1-Molekül gebunden hatten, wurde das FITC/Protein-Verhältnis ermittelt. Hierfür wurde das Eluat photometrisch bei einer Wellenlänge von 280nm (Absorption durch Proteine) und 495nm (Absorption durch FITC) vermessen. Eine Bindung von durchschnittlich 3-6 FITC-Molekülen an ein Thrombospondin-1-Molekül wurde dabei erreicht. Die Berechnung des FITC/Protein-Verhältnisses (molar F/P ratio) und der Thrombospondin-1-Konzentration, kontrolliert durch einen BCA-Test, erfolgte nach diesen Formeln:

- molar F/P ratio =  $(A_{495} \times C) / (A_{280} - (A_{495} \times 0,35))$
- Konzentration<sub>TSP</sub> (mg/ml) =  $(A_{280} - (A_{495} \times 0,35)) / \epsilon_{TSP}$

wobei:  $C = (MG_{TSP} \times \epsilon_{TSP}) / (MG_{FITC} \times \epsilon_{FITC})$

$A_{495}$  = Absorption bei 495nm (FITC)

$A_{280}$  = Absorption bei 280nm (Protein)

$MG_{TSP}$  = Molekülgewicht TSP (450.000Da)

$MG_{FITC}$  = Molekülgewicht FITC (390Da)

$\epsilon_{TSP}$  = Extinktionskoeffizient Thrombospondin (1,05)

$\epsilon_{FITC}$  = Extinktionskoeffizient FITC (195)

Die so gewonnene Lösung mit FITC-markiertem Thrombospondin-1 wurde bis zur endgültigen Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

⇒ Verwendete Puffer und Lösungen:

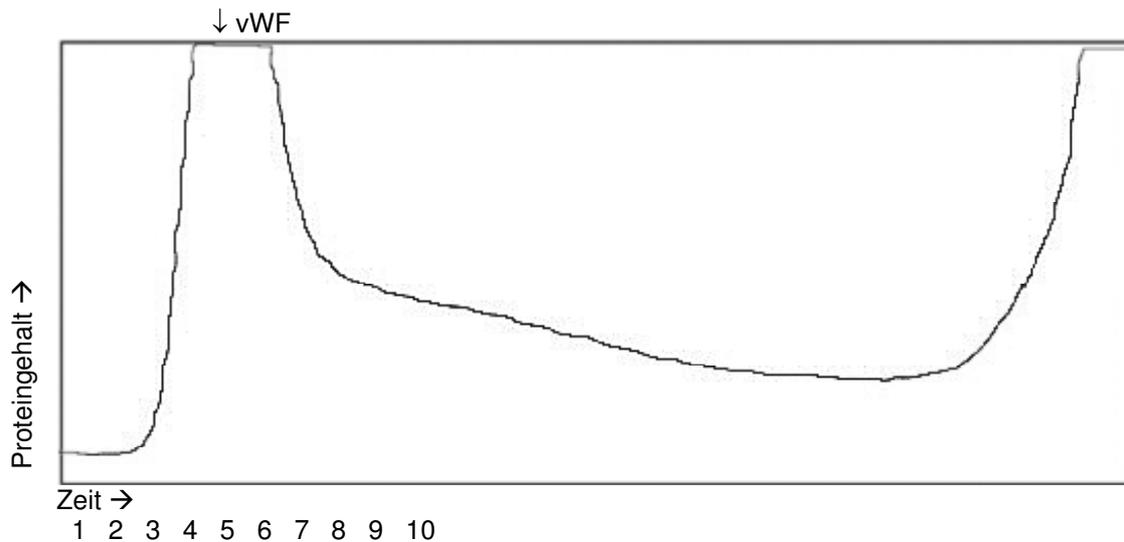
- $\text{Ca}^{2+}$ -TBS-Puffer (pH 7,4):
  - 10mM Tris
  - 150mM Natriumchlorid
  - 2mM Calciumchlorid

## 2.7. von-Willebrand-Faktor

### 2.7.1. Aufreinigung des von-Willebrand-Faktors

Der von-Willebrand-Faktor wurde aus dem Präparat Haemate<sup>®</sup> HS 500 (Centeon Pharma, Marburg) gewonnen. Dieses enthält von-Willebrand-Faktor, Humanalbumin und den Gerinnungsfaktor VIII. Das Trockenpulver von Haemate<sup>®</sup> HS 500 wurde in 3ml Aqua dest. aufgelöst. In dieser Lösung wurde nach erneuter Zugabe von 3ml Aqua dest. das Trockenpulver einer weiteren Einheit Haemate<sup>®</sup> HS 500 gelöst. Um den von-Willebrand-Faktor von den übrigen Bestandteilen des Haemate<sup>®</sup> zu trennen, wurde eine Gelfiltrations-Chromatographie-Säule (BioRad, München) mit einem Gesamtvolumen von 177ml und einem Innendurchmesser von 1,5cm verwendet. Sie war mit BioGel A-15-m-medium (BioRad, München) befüllt und wurde mit vWF-Puffer äquilibriert. Nachdem die Haemate<sup>®</sup>-Lösung vorsichtig auf die Säule aufgetragen

worden war, erfolgte die Elution mit dem vWF-Puffer. Das Eluat wurde fraktioniert aufgefangen. Dabei enthielt die erste ausgewaschene Proteinfraction den von-Willebrand-Faktor, da die übrigen kleineren Proteine in den Poren des Gels zurückgehalten wurden (Abb. 2.3.).

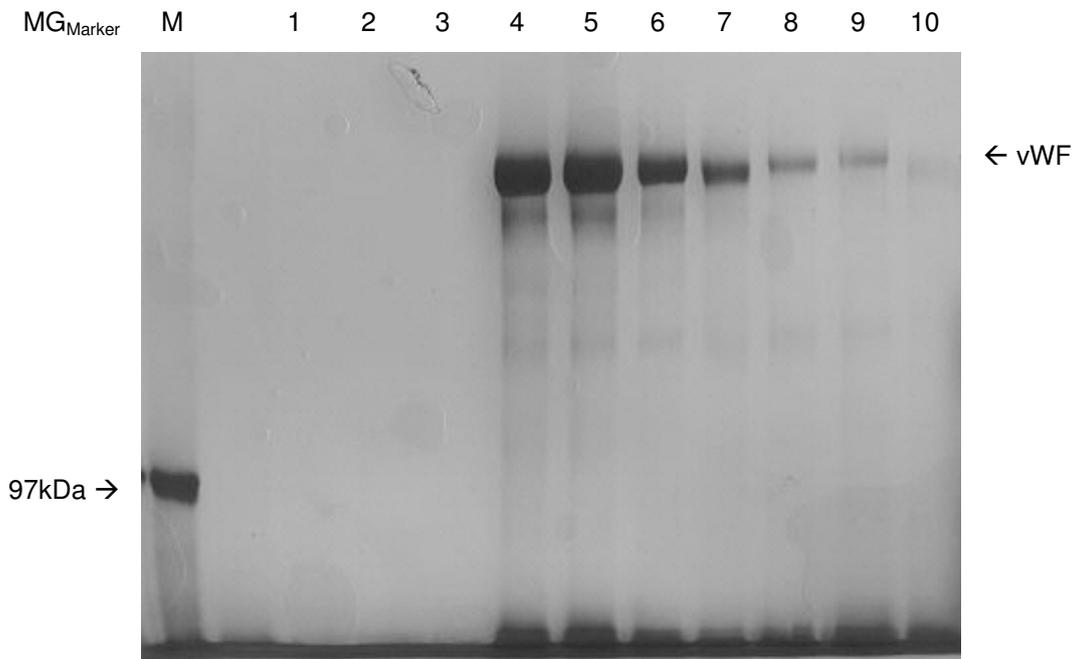


**Abb. 2.3.** Proteingehalt des fraktioniert aufgefangenen Eluats mit einem Photometer gemessen und einem Zwei-Kanal-Schreiber aufgezeichnet. vWF= von-Willebrand-Faktor. 1-10: aufgefangene Fraktionen.

Anschließend wurden in einer Gelelektrophorese (SDS-PAGE) für große Gele (siehe Kapitel 2.8.) die Fraktionen bestimmt, die von-Willebrand-Faktor enthielten (Abb. 2.4.). Diese Fraktionen wurden vereinigt. Durch einen BCA-Test wurde die Endkonzentration ermittelt.

⇒ Verwendete Puffer und Lösungen:

- vWF-Puffer (pH 7,35):
  - 50mM Tris
  - 150mM Natriumchlorid
  - 5mM Natrium-Citrat
  - 1mM PMSF
  - 2 $\mu$ M Leupeptin



**Abb. 2.4.** Gelelektrophorese (SDS-PAGE) des aufgereinigten von-Willebrand-Faktor in reduzierter Form.  $MG_{\text{Marker}}$  = Molekülgewicht der Markerbanden, M = Marker, 1-7 = Fraktioniert aufgefangenes Eluat, vWF = von-Willebrand-Faktor-Monomere.

### 2.7.2. Markierung des von-Willebrand-Faktors mit Fluoresceinisothiocyanat

Um die Bindung des von-Willebrand-Faktors (vWF) an Thrombozyten im Durchflusszytometer messen zu können, wurde er leicht modifiziert nach GOTO (1995) mit dem Farbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markiert. Um das zu erreichen, wurde in der aufgereinigten vWF-Lösung FITC an Celite 10% (Calbiochem, Bad Soden) gelöst, wobei ein Konzentrationsverhältnis zwischen FITC und vWF von 1:60 gewählt wurde. Die Lösung wurde für 30 Minuten in Dunkelheit bei 4°C unter leichter Bewegung inkubiert. Um die nicht gelösten FITC-Moleküle zu entfernen, wurde die Lösung anschließend für 5 Minuten mit 13.000rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Danach wurde der Überstand auf Sephadex G-25M PD-10 Gelfiltrationssäulen (Amersham, Schweden) aufgetragen, die vorher mit  $Ca^{2+}$ -TBS-Puffer äquilibriert wurden. Entsprechend den Herstellerangaben wurden die FITC-markierten vWF-Moleküle mit  $Ca^{2+}$ -TBS-Puffer aus der Säule eluiert, während die freien FITC-Moleküle in der Säule verblieben. Um festzustellen, wie viele FITC-Moleküle an ein vWF-Molekül

gebunden hatten, wurde das FITC/Protein-Verhältnis ermittelt. Das Eluat wurde zu diesem Zweck photometrisch bei einer Wellenlänge von 280nm (Absorption von Proteinen) und 495nm (Absorption von FITC) vermessen. Eine durchschnittliche Bindung von etwa 2 – 4 FITC-Molekülen an ein vWF-Molekül wurde dabei erreicht. Die Berechnung des FITC/Proteinverhältnisses (molar F/P ratio) und der vWF-Konzentration, bestätigt durch einen BCA-Test, erfolgte nach diesen Formeln:

- molar F/P ratio =  $(A_{495} \times C) / (A_{280} - (A_{495} \times 0,35))$
- Konzentration<sub>vWF</sub> (mg/ml) =  $(A_{280} - (A_{495} \times 0,35)) / \epsilon_{vWF}$

wobei:  $C = (MG_{vWF} \times \epsilon_{vWF}) / (MG_{FITC} \times \epsilon_{FITC})$

$A_{495}$  = Absorption bei 495nm (FITC)

$A_{280}$  = Absorption bei 280nm (Protein)

$MG_{vWF}$  = Molekulargewicht vWF (250.000Da)

$MG_{FITC}$  = Molekulargewicht FITC (390Da)

$\epsilon_{vWF}$  = Extinktionskoeffizient vWF (0,7)

$\epsilon_{FITC}$  = Extinktionskoeffizient FITC (195)

Bis zur endgültigen Verwendung wurde die gewonnene Lösung aus FITC-markierten vWF-Molekülen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

⇒ Verwendete Puffer und Lösungen:

- $\text{Ca}^{2+}$ -TBS-Puffer (pH 7,4):
  - 10mM Tris
  - 150mM Natriumchlorid
  - 2mM Calciumchlorid

## 2.8. Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

### 2.8.1. Durchführung der SDS-PAGE

Die Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist ein Verfahren, Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. Dabei bindet Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulfat) an die hydrophoben Regionen eines

Proteins und erzeugt so negative Ladungen, deren Stärke mit dessen Molekülgröße korreliert. Entsprechend dieser Ladungen wandern die Proteine im elektrischen Feld unterschiedlich schnell durch ein Netz aus Acrylamid-Ketten und können so durch dieses Verfahren nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden (COOPER, 1981). Zunächst wurde das Trenngel hergestellt, indem die Trenngel-Lösung nach Aktivierung der Polymerisation durch den Radikalstarter Ammoniumpersulfat (APS) und den Katalysator Tetramethyldiamin (TEMED) zwischen zwei nach außen abgedichtete Glasplatten gegossen wurde. Nach erfolgter Polymerisation wurde zwischen die beiden Glasplatten oberhalb des jetzt festen Trenngels ein Kunststoffkamm eingehängt. Anschließend wurde die Sammelgel-Lösung ebenfalls durch APS und TEMED aktiviert und zwischen die Zinken des Kunststoffkamms gefüllt. Nach erfolgter Polymerisation des Sammelgels und vorsichtiger Entfernung des Kamms wurde die so hergestellte Gelplatte in die Elektrophoresekammer eingebracht, welche dann mit Elektrophoresepuffer befüllt wurde. Anschließend wurden die aufzutragenden Proben vorbereitet. Die Proben wurden jeweils in reduzierter Form und in nicht reduzierter Form eingesetzt. In den reduzierten Proben wurden durch Hitzewirkung Verbindungen zwischen den einzelnen Molekülen getrennt. Die Vorbereitung erfolgte nach folgendem Schema:

#### A. Kleine Gele (10,1cm x 8,2cm)

##### a) reduzierte Proben:

Zu 50µl einer jeden Probe wurden 50µl Auftragspuffer und 5µl DTE-Lösung gegeben. Als Marker wurde ein High-Range Prestained SDS-PAGE Standard-Marker (BioRad, U.S.A.) verwendet. 5µl Marker wurden mit 10µl Auftragspuffer und 2,5µl DTE-Lösung versetzt. Alle Ansätze wurden anschließend für 5 Minuten in ein 100°C heißes Wasserbad gegeben. Nach kurzem Abkühlen wurden erneut in jeden Ansatz 5µl DTE-Lösung gegeben, und die Proben für 10 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Nun wurden 10µl IAA-Lösung zu jedem Ansatz gegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur unter Bewegung inkubiert.

## b) nicht reduzierte Proben:

50µl jeder zu untersuchenden Probe wurden mit 50µl Auftragspuffer und 10µl NEM-Lösung vermischt. Als Marker wurde ebenfalls ein High-Range Prestained SDS-PAGE Standard-Marker (BioRad, U.S.A.) verwendet, von dem 5µl mit 10µl Auftragspuffer und 5µl NEM-Lösung versetzt wurden. Nachdem alle Ansätze für 10 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubierten, wurden jeder Probe 10µl IAA-Lösung zugegeben und erneut für 15 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt.

## B. Große Gele (18cm x 16cm)

## a) reduzierte Proben:

80µl der zu untersuchenden Probe wurden zu 60µl Auftragspuffer und 6µl DTE-Lösung gegeben. Als Marker wurde auch hier ein High-Range Prestained SDS-PAGE Standard-Marker (BioRad, U.S.A.) verwendet, von dem 30µl mit 80µl Auftragspuffer und 6µl DTE-Lösung versetzt wurden. Alle Ansätze wurden anschließend für 5 Minuten in ein 100°C heißes Wasserbad gegeben. Nach kurzem Abkühlen wurden erneut jeweils 6µl DTE-Lösung zugegeben, und die Proben für 10 Minuten bei Raumtemperatur auf einen Schüttler gestellt. Als nächstes wurden jedem Ansatz 12µl IAA-Lösung zugegeben und die Proben erneut für 15 Minuten bei Raumtemperatur unter Bewegung inkubiert.

## b) nicht reduzierte Proben:

80µl der zu untersuchenden Probe wurden mit 60µl Auftragspuffer und 12µl NEM-Lösung vermischt. Als Marker wurde wieder ein High-Range Prestained SDS-PAGE Standard-Marker (BioRad, U.S.A.) verwendet, von dem 30µl mit 80µl Auftragspuffer und 12µl NEM-Lösung versetzt wurden. Nachdem alle Ansätze für 10 Minuten bei Raumtemperatur auf einen Schüttler waren, wurden jedem Ansatz 12µl IAA-Lösung zugegeben und die Proben erneut für 15 Minuten bei Raumtemperatur auf den Schüttler gestellt.

Nach der Vorbereitung wurden die Proben in die Taschen eingefüllt, die durch den Kamm im Sammelgel gebildet wurden. Für die kleinen Gele wurden jeweils 10µl Probe pro Tasche aufgetragen, für die großen Gele wurden jeweils 60µl Probe pro Tasche

eingesetzt. Anschließend wurde eine Spannung an das Gel angelegt. Für die kleinen Gele wurde zunächst ein Stromfluss von 7,5mA pro Gel, nach Erreichen der Trenngelgrenze 25mA pro Gel erzeugt. Für die großen Gele wurden 15mA pro Gel, später 50mA pro Gel angelegt, bis die schnellste Proteinfraction das gesamte Gel durchwandert hatte. Nach Beendigung des Durchlaufs wurde das Gel aus den Glasplatten entfernt und für 1 Stunde in Gelfixierlösung gelegt. Nach deren Absaugen wurde dreimal für jeweils 20 Minuten Ethanol zugegeben und anschließend mit der Wasserstrahlpumpe wieder abgesaugt.

⇒ Verwendete Puffer und Lösungen:

- Trenngel:
  - 15ml Acrylamid-Lösung
  - 30ml Trenngelpuffer
  - 13ml Aqua bidest.
  - 30µl TEMED (BioRad, U.S.A.)
  - 2ml APS-Lösung
- Acrylamid-Lösung:
  - 4M Acrylamid
  - 50mM N-N-Methylenbisacrylamid
- Trenngelpuffer (pH 8,8):
  - 7mM Natriumdodecylsulfat
  - 750mM Tris
- APS-Lösung:
  - 92mM Ammoniumpersulfat
- Sammelgel:
  - 1,9ml Acrylamid-Lösung
  - 6,25ml Sammelgelpuffer
  - 4ml Aqua bidest.
  - 15µl TEMED (BioRad, U.S.A.)
  - 413µl APS-Lösung
- Sammelgelpuffer (pH 6,8):
  - 7mM Natriumdodecylsulfat
  - 250mM Tris
- Ethanol:
  - 6,522M Ethanol

- Elektrophoresepuffer:
  - 25mM Tris
  - 200mM Glycin
  - 3mM Natriumdodecylsulfat
- Auftragspuffer:
  - 8M Harnstoff
  - 100mM Tris
  - 70mM Natriumdodecylsulfat
- DTE-Lösung:
  - 200mM Dithioerythritol in Auftragspuffer
- NEM-Lösung:
  - 40mM N-Ethylmalinimid in PBS
- PBS (pH 7,4):
  - 137mM Natriumchlorid
  - 2,7mM Kaliumchlorid
  - 10,3mM Natriumdihydrogenphosphat
  - 1,47mM Kaliumdihydrogenphosphat
- IAA-Lösung:
  - 778mM Iodacetamid in 1:1-Mischung aus Auftragspuffer und BPB-Lösung
- BPB-Lösung:
  - 14mM Bromphenolblau in Auftragspuffer
- Gelfixierlösung:
  - 12,5mM Methanol
  - 1,66M Eisessig (95% Ethansäure)

### 2.8.2. Silberfärbung der SDS-PAGE

Um die einzelnen Proteinfractionen im Gel sichtbar zu machen, erfolgte eine Silberfärbung. Zu dem in der Gelelektrophorese gewonnenen Gel wurde Thiosulfat-Lösung zugegeben und nach einer Minute mit einer Wasserstrahlpumpe vorsichtig abgesaugt, um eine Hintergrundfärbung zu verhindern. Danach wurde dreimal für jeweils 20 Sekunden Aqua dest. zugegeben und anschließend abgesaugt. Für 20 Minuten wurde nun die Silbernitrat-Lösung auf das Gel gefüllt, welche anschließend

durch zweimalige Zugabe von Aqua dest. für etwa 20 Sekunden ausgewaschen wurde. Das Silbernitrat reicherte sich in den Proteinfractionen und in den Markersubstanzen an. Um das Silbernitrat sichtbar zu machen, wurde die Entwickler-Lösung auf das Gel gegeben und sofort wieder abgesaugt. Ein weiteres Mal wurde Entwickler-Lösung eingefüllt und dieses Mal erst abgesaugt, nachdem sich eine deutliche Färbung des Gels eingestellt hatte. Um den Färbeprozess nun zu beenden, wurde zweimal für jeweils eine Minute EDTA-Lösung zugesetzt, die danach für zehn Minuten durch Foto-Fixierlösung ersetzt wurde. Im Anschluss an dieses Färbeprozess wurde das Gel zunächst für mindestens 30 Minuten in Aqua dest. gewaschen und anschließend auf einem Gelrockner getrocknet.

⇒ Verwendete Puffer und Lösungen:

- Thiosulfat-Lösung:
  - 0,8mM Thiosulfatpentahydrat
- Silbernitrat-Lösung:
  - 12mM Silbernitrat in Aqua bidest.
  - 2mM Formaldehyd
- Entwickler-Lösung:
  - 566mM Natriumcarbonat
  - 16µM Thiosulfat
  - 5mM Formaldehyd
- EDTA-Lösung:
  - 13mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)
- Foto-Fixierlösung:
  - 1:10 Verdünnung von Superfix<sup>®</sup> Fixierlösung (Tetenal, Norderstedt) in Aqua dest.

## **2.9. Gewinnung des Gerinnungsfaktors VIIa und dessen Markierung mit Fluoresceinisothiocyanat**

Zur Gewinnung des Gerinnungsfaktors VIIa (FVIIa) wurden 4,8mg Trockenpulver des Präparats NovoSeven<sup>®</sup> (Nordisk, Dänemark), welches aus rekombinantem Faktor VIIa besteht, in 4,8ml Ca<sup>2+</sup>-TBS-Puffer aufgelöst. Anschließend wurde diese Lösung mit

1mg/ml FITC an Celite 10% (Calbiochem, Bad Soden) vermennt und für 48 Stunden unter leichter Bewegung bei 4°C in Dunkelheit inkubiert. Die nicht gelösten FITC-Moleküle wurden nach dieser Zeitspanne durch Zentrifugation für 5 Minuten mit 13.000rpm bei Raumtemperatur aus der Lösung entfernt. Danach wurde der Überstand auf Sephadex G-25M PD-10 Gelfiltrationssäulen (Amersham, Schweden) aufgetragen, die vorher mit  $\text{Ca}^{2+}$ -TBS-Puffer äquilibriert wurden. Nach Herstellerangaben wurden die FITC-markierten FVIIa-Moleküle mit  $\text{Ca}^{2+}$ -TBS-Puffer unter Retention der freien FITC-Moleküle eluiert. Um festzustellen, wie viele FITC-Moleküle an ein FVIIa-Molekül gebunden hatten, wurde photometrisch das FITC/Protein-Verhältnis ermittelt, indem es bei einer Wellenlänge von 280nm (Absorption von Proteinen) und 495nm (Absorption von FITC) gemessen wurde. Dabei wurde eine Bindung von durchschnittlich 0,4 FITC-Molekülen an ein FVIIa-Molekül erreicht. Offenbar reagierten nicht alle FVIIa-Moleküle mit dem Fluoresceinisothiocyanat, so dass auch unmarkierte FVIIa-Moleküle in der Lösung vorlagen. Dieses Phänomen wurde bereits in anderen Arbeiten beschrieben und hat keinen Einfluss auf die durchgeführten Messungen (MCCALLUM, 1996). Die Berechnung des FITC/Proteinverhältnisses (molar F/P ratio) und der FVIIa-Konzentration, die zusätzlich durch einen BCA-Test überprüft wurde, erfolgte nach diesen Formeln:

- molar F/P ratio =  $(A_{495} \times C) / (A_{280} - (A_{495} \times 0,35))$
- Konzentration<sub>FVIIa</sub> (mg/ml) =  $(A_{280} - (A_{495} \times 0,35)) / \epsilon_{\text{FVIIa}}$

wobei:  $C = (MG_{\text{FVIIa}} \times \epsilon_{\text{FVIIa}}) / (MG_{\text{FITC}} \times \epsilon_{\text{FITC}})$

$A_{495}$  = Absorption bei 495nm (FITC)

$A_{280}$  = Absorption bei 280nm (Protein)

$MG_{\text{FVIIa}}$  = Molekulgewicht FVIIa (50.000Da)

$MG_{\text{FITC}}$  = Molekulgewicht FITC (390Da)

$\epsilon_{\text{FVIIa}}$  = Extinktionskoeffizient FVIIa (1,39)

$\epsilon_{\text{FITC}}$  = Extinktionskoeffizient FITC (195)

Bis zur endgültigen Verwendung wurde die gewonnene Lösung aus FITC-markierten Faktor-VIIa-Molekülen bei -80°C eingefroren.

⇒ Verwendete Puffer und Lösungen:

- $\text{Ca}^{2+}$ -TBS-Puffer (pH 7,4):
  - 10mM Tris
  - 150mM Natriumchlorid
  - 2mM Calciumchlorid

## 2.10. Gewinnung des Gerinnungsfaktors XIII und dessen Markierung mit Fluoresceinisothiocyanat

Zur Gewinnung des Gerinnungsfaktors XIII (FXIII) wurde das Trockenpulver von 1250I.E. des FXIII-Konzentrats Fibrogammin<sup>®</sup> HS (Centeon Pharma, Marburg) in 15ml Aqua dest. aufgelöst. Nach der Zugabe von 12,5mg FITC an Celite 10% (Calbiochem, Bad Soden) und Inkubation für 12 Stunden unter leichter Bewegung bei 4°C in Dunkelheit, wurden die nicht gelösten FITC-Moleküle durch Zentrifugation für 5 Minuten mit 13.000rpm bei Raumtemperatur entfernt. Nach Herstellerangaben wurden die FITC-markierten FXIII-Moleküle mit  $\text{Ca}^{2+}$ -TBS-Puffer unter Retention der freien FITC-Moleküle in mit  $\text{Ca}^{2+}$ -TBS-Puffer äquilibrierten Sephadex G-25M PD-10 Gelfiltrationssäulen (Amersham, Schweden) eluiert. Um festzustellen, wie viele FITC-Moleküle an ein FXIII-Molekül gebunden haben, wurde das Eluat photometrisch bei einer Wellenlänge von 280nm (Absorption von Proteinen) und 495nm (Absorption von FITC) vermessen. An ein FXIII-Molekül wurden durchschnittlich 2-3 FITC-Moleküle gebunden. Die Berechnung des FITC/Proteinverhältnisses (molar F/P ratio) und der FXIII-Konzentration, die zusätzlich durch einen BCA-Test bestätigt wurde, erfolgte nach diesen Formeln:

- molar F/P ratio =  $(A_{495} \times C) / (A_{280} - (A_{495} \times 0,35))$
- Konzentration<sub>FXIII</sub> (mg/ml) =  $(A_{280} - (A_{495} \times 0,35)) / \epsilon_{\text{FXIII}}$

wobei:  $C = (MG_{\text{FXIII}} \times \epsilon_{\text{FXIII}}) / (MG_{\text{FITC}} \times \epsilon_{\text{FITC}})$

$A_{495}$  = Absorption bei 495nm (FITC)

$A_{280}$  = Absorption bei 280nm (Protein)

$MG_{\text{FXIII}}$  = Molekülgewicht FXIII (320.000Da)

$MG_{\text{FITC}}$  = Molekülgewicht FITC (390Da)

$\epsilon_{\text{FXIII}}$  = Extinktionskoeffizient FXIII (1,38)

$\epsilon_{\text{FITC}}$  = Extinktionskoeffizient FITC (195)

Die gewonnene Lösung aus FITC-markierten Faktor-XIII-Molekülen wurde bis zur endgültigen Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

⇒ Verwendete Puffer und Lösungen:

- $\text{Ca}^{2+}$ -TBS-Puffer (pH 7,4):
  - 10mM Tris
  - 150mM Natriumchlorid
  - 2mM Calciumchlorid

## 2.11. Markierung von Fibrinogen mit Fluoresceinisothiocyanat

Leicht modifiziert nach XIA (1996) wurde Fibrinogen mit dem Farbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markiert, um dessen Bindung an Thrombozyten und Leukozyten im Durchflusszytometer messen zu können. Dazu wurden 10mg humanes lyophilisiertes Fibrinogen (Enzym Research Labs, U.S.A.) in 5ml Kopplungspuffer gelöst und anschließend mit 5mg FITC an Celite 10% (Calbiochem, Bad Soden) versetzt. Die Lösung wurde im Dunkeln für 24 Stunden bei Raumtemperatur unter leichter Bewegung inkubiert. Nicht gelöste Bestandteile wurden danach durch 5 Minuten dauernde Zentrifugation mit 13.000rpm bei Raumtemperatur abgetrennt und die FITC-markierten Fibrinogen-Moleküle mittels einer Gelfiltrationssäule (BioRad, München) von den freien FITC-Molekülen getrennt. Die Säule hatte einen Durchmesser von 1,8cm, war mit 30ml Sephadex-G25-coarse-Gel (Amersham, Schweden) befüllt und war zuvor mit PBS-Puffer äquilibriert worden. Die Elution erfolgte ebenfalls mit PBS-Puffer. Um festzustellen, wie viele FITC-Moleküle an ein Fibrinogen-Molekül gebunden hatten, wurde das Eluat photometrisch bei einer Wellenlänge von 280nm (Absorption von Proteinen) und 495nm (Absorption von FITC) vermessen. Im Durchschnitt wurden 6 FITC Moleküle an ein Fibrinogen-Molekül gebunden. Die Berechnung des FITC/Proteinverhältnisses (molar F/P ratio) und der Fibrinogen-Konzentration, die durch einen BCA-Test bestätigt wurde, erfolgte nach diesen Formeln:

- molar F/P ratio =  $(A_{495} \times C) / (A_{280} - (A_{495} \times 0,35))$
- Konzentration<sub>Fib</sub> (mg/ml) =  $(A_{280} - (A_{495} \times 0,35)) / \epsilon_{Fib}$

wobei:  $C = (MG_{Fib} \times \epsilon_{Fib}) / (MG_{FITC} \times \epsilon_{FITC})$

$A_{495}$  = Absorption bei 495nm (FITC)

$A_{280}$  = Absorption bei 280nm (Protein)

$MG_{Fib}$  = Molekülgewicht Fibrinogen (340.000Da)

$MG_{FITC}$  = Molekülgewicht FITC (390Da)

$\epsilon_{Fib}$  = Extinktionskoeffizient Fibrinogen (1,51)

$\epsilon_{FITC}$  = Extinktionskoeffizient FITC (195)

Bis zur endgültigen Verwendung wurde die gewonnene Lösung aus FITC-markiertem Fibrinogen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

⇒ Verwendete Puffer und Lösungen:

- Kopplungspuffer:
  - 4,5ml PBS-Puffer
  - 0,5ml Natriumcitratlösung (110mM)
  - 24 $\mu$ l 5%-Natriumcarbonat-Lösung
- PBS-Puffer (pH 7,4):
  - 137mM Natriumchlorid
  - 2,7mM Kaliumchlorid
  - 10,3mM Natriumdihydrogenphosphat
  - 1,47mM Kaliumdihydrogenphosphat

## 2.12. Markierung des CD11b-Antikörpers und des CD41/61-Antikörpers mit Biotin

Ein CD41/61-Antikörper, welcher gegen den Fibrinogen-Rezeptor auf Thrombozyten (Glykoprotein IIb/IIIa) gerichtet ist, diente als Thrombozyten-Marker im Durchflusszytometer. Ein CD11b-Antikörper wurde als Aktivierungsmarker für Leukozyten verwendet. Er richtet sich gegen die Untereinheit eines leukozytenspezifischen Integrins ( $\alpha_M$ ). Um den CD11b-Antikörper und den CD41/61-Antikörper im Durchflusszytometer detektieren zu können, wurden sie zuvor biotinyliert.

Dazu wurde das Biotin Labeling Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) leicht modifiziert nach Herstellerangaben eingesetzt. Zunächst wurden 6ml des zu biotinylierenden Antikörpers mittels Centricon-Konzentratoren (Amicon, U.S.A.) bei einer Filtrationsgröße von 30.000Da und Zentrifugation mit 3200rpm bei Raumtemperatur auf ein Volumen von 1ml aufkonzentriert. Nach Herstellerangaben wurde der Inhalt eines Gefäßes Biotin-7-NHS in 250µl DMSO aufgelöst. Anschließend wurde eine 1:10-Verdünnung der Biotin-Lösung in DMSO hergestellt und davon 15µl zur Antikörper-Lösung zugegeben. Es folgte die Inkubation unter leichter Bewegung für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Die mit Sephadex-G25 befüllte Gelfiltrationssäule des Biotin Labeling Kit wurde mit 5ml der mitgelieferten Blockierlösung befüllt und anschließend mit 30ml PBS-Puffer gespült. Durch die Blockierlösung wurden Bindungsstellen der Sepharose blockiert, die sonst eine direkte Bindung des Biotin an die Sepharose bewirkt hätten. Nach der Inkubation wurde die Antikörper-Lösung auf die so vorbereitete Säule aufgetragen. Damit das einlaufende Gesamtvolumen zusammen mit der Antikörperlösung genau 2,5ml betrug, wurde das fehlende Volumen durch PBS-Puffer ergänzt. Anschließend wurde der biotinylierte Antikörper mit 3,5ml PBS-Puffer eluiert und fraktioniert aufgefangen. Mittels photometrischer Vermessung der eluierten Fraktionen bei einer Wellenlänge von 280nm (Absorption von Proteinen) wurden die Antikörper enthaltenden Fraktionen bestimmt und anschließend vereint.

⇒ Verwendete Puffer und Lösungen:

- PBS-Puffer (pH 7,4):
  - 137mM Natriumchlorid
  - 2,7mM Kaliumchlorid
  - 10,3mM Natriumdihydrogenphosphat
  - 1,47mM Kaliumdihydrogenphosphat

## 2.13. Proteinkonzentrationsbestimmung

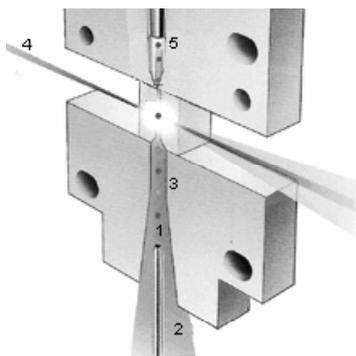
Zur Bestimmung des Proteingehalts in wässrigen Lösungen wurde ein BCA-Protein-Assay-Testkit (Pierce, U.S.A.) verwendet, das nach der Bicinchoninsäure-Methode arbeitet. Grundlage ist die Biuret-Reaktion, bei der Proteine zweiwertiges zu

einwertigem Kupfer reduzieren. Diese Kupferionen reagieren dann mit jeweils zwei Bicinchoninsäure-Molekülen (BCA) zu einem Farbkomplex mit einer starken Absorption bei 562nm, welche linear mit der Proteinkonzentration ansteigt (SMITH, 1985). Die zu untersuchende Lösung wurde dabei mit einer Reihe aus Standardproben mit bekanntem Gehalt an Rinderserumalbumin verglichen. 25µl der Probe bzw. der Standardreihe wurden in jeweils eine Vertiefung einer ELISA-Microtiterplatte gefüllt. Für jede Probe erfolgte eine Doppelbestimmung. Anschließend wurde die Reaktionslösung des Testkits hergestellt, indem 5ml der Reagenz A mit 100µl der Reagenz B versetzt wurden. 200µl dieser Reaktionslösung wurden jeweils den Vertiefungen zugegeben. Nach der Inkubation für 30 Minuten bei 37°C wurde die Platte in einem ELISA-Reader photometrisch vermessen, der die Proben mit einer Wellenlänge von 578nm messen konnte. Aus dem Vergleich der Absorptionen von Probe und Standardreihe wurde der Proteingehalt der Probe ermittelt.

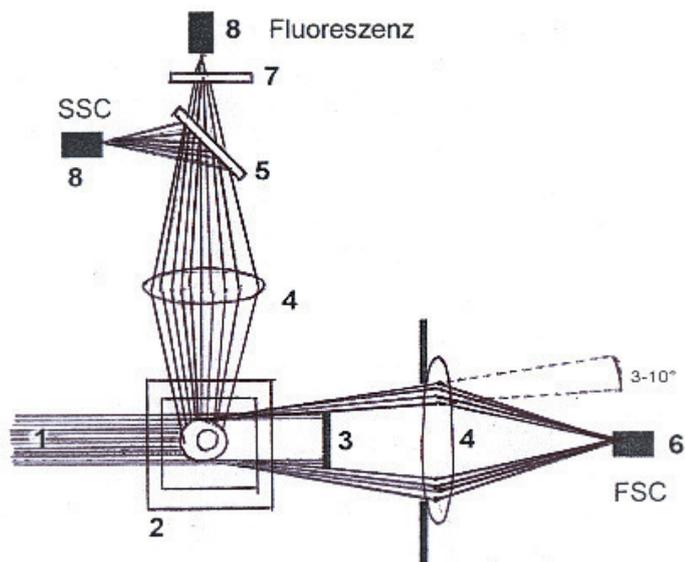
## 2.14. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, das die gleichzeitige Messung verschiedener physikalischer und biochemischer Eigenschaften von lebenden Zellen erlaubt, die in einem Flüssigkeitsstrom fokussiert sind. Die zu untersuchenden Zellen werden dazu in Suspension gebracht und über eine Kapillare in das Messgerät gesaugt, wo sie mittels einer Trägerflüssigkeit in die Messkammer transportiert werden. Der Flüssigkeitsstrom verengt sich auf das Zentrum der Messkammer hin, so dass sich die Flussgeschwindigkeit von wenigen Zentimetern pro Sekunde auf etwa sieben Meter pro Sekunde steigert. Gleichzeitig drängt ein von außen zufließender Hüllstrom aus Trägerflüssigkeit die Zellen in die Mitte der Flüssigkeitssäule. Dieses als „hydrodynamische Fokussierung“ bezeichnete Phänomen bewirkt, dass die Zellen einzeln an der Messstelle vorbeigeführt und einzeln vermessen werden können (Abb. 2.5.a). Die Vermessung der Zellen an der Messstelle erfolgt mittels eines Argon-Lasers, der eine Wellenlänge von 488nm aufweist. Der Laser-Strahl trifft die vereinzelte Zelle in der Messkammer und gleichzeitig werden bis zu 5 Eigenschaften der jeweiligen Zelle erfasst und aufgezeichnet. Trifft der Lichtstrahl auf die Zelle, wird das Licht in verschiedener Weise gestreut. Ein Teil des Lichts wird in einem Winkel von 3°-10° gestreut und von einem Detektionssystem axial zum Laserstrahl registriert.

Dieses Vorwärtsstreulicht (*Forward Angle Light Scatter* [FSC]) enthält Informationen über die Zellgröße. Ein anderer Teil des Lichts wird in einem Winkel von etwa  $90^\circ$  gestreut und orthogonal zum Laserstrahl detektiert. Dieses Seitwärtsstreulicht (*Sideward Angle Light Scatter* [SSC]) ist abhängig von der Granularität und Membranbeschaffenheit der Zelle (Abb. 2.5.b). Zusätzlich lassen sich verschiedene Farbstoffe im Durchflusszytometer nachweisen. Verwendung finden hierbei vor allem die Fluorochrome Fluoresceinisothiocyanat (FITC), R-Phycoerythrin (PE) und Peridin-Chlorophyll-a-Protein (PerCP). Alle diese Farbstoffe lassen sich spezifisch durch den Laserstrahl mit der Wellenlänge von 488nm anregen. Kehren diese Substanzen in ihren ursprünglichen Energiezustand zurück, emittieren sie ein Licht mit einer charakteristischen Wellenlänge, das von einem optischen System im Durchflusszytometer detektiert wird. Die Emissionswellenlängen der drei oben genannten Fluorochrome überschneiden sich dabei nicht bzw. kaum (FITC: 525nm; PE: 578nm; PerCP: 680nm), so dass gleichzeitig alle drei Farbstoffe auf einer Zelle detektiert und getrennt ausgewertet werden können. Die Fluorochrome können dabei an Antikörper, Proteine oder andere zellbindende Substanzen gekoppelt sein und so deren Bindung an die untersuchte Zelle quantisieren.



**Abb. 2.5.a.** Hydrodynamische Fokussierung im Durchflusszytometer. 1= Laserstrahl, 2= Zellsuspension, 2= Hüllstrom, 3= Messküvette, 3= Blockerstreifen, 4= Hydrodynamische Fokussierung, 4= Laserstrahl, 5= Abfluss. (Abbildung: Becton Dickinson, modifiziert)



**Abb. 2.5.b.** Strahlengang im Durchflusszytometer. Blick von oben auf die Messküvette. 1= Laserstrahl, 2= Messküvette, 3= Blockerstreifen, 4= Sammellinse, 5= Spiegel, 6= Detektor, 7= Filter, 8= Detektor. (aus: RAFFAEL, 1994)



**Abb. 2.6.** Arbeitsplatz am Durchflusszytometer mit computergestützter Steuerung und Auswertung.

Für jede einzelne durch die Messkammer geführte Zelle werden also im Durchflusszytometer bis zu fünf verschiedene Parameter detektiert. Eine vorher festgelegte Anzahl von Zellen wird vermessen, und die erhaltenen Messwerte werden anschließend computergestützt ausgewertet. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt als Histogramm der Häufigkeitsverteilung einer bestimmten Eigenschaft der Zellen oder als Zweiparameter-Darstellung (Dot Plot), bei der jede einzelne Zelle durch einen Punkt dargestellt wird und zwei ihrer Eigenschaften miteinander korreliert werden. So lassen sich verschiedene Zellpopulationen unterscheiden und deren physikalische und biochemische Eigenschaften feststellen (RAFFAEL, 1994).

### **2.14.1. Untersuchung von Thrombozyten**

#### **2.14.1.1. Gewinnung von Thrombozyten**

Über den zentralvenösen Schenkel des Pulmonalis-Katheters wurde vorsichtig gemischt-venöses Blut in 10ml-Citrat-Monovetten (Becton Dickinson, Heidelberg) aspiriert und unverzüglich der Verarbeitung zugeführt. Durch schonende Blutabnahme und kurze Lagerungszeiten wurde einer ungewollten Aktivierung der Thrombozyten vorgebeugt. Durch Zentrifugation für 15min mit 1400rpm bei Raumtemperatur wurde Plättchenreiches Plasma (PRP) von den übrigen Blutzellen getrennt und dann den Versuchen zugeführt.

#### 2.14.1.2. Bestimmung der Thrombozyten-Konzentration

Zur Bestimmung der Thrombozyten-Konzentration im gewonnenen Plättchenreichen Plasma (PRP) wurde das Zellzählgerät CellCounter 9000 (Serono Baker Diagnostics, U.S.A.) verwendet. Ein vorgefertigter Messbehälter wurde automatisch durch das Gerät mit 10ml einer Trägerlösung befüllt. In dieses Gefäß wurden 40µl des gewonnenen PRP gegeben und nach gutem Durchmischen mit dem Gerät nach Herstellerangaben im *Prediluted*-Modus gemessen. Als Grundlage für die Berechnung der einzusetzenden Thrombozyten-Mengen wurde die Thrombozyten-Konzentration auf dem Ausdruck „*Platelet Histogramm*“ verwendet.

#### 2.14.1.3. Detektion von Thrombozyten im Durchflusszytometer

Das Plättchenreiche Plasma (PRP) muss zunächst mit einer Pufferlösung verdünnt werden, damit sich möglichst wenige Thrombozyten-Aggregate bilden. Um die problemlose Messung von Einzelzellen im Durchflusszytometer zu gewährleisten, wird zusätzlich GPRP (H-Gly-Pro-Arg-Pro-OH) hinzugegeben, welches die Fibrin-Polymerisation verhindert. Anschließend werden fluorochrommarkierte Proteine oder Antikörper, deren Bindung an die Blutplättchen untersucht werden soll, zu der Suspension gegeben. Um eine weitere Reaktion der Zellen zu verhindern, wird danach Formaldehydlösung zugesetzt. Nach erneuter Verdünnung können die Thrombozyten dann vermessen werden (MICHELSON, 2000). Die Proben wurden mit dem Durchflusszytometer FACScan (Becton Dickinson, Heidelberg) gemessen. Die Identifizierung der Thrombozyten erfolgte zunächst in einer Dot Plot-Darstellung, in der die beiden Parameter *Forward Angle Light Scatter* (FSC) und *Sideward Angle Light Scatter* (SSC) miteinander korreliert wurden. Dabei stellten sich die Thrombozyten des Schafes etwas kleiner als humane Thrombozyten dar. Damit Verunreinigungen und Zelltrümmer nicht die Messung beeinflussen, wurde ein Gate gesetzt, in dem die Thrombozyten ausgewertet wurden. Zellen oder Zelltrümmer, die sich außerhalb des Gates befanden, wurden nicht in die Messung einbezogen. Um die Bindung von fluorochrommarkierten Proteinen oder Antikörpern an die Thrombozyten zu beurteilen, erfolgte die Darstellung der Intensität der Fluoreszenz auf den erfassten Thrombozyten in einem Histogramm.

#### 2.14.1.4. Bindung von Thrombospondin-1, Gerinnungsfaktor VIIa, Gerinnungsfaktor XIII und von-Willebrand-Faktor an Thrombozyten *ex vivo*

Um den aktuellen Aktivierungszustand der Thrombozyten darstellen zu können, wurden Thrombozyten *ex vivo* verarbeitet, d.h. sie wurden nach der Blutentnahme in ihrem Zustand unverändert der Messung zugeführt. Die Thrombozyten wurden dazu mit einer Konzentration von 50.000PLT/ $\mu$ l in einem Endvolumen von 100 $\mu$ l mit Ca<sup>2+</sup>-TBS-Puffer eingestellt und mit 1,25mM GPRP (Bachem, Weil am Rhein) versetzt. Um die Bindung von Thrombospondin-1, von-Willebrand-Faktor und der Gerinnungsfaktoren VIIa und XIII an die Thrombozyten im Durchflusszytometer detektieren zu können, wurden die Proteine zuvor mit dem Fluorochrom Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markiert (siehe Kapitel 2.6., 2.7., 2.9. und 2.10.). Die so markierten Proteine wurden mit der in Tabelle 2.3. angegebenen Konzentration in getrennten Versuchsansätzen zu 100 $\mu$ l der Thrombozyten-Suspension gegeben.

Protein	Eingesetzte Konzentration
Thrombospondin-1-FITC	50 $\mu$ g/ml
Gerinnungsfaktor VIIa-FITC	300 $\mu$ g/ml
Gerinnungsfaktor XIII-FITC	300 $\mu$ g/ml
von-Willebrand-Faktor-FITC	75 $\mu$ g/ml

**Tab. 2.3.** FITC-markierte Proteine, deren Anbindung an Thrombozyten *ex vivo* untersucht wurde, und die Konzentration, mit der sie im Versuchsansatz eingesetzt wurden.

Für 10 Minuten inkubierten nun die Proteine mit den Thrombozyten. Danach wurde jeder Ansatz mit 100 $\mu$ l 1%-Formaldehyd-Lösung versetzt und so für 30 Minuten bei Raumtemperatur ohne weitere Bewegung fixiert, um eine weitere Reaktion und Veränderung der Thrombozyten zu verhindern. Durch die Zugabe von 1ml Ca<sup>2+</sup>-TBS-Puffer wurde der Fixationsvorgang beendet und die Ansätze anschließend für 10 Minuten mit 2200rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, um das Formaldehyd und nicht gebundene Moleküle aus den Proben zu entfernen. Anschließend wurden diese zeitnah im Durchflusszytometer nach Zugabe von 300 $\mu$ l Ca<sup>2+</sup>-TBS-Puffer gemessen.

⇒ Verwendete Puffer und Lösungen:

siehe Kapitel 2.14.1.5.

#### 2.14.1.5. Bindung von Thrombospondin-1, Gerinnungsfaktor VIIa, Gerinnungsfaktor XIII und von-Willebrand-Faktor an Thrombozyten nach Aktivierung *in vitro*

Um den Zustand der Thrombozyten weiter differenzieren zu können, wurde untersucht, inwieweit die Thrombozyten *in vitro* noch funktionsfähig sind. Als Aktivierungsmarker wurde erneut die Anbindung von Thrombospondin-1, von-Willebrand-Faktor und der Gerinnungsfaktoren VIIa und XIII untersucht, die zur Detektion im Durchflusszytometer mit FITC markiert wurden (siehe Kapitel 2.6., 2.7., 2.9. und 2.10.). Die Thrombozyten-Konzentration wurde auf 50.000PLT/ $\mu$ l in einem Endvolumen von 250 $\mu$ l mit Ca<sup>2+</sup>-TBS-Puffer eingestellt. Um die Fibrin-Polymerisation zu verhindern, wurde auch diese Suspension mit 1,25mM GPRP (Bachem, Weil am Rhein) versetzt. Die markierten Proteine wurden den jeweils getrennten Versuchsansätzen mit der in Tabelle 2.4. angegebenen Konzentration zugegeben. Die *in vitro*-Aktivierung der Thrombozyten erfolgte mit unterschiedlichen aktivierenden Substanzen. Eingesetzt wurden methyliertes Kollagen Typ I, *Thrombin Receptor Activating Peptide* (TRAP) und Ristocetin A. Die aktivierenden Substanzen wurden in jeweils getrennte leere Probenröhrchen mit der in Tabelle 2.5. angegebenen Konzentration vorgelegt. 100 $\mu$ l der zuvor hergestellten proteinhaltigen Thrombozytensuspension wurden dann hinzugegeben, um die Aktivierung der Thrombozyten und ihre Reaktion mit den markierten Proteinen auszulösen. Nach genau 3 Minuten wurden die Ansätze mit 100 $\mu$ l 1%-Formaldehyd-Lösung versetzt und so für 30 Minuten bei Raumtemperatur ohne weitere Bewegung fixiert. So sollte eine weitere Aktivierung der Thrombozyten verhindert werden. Nachdem 1ml Ca<sup>2+</sup>-TBS-Puffer zur Beendigung der Fixation zugegeben wurde, erfolgte die Zentrifugation der Proben für 10 Minuten mit 2200rpm bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und die Proben nach Zugabe von 300 $\mu$ l Ca<sup>2+</sup>-TBS-Puffer zeitnah im Durchflusszytometer gemessen.

Protein	Eingesetzte Konzentration
Thrombospondin-1-FITC	50 $\mu$ g/ml
Gerinnungsfaktor VIIa-FITC	300 $\mu$ g/ml
Gerinnungsfaktor XIII-FITC	300 $\mu$ g/ml
von-Willebrand-Faktor-FITC	75 $\mu$ g/ml

**Tab. 2.4.** FITC-markierte Proteine, deren Anbindung an Thrombozyten nach Aktivierung *in vitro* untersucht wurde, und die Konzentration, mit der sie im Versuchsansatz eingesetzt wurden.

Protein	Aktivierende Substanz	Konzentration der Substanz
Thrombospondin-1-FITC	Kollagen	1,5µg/ml
Thrombospondin-1-FITC	TRAP	50µM
Gerinnungsfaktor VIIa-FITC	Kollagen	1,5µg/ml
Gerinnungsfaktor XIII-FITC	Kollagen	1,5µg/ml
von-Willebrand-Faktor-FITC	Ristocetin A	0,8µg/ml

**Tab. 2.5.** FITC-markierte Proteine, deren Anbindung an Thrombozyten nach Aktivierung *in vitro* untersucht wurde, mit der jeweiligen untersuchten aktivierenden Substanz und die Konzentration, mit der diese eingesetzt wurden. TRAP= *Thrombin Receptor Activating Peptide*.

⇒ Verwendete Puffer und Lösungen:

- Ca<sup>2+</sup>-TBS-Puffer (pH7,4):
  - 10mM Tris
  - 150mM Natriumchlorid
  - 2mM Calciumchlorid
- 1%-Formaldehyd-Lösung:
  - 1% Formaldehyd in Ca<sup>2+</sup>-TBS-Puffer

#### 2.14.1.6. Bindung von Annexin V an Thrombozyten *ex vivo* und nach Aktivierung *in vitro*

Die Messung der Annexin V-Bindung an Thrombozyten erfolgte nach DÖRMANN (1998). Um das auf der Zelloberfläche gebundene Annexin V im Durchflusszytometer detektieren zu können, wurde mit FITC gekoppeltes Annexin V verwendet. Die Thrombozyten wurden in einer Endkonzentration von 50.000PLT/µl in 250µl Ca<sup>2+</sup>-TBS-Puffer eingestellt und mit 1,25mM GPRP (Bachem, Weil am Rhein) zur Verhinderung der Fibrin-Polymerisation versetzt. Der verwendete Ca<sup>2+</sup>-TBS-Puffer wies eine Calciumkonzentration von 6mM auf, da die Annexin V-Bindung an Thrombozyten streng calciumabhängig ist. Nach *in vitro*-Aktivierung der Thrombozyten mit 3µg/ml Kollagen wurden die Proben gemeinsam mit den unaktivierten Proben für die *ex vivo*-Messung für 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln geschüttelt. Dann wurden 2µl einer 1:100-Verdünnung der Annexin V-FITC-Lösung aus einem Annexin-Kit (Bender Med Systems, Österreich) zu den Proben gegeben, die für weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln geschüttelt wurden. Im Anschluss wurden 500µl des

Ca<sup>2+</sup>-TBS-Puffers zugegeben, und es erfolgte sofort die Messung im Durchflusszytometer.

⇒ Verwendete Puffer und Lösungen:

- Ca<sup>2+</sup>-TBS-Puffer (pH 7,4):
  - 10mM Tris
  - 150mM Natriumchlorid
  - 6mM Calciumchlorid

### **2.14.2. Untersuchung von Monozyten und PMNL**

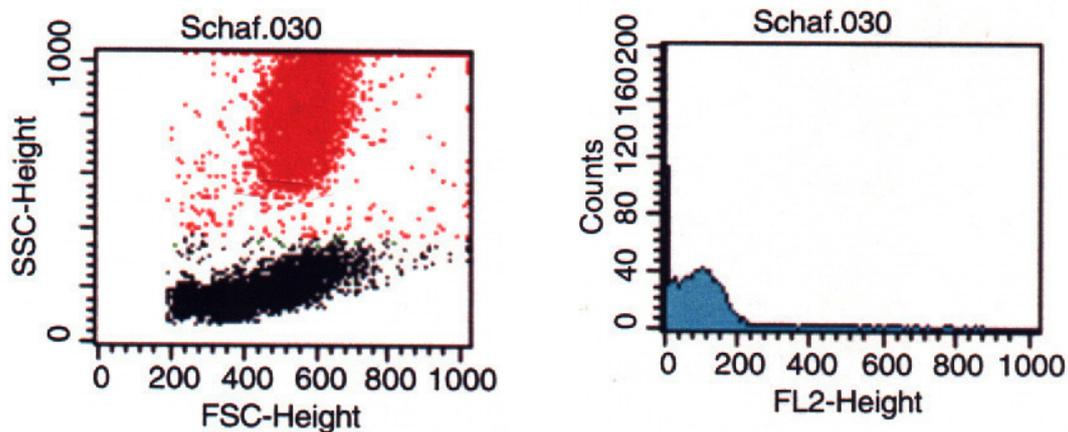
Leukozyten, insbesondere Monozyten und Granulozyten (Polymorphnukleäre Leukozyten [PMNL]), spielen eine wichtige Rolle bei der Entzündungsreaktion, aber auch bei der Aktivierung und Regulierung der Blutgerinnung. Zur Beurteilung der Aktivierung von Entzündungs- und Hämostasesystem im Rahmen einer Sepsis, sind daher neben den Thrombozyten auch die Leukozyten von Interesse. Als Indikatoren für diese Interaktion dienen hier die aktivitätsabhängige Anbindung verschiedener Proteine, die Präsentation von Oberflächenproteinen und die Bildung von Leukozyten-Thrombozyten-Assoziaten.

#### **2.14.2.1. Gewinnung von Monozyten, PMNL und Thrombozyten**

Die Untersuchung von Monozyten, PMNL (Granulozyten) und deren Interaktion mit Thrombozyten erfolgte im Vollblut. Dafür wurde gemischt-venöses Blut vorsichtig in 10ml-Citrat-Monovetten (Becton Dickinson, Heidelberg) über den zentralvenösen Schenkel des Pulmonalis-Katheters aspiriert und anschließend unverzüglich der Verarbeitung zugeführt.

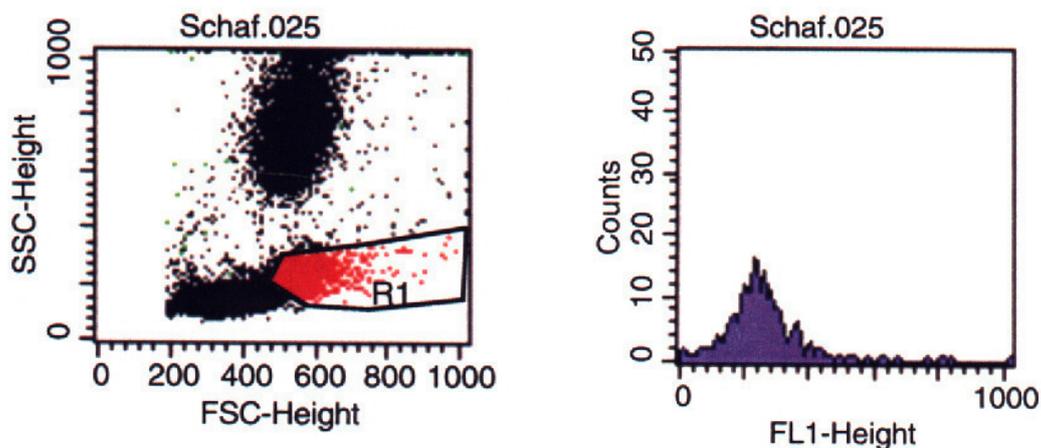
### 2.14.2.2. Detektion von Monozyten und PMNL im Durchflusszytometer

Aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe und Granularität, erfasst über den *Forward Angle Light Scatter* (FSC) und den *Sideward Angle Light Scatter* (SSC), lassen sich die einzelnen Zellpopulationen durch ihre Lage im FSC/SSC-Dot Plot unterscheiden. Die PMNL erscheinen dabei als deutlich abgrenzbare Population relativ großer Zellen (hoher FSC) mit ausgeprägter Granularität (hoher SSC). Diese Population wurde dann in einem Gate erfasst und die Fluoreszenz auf allen Zellen innerhalb des Gates gemessen (Abb. 2.7.).



**Abb. 2.7.** *Links:* Detektion von Leukozyten und Thrombozyten im Durchflusszytometer. Darstellung im FSC/SSC-Dot Plot. Rot dargestellt ist die Population der Granulozyten. Schwarz dargestellt sind Thrombozyten und Monozyten. *Rechts:* Darstellung der Fluoreszenz auf den erfassten Granulozyten im Histogramm, hier am Beispiel der Anbindung des PE-markierten CD11b-Antikörpers.

Monozyten stellen sich als Zellpopulation dar, die ebenfalls große Zellen enthält (hoher FSC), aber eine ähnlich niedrige Granularität wie Thrombozyten aufweist (mittlerer SSC). Die Population der Monozyten schließt sich daher im FSC/SSC-Dot Plot dicht an die Zellpopulation der kleineren Blutplättchen an und lässt sich etwas weniger deutlich von diesen unterscheiden. Auch die Population der Monozyten wurde mittels eines Gates erfasst und die Fluoreszenz auf diesen Zellen gemessen (Abb. 2.10.). Die Thrombozyten stellen sich als Zellpopulation links neben den Monozyten dar. Sie erscheinen als kleine Zellen (niedriger FSC) mit einer geringen Granularität (niedriger SSC) und lassen sich etwas undeutlich von den größeren Monozyten abgrenzen (Abb. 2.8.).



**Abb. 2.8.** Links: Detektion von Leukozyten und Thrombozyten im Durchflusszytometer. Darstellung im FSC/SSC-Dot Plot. Rot dargestellt ist die Population der Monozyten. R1= Gate, das die Monozyten erfasst. Schwarz dargestellt sind Thrombozyten und Granulozyten. Rechts: Darstellung der Fluoreszenz auf den erfassten Monozyten im Histogramm, hier am Beispiel der Anbindung des FITC-markierten Fibrinogens.

#### 2.14.2.3. Bindung von Fibrinogen an Monozyten und PMNL *ex vivo*

Ein Indikator für die Aktivierung des Entzündungs- und Hämostasesystems *ex vivo* ist die Anbindung von *in vitro* zugesetztem Fibrinogen sowohl an Monozyten als auch an PMNL. Dazu wurden 100µl unverändertes Citrat-Vollblut mit 1,25mM GPRP (Bachem, Weil am Rhein) zur Verhinderung der Fibrinpolymerisation versetzt. Dann wurde den Proben Fibrinogen in einer Konzentration von 150µg/ml zugesetzt. Das Fibrinogen wurde zuvor mit FITC markiert, um es im Durchflusszytometer während der Messung detektieren zu können (siehe Kapitel 2.11.). Nach dem Zusetzen der Fibrinogen-Lösung wurden die Proben bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Zellen zu fixieren und so weitere Zellveränderungen zu verhindern, wurden nach 10 Minuten 100µl 0,4%-Formaldehyd-Lösung zugegeben. Die Fixation erfolgte für 30 Minuten bei Raumtemperatur ohne weitere Bewegung. Anschließend wurde die Fixation durch die Zugabe von 2ml Tyrode-HEPES-Puffer beendet und es folgte die Zentrifugation der Proben für 10 Minuten mit 1700rpm bei Raumtemperatur. Nach dem vorsichtigen Absaugen des Überstandes wurde das Vollblut in etwa 300µl Tyrode-HEPES-Puffer resuspendiert. Um die Proben im Durchflusszytometer artefaktfrei messen zu können, erfolgte dann die schonende Lyse der Erythrozyten, welche durch ihre große Anzahl im Vollblut die Messung im Durchflusszytometer stark gestört hätten. Dazu wurden den

Proben 2ml Lyse-Reagenz zugegeben und durch kräftiges Schütteln schnell mit dem Vollblut vermischt. Sobald die Lyse der Erythrozyten vollständig abgelaufen und die Probe durchscheinend klar geworden war, wurde der Lyse-Vorgang durch die Zugabe von 2ml Tyrode-HEPES-Puffer beendet. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Proben für 10 Minuten mit 1700rpm bei Raumtemperatur. Vorsichtig wurde nun der Überstand abgesaugt. Um die Proben gründlich von den Erythrozytenfragmenten zu befreien, erfolgte noch zweimal die Zugabe von 2ml Tyrode-HEPES-Puffer mit anschließender Zentrifugation. Nach dem letzten Absaugen wurden den Proben 300µl Tyrode-HEPES-Puffer zugegeben und diese dann zeitnah im Durchflusszytometer vermessen.

⇒ Verwendete Puffer und Lösungen:

siehe Kapitel 2.14.2.6.

#### 2.14.2.4. Beurteilung der Fibrinogen-Bindung an Monozyten und PMNL *in vivo*

Um die Bindung von Fibrinogen an Monozyten und PMNL beurteilen zu können, die *in vivo* stattgefunden hat, wurde das bereits an die Zelloberfläche gebundene Fibrinogen mit einem Fibrinogen-Antikörper nachgewiesen. Um diesen im Durchflusszytometer detektieren zu können, wurde ein FITC-markierter Antikörper verwendet. 100µl Vollblut wurden mit 1,25mM GPRP (Bachem, Weil am Rhein) zur Verhinderung der Fibrinpolymerisation versetzt. Um eine weitere Veränderung der Zellen *in vitro* zu verhindern, erfolgte die Fixation der Zellen mit 100µl 0,4%-Formaldehyd-Lösung. Nach 30minütiger Fixation ohne Bewegung wurden dem Ansatz 2ml Tyrode-HEPES-Puffer zugegeben und dieser für 10 Minuten mit 1700rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Um das Formaldehyd zu entfernen wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt. Nach dem Resuspendieren der Probe wurden 10µl des Fibrinogen-Antikörpers zugegeben und für weitere 30 Minuten unter leichter Bewegung bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 2ml des Tyrode-HEPES-Puffer zugegeben und die Proben für weitere 10 Minuten mit 1700rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Damit nicht gebundene Antikörper aus der Lösung entfernt werden konnten, wurde anschließend der Überstand abgesaugt. Um die Messung der Proben im Durchflusszytometer artefaktfrei durchführen zu können, erfolgte auch hier die Lyse der Erythrozyten nach

dem in Kapitel 2.14.2.3. beschriebenen Verfahren. Nach der Lyse und dem Waschen der Probe erfolgte die zeitnahe Vermessung der Probe im Durchflusszytometer.

⇒ Verwendete Puffer und Lösungen:

siehe Kapitel 2.14.2.6.

#### 2.14.2.5. CD11b-Expression auf Monozyten und PMNL

Als Indikator für die Aktivierung von Leukozyten *in vivo* kann die CD11b-Expression auf der Leukozytenoberfläche dienen. Dabei handelt es sich um ein leukozytenspezifisches Integrin ( $\beta_2\alpha_M$ ), welches nach Aktivierung an der Oberfläche vermehrt exprimiert wird. Zum Nachweis im Durchflusszytometer wurde ein monoklonaler CD11b-Antikörper verwendet, welcher zuvor biotinyliert wurde (siehe Kapitel 2.12.). 100µl Vollblut wurden mit 1,25mM GPRP (Bachem, Weil am Rhein) versetzt und danach mit 5µl des CD11b-Antikörpers versetzt. Für 30 Minuten wurde das Vollblut mit dem Antikörper bei Raumtemperatur unter leichter Bewegung inkubiert. Durch Zugabe von 100µl 0,4%-Formaldehyd-Lösung wurden die Zellen in ihrem Zustand fixiert. Nach 30minütiger Fixation bei Raumtemperatur ohne weiterer Bewegung wurde der Fixationsvorgang durch Zugabe von 2ml Tyrode-HEPES-Puffer beendet. Nach 10minütiger Zentrifugation der Proben mit 1700rpm bei Raumtemperatur wurde der Überstand abgesaugt, um Formaldehyd und nicht gebundenen Antikörper aus der Probe zu entfernen. Danach wurden 5µl PE-markiertes Extravidin (Sigma, U.S.A.) zugegeben. Extravidin, ein modifiziertes Hühnereiweißprotein, bindet mit vier Bindungsstellen spezifisch an Biotin, so dass es über die Fluoreszenz des R-Phycoerythrin (PE) im Durchflusszytometer als indirekter Marker für den biotinylierten Antikörper dient. Erneut erfolgte die Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter leichter Bewegung. Nach dem Ende der Inkubation wurden 2ml Tyrode-HEPES-Puffer zugegeben und die Proben erneut für 10 Minuten mit 1700rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nachdem auch hier der Überstand vorsichtig abgesaugt wurde, erfolgte die Lyse der Erythrozyten nach dem in Kapitel 2.14.2.3. beschriebenen Verfahren, um die Proben artefaktfrei im Durchflusszytometer vermessen zu können. Im Anschluss wurden die Proben nach Zugabe von 300µl Tyrode-HEPES-Puffer zeitnah im Durchflusszytometer vermessen.

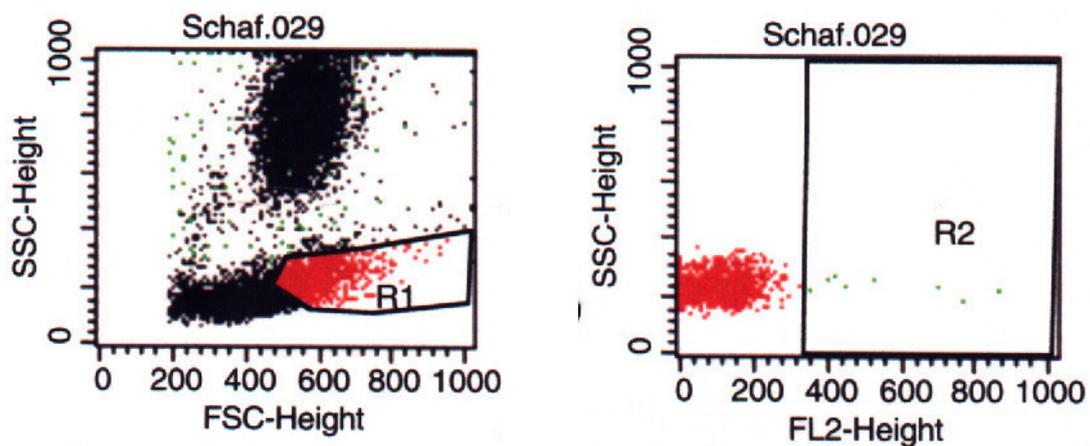
⇒ Verwendete Puffer und Lösungen:

siehe Kapitel 2.14.2.6.

#### 2.14.2.6. Assoziate zwischen Thrombozyten und Monozyten

Ein wichtiger Indikator für die Aktivierung von Thrombozyten und Leukozyten ist die Bildung von Thrombozyten-Leukozyten-Assoziaten. Hier wurden die Assoziate zwischen Thrombozyten und Monozyten untersucht. Sie sind Ausdruck des intensiven *cross-talk* zwischen Thrombozyten und Leukozyten. 100µl Vollblut wurden mit 1,25mM GPRP (Bachem, Weil am Rhein) versetzt, um die Fibrinpolymerisation zu verhindern. Als Thrombozyten-Marker dienten 5µl eines CD41/61-Antikörpers, der zuvor biotinyliert worden war (siehe Kapitel 2.12.). Der Antikörper richtet sich dabei gegen den thrombozytären Fibrinogen-Rezeptor, das GPIIb/IIIa. Die Inkubation des Vollblutes mit dem Antikörper erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur unter leichter Bewegung. Danach wurden die Zellen der Vollblutprobe durch Zugabe von 100µl 0,4%-Formaldehyd-Lösung in ihrem Zustand fixiert. Nach 30minütiger Fixation bei Raumtemperatur ohne weitere Bewegung wurde der Fixationsvorgang durch Zugabe von 2ml Tyrode-HEPES-Puffer beendet. Es folgte eine Zentrifugation der Proben für 10 Minuten mit 1700rpm bei Raumtemperatur. Nach dem Absaugen des Überstandes wurden 5µl PE-markiertes Extravidin (Sigma, U.S.A.) zugegeben. Extravidin, ein modifiziertes Hühnereiweißprotein, bindet mit vier Bindungsstellen spezifisch an Biotin, so dass es über die Fluoreszenz des R-Phycoerythrin im Durchflusszytometer als indirekter Marker für den biotinylierten Antikörper dient. Erneut erfolgte die Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter leichter Bewegung. Nach dem Ende der Inkubation wurden 2ml Tyrode-HEPES-Puffer zugegeben und die Proben erneut für 10 Minuten mit 170rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nachdem auch hier der Überstand vorsichtig abgesaugt wurde, erfolgte die Lyse der Erythrozyten nach dem in Kapitel 2.14.2.3. beschriebenen Verfahren, um die Proben artefaktfrei im Durchflusszytometer vermessen zu können. Im Anschluss wurden die Proben nach Zugabe von 300µl Tyrode-HEPES-Puffer zeitnah im Durchflusszytometer vermessen. Die Darstellung der einzelnen Zellpopulationen erfolgte wiederum nach ihrer Größe und Granularität im FSC/SSC-Dot Plot. Die Monozyten wurden über ein Gate erfasst und die Fluoreszenz auf diesen Zellen gemessen. Der indirekt PE-markierte CD41/61-

Antikörper hatte an Thrombozyten gebunden und konnte daher die Bindung von Thrombozyten an die erfassten Monozyten messbar machen. Monozyten, die eine geringe PE-Fluoreszenz aufwiesen, waren keine Bindung mit Thrombozyten eingegangen. Monozyten mit einer hohen PE-Fluoreszenz hatten dagegen Assoziat mit Thrombozyten gebildet und wurden in einem weiteren Gate erfasst (Abb. 2.9.). Anschließend wurde der prozentuale Anteil dieser „plättchen-positiven“ Zellen an allen erfassten Monozyten berechnet, um das Ausmaß der Assoziat-Bildung zu quantisieren.



**Abb. 2.9.** Links: Detektion von Leukozyten und Thrombozyten im Durchflusszytometer. Darstellung im FSC/SSC-Dot Plot. Rot dargestellt ist die Population der Monozyten. R1= Gate, das die Monozyten erfasst. Schwarz dargestellt sind Thrombozyten und Granulozyten. Rechts: Darstellung der erfassten Monozyten in Abhängigkeit von der PE-Fluoreszenz (FL2), welche Thrombozyten markiert. Rot dargestellt sind Monozyten mit geringer Fluoreszenz. Sie haben keine Thrombozyten gebunden. Grün dargestellt sind Monozyten, die eine deutliche Fluoreszenz aufweisen, da sie Assoziat mit Thrombozyten eingegangen sind. R2= Gate, in dem die Monozyten erfasst werden, welche Assoziat mit Thrombozyten bilden.

⇒ Verwendete Puffer und Lösungen:

- Tyrode-HEPES-Puffer (pH 7,4):
  - 140mM Natriumchlorid
  - 2,7mM Kaliumchlorid
  - 0,42mM Natriumdihydrogenphosphat
  - 12mM Natriumhydrogencarbonat
  - 5,5mM Glucose
  - 5mM Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure (HEPES)
- 0,4%-Formaldehyd-Lösung:
  - 0,4% Formaldehyd in  $\text{Ca}^{2+}$ -TBS-Puffer

- Lyse-Reagenz:
  - 1:10 Verdünnung von IOTest 3 Lysing Solution (Immunotech, Frankreich) in Aqua dest.

## **2.15. Als Verum eingesetztes Thrombospondin-1**

Das in dieser Arbeit untersuchte und als Verum eingesetzte Thrombospondin-1 wurde in der Abteilung für Experimentelle und Klinische Hämostaseologie, Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin des Universitätsklinikums Münster unter der Leitung von Frau Prof. Dr. rer. nat. B. Kehrel hergestellt und zur Verfügung gestellt. Es lag in zwei Herstellungschargen vor. Aus Schutzgründen kann auf den Unterschied der beiden Chargen hier nicht eingegangen werden.

## **2.16. Auswertung und Statistik**

Die Messungen des Durchflusszytometers wurden mit der Software CellQuest 3.1f (Becton Dickinson, Heidelberg) ausgewertet. Die grafische Darstellung der Ergebnisse und die statistische Auswertung erfolgte mittels der Software Excel 2000 (Microsoft, U.S.A.) und SigmaStat 3.1 (Systat, U.S.A.). Die Ergebnisse wurden als Median  $\pm$  Standardfehler (S.E.M.) dargestellt. Zur statistischen Auswertung wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse für Messwiederholung auf dem Faktor „Zeit“ durchgeführt. Anschließend erfolgten post-hoc-Testungen nach Student-Newman-Keuls. Für die Überlebensstatistik wurde ein Kaplan-Meier-Log-Rank-Test durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde  $p < 0.05$  gewählt.

### 3. Ergebnisse

In der Placebogruppe befanden sich zehn Schafe. Bei einem Schaf traten bereits zur Baseline über alle Messwerte maximal erhöhte Aktivierungsparameter der Thrombozyten auf. Das Tier wurde daraufhin von der Auswertung ausgeschlossen. Von den neun verbleibenden Schafen starben zwei zwischen der 8. und 12. Stunde, zwei weitere zwischen der 12. und 24. Stunde des Versuchs. In der Verumgruppe befanden sich acht Schafe. Hier traten bei drei Tieren zur Baseline pathologisch erhöhte Aktivierungsparameter auf, so dass auch diese von der Auswertung ausgeschlossen werden mussten. In der verbleibenden Verumgruppe erhielten drei Tiere das Verum der Charge A und zwei Tiere das Verum der Charge B.

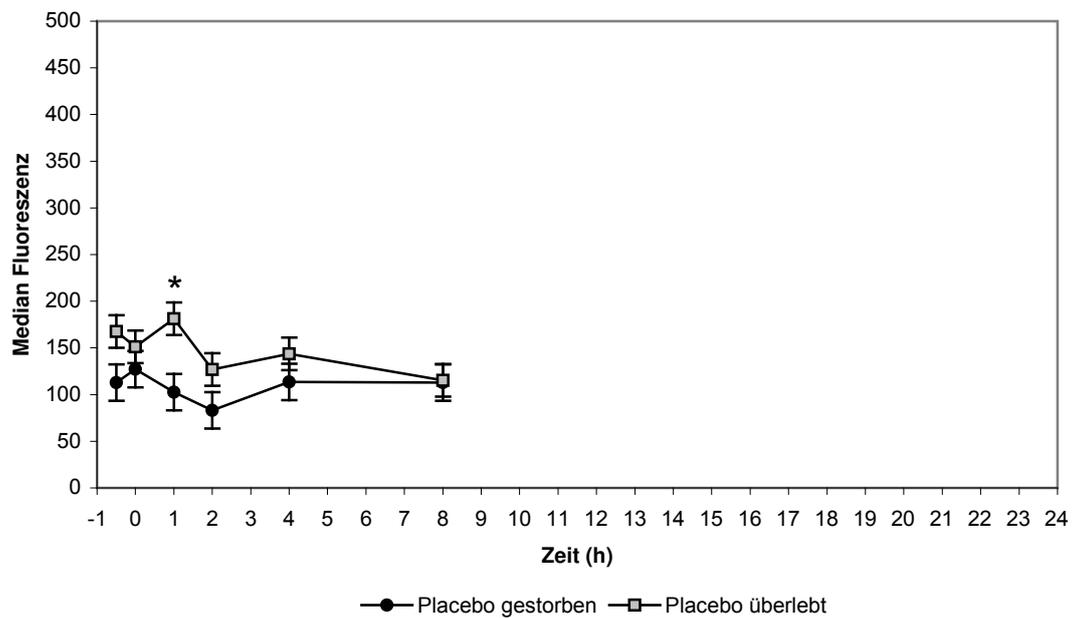
#### 3.1. Innergruppenvergleich: Placebo

Um eine Aussage zu treffen, welche Parameter sich als frühe Prognoseparameter für den Verlauf eines SIRS bzw. einer Sepsis eignen, wurde die Placebogruppe mit unbehandeltem SIRS in zwei Untergruppen aufgeteilt. Zum einen wurden die fünf Tiere zu einer Gruppe zusammengefasst, welche den gesamten Versuchszeitraum von 24 Stunden überlebt hatten, während die übrigen vier Tiere, welche vor Ende des Versuches am SIRS gestorben waren, die andere Untergruppe bildeten. Da der Messzeitpunkt 8h der letzte Zeitpunkt war, an dem für alle Placeboschafe ein Messwert erhoben werden konnte, erfolgt die Betrachtung hier nur über den Verlauf bis zur achten Stunde.

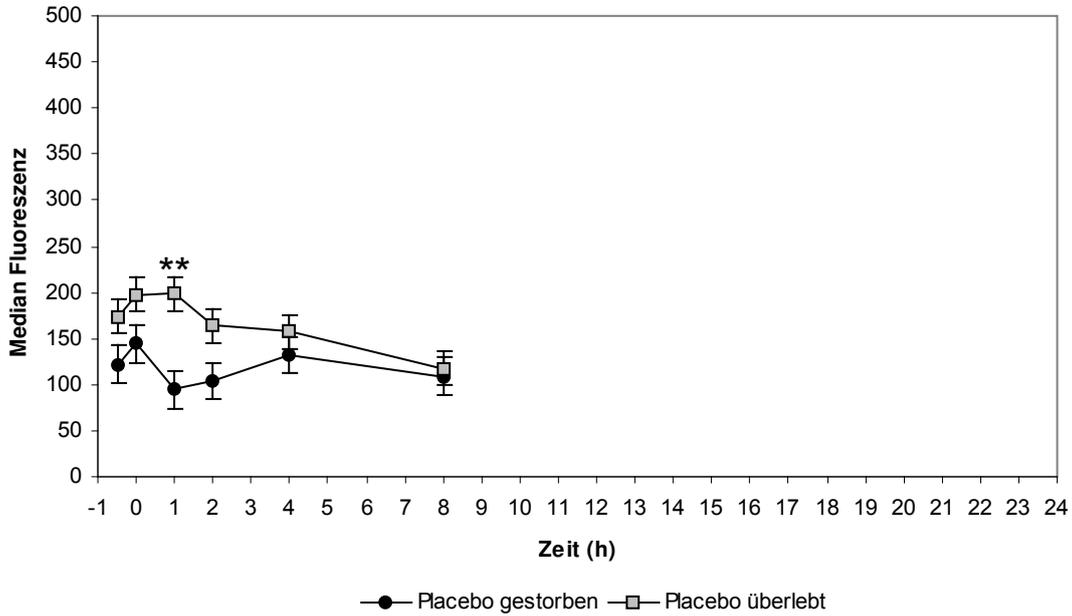
##### 3.1.1. Thrombospondin-1-Bindung an Thrombozyten

Das Ausmaß der Thrombospondin-1-Bindung an Thrombozyten *ex vivo* zeigte sich insbesondere bis zum Zeitpunkt 2h in der Gruppe der überlebenden Tiere höher als in der Gruppe der gestorbenen Tiere. Zum Messzeitpunkt 1h erreicht dieser Unterschied das Signifikanzniveau (Abb. 3.1.). Auch nach *in vitro*-Aktivierung durch Kollagen und TRAP zeigte sich in der Gruppe der überlebenden Tiere tendenziell eine höhere

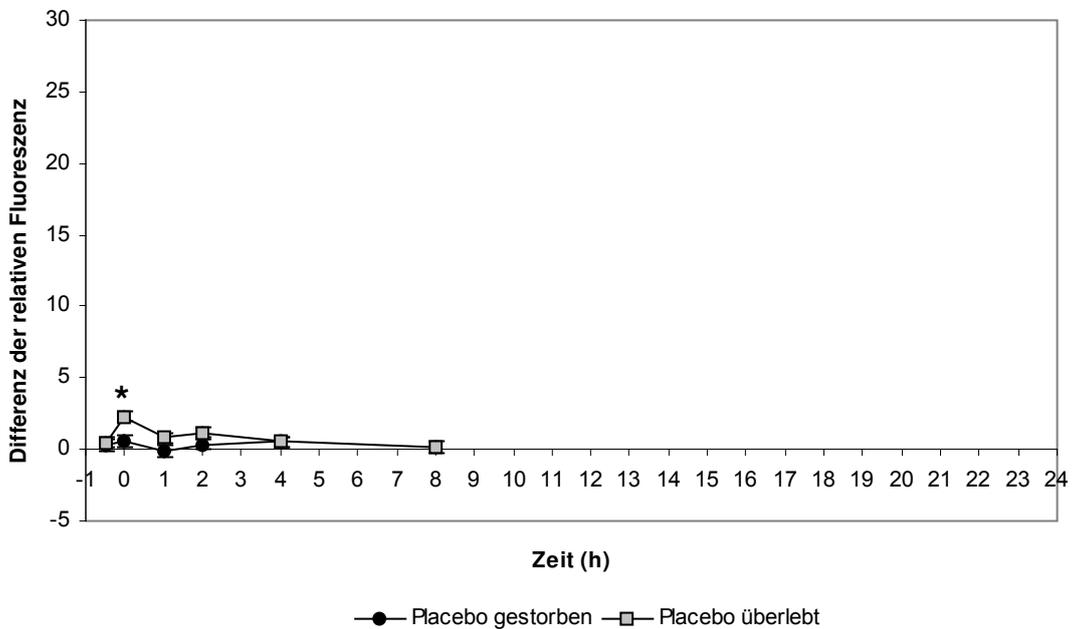
Anbindungsfähigkeit als in der Gruppe der gestorbenen Tiere. Zum Zeitpunkt 1h war dieser Unterschied ebenfalls in allen Messreihen signifikant. Nach Aktivierung durch 50 $\mu$ M TRAP zeigte sich zusätzlich zur Baseline eine signifikant höhere Thrombospondin-1-Anbindung (Abb. 3.2. bis Abb. 3.5.).



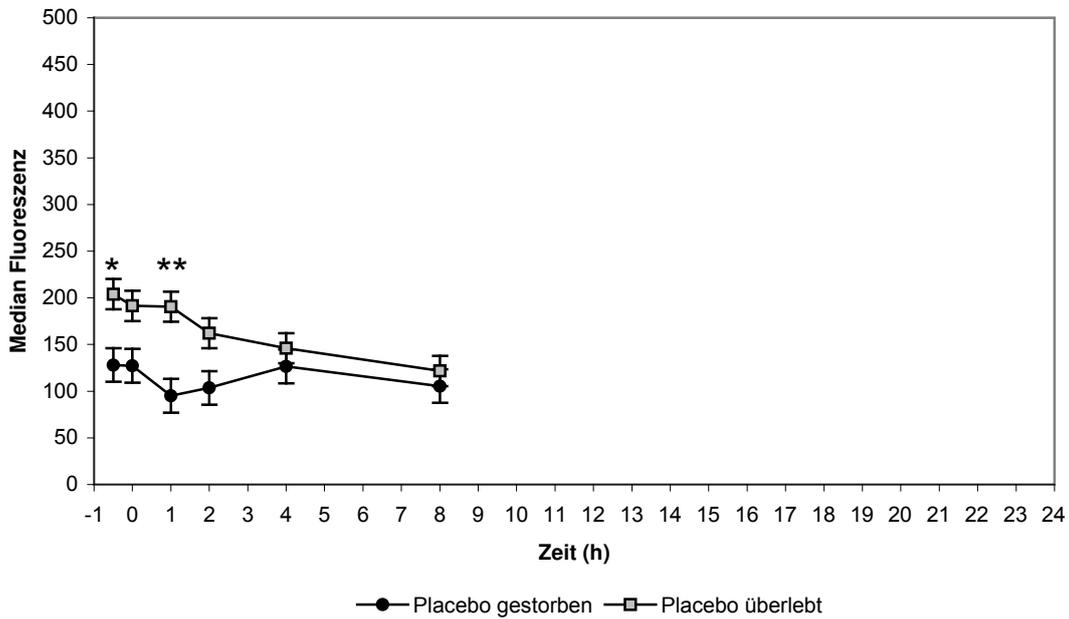
**Abb. 3.1.:** Bindung von Thrombospondin-1-FITC an Thrombozyten *ex vivo*. Placebogruppe, gestorbene Tiere (n=4) vs. Placebogruppe, überlebende Tiere (n=5). Darstellung als Median der Fluoreszenz  $\pm$  S.E.M. Signifikanzen: \* p<0.05.



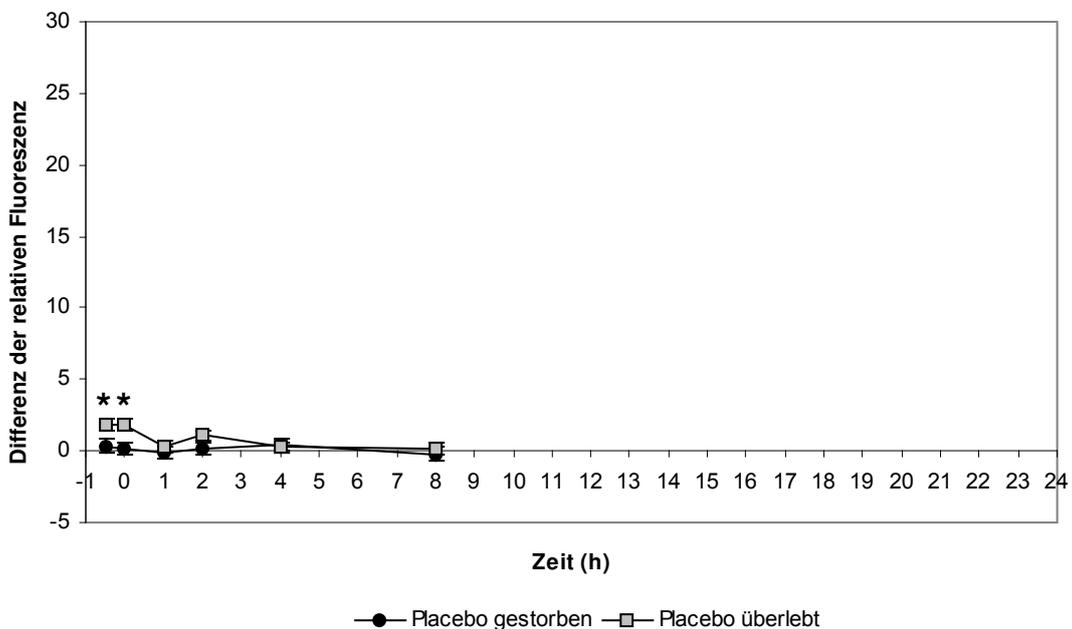
**Abb. 3.2.:** Bindung von Thrombospondin-1-FITC an Thrombozyten nach Aktivierung *in vitro* mit 1,5µg/ml Kollagen. Placebogruppe, gestorbene Tiere (n=4) vs. Placebogruppe, überlebende Tiere (n=5). Darstellung als Median der Fluoreszenz ± S.E.M. Signifikanzen: \*\* p≤0.01.



**Abb. 3.3.:** Bindung von Thrombospondin-1-FITC an Thrombozyten nach Aktivierung mit 1,5µg/ml Kollagen *in vitro*. Placebogruppe, gestorbene Tiere (n=4) vs. Placebogruppe, überlebende Tiere (n=5). Darstellung als Differenz der relativen Fluoreszenz zur *ex vivo* Messung ± S.E.M. Signifikanzen: \* p<0.05.



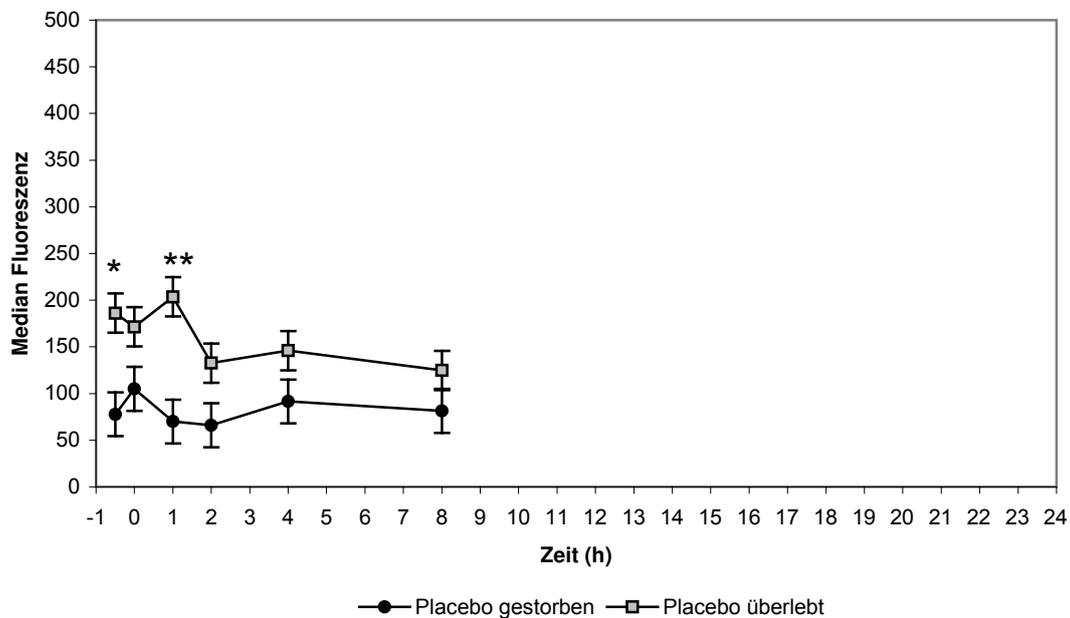
**Abb. 3.4.:** Bindung von Thrombospondin-1-FITC an Thrombozyten nach Aktivierung *in vitro* mit 50µM TRAP. Placebogruppe, gestorbene Tiere (n=4) vs. Placebogruppe, überlebende Tiere (n=5). Darstellung als Median der Fluoreszenz ± S.E.M. Signifikanzen: \* p<0.05, \*\* p≤0.01.



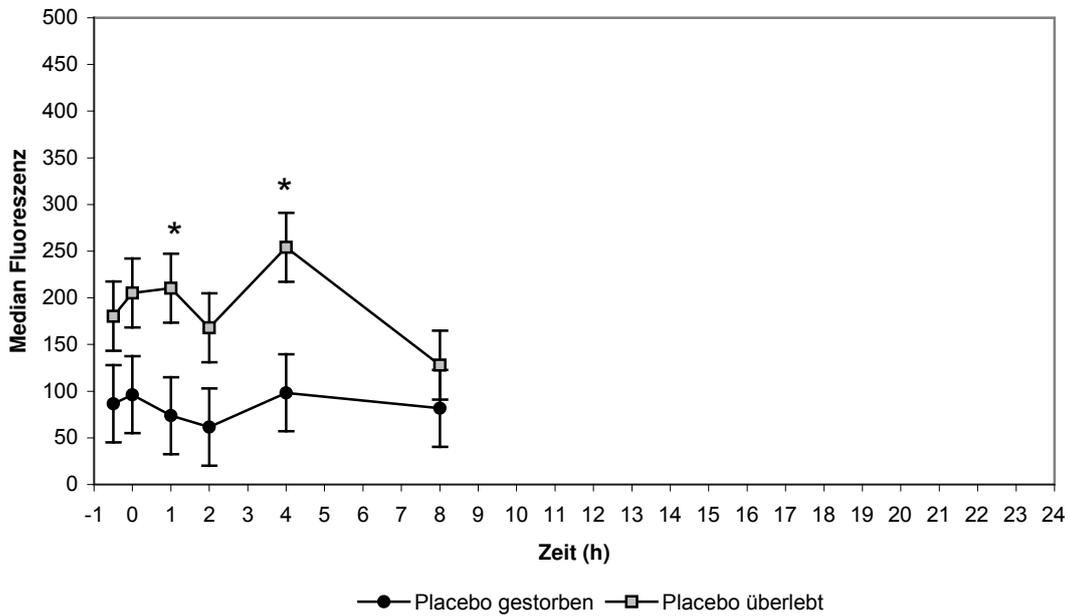
**Abb. 3.5.:** Bindung von Thrombospondin-1-FITC an Thrombozyten nach Aktivierung mit 50µM TRAP *in vitro*. Placebogruppe, gestorbene Tiere (n=4) vs. Placebogruppe, überlebende Tiere (n=5). Darstellung als Differenz der relativen Fluoreszenz zur *ex vivo* Messung ± S.E.M. Signifikanzen: \* p<0.05.

### 3.1.2. Gerinnungsfaktor VIIa-Bindung an Thrombozyten

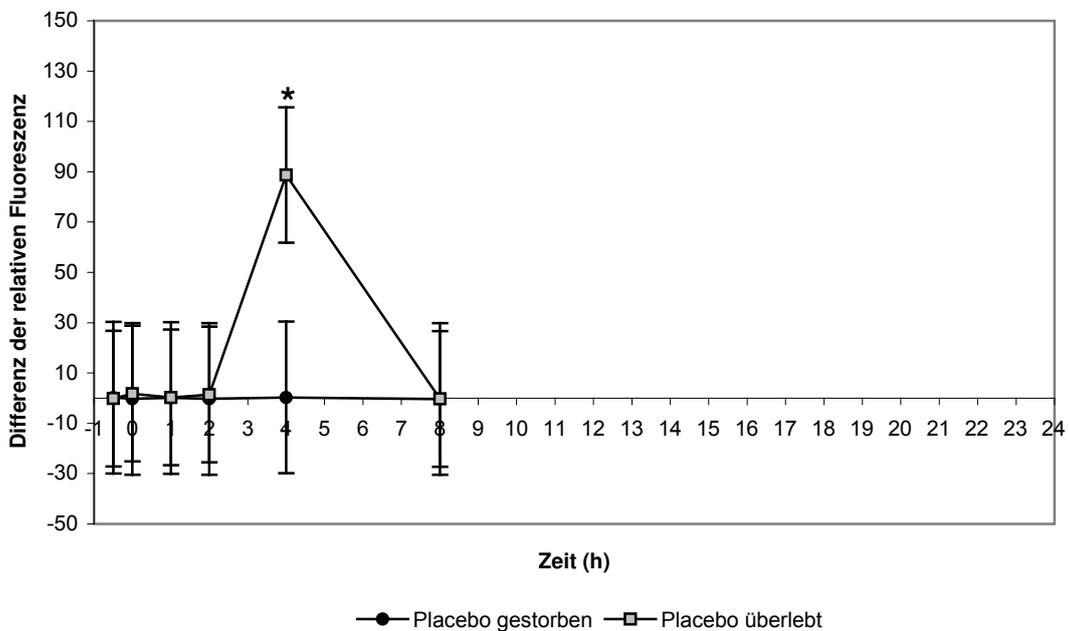
In der Gruppe der überlebenden Tiere zeigte sich sowohl *ex vivo* als auch nach *in vitro*-Aktivierung durch Kollagen insbesondere bis zum Zeitpunkt 4h eine tendenziell höhere Anbindung des Gerinnungsfaktors VIIa als in der Gruppe der gestorbenen Tiere. In der *ex vivo*-Messung erreichte dieser Unterschied zur Baseline und zu 1h das Signifikanzniveau (Abb. 3.6.). Nach Aktivierung durch 1,5µg/ml Kollagen zeigte sich der Unterschied zu den Zeitpunkten 1h und 4h signifikant (Abb. 3.7., Abb. 3.8.).



**Abb. 3.6.:** Bindung von Gerinnungsfaktor VIIa-FITC an Thrombozyten *ex vivo*. Placebogruppe, gestorbene Tiere (n=4) vs. Placebogruppe, überlebende Tiere (n=5). Darstellung als Median der Fluoreszenz  $\pm$  S.E.M. Signifikanzen: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ .



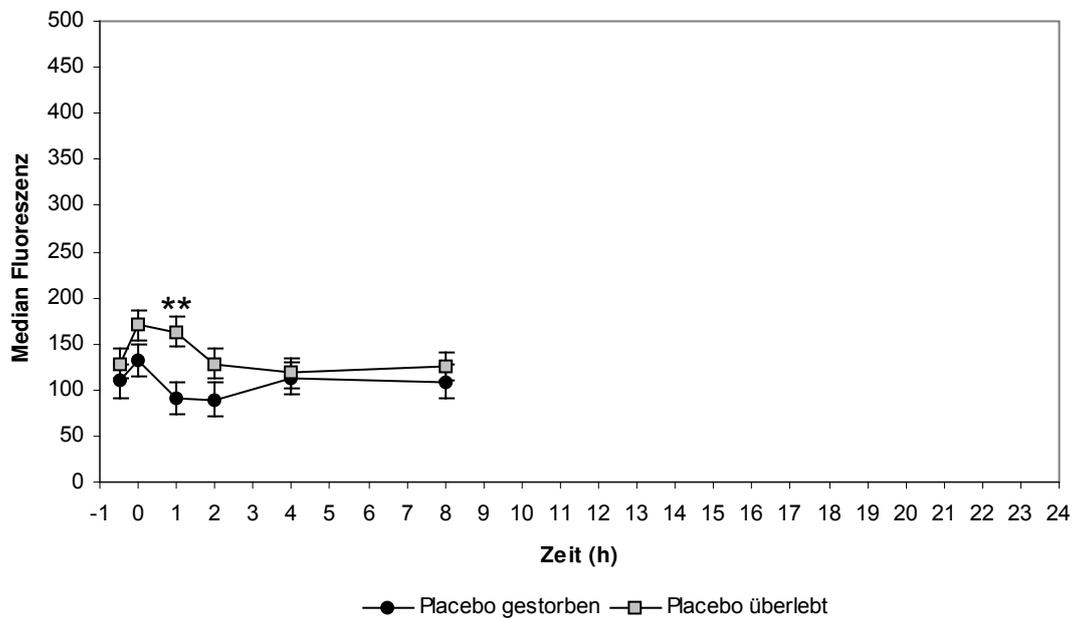
**Abb. 3.7.:** Bindung von Gerinnungsfaktor VIIa-FITC an Thrombozyten nach Aktivierung *in vitro* mit 1,5µg/ml Kollagen. Placebogruppe, gestorbene Tiere (n=4) vs. Placebogruppe, überlebende Tiere (n=5). Darstellung als Median der Fluoreszenz ± S.E.M. Signifikanzen: \* p<0.05.



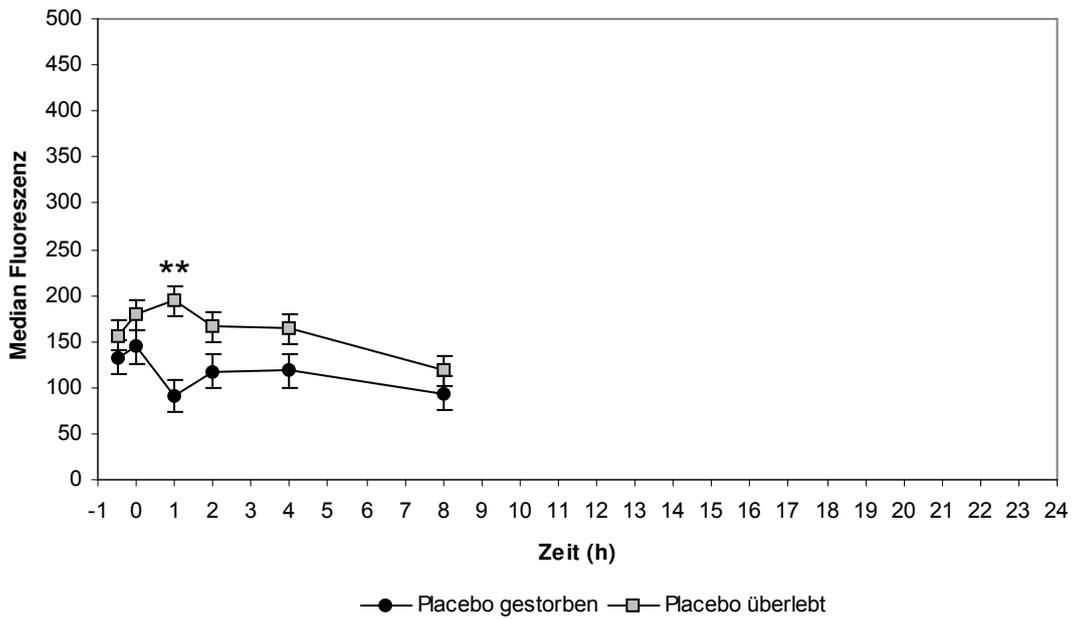
**Abb. 3.8.:** Bindung von Gerinnungsfaktor VIIa-FITC an Thrombozyten nach Aktivierung mit 1,5µg/ml Kollagen *in vitro*. Placebogruppe, gestorbene Tiere (n=4) vs. Placebogruppe, überlebende Tiere (n=5). Darstellung als Differenz der relativen Fluoreszenz zur *ex vivo* Messung ± S.E.M. Signifikanzen: \* p<0.05.

### 3.1.3. von-Willebrand-Faktor-Bindung an Thrombozyten

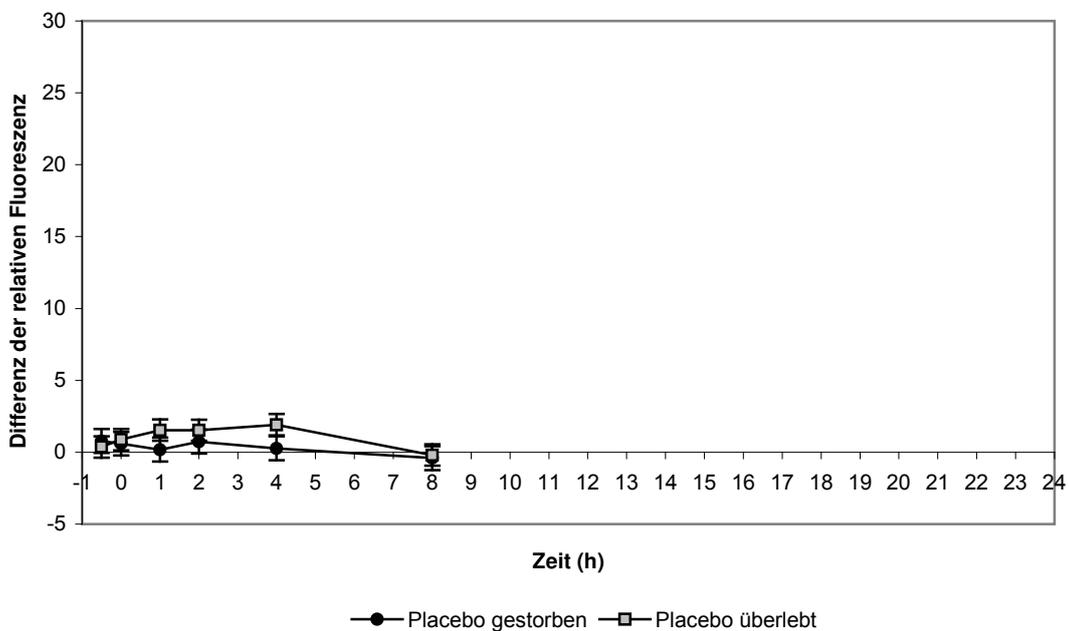
Die *ex vivo*-Anbindung des von-Willebrand-Faktors lag in der Gruppe der überlebenden Tiere tendenziell über der Gruppe der gestorbenen Tiere. Zum Messzeitpunkt 1h erreichte dieser Unterschied das Signifikanzniveau (Abb. 3.9.). Nach Aktivierung *in vitro* mit 0,8µg/ml Ristocetin lag die Anbindungsfähigkeit in der Gruppe der überlebenden Tiere ebenfalls tendenziell höher als in der Gruppe der gestorbenen Tiere und war auch hier zum Zeitpunkt 1h signifikant (Abb. 3.10., Abb. 3.11.).



**Abb. 3.9.:** Bindung von von-Willebrand-Faktor-FITC an Thrombozyten *ex vivo*. Placebogruppe, gestorbene Tiere (n=4) vs. Placebogruppe, überlebende Tiere (n=5). Darstellung als Median der Fluoreszenz  $\pm$  S.E.M. Signifikanzen: \*\*  $p \leq 0.01$ .



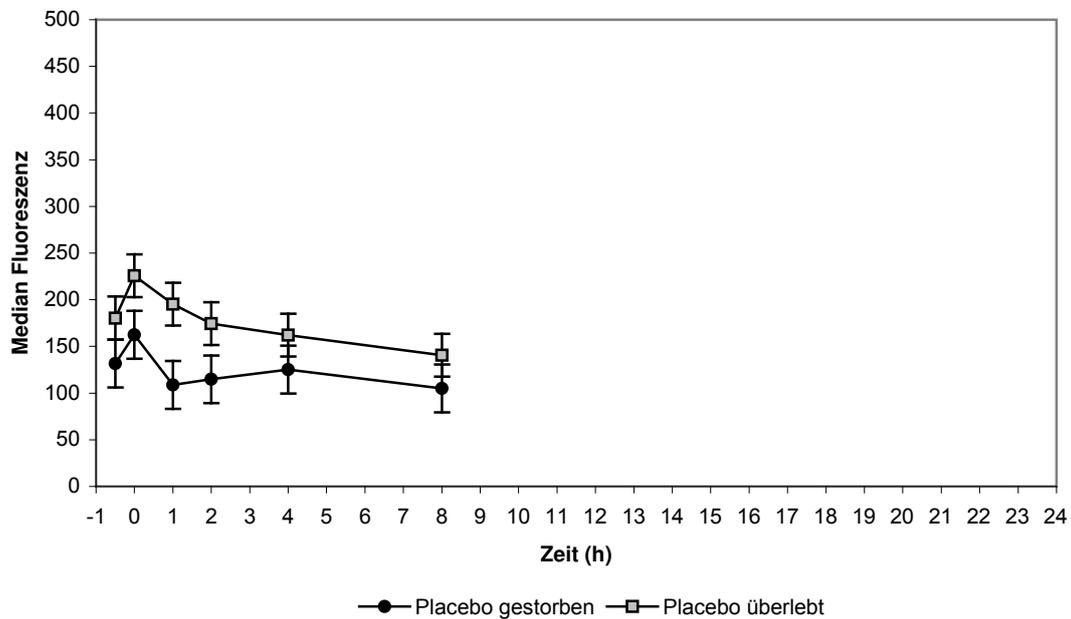
**Abb. 3.10.:** Bindung von von-Willebrand-Faktor-FITC an Thrombozyten nach Aktivierung *in vitro* mit 0,8µg/ml Ristocetin. Placebogruppe, gestorbene Tiere (n=4) vs. Placebogruppe, überlebende Tiere (n=5). Darstellung als Median der Fluoreszenz ± S.E.M. Signifikanzen: \*\* p≤0.01.



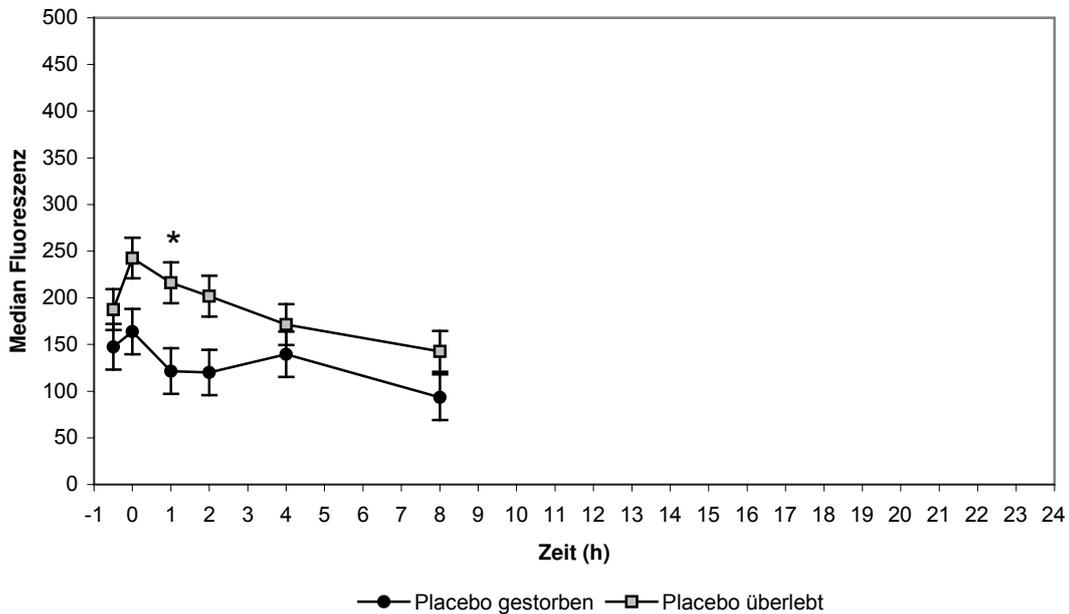
**Abb. 3.11.:** Bindung von von-Willebrand-Faktor-FITC an Thrombozyten nach Aktivierung mit 0,8µg/ml Ristocetin *in vitro*. Placebogruppe, gestorbene Tiere (n=4) vs. Placebogruppe, überlebende Tiere (n=5). Darstellung als Differenz der relativen Fluoreszenz zur *ex vivo* Messung ± S.E.M.

### 3.1.4. Gerinnungsfaktor XIII-Bindung an Thrombozyten

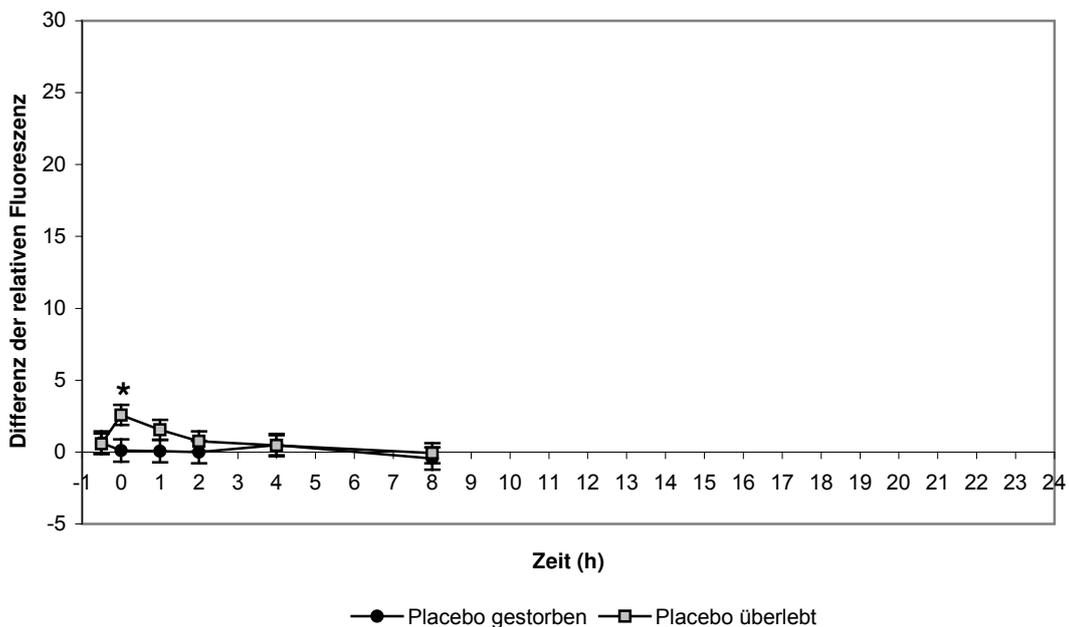
Sowohl *ex vivo* als auch nach *in vitro*-Aktivierung mit Kollagen lag die Anbindung des Gerinnungsfaktors XIII in der Gruppe der überlebenden Tiere tendenziell über der Gruppe der gestorbenen Tiere. Nach Aktivierung mit 1,5µg/ml Kollagen erreichte dieser Unterschied zum Messzeitpunkt 1h das Signifikanzniveau (Abb. 3.12. bis Abb. 3.14.)



**Abb. 3.12.:** Bindung von Gerinnungsfaktor XIII-FITC an Thrombozyten *ex vivo*. Placebogruppe, gestorbene Tiere (n=4) vs. Placebogruppe, überlebende Tiere (n=5). Darstellung als Median der Fluoreszenz  $\pm$  S.E.M.



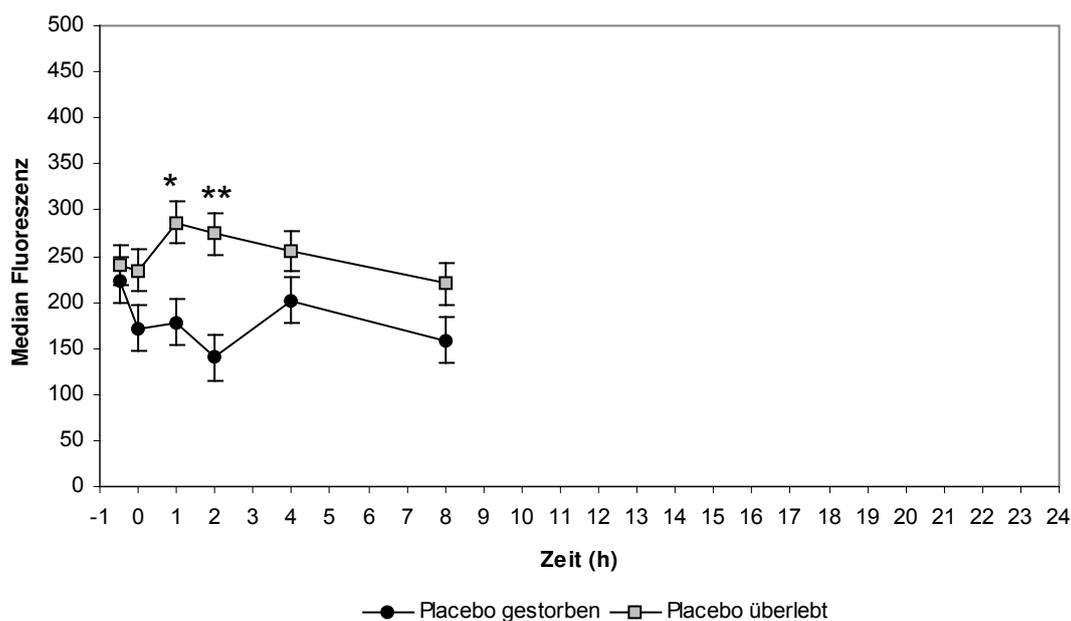
**Abb. 3.13.:** Bindung von Gerinnungsfaktor XIII-FITC an Thrombozyten nach Aktivierung *in vitro* mit 1,5 $\mu$ g/ml Kollagen. Placebogruppe, gestorbene Tiere (n=4) vs. Placebogruppe, überlebende Tiere (n=5). Darstellung als Median der Fluoreszenz  $\pm$  S.E.M. Signifikanzen: \* p<0.05.



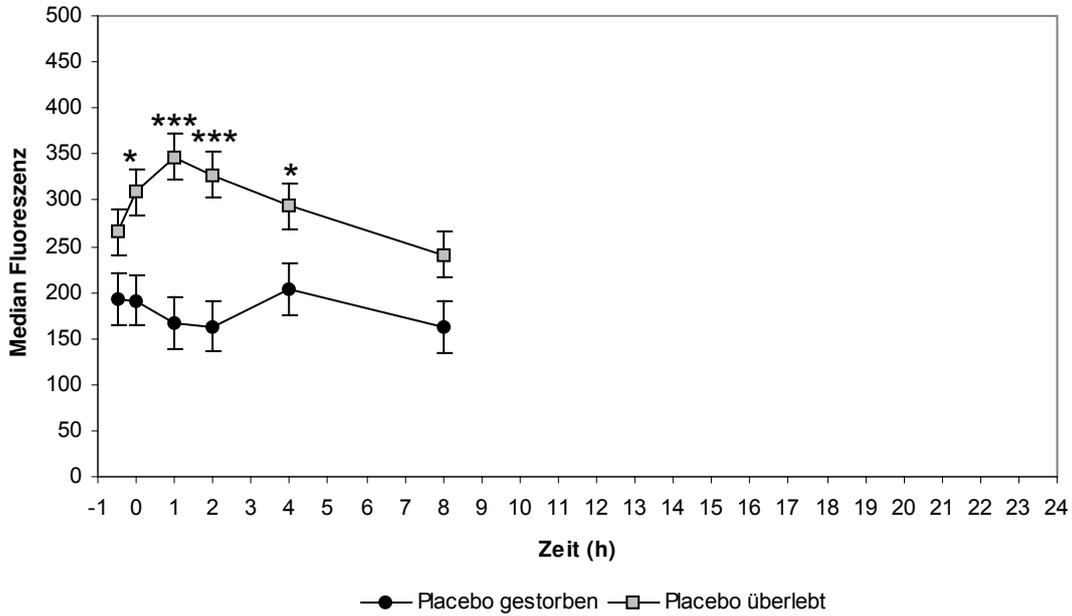
**Abb. 3.14.:** Bindung von Gerinnungsfaktor XIII-FITC an Thrombozyten nach Aktivierung mit 1,5 $\mu$ g/ml Kollagen *in vitro*. Placebogruppe, gestorbene Tiere (n=4) vs. Placebogruppe, überlebende Tiere (n=5). Darstellung als Differenz der relativen Fluoreszenz zur *ex vivo* Messung  $\pm$  S.E.M als Marker für die Aktivierbarkeit. Signifikanzen: \* p<0.05.

### 3.1.5. Fibrinogen-Bindung an Thrombozyten

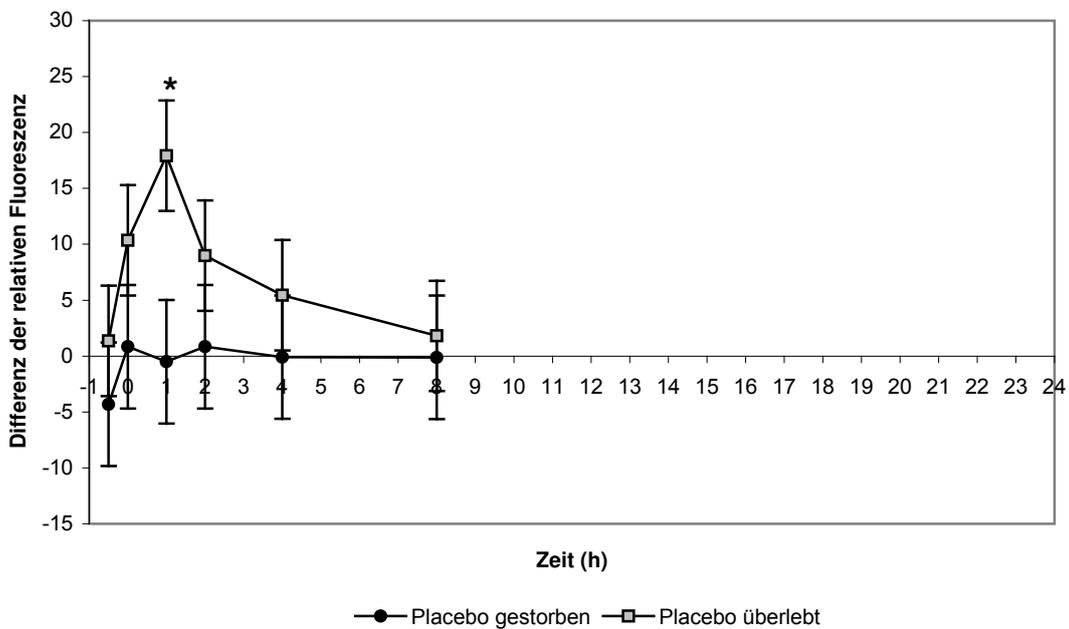
Die Fibrinogen-Bindung *ex vivo* und nach Aktivierung *in vitro* wurde in einer parallel durchgeführten Dissertation untersucht (DANIELA STOLTE, Dissertation, Medizinische Fakultät der WWU Münster). Hierbei zeigte sich analog eine höhere Anbindung in der Gruppe der überlebenden Tiere im Vergleich zur Gruppe der gestorbenen Tiere. Dieser Unterschied erreichte zu den Zeitpunkten 1h und 2h das Signifikanzniveau (Abb. 3.15.). Nach *in vitro*-Aktivierung mit 1,5µg/ml Kollagen lag die Anbindung des Fibrinogen in der überlebenden Gruppe deutlich über der Gruppe der gestorbenen Tiere. Zu den Zeitpunkten Baseline, 'Verumeffekt', 1h, 2h und 4h war der Unterschied jeweils statistisch signifikant (Abb. 3.16., Abb. 3.17.).



**Abb. 3.15.:** Bindung von Fibrinogen-FITC an Thrombozyten *ex vivo*. Placebogruppe, gestorbene Tiere (n=4) vs. Placebogruppe, überlebende Tiere (n=5). Darstellung als Median der Fluoreszenz  $\pm$  S.E.M. Signifikanzen: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ . (DANIELA STOLTE, Dissertation, Medizinische Fakultät der WWU Münster)



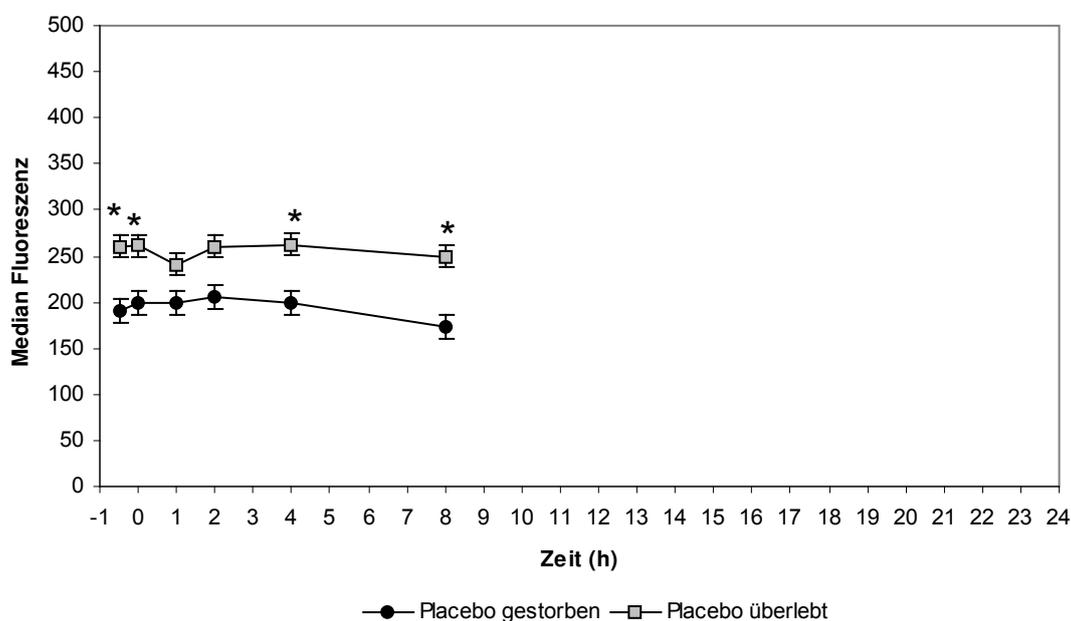
**Abb. 3.16.:** Bindung von Fibrinogen-FITC an Thrombozyten nach Aktivierung mit 1,5µg/ml Kollagen *in vitro*. Placebogruppe, gestorbene Tiere (n=4) vs. Placebogruppe, überlebende Tiere (n=5). Darstellung als Median der Fluoreszenz ± S.E.M. Signifikanzen: \* p<0.05, \*\*\* p≤0.001. (DANIELA STOLTE, Dissertation, Medizinische Fakultät der WWU Münster)



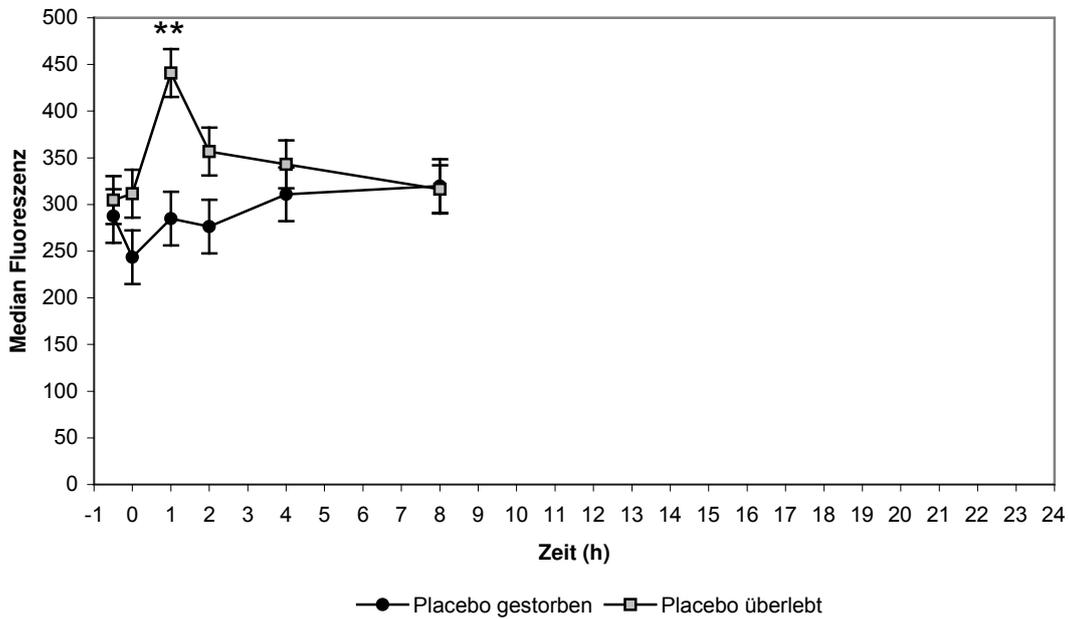
**Abb. 3.17.:** Bindung von Fibrinogen-FITC an Thrombozyten nach Aktivierung mit 1,5µg/ml Kollagen *in vitro*. Placebogruppe, gestorbene Tiere (n=4) vs. Placebogruppe, überlebende Tiere (n=5). Darstellung als Differenz der relativen Fluoreszenz zur *ex vivo* Messung ± S.E.M. Signifikanzen: \* p<0.05. (DANIELA STOLTE, Dissertation, Medizinische Fakultät der WWU Münster)

### 3.1.6. Monozyten

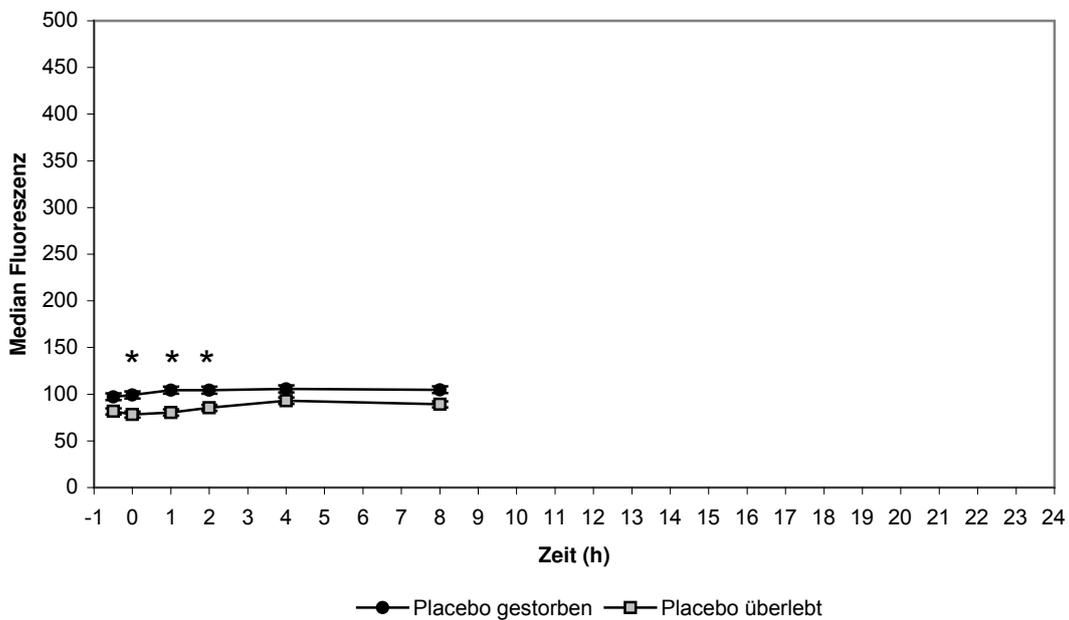
In der Untersuchung der Fibrinogen-Bindung *ex vivo* an Monozyten zeigte sich in der Gruppe der überlebenden Tiere eine tendenziell höhere Bindung als in der Gruppe der gestorbenen Tiere. Zur Baseline, zur Baseline ‚Verumeffekt‘, 4h und 8h war dieser Unterschied statistisch signifikant (Abb. 3.18.). Ähnliches zeigte sich im Nachweis von *in vivo* gebundenem Fibrinogen, welches über den Fibrinogen-Antikörper detektiert wurde. Hier erreichte der Unterschied zum Zeitpunkt 1h das Signifikanzniveau (Abb. 3.19.). Dagegen zeigte sich in der Gruppe der überlebenden Tiere eine etwas geringere CD11b-Expression als in der Gruppe der gestorbenen Tiere. Zur Baseline ‚Verumeffekt‘, 1h und 2h war dieser Unterschied signifikant (Abb. 3.20.). Der Anteil der Monozyten-Leukozyten-Assoziate war in der Gruppe der überlebenden Tiere tendenziell im Verlauf zunächst etwas niedriger, später etwas höher als in der Gruppe der gestorbenen Tiere. Dieser Unterschied erreichte jedoch nicht das Signifikanzniveau (Abb. 3.21.).



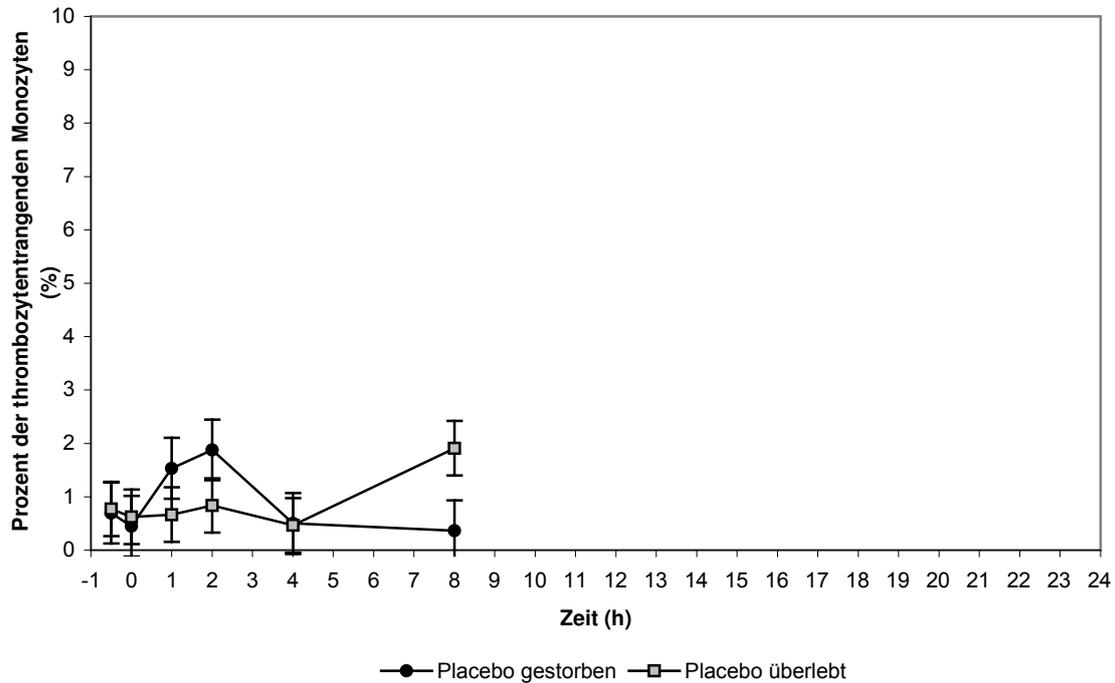
**Abb. 3.18.:** Bindung von Fibrinogen-FITC an Monozyten *ex vivo*. Placebogruppe, gestorbene Tiere (n=4) vs. Placebogruppe, überlebende Tiere (n=5). Darstellung als Median der Fluoreszenz  $\pm$  S.E.M. Signifikanzen: \*  $p < 0.05$ .



**Abb. 3.19.:** Bindung von endogenem Fibrinogen an Monozyten *ex vivo* (gemessen mit anti-Fibrinogen-Antikörper-FITC). Placebogruppe, gestorbene Tiere (n=4) vs. Placebogruppe, überlebende Tiere (n=5). Darstellung als Median der Fluoreszenz  $\pm$  S.E.M. Signifikanzen: \*\*  $p \leq 0.01$ .



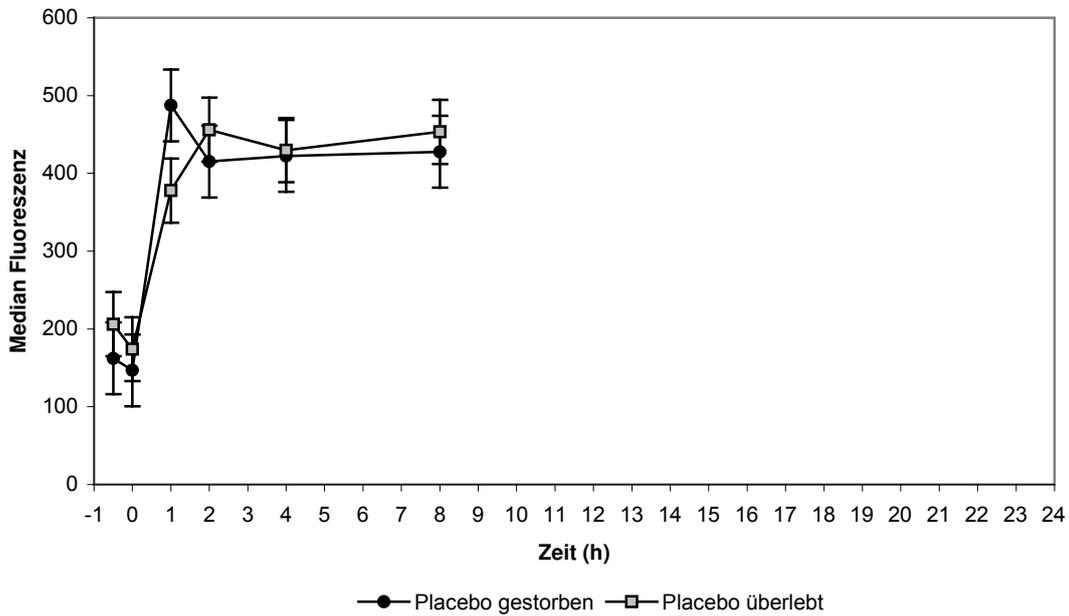
**Abb. 3.20.:** CD11b-Expression auf Monozyten *ex vivo*. Placebogruppe, gestorbene Tiere (n=4) vs. Placebogruppe, überlebende Tiere (n=5). Darstellung als Median der Fluoreszenz  $\pm$  S.E.M. Signifikanzen: \*  $p < 0.05$ .



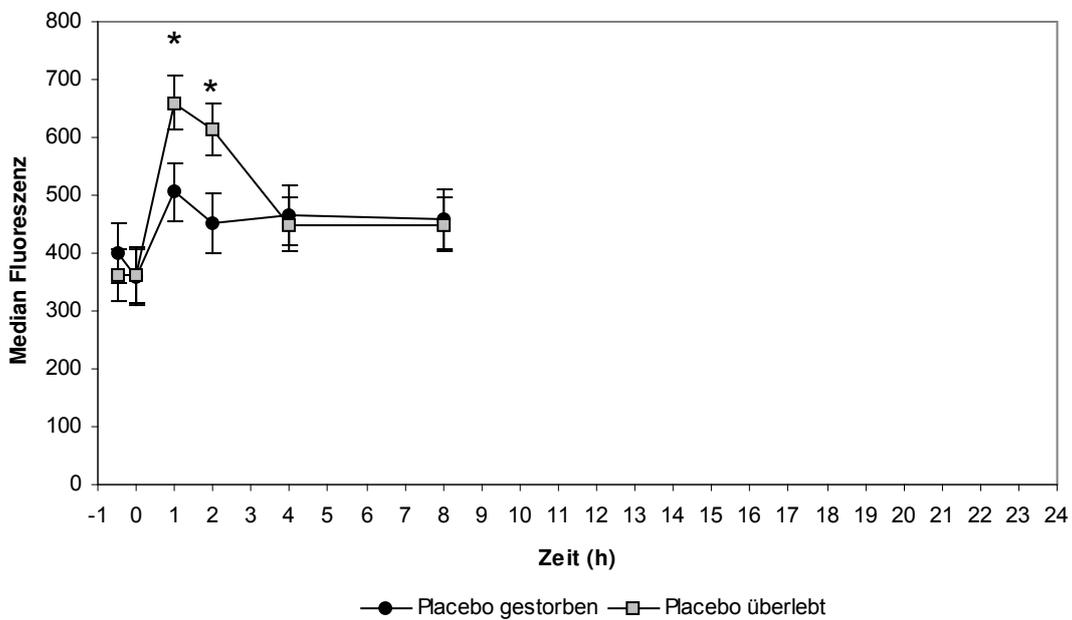
**Abb. 3.21.:** Monozyten-Thrombozyten-Assoziat *ex vivo*. Placebogruppe, gestorbene Tiere (n=4) vs. Placebogruppe, überlebende Tiere (n=5). Darstellung als Median der Fluoreszenz  $\pm$  S.E.M.

### 3.1.7. PMNL

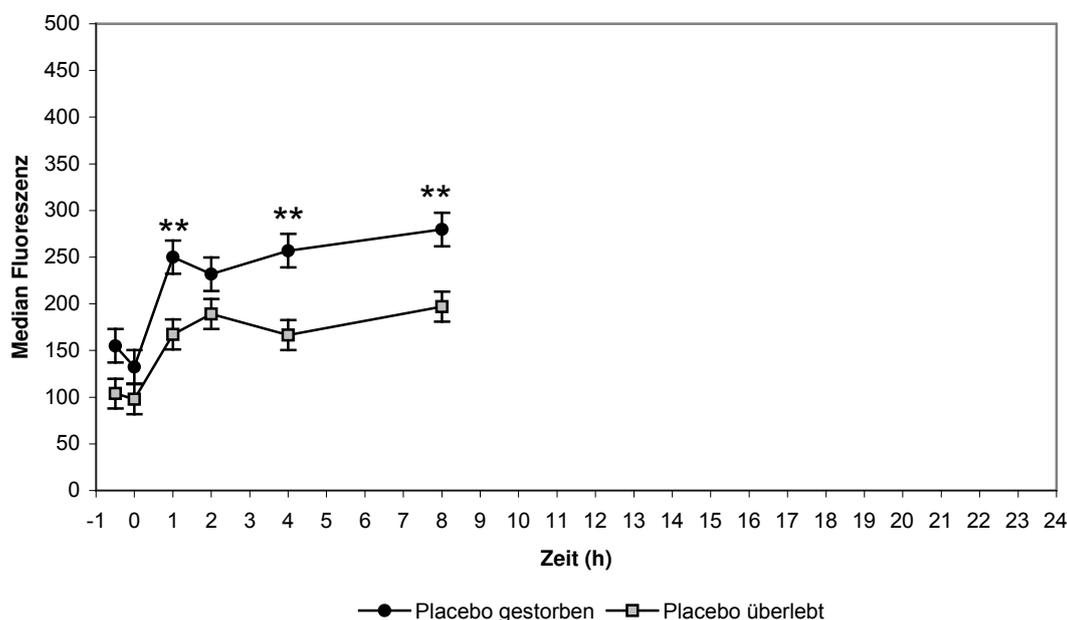
In der Bindung von exogenem Fibrinogen (Fibrinogen-FITC) an PMNL *ex vivo* zeigte sich kein Unterschied zwischen den überlebenden Tieren und den gestorbenen Tieren (Abb. 3.22.). Bei Betrachtung der *in vivo*-Fibrinogen-Bindung, welche über einen FITC-markierten Fibrinogen-Antikörper quantifiziert wurde, zeigte sich in der Gruppe der überlebenden Tiere eine tendenziell höhere Anbindung, welche zum Zeitpunkt 1h das Signifikanzniveau erreichte (Abb. 3.23.). Bei den überlebenden Tieren zeigte sich eine geringere CD11b-Expression als in der Gruppe der gestorbenen Tiere. Dieser Unterschied war zu den Zeitpunkten 1h, 4h und 8h statistisch signifikant (Abb. 3.24.).



**Abb. 3.22.:** Bindung von exogenem Fibrinogen (Fibrinogen-FITC) an PMNL *ex vivo*. Placebogruppe, gestorbene Tiere (n=4) vs. Placebogruppe, überlebende Tiere (n=5). Darstellung als Median der Fluoreszenz  $\pm$  S.E.M.



**Abb. 3.23.:** Bindung von endogenem Fibrinogen (Fibrinogen-Antikörper) an PMNL *ex vivo*. Placebogruppe, gestorbene Tiere (n=4) vs. Placebogruppe, überlebende Tiere (n=5). Darstellung als Median der Fluoreszenz  $\pm$  S.E.M. Signifikanzen: \*  $p < 0.05$ .



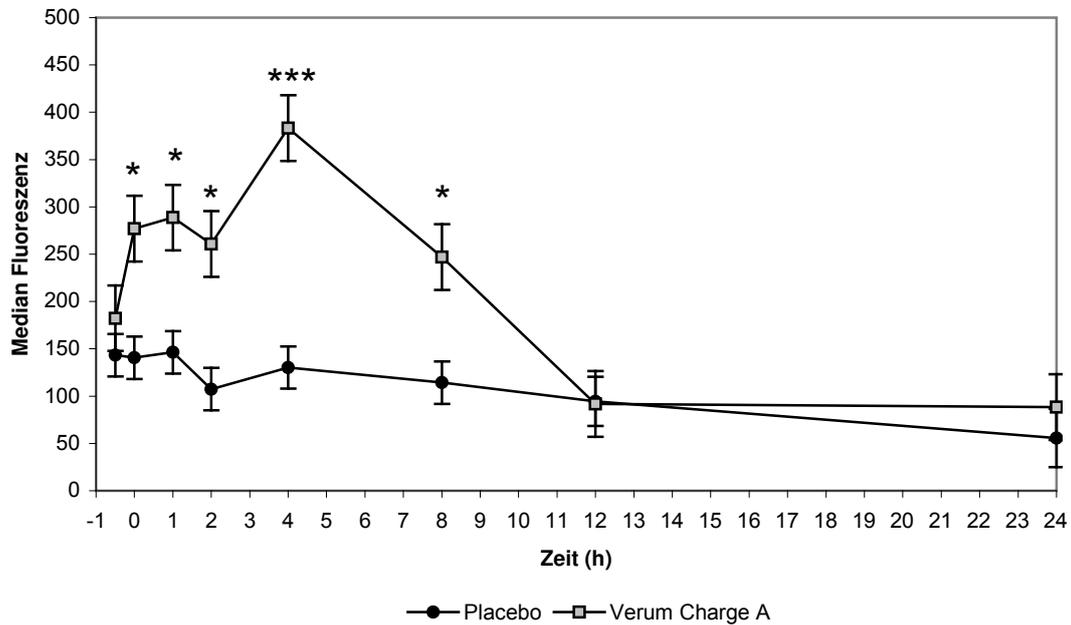
**Abb. 3.24.:** CD11b-Expression (CD11b-Antikörper-Bindung) auf PMNL *ex vivo*. Placebogruppe, gestorbene Tiere (n=4) vs. Placebogruppe, überlebende Tiere (n=5). Darstellung als Median der Fluoreszenz  $\pm$  S.E.M. Signifikanzen: \*\*  $p \leq 0.01$ .

## 3.2. Intergruppenvergleich: Thrombozyten

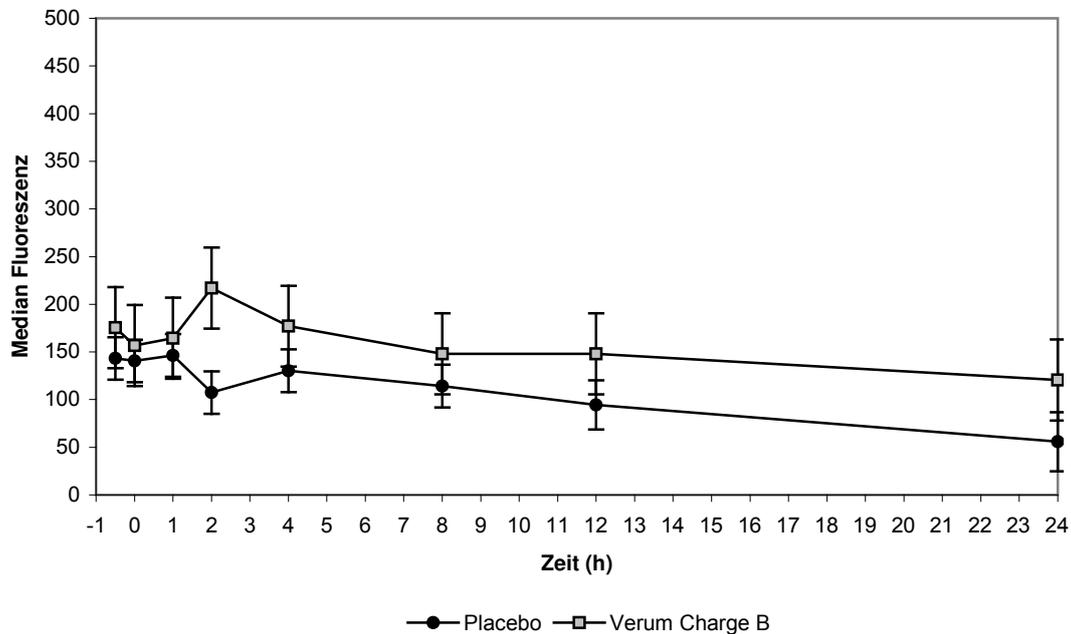
### 3.2.1. Thrombospondin-1-Bindung

Die Bindung von exogenem Thrombospondin-1 (Thrombospondin-1-FITC) an Thrombozyten zeigte zur Baseline keinen signifikanten Unterschied zwischen der Placebogruppe und den zwei Verumchargen. Zur Baseline ‚Verumeffekt‘ zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen Placebo und dem Verum der Charge B. Zwischen Placebo und dem Verum der Charge A zeigten sich dagegen zur Baseline ‚Verumeffekt‘ signifikant höhere Fluoreszenzen ( $p < 0.05$  und  $p \leq 0.01$ ).

In der Gruppe der Verumcharge A zeigten sich zu den Zeitpunkten 1h, 2h, 4h und 8h signifikant höhere Thrombospondin-1-Anbindungen an Thrombozyten als in der Placebogruppe. Zu den Zeitpunkten 12h und 24h stellte sich wiederum kein signifikanter Unterschied zur Placebogruppe dar (Abb. 3.25.). In der Gruppe der Verumcharge B zeigte sich zu keinem Messzeitpunkt ein signifikanter Unterschied zur Placebogruppe (Abb. 3.26.).



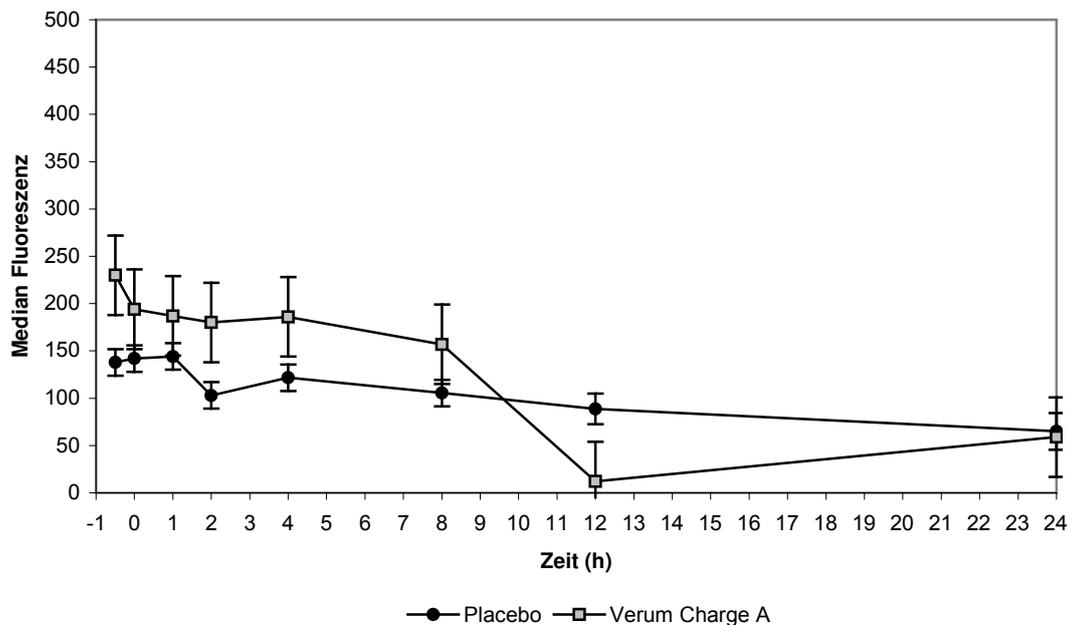
**Abb. 3.25.:** Bindung von Thrombospondin-1-FITC an Thrombozyten *ex vivo*. Verumgruppe mit Charge A (n=3) vs. Placebogruppe (n=9). Darstellung als Median der Fluoreszenz  $\pm$  S.E.M. Signifikanzen: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ .



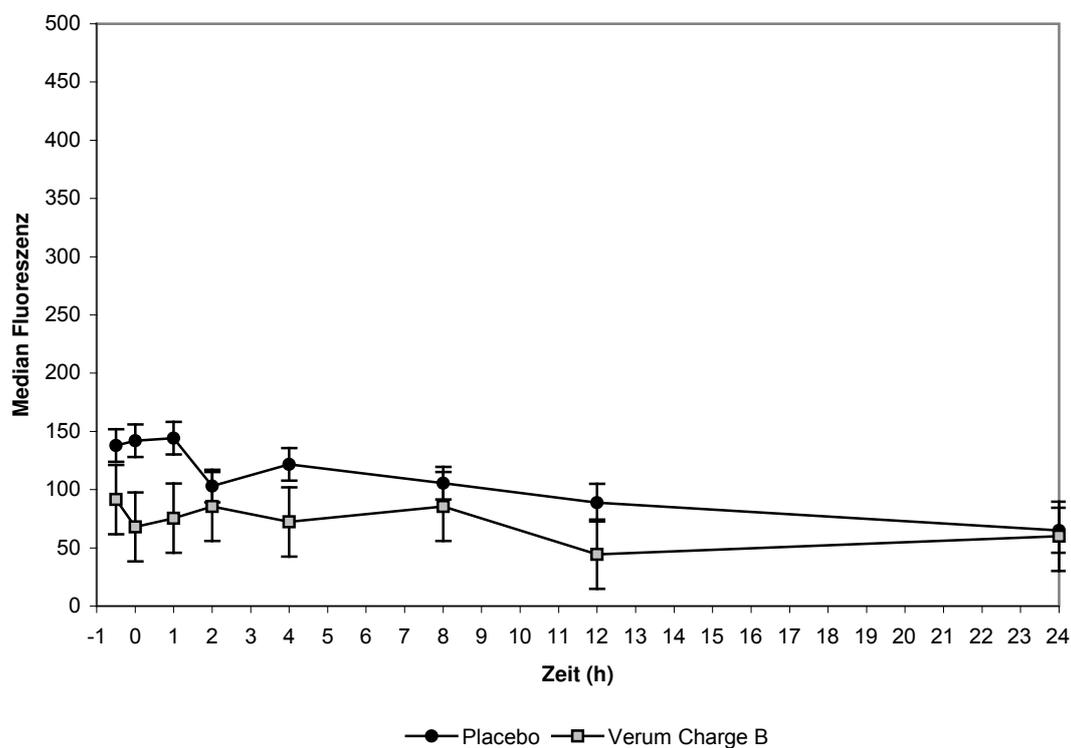
**Abb. 3.26.:** Bindung von Thrombospondin-1-FITC an Thrombozyten *ex vivo*. Verumgruppe mit Charge B (n=2) vs. Placebogruppe (n=9). Darstellung als Median der Fluoreszenz  $\pm$  S.E.M.

### 3.2.2. Gerinnungsfaktor VIIa-Bindung

In der Anbindung des Gerinnungsfaktors VIIa an Thrombozyten *ex vivo* zeigte sich im Vergleich der zwei Verumchargen A und B mit der Placebogruppe zu keinem Messzeitpunkt ein signifikanter Unterschied (Abb. 3.27., Abb. 3.28.). In der Charge A zeigte sich jedoch die Tendenz, dass die Faktor VIIa-Anbindung zwischen 1h und 8h größer als in der Placebogruppe war. Danach sank die Anbindungsrate unter die der Placebogruppe, während in der Chargen B die Anbindung in der Verumgruppe zu allen Zeitpunkten niedriger als in der Placebogruppe war.



**Abb. 3.27.:** Bindung von Gerinnungsfaktor VIIa-FITC an Thrombozyten *ex vivo*. Verumgruppe mit Charge A (n=3) vs. Placebogruppe (n=9). Darstellung als Median der Fluoreszenz  $\pm$  S.E.M.

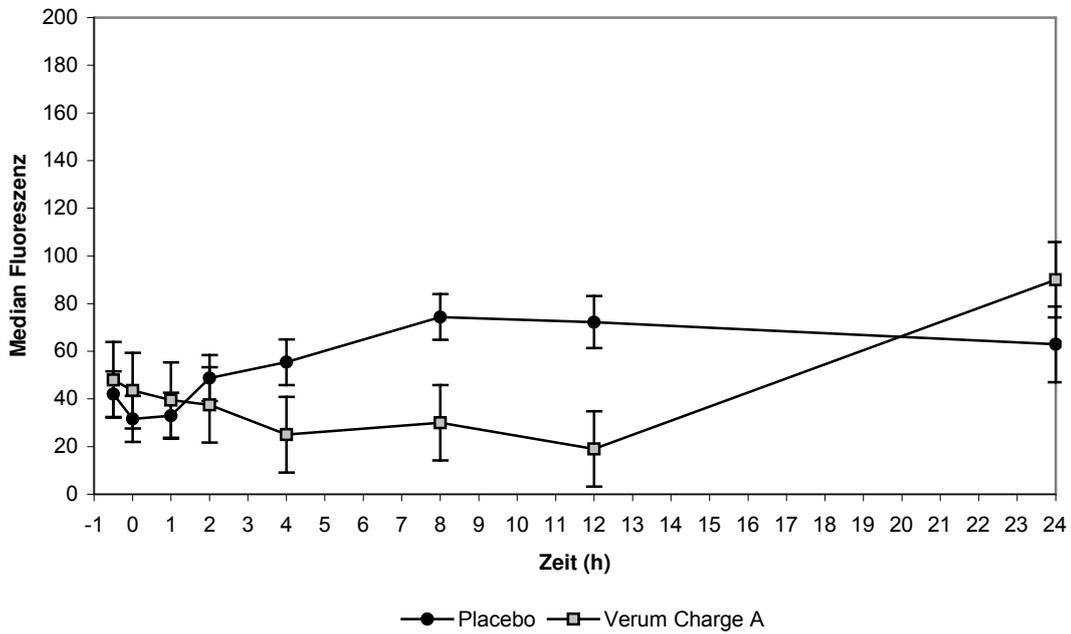


**Abb. 3.28.:** Bindung von Gerinnungsfaktor VIIa-FITC an Thrombozyten *ex vivo*. Verumgruppe mit Charge B (n=2) vs. Placebogruppe (n=9). Darstellung als Median der Fluoreszenz  $\pm$  S.E.M.

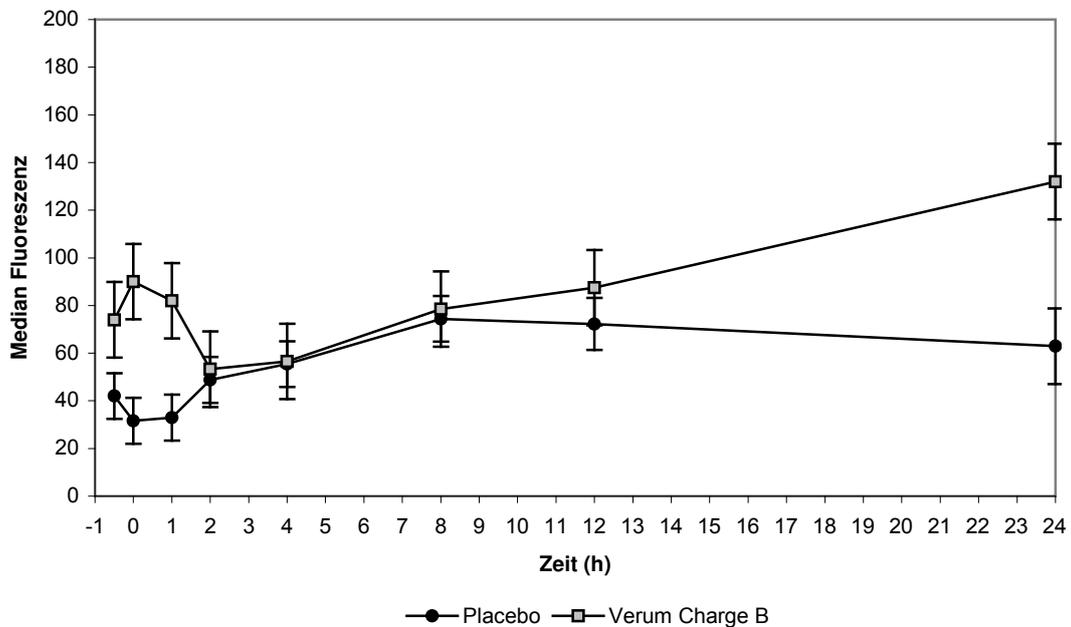
### 3.2.3. Annexin V-Bindung

In der Annexin V-Bindung an Thrombozyten *ex vivo* zeigte sich zur Baseline und zur Baseline ‚Verumeffekt‘ in beiden Versuchsgruppen kein Unterschied zur Placebogruppe.

Zu allen Messzeitpunkten in den beiden Verumgruppen gab es keinen signifikanten Unterschied zur Placebogruppe (Abb. 3.29., Abb. 3.30.). Als Tendenz zeigte sich in der Verumgruppe der Charge A zwischen den Zeitpunkten 2h und 12h eine niedrigere Annexin V-Anbindung als in der Placebogruppe. In der Gruppe der Charge B zeigte sich dagegen bis zum Zeitpunkt 2h eine höhere Annexin V-Bindung an Thrombozyten als in der Placebogruppe.



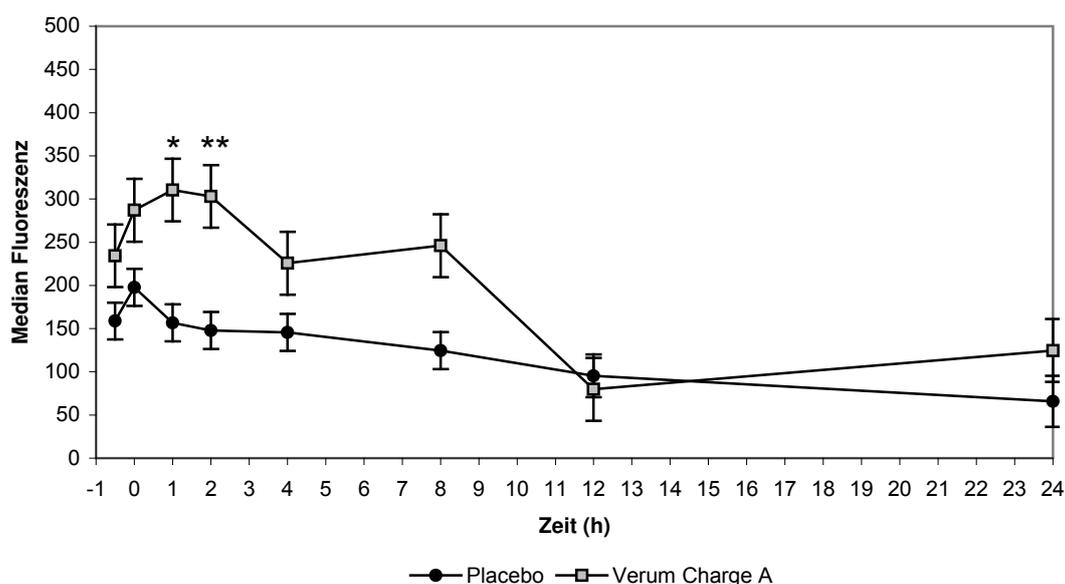
**Abb. 3.29.:** Bindung von Annexin V-FITC an Thrombozyten *ex vivo*. Verumgruppe mit Charge A (n=3) vs. Placebogruppe (n=9). Darstellung als Median der Fluoreszenz  $\pm$  S.E.M.



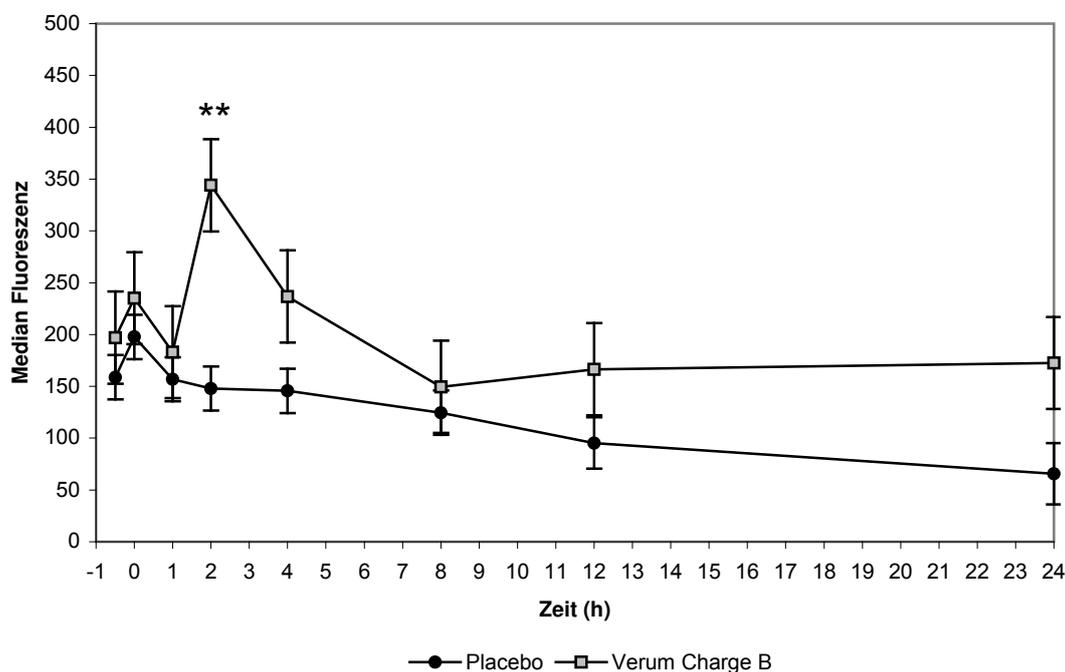
**Abb. 3.30.:** Bindung von Annexin V-FITC an Thrombozyten *ex vivo*. Verumgruppe mit Charge B (n=2) vs. Placebogruppe (n=9). Darstellung als Median der Fluoreszenz  $\pm$  S.E.M.

### 3.2.4. Gerinnungsfaktor XIII-Bindung

Die Gerinnungsfaktor XIII-Bindung an Thrombozyten zeigte zur Baseline keinen signifikanten Unterschied zwischen der Placebogruppe und den jeweiligen zwei Verumchargen. Zur Baseline ‚Verumeffekt‘ zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen Placebo und dem Verum der Chargen A und B. In der Gruppe der Verumcharge A zeigten sich zu den Zeitpunkten 1h und 2h signifikant höhere Anbindungen an Thrombozyten als in der Placebogruppe ( $p < 0.05$  und  $p \leq 0.01$ ). Es zeigte sich auch hier die Tendenz, dass die Faktor XIII-Bindung an Thrombozyten bis 12h über der der Placebogruppe liegt (Abb. 3.31.). In der Gruppe der Verumcharge B zeigte sich lediglich zum Messzeitpunkt 2h ein signifikanter Unterschied zur Placebogruppe ( $p \leq 0.01$ ) (Abb. 3.32.).



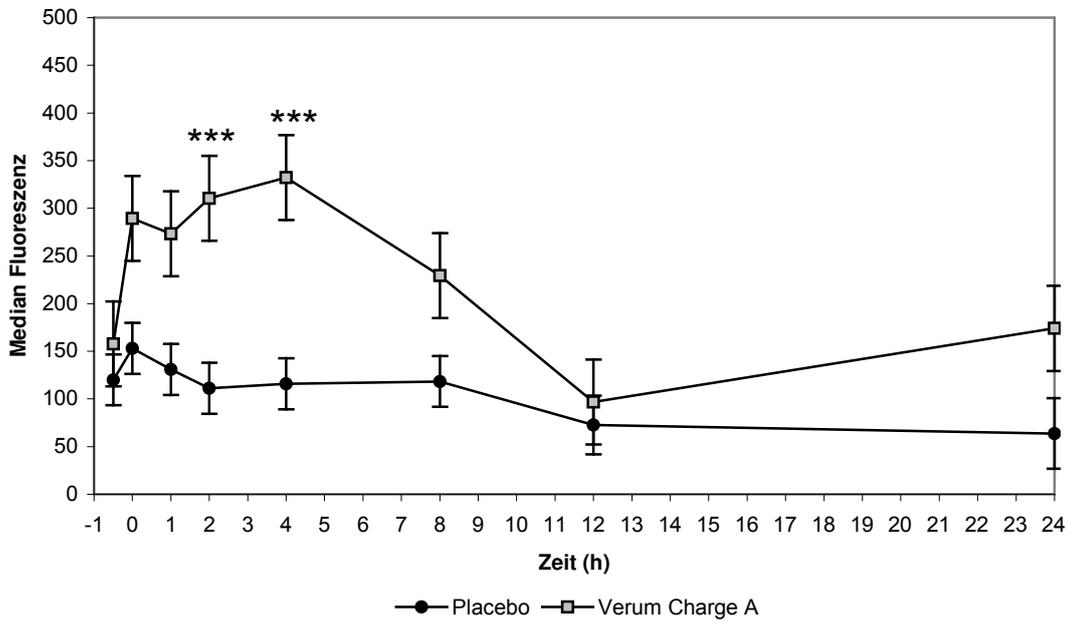
**Abb. 3.31.:** Bindung von Gerinnungsfaktor XIII-FITC an Thrombozyten *ex vivo*. Verumgruppe mit Charge A (n=3) vs. Placebogruppe (n=9). Darstellung als Median der Fluoreszenz  $\pm$  S.E.M. Signifikanzen: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ .



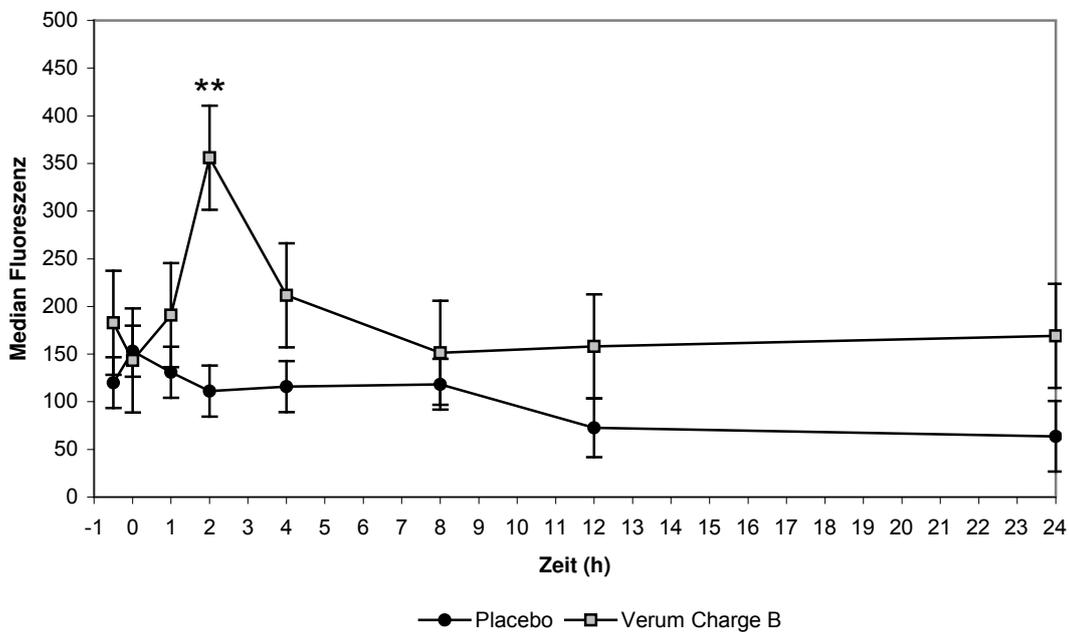
**Abb. 3.32.:** Bindung von Gerinnungsfaktor XIII-FITC an Thrombozyten *ex vivo*. Verumgruppe mit Charge B (n=2) vs. Placebogruppe (n=9). Darstellung als Median der Fluoreszenz  $\pm$  S.E.M. Signifikanzen: \*\*  $p \leq 0.01$ .

### 3.2.5. von-Willebrand-Faktor-Bindung

Die von-Willebrand-Faktor-Bindung an Thrombozyten zeigte zur Baseline keinen signifikanten Unterschied zwischen der Placebogruppe und den zwei Verumchargen. Zur Baseline ‚Verumeffekt‘ zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen Placebo und dem Verum der Chargen A und B. In der Gruppe der Verumcharge A zeigten sich zu den Zeitpunkten 2h und 4h signifikant höhere Anbindungen an Thrombozyten als in der Placebogruppe ( $p \leq 0.001$ ). Auch hier zeigte sich die Tendenz, dass bis zu 12h die vWF-Anbindung an Thrombozyten höher ist als in der Placebogruppe (Abb. 3.33.). In der Gruppe der Verumcharge B zeigte sich lediglich zum Messzeitpunkt 2h ein signifikanter Unterschied zur Placebogruppe ( $p \leq 0.01$ ) (Abb. 3.34.).



**Abb. 3.33.:** Bindung von von-Willebrand-Faktor-FITC an Thrombozyten *ex vivo*. Verumgruppe mit Charge A (n=3) vs. Placebogruppe (n=9). Darstellung als Median der Fluoreszenz  $\pm$  S.E.M. Signifikanzen: \*\*\*  $p < 0.001$ .



**Abb. 3.34.:** Bindung von von-Willebrand-Faktor-FITC an Thrombozyten *ex vivo*. Verumgruppe mit Charge B (n=2) vs. Placebogruppe (n=9). Darstellung als Median der Fluoreszenz  $\pm$  S.E.M. Signifikanzen: \*\*  $p < 0.01$ .

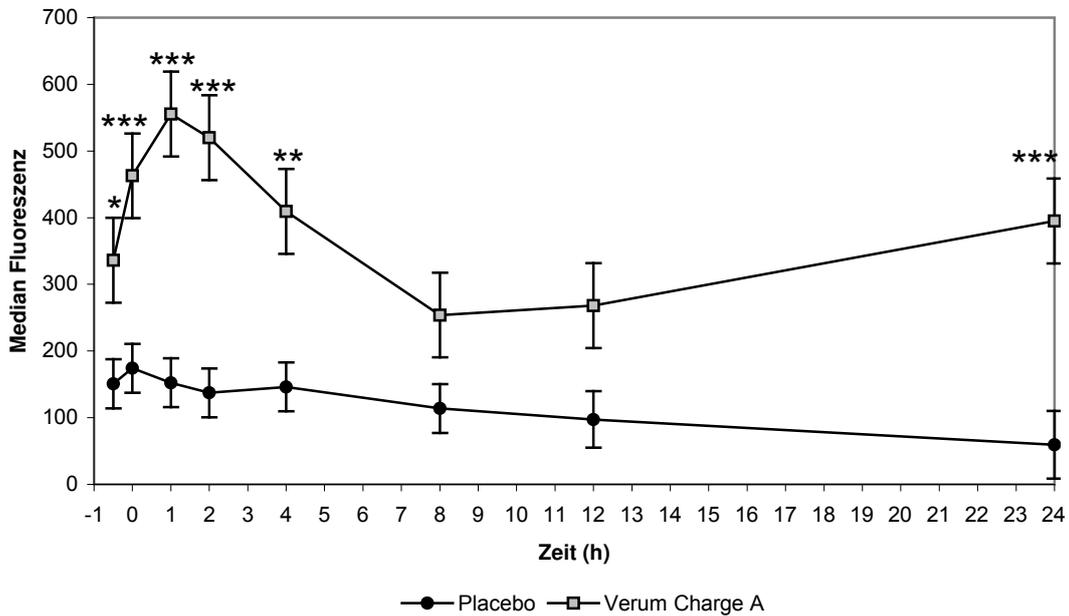
### 3.2.6. Aktivierbarkeit *in vitro*

#### 3.2.6.1. Aktivierung durch Kollagen

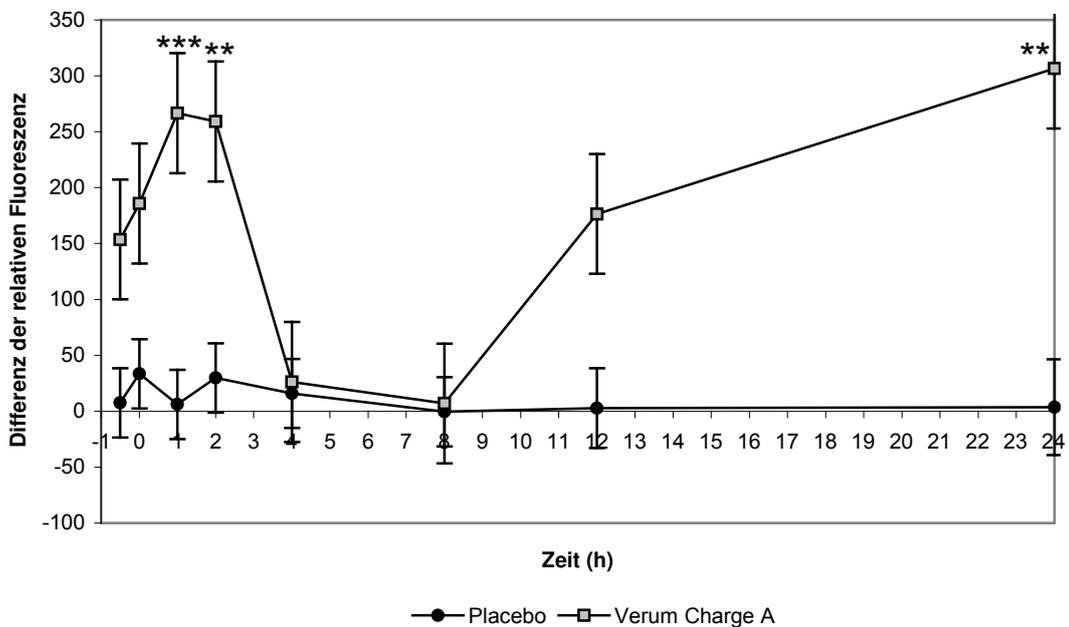
Nach Aktivierung *in vitro* durch 1,5µg/ml Kollagen zeigte sich in der Thrombospondin-1-Bindung an Thrombozyten zur Baseline ein signifikanter Unterschied zwischen der Placebogruppe und der Verumgruppe der Charge A ( $p < 0.05$ ). Auch zur Baseline ‚Verumeffekt‘ und zu den Zeitpunkten 1h, 2h, 4h und 24h zeigte sich in der Verumgruppe der Charge A eine signifikant höhere Anbindung nach Aktivierung durch Kollagen als in der Placebogruppe. Zur Baseline und den übrigen Zeitpunkten erreichten die Unterschiede nicht das Signifikanzniveau (Abb. 3.35.).

In der Gruppe, welche mit der Verumcharge B behandelt wurde, fand sich nach Aktivierung *in vitro* mit 1,5µg/ml Kollagen zu den beiden Baselines kein signifikanter Unterschied in der Thrombospondin-1-Bindung an Thrombozyten im Vergleich mit der Placebogruppe. Zu den Zeitpunkten 1h, 2h, 4h und 24h zeigte sich eine signifikant höhere Anbindung als in der Placebogruppe. Tendenziell zeigte sich auch zu den übrigen Zeitpunkten eine höhere Anbindung (Abb. 3.37.).

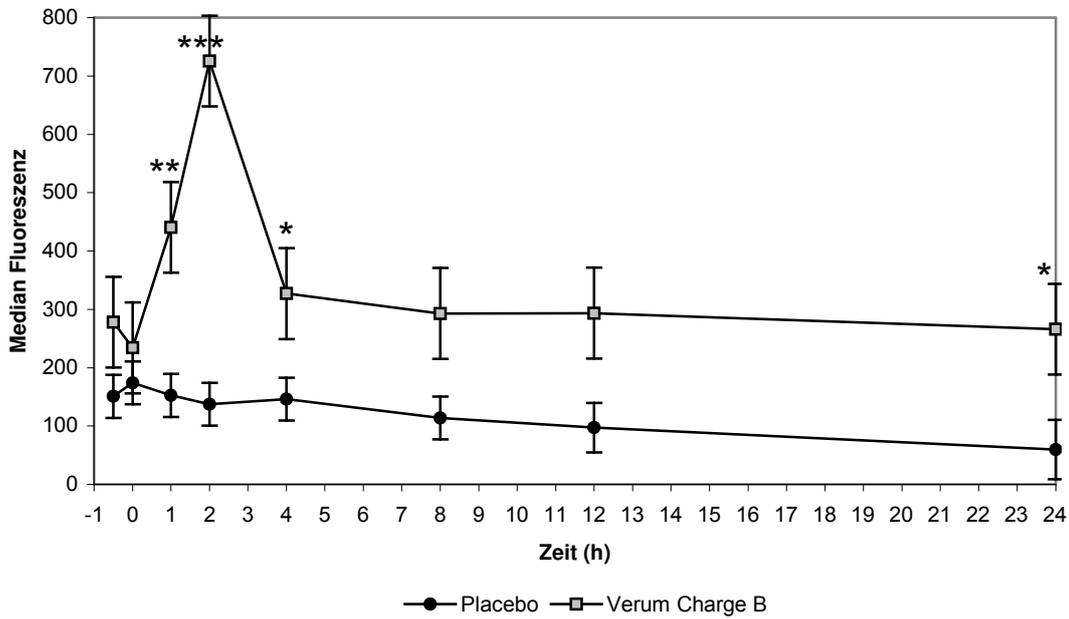
Betrachtet man die Differenz zwischen der *ex vivo*-Messung und der Messung nach Aktivierung, kann man unabhängig von der Voraktivierung die weitere Aktivierbarkeit *in vitro* beurteilen. In allen Messreihen zeigte sich in der Placebogruppe, dass durch die *in vitro*-Zugabe von Kollagen keine weitere Zunahme der Anbindung ausgelöst werden kann. Nach Aktivierung mit 1,5µg/ml Kollagen ließ sich in der Verumgruppe der Charge A zu den Zeitpunkten 1h, 2h und 24h, in der Verumgruppe der Charge B zu den Zeitpunkten 1h und 2h dagegen eine signifikante Zunahme der Thrombospondin-1-Anbindung feststellen (Abb. 3.36., Abb. 3.38.).



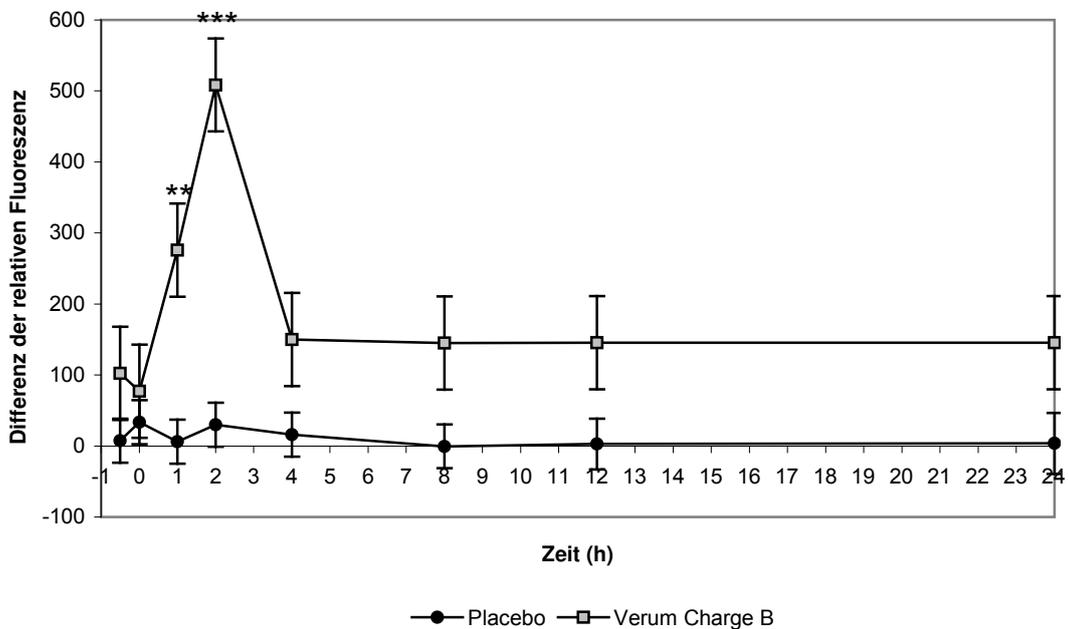
**Abb. 3.35.:** Bindung von Thrombospondin-1-FITC an Thrombozyten nach Aktivierung mit 1,5µg/ml Kollagen *in vitro*. Verumgruppe mit Charge A (n=3) vs. Placebogruppe (n=9). Darstellung als Median der Fluoreszenz ± S.E.M. Signifikanzen: \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001.



**Abb. 3.36.:** Bindung von Thrombospondin-1-FITC an Thrombozyten nach Aktivierung mit 1,5µg/ml Kollagen *in vitro*. Verumgruppe mit Charge A (n=3) vs. Placebogruppe (n=9). Darstellung als Differenz der relativen Fluoreszenz zur *ex vivo* Messung ± S.E.M, um die Aktivierbarkeit der Thrombozyten darzustellen. Signifikanzen: \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001.



**Abb. 3.37.:** Bindung von Thrombospondin-1-FITC an Thrombozyten nach Aktivierung mit 1,5µg/ml Kollagen *in vitro*. Verumgruppe mit Charge B (n=2) vs. Placebogruppe (n=9). Darstellung als Median der Fluoreszenz ± S.E.M. Signifikanzen: \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001.

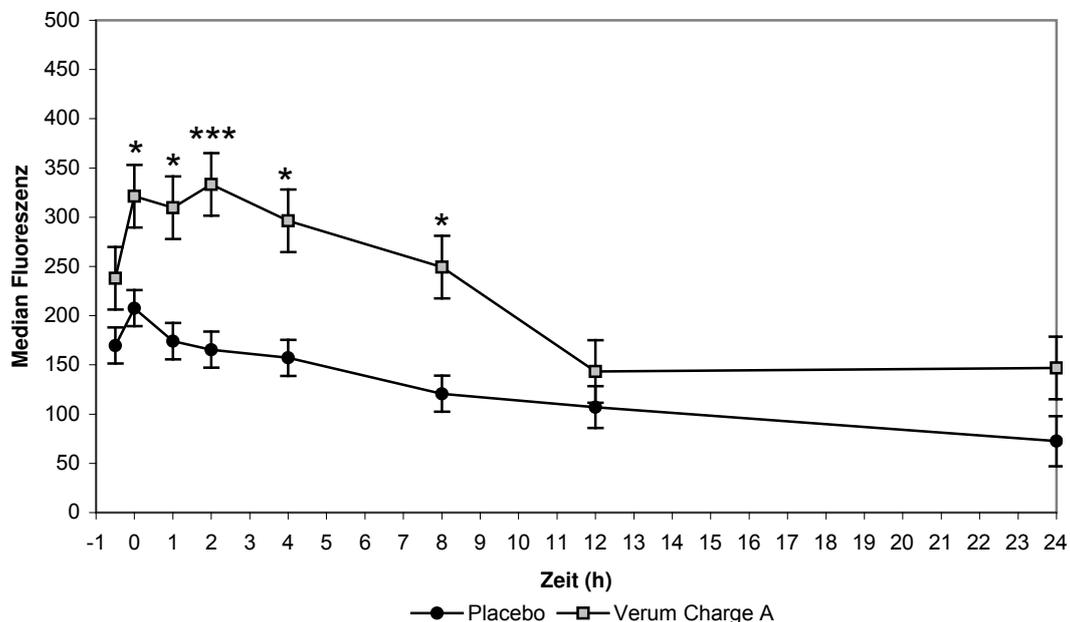


**Abb. 3.38.:** Bindung von Thrombospondin-1-FITC an Thrombozyten nach Aktivierung mit 1,5µg/ml Kollagen *in vitro*. Verumgruppe mit Charge B (n=2) vs. Placebogruppe (n=9). Darstellung als Differenz der relativen Fluoreszenz zur *ex vivo* Messung ± S.E.M. Signifikanzen: \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001.

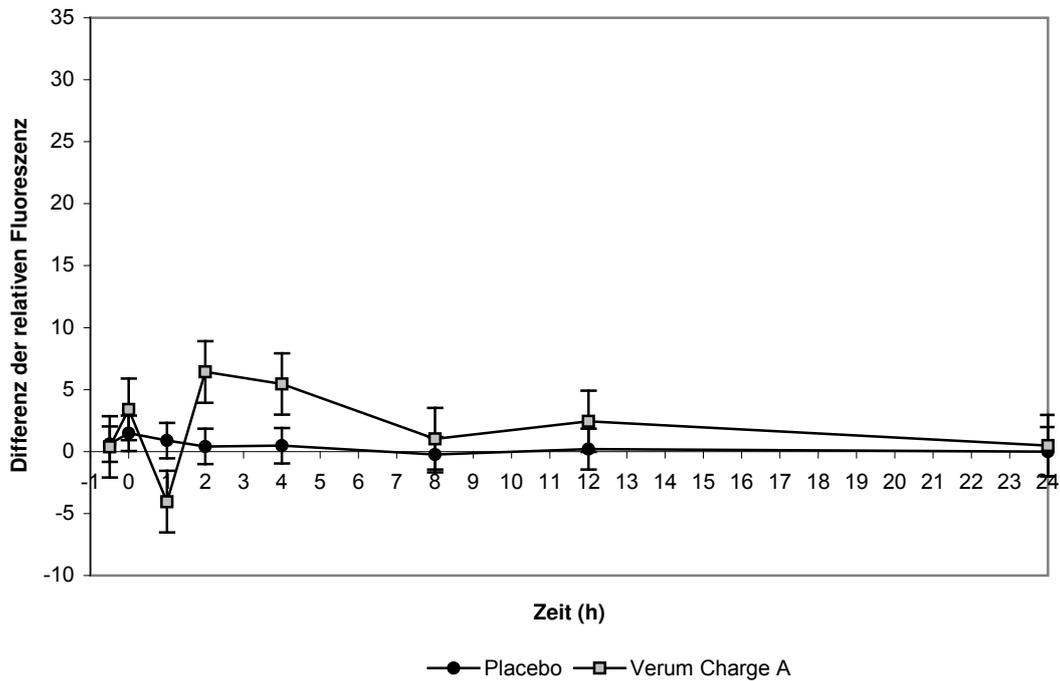
Eine signifikant höhere Anbindung des Gerinnungsfaktors XIII an Thrombozyten zeigte sich nach *in vitro*-Aktivierung mit 1,5µg/ml Kollagen in der Versuchsgruppe, welche mit dem Verum der Charge A behandelt wurde, zur Baseline ‚Verumeffekt‘, 1h, 2h, 4h und 8h im Vergleich mit der Placebogruppe (Abb. 3.39.).

In der Verumgruppe der Charge B zeigte sich nach *in vitro*-Aktivierung durch 1,5µg/ml Kollagen zu den Zeitpunkten 2h und 4h eine signifikant höhere Bindungsrate von Faktor XIII an Thrombozyten als in der Placebogruppe (Abb. 3.41.).

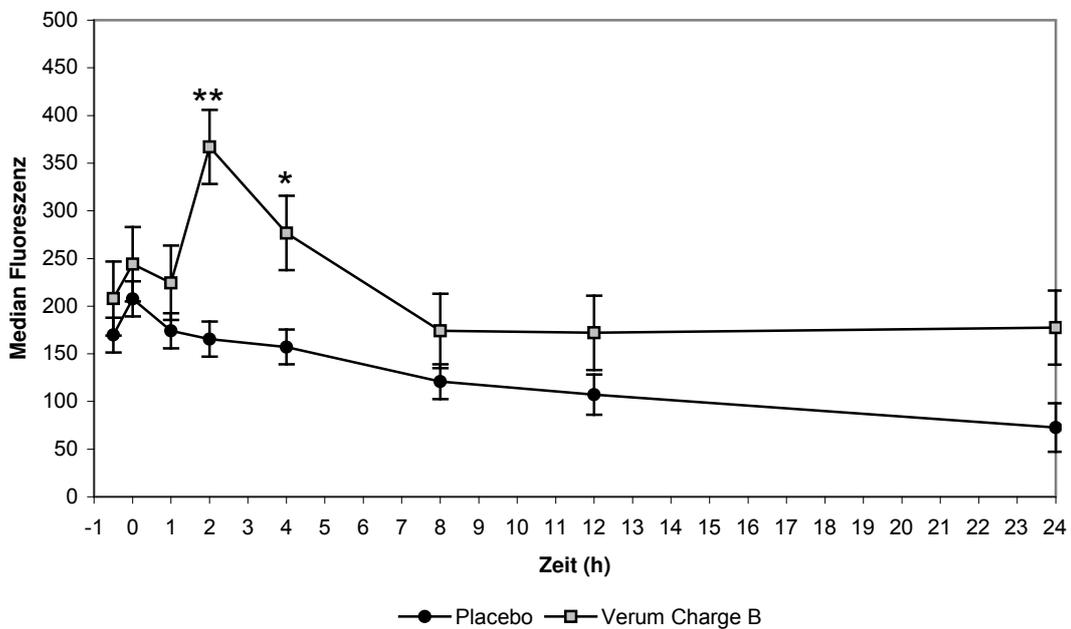
Auch hier wurde die Differenz zwischen der *ex vivo*-Messung und der Messung nach Aktivierung betrachtet, um unabhängig von der Voraktivierung die weitere Aktivierbarkeit *in vitro* beurteilen zu können. In allen Messreihen zeigte sich in der Placebogruppe, dass durch die *in vitro*-Zugabe von Kollagen keine weitere Zunahme der Anbindung ausgelöst werden kann. Nach Aktivierung mit 1,5µg/ml Kollagen zeigte sich in der Verumgruppe der Charge A ebenfalls keine signifikante Zunahme der Anbindung. Auch in der Verumgruppe der Charge B zeigte sich nach Aktivierung mit 1,5µg/ml Kollagen keine signifikante Änderung (Abb. 3.40., Abb. 3.42.).



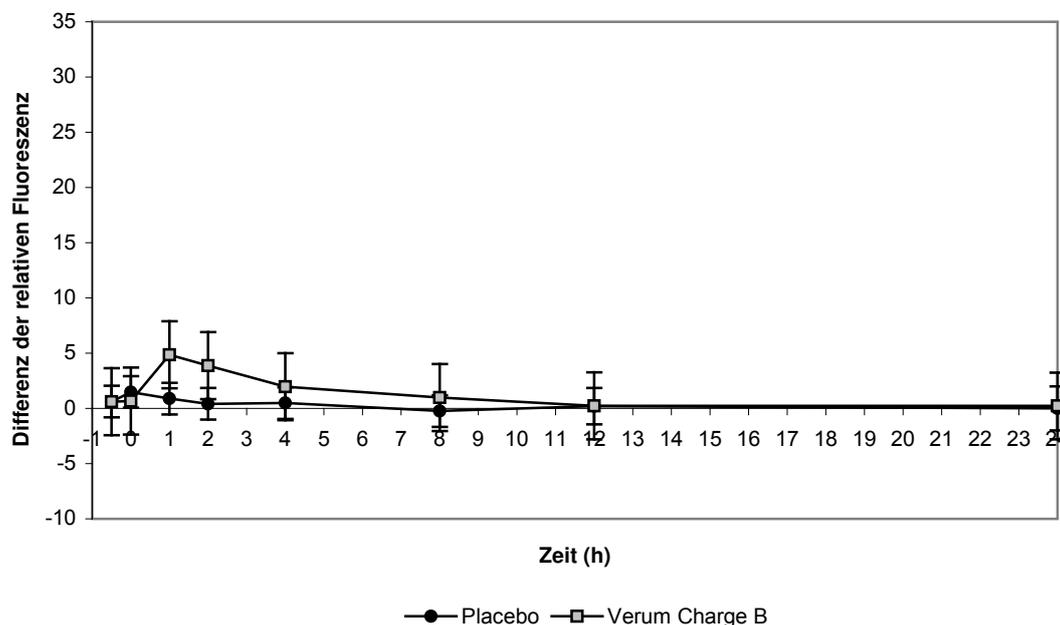
**Abb. 3.39.:** Bindung von Gerinnungsfaktor XIII-FITC an Thrombozyten nach Aktivierung mit 1,5µg/ml Kollagen *in vitro*. Verumgruppe mit Charge A (n=3) vs. Placebogruppe (n=9). Darstellung als Median der Fluoreszenz ± S.E.M. Signifikanzen: \* p<0.05, \*\*\* p≤0.001.



**Abb. 3.40.:** Bindung von Gerinnungsfaktor XIII-FITC an Thrombozyten nach Aktivierung mit 1,5µg/ml Kollagen *in vitro*. Verumgruppe mit Charge A (n=3) vs. Placebogruppe (n=9). Darstellung als Differenz der relativen Fluoreszenz zur *ex vivo* Messung ± S.E.M.



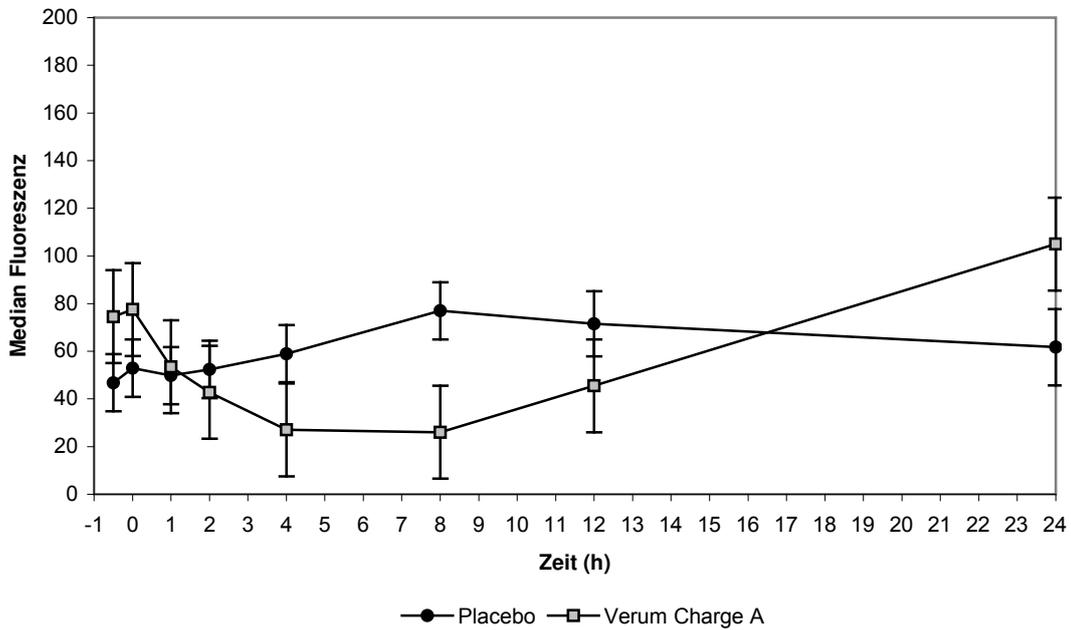
**Abb. 3.41.:** Bindung von Gerinnungsfaktor XIII-FITC an Thrombozyten nach Aktivierung mit 1,5µg/ml Kollagen *in vitro*. Verumgruppe mit Charge B (n=2) vs. Placebogruppe (n=9). Darstellung als Median der Fluoreszenz ± S.E.M. Signifikanzen: \* p<0.05, \*\* p<0.01.



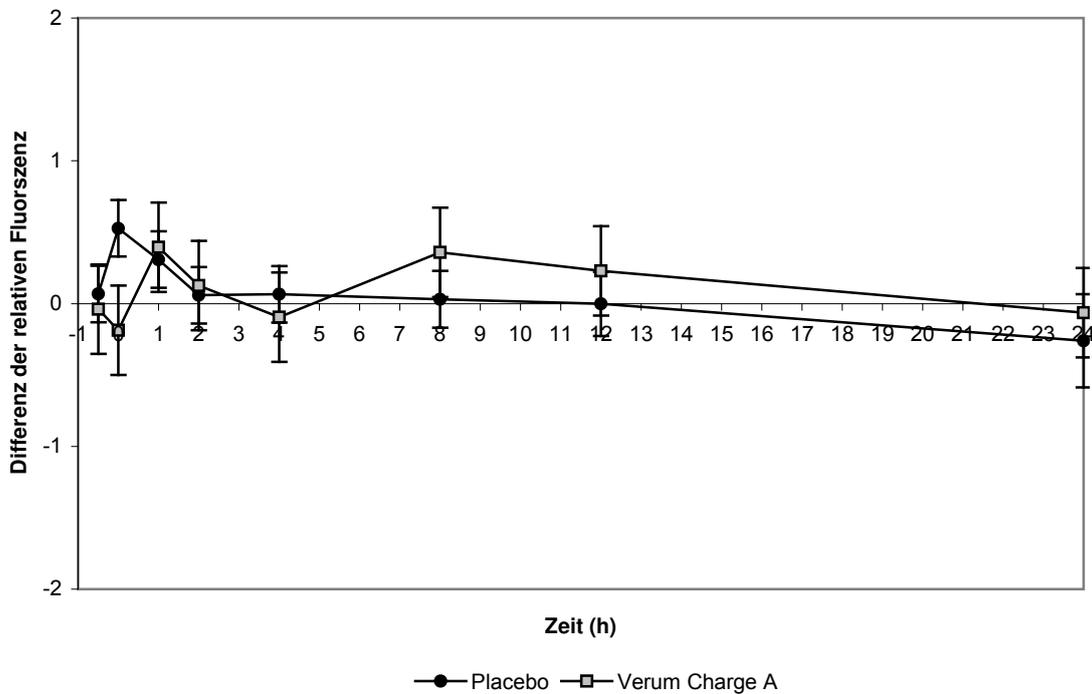
**Abb. 3.42.:** Bindung von Gerinnungsfaktor XIII-FITC an Thrombozyten nach Aktivierung mit 1,5 $\mu$ g/ml Kollagen *in vitro*. Verumgruppe mit Charge B (n=2) vs. Placebogruppe (n=9). Darstellung als Differenz der relativen Fluoreszenz zur *ex vivo* Messung  $\pm$  S.E.M.

In der Annexin V-Bindung an Thrombozyten nach Aktivierung *in vitro* mit 3,0 $\mu$ g/ml Kollagen zeigte sich zu allen Messzeitpunkten kein signifikanter Unterschied in der Aktivierbarkeit zwischen der Placebogruppe und einer der beiden Verumgruppen A oder B. In der Verumgruppe der Charge A fand sich die Tendenz einer niedrigeren Annexin V-Bindung an Thrombozyten zwischen den Zeitpunkten 2h und 12h. In der Gruppe der Charge B lagen die Werte bis auf die Zeitpunkte 2h und 4h tendenziell über denen der Placebogruppe (Abb. 3.43., Abb. 3.45.). In der Differenz zwischen der Anbindungsfähigkeit in der *ex vivo*-Messung und der Messung nach Kollagenaktivierung zeigte sich, dass zu allen Messzeitpunkten keine signifikanten Unterschiede festzustellen waren (Abb. 3.44., Abb. 3.46.).

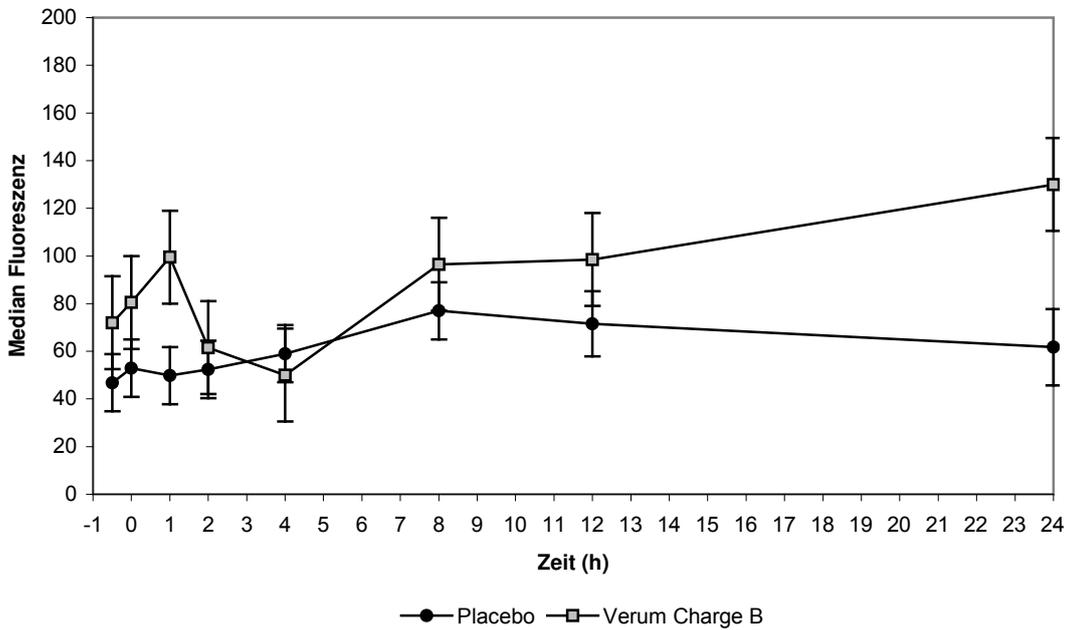
In der Bindung des Gerinnungsfaktors VIIa an Thrombozyten zeigte sich nach Aktivierung *in vitro* mit 1,5 $\mu$ g/ml Kollagen zu keinem der Messzeitpunkte ein signifikanter Unterschied in der Anbindung zwischen der Placebogruppe und einer der beiden Verumgruppen A und B (Abb. 3.47., Abb. 3.49.). Auch in der Differenz zwischen der Anbindungsfähigkeit in den *ex vivo*-Messungen und den Messungen nach *in vitro*-Aktivierung zeigte sich zu keinem Messzeitpunkt und in keiner Versuchsgruppe eine signifikante Steigerung der Fluoreszenz (Abb. 3.48., Abb. 3.50.).



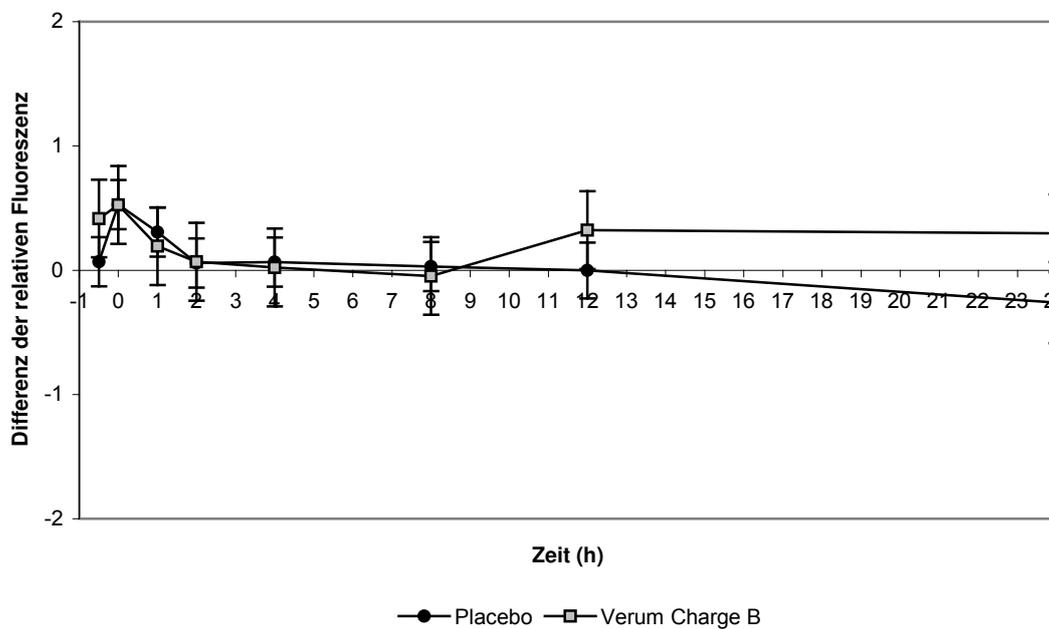
**Abb. 3.43.:** Bindung von Annexin V-FITC an Thrombozyten nach Aktivierung mit 3,0µg/ml Kollagen *in vitro*. Verumgruppe mit Charge A (n=3) vs. Placebogruppe (n=9). Darstellung als Median der Fluoreszenz ± S.E.M.



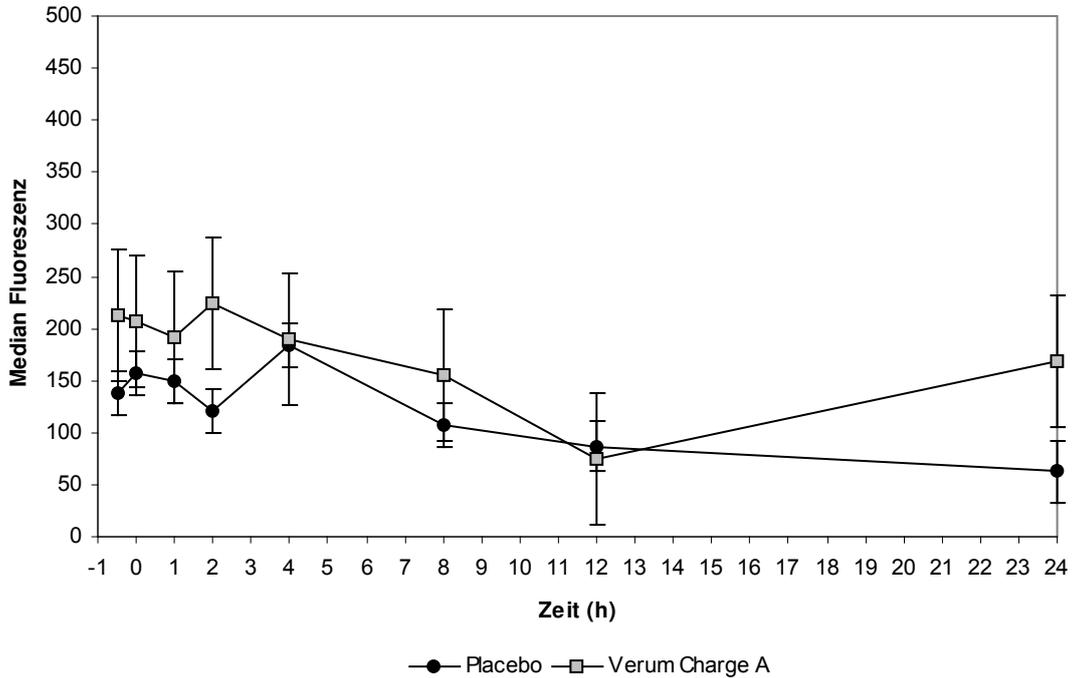
**Abb. 3.44.:** Bindung von Annexin V-FITC an Thrombozyten nach Aktivierung mit 3,0µg/ml Kollagen *in vitro*. Verumgruppe mit Charge A (n=3) vs. Placebogruppe (n=9). Darstellung als Differenz der relativen Fluoreszenz zur *ex vivo* Messung ± S.E.M.



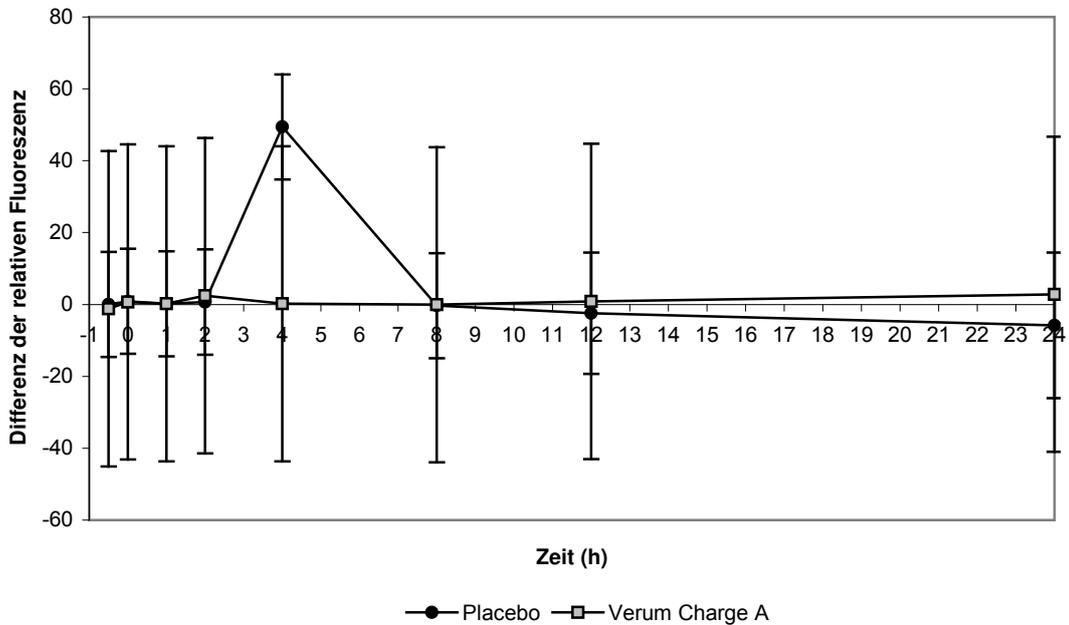
**Abb. 3.45.:** Bindung von Annexin V-FITC an Thrombozyten nach Aktivierung mit 3,0µg/ml Kollagen *in vitro*. Verumgruppe mit Charge B (n=2) vs. Placebogruppe (n=9). Darstellung als Median der Fluoreszenz ± S.E.M.



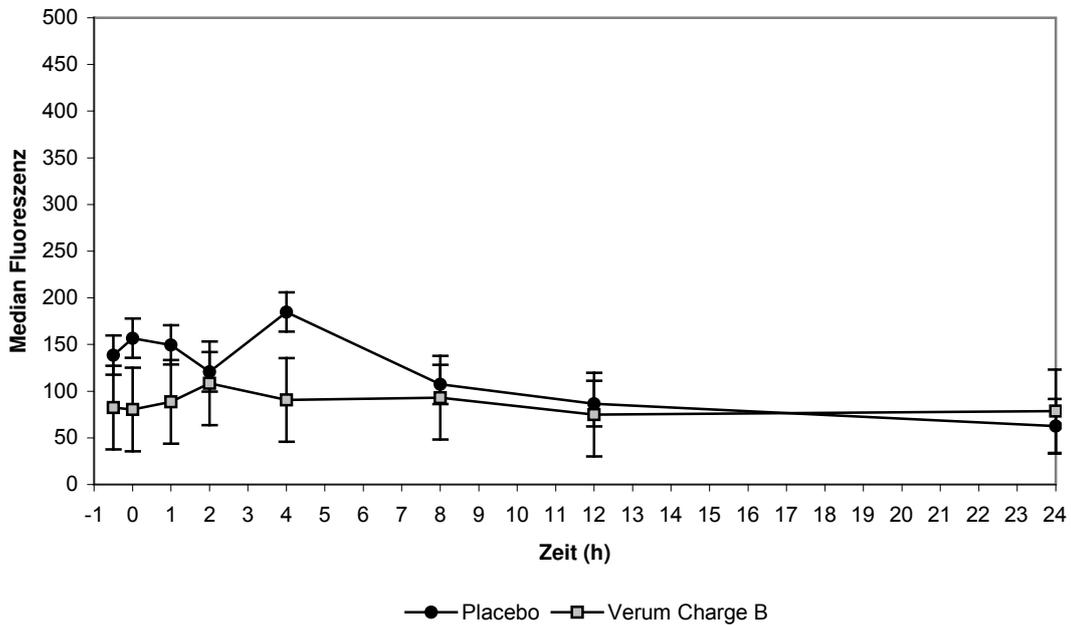
**Abb. 3.46.:** Bindung von Annexin V-FITC an Thrombozyten nach Aktivierung mit 3,0µg/ml Kollagen *in vitro*. Verumgruppe mit Charge B (n=3) vs. Placebogruppe (n=9). Darstellung als Differenz der relativen Fluoreszenz zur *ex vivo* Messung ± S.E.M.



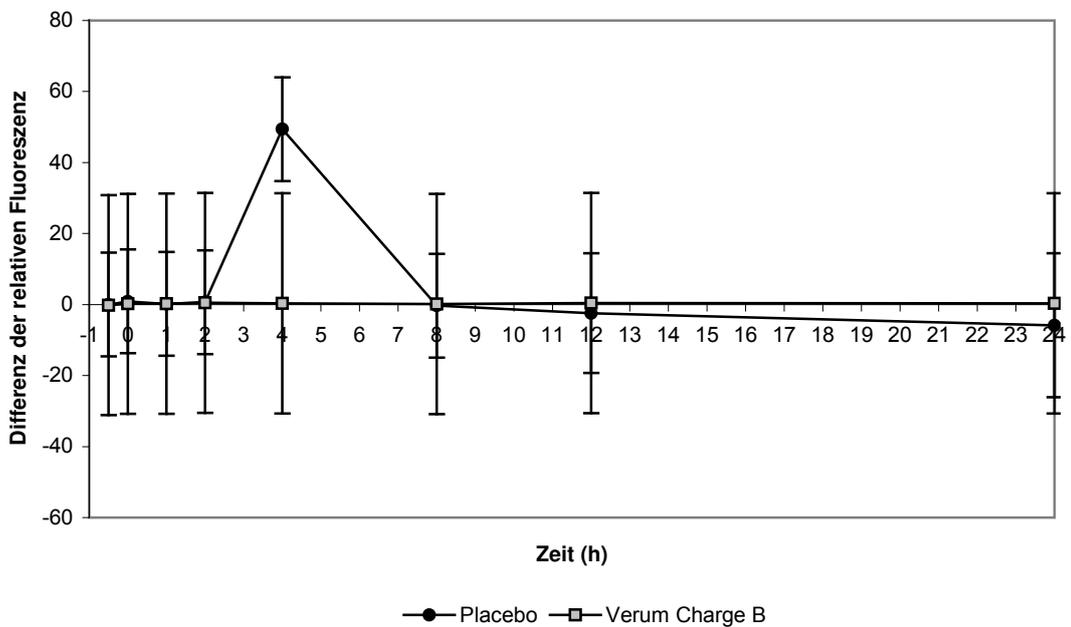
**Abb. 3.47.:** Bindung von Gerinnungsfaktor VIIa-FITC an Thrombozyten nach Aktivierung mit 1,5µg/ml Kollagen *in vitro*. Verumgruppe mit Charge A (n=3) vs. Placebogruppe (n=9). Darstellung als Median der Fluoreszenz ± S.E.M.



**Abb. 3.48.:** Bindung von Gerinnungsfaktor VIIa-FITC an Thrombozyten nach Aktivierung mit 1,5µg/ml Kollagen *in vitro*. Verumgruppe mit Charge A (n=3) vs. Placebogruppe (n=9). Darstellung als Differenz der relativen Fluoreszenz zur *ex vivo* Messung ± S.E.M.



**Abb. 3.49.:** Bindung von Gerinnungsfaktor VIIa-FITC an Thrombozyten nach Aktivierung mit 1,5µg/ml Kollagen *in vitro*. Verumgruppe mit Charge B (n=2) vs. Placebogruppe (n=9). Darstellung als Median der Fluoreszenz ± S.E.M.

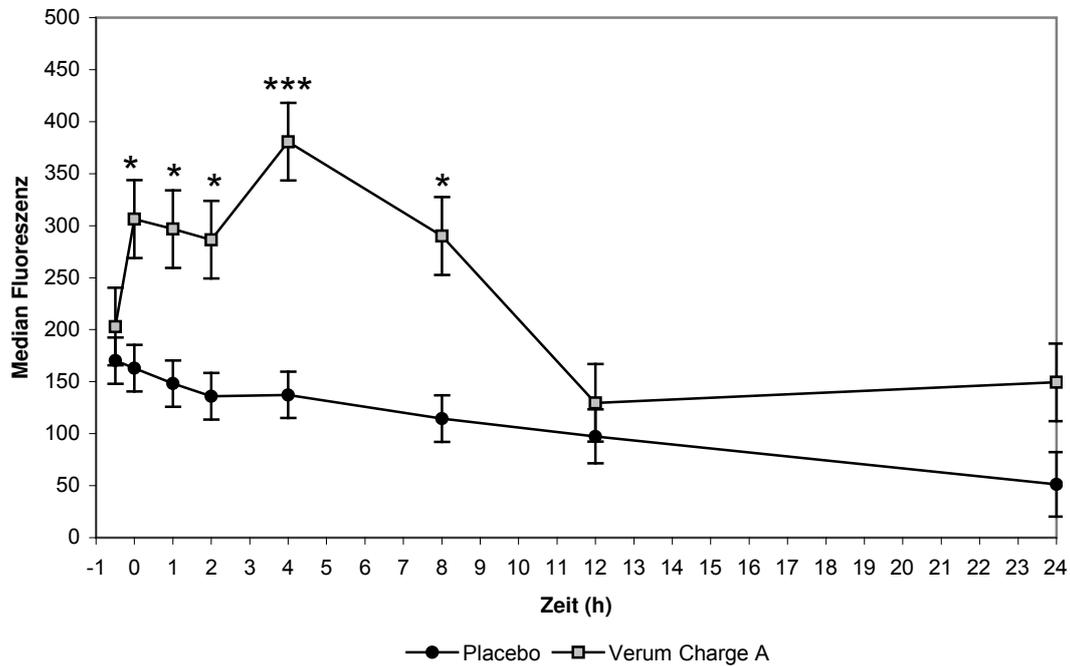


**Abb. 3.50.:** Bindung von Gerinnungsfaktor VIIa-FITC an Thrombozyten nach Aktivierung mit 1,5µg/ml Kollagen *in vitro*. Verumgruppe mit Charge B (n=2) vs. Placebogruppe (n=9). Darstellung als Differenz der relativen Fluoreszenz zur *ex vivo* Messung ± S.E.M.

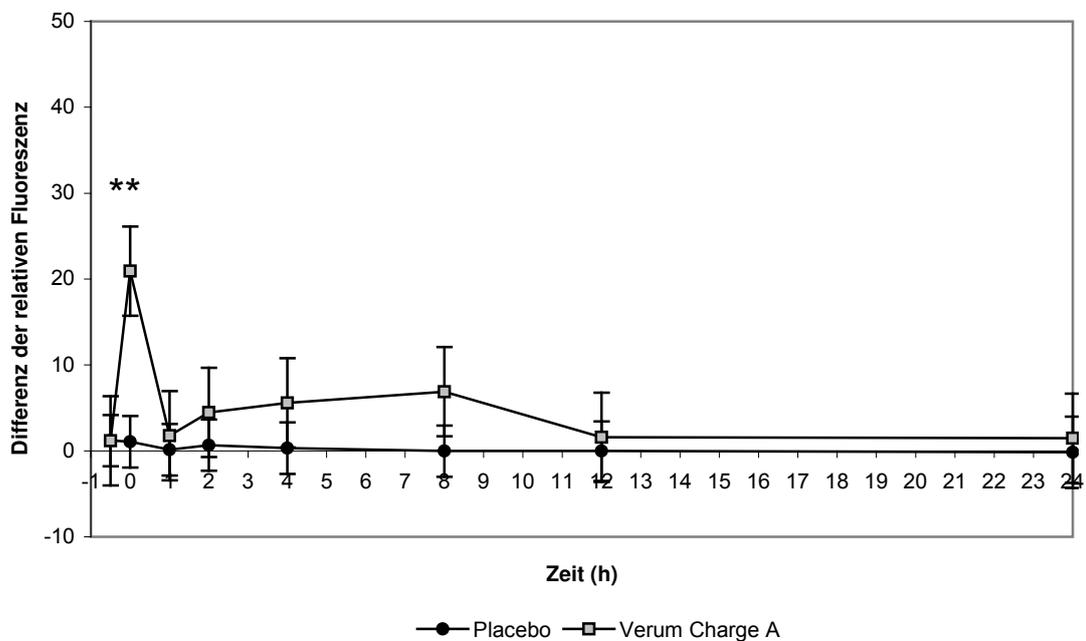
### 3.2.6.2. Aktivierung durch TRAP

Es wurde die Thrombospondin-1-Bindung an Thrombozyten nach *in vitro*-Aktivierung durch TRAP untersucht. Im Vergleich der Verumgruppe der Charge A mit der Placebogruppe zeigte sich nach Aktivierung mit 50µM TRAP eine signifikant höhere Anbindung von Thrombospondin-1 zur Baseline ‚Verumeffekt‘, 1h, 2h, 4h und 8h (Abb. 3.51.). In der Verumgruppe der Charge B zeigte sich nach Aktivierung durch 50µM TRAP zu den Zeitpunkten 2h und 4h eine signifikant höhere Bindung von Thrombospondin-1-FITC an Thrombozyten als in der Placebogruppe (Abb. 3.53.).

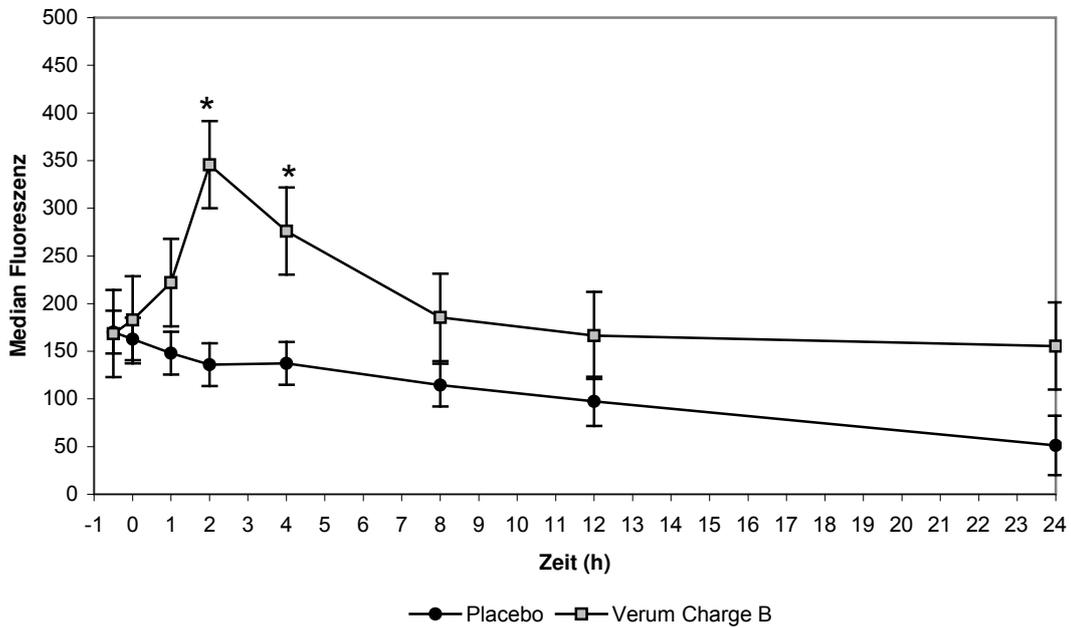
Um zu beurteilen, ob die *in vitro*-Aktivierung durch TRAP eine Zunahme der Anbindungsfähigkeit unabhängig von der Voraktivierung auslösen kann, wurde auch hier die Differenz zur *ex vivo*-Messung berechnet. In allen Messreihen zeigte sich in der Placebogruppe, dass durch die *in vitro*-Zugabe von TRAP keine weitere Zunahme der Anbindung ausgelöst werden konnte. In der Verumgruppe der Charge A ergab sich nach Aktivierung mit 50µM TRAP zur Baseline ‚Verumeffekt‘ ein signifikanter Zuwachs der Anbindungsfähigkeit von Thrombospondin-1, und bis zur zwölften Stunde des Versuches zumindest tendenziell eine höhere Anbindung. In der Verumgruppe der Charge B zeigte sich nach Zugabe von 50µM TRAP tendenziell ein Zuwachs zu den Zeitpunkten 2h und 4h, welcher jedoch nicht das Signifikanzniveau erreichte (Abb. 3.52., Abb. 3.54.).



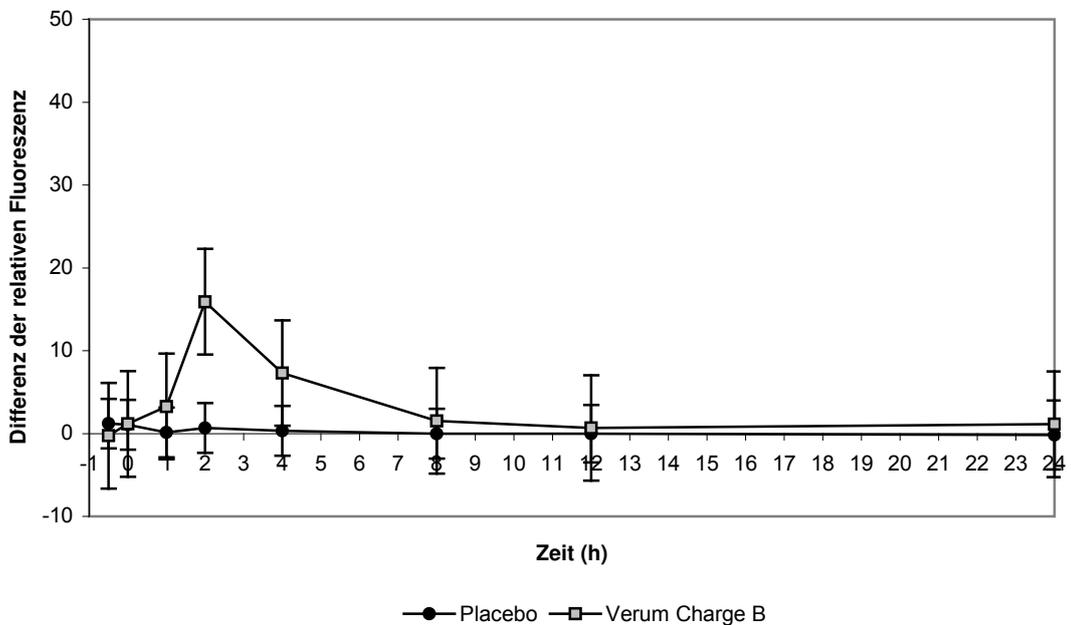
**Abb. 3.51.:** Bindung von Thrombospondin-1-FITC an Thrombozyten nach Aktivierung mit 50 $\mu$ M TRAP *in vitro*. Verumgruppe Charge A (n=3) vs. Placebogruppe (n=9). Darstellung als Median der Fluoreszenz  $\pm$  S.E.M. Signifikanzen: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ .



**Abb. 3.52.:** Bindung von Thrombospondin-1-FITC an Thrombozyten nach Aktivierung mit 50 $\mu$ M TRAP *in vitro*. Verumgruppe mit Charge A (n=3) vs. Placebogruppe (n=9). Darstellung als Differenz der relativen Fluoreszenz zur *ex vivo* Messung  $\pm$  S.E.M. Signifikanzen: \*\*  $p \leq 0.01$ .



**Abb. 3.53.:** Bindung von Thrombospondin-1-FITC an Thrombozyten nach Aktivierung mit 50µM TRAP *in vitro*. Verumgruppe mit Charge B (n=2) vs. Placebogruppe (n=9). Darstellung als Median der Fluoreszenz ± S.E.M. Signifikanzen: \* p<0.05, \*\* p≤0.01.

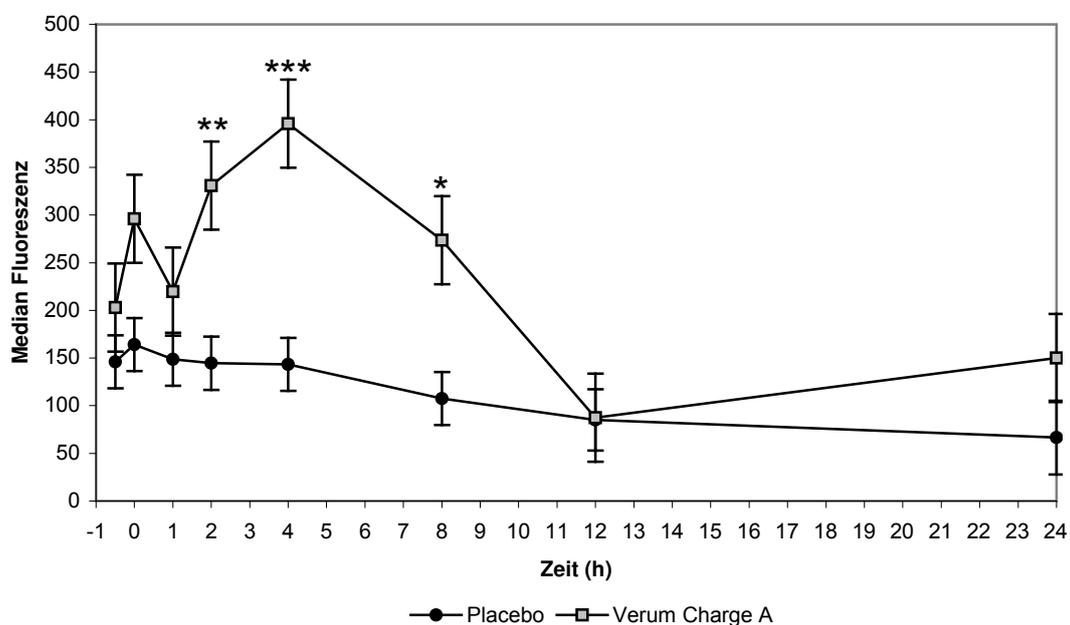


**Abb. 3.54.:** Bindung von Thrombospondin-1-FITC an Thrombozyten nach Aktivierung mit 50µM TRAP *in vitro*. Verumgruppe mit Charge B (n=2) vs. Placebogruppe (n=9). Darstellung als Differenz der relativen Fluoreszenz zur *ex vivo* Messung ± S.E.M.

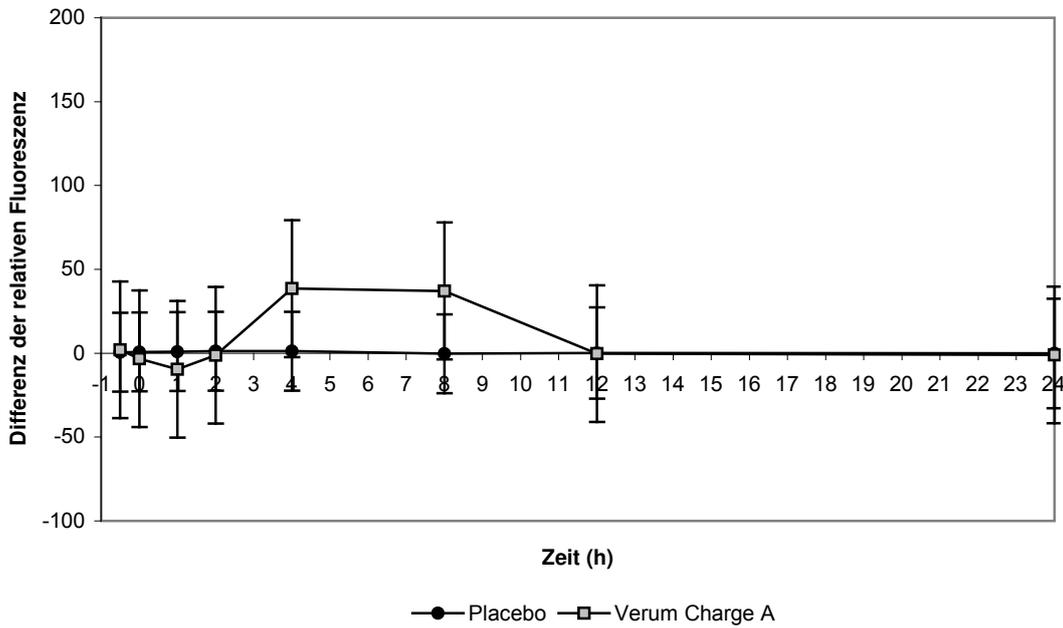
### 3.2.6.3. Aktivierung durch Ristocetin A

Die Aktivierbarkeit der Thrombozyten durch Ristocetin wurde anhand der Bindung des von-Willebrand-Faktors an Thrombozyten untersucht. Nach der Zugabe von 0,8µg/ml Ristocetin zeigte sich in der Verumgruppe der Charge A zu den Zeitpunkten 2h, 4h und 8h eine signifikant höhere Anbindung als in der Placebogruppe. Alle übrigen Unterschiede erreichten nicht das Signifikanzniveau (Abb. 3.55.). In der Verumgruppe der Charge B zeigte sich nach Aktivierung mit 0,8µg/ml Ristocetin nur zum Zeitpunkt 2h eine signifikant höhere Anbindung des von-Willebrand-Faktors im Vergleich zur Placebogruppe (Abb. 3.57.).

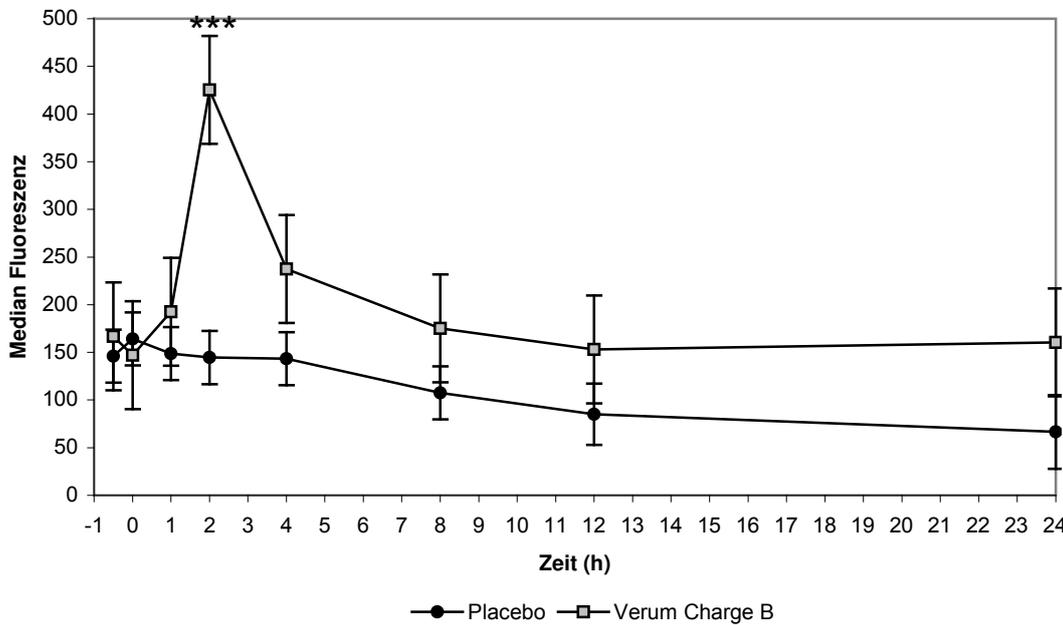
In der Differenz zwischen der Anbindungsfähigkeit in der *ex vivo*-Messungen und den Messung nach *in vitro*-Aktivierung durch Ristocetin erreichte zu keinem der Messzeitpunkte in beiden Versuchsgruppen eine Unterschied das Signifikanzniveau. In der Verumgruppe der Charge A ließ sich eine tendenziell höhere Anbindung als in der Placebogruppe zu den Zeitpunkten 4h und 8h erkennen, welche jedoch nicht statistisch signifikant wurde (Abb. 3.56., Abb. 3.58.).



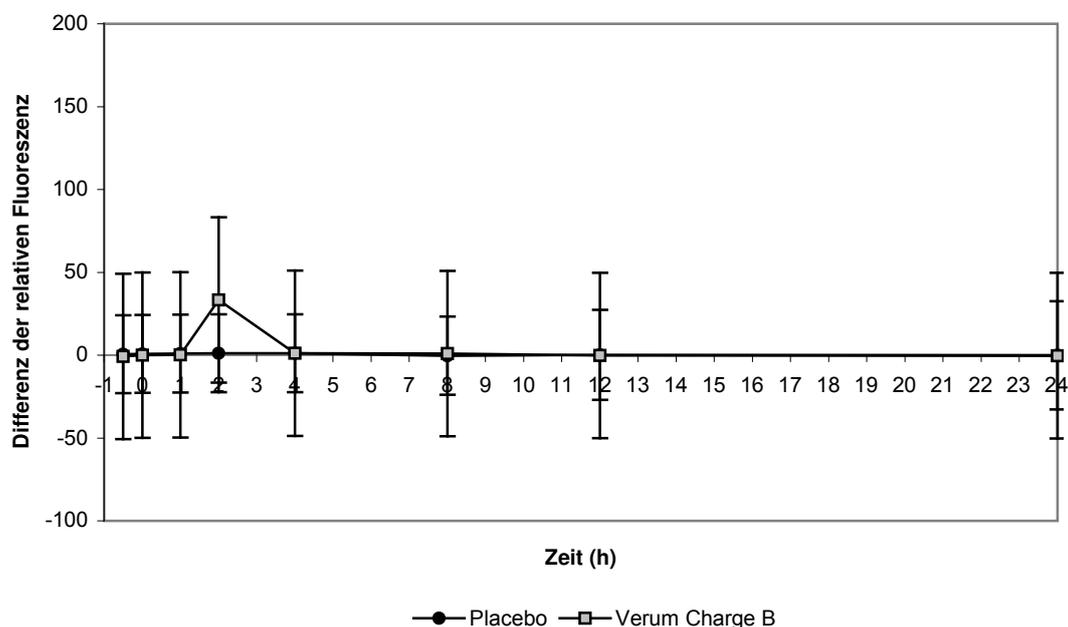
**Abb. 3.55.:** Bindung von von-Willebrand-Faktor-FITC an Thrombozyten nach Aktivierung mit 0,8µg/ml Ristocetin *in vitro*. Verumgruppe mit Charge A (n=3) vs. Placebogruppe (n=9). Darstellung als Median der Fluoreszenz ± S.E.M. Signifikanzen: \* p<0.05, \*\* p≤0.01, \*\*\* p≤0.001.



**Abb. 3.56.:** Bindung von von-Willebrand-Faktor-FITC an Thrombozyten nach Aktivierung mit 0,8µg/ml Ristocetin *in vitro*. Verumgruppe mit Charge A (n=3) vs. Placebogruppe (n=9). Darstellung als Differenz der relativen Fluoreszenz zur *ex vivo* Messung ± S.E.M.



**Abb. 3.57.:** Bindung von von-Willebrand-Faktor-FITC an Thrombozyten nach Aktivierung mit 0,8µg/ml Ristocetin *in vitro*. Verumgruppe mit Charge B (n=2) vs. Placebogruppe (n=9). Darstellung als Median der Fluoreszenz ± S.E.M. Signifikanzen: \*\*\* p≤0.001.

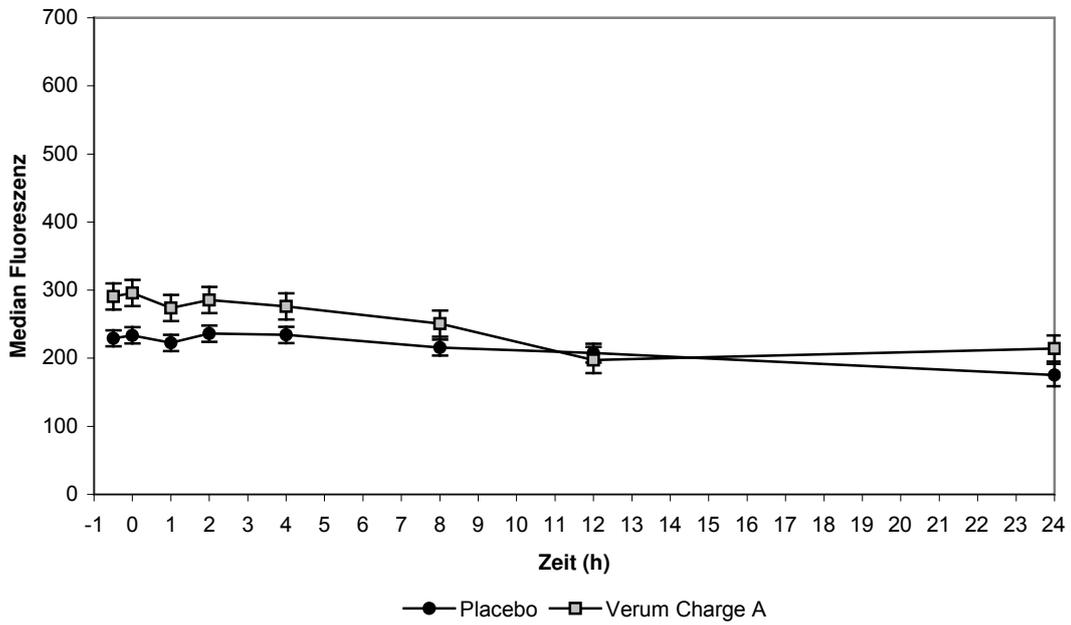


**Abb. 3.58.:** Bindung von von-Willebrand-Faktor-FITC an Thrombozyten nach Aktivierung mit 0,8 $\mu$ g/ml Ristocetin *in vitro*. Verumgruppe mit Charge B (n=2) vs. Placebogruppe (n=9). Darstellung als Differenz der relativen Fluoreszenz zur *ex vivo* Messung  $\pm$  S.E.M.

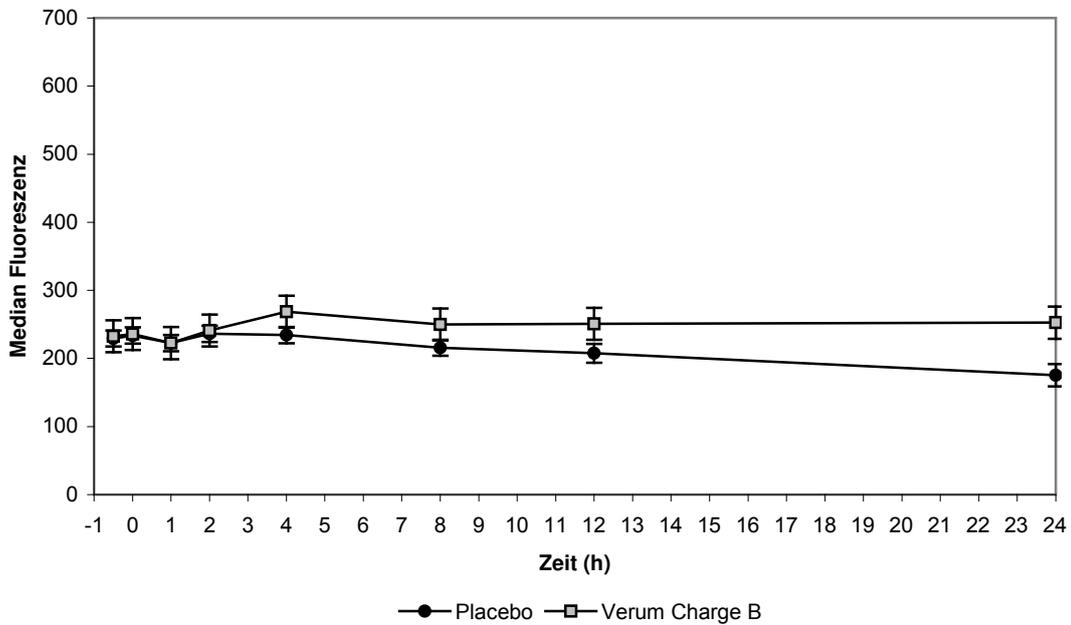
### 3.3 . Intergruppenvergleich: Monozyten

#### 3.3.1. Fibrinogen-Bindung

In der Fibrinogen-Bindung an Monozyten *ex vivo* zeigte sich zur Baseline und zur Baseline ‚Verumeffekt‘ in beiden Versuchsgruppen kein Unterschied zur Placebogruppe. Im Vergleich der Verumgruppen der Chargen A und B mit der Placebogruppe ergab sich auch zu keinem der übrigen Messzeitpunkte ein signifikanter Unterschied. In der Tendenz zeigte sich eine geringfügig höhere Fibrinogen-Anbindung als in der Placebogruppe (Abb. 3.59., Abb. 3.60.).



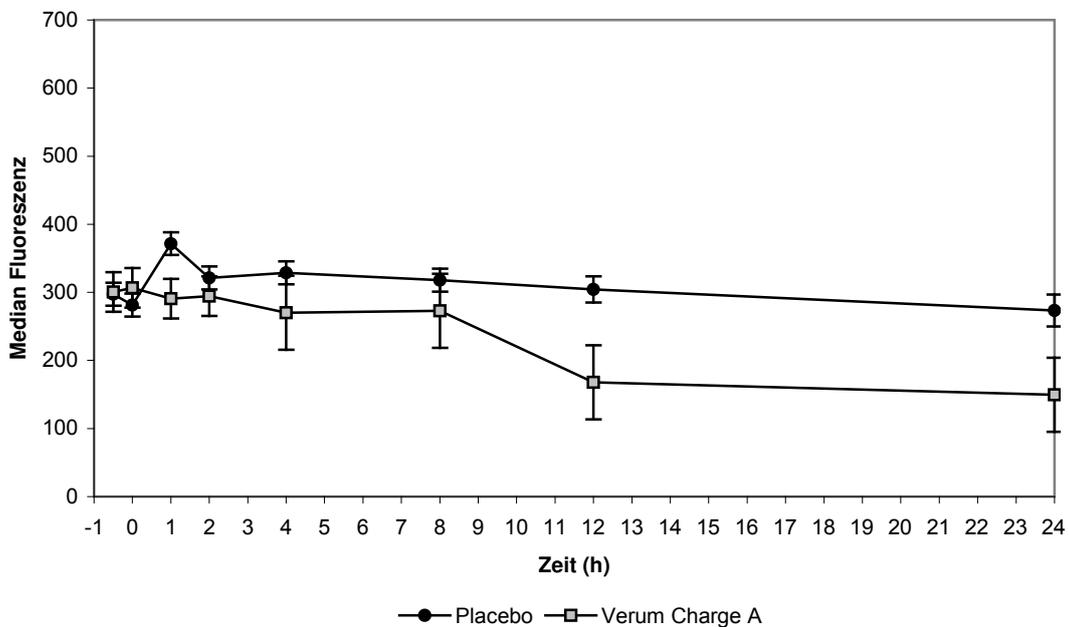
**Abb. 3.59.:** Bindung von Fibrinogen-FITC an Monozyten *ex vivo*. Verumgruppe mit Charge A (n=3) vs. Placebogruppe (n=9). Darstellung als Median der Fluoreszenz  $\pm$  S.E.M.



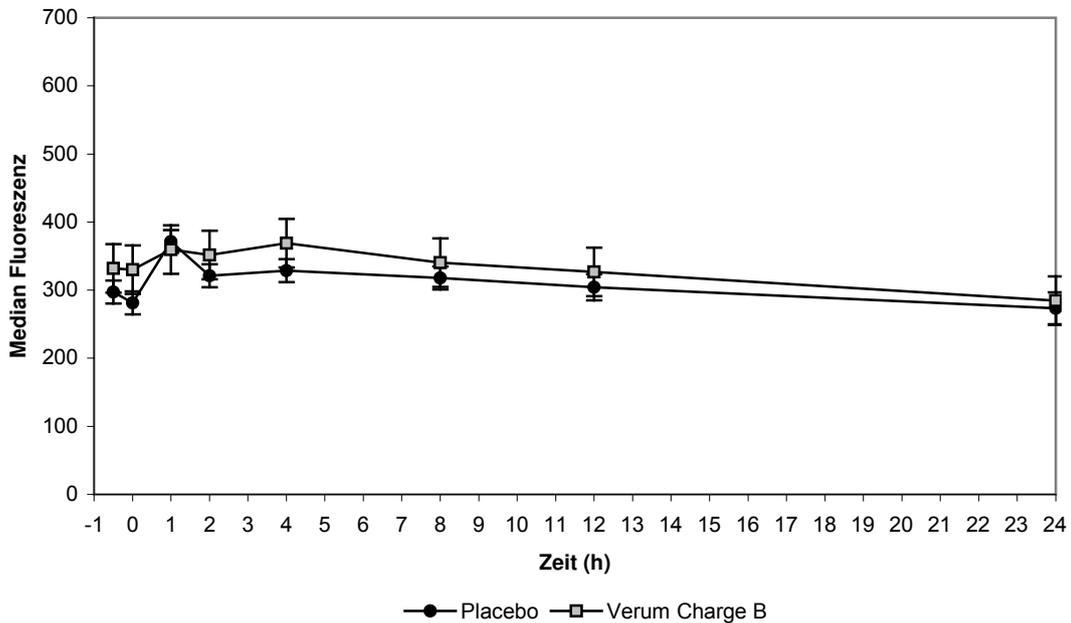
**Abb. 3.60.:** Bindung von Fibrinogen-FITC an Monozyten *ex vivo*. Verumgruppe mit Charge B (n=2) vs. Placebogruppe (n=9). Darstellung als Median der Fluoreszenz  $\pm$  S.E.M.

### 3.3.2. Fibrinogen-Antikörper-Bindung

In der Bindung des Fibrinogen-Antikörpers an Monozyten *ex vivo* zeigte sich zu keinem der Messzeitpunkte ein signifikanter Unterschied zwischen der Placebogruppe und einer der beiden Verumgruppen A und B. In der Gruppe der Charge A fanden sich jedoch tendenziell niedrigere Werte als in der Placebogruppe, während sich in der Gruppe der Charge B tendenziell eher höhere Werte in der Bindung des Anti-Fibrinogen-Antikörpers (Abb. 3.61., Abb. 3.62.).



**Abb. 3.61.:** Bindung von Anti-Fibrinogen-Antikörper-FITC an Monozyten *ex vivo*. Verumgruppe mit Charge A (n=3) vs. Placebogruppe (n=9). Darstellung als Median der Fluoreszenz  $\pm$  S.E.M.

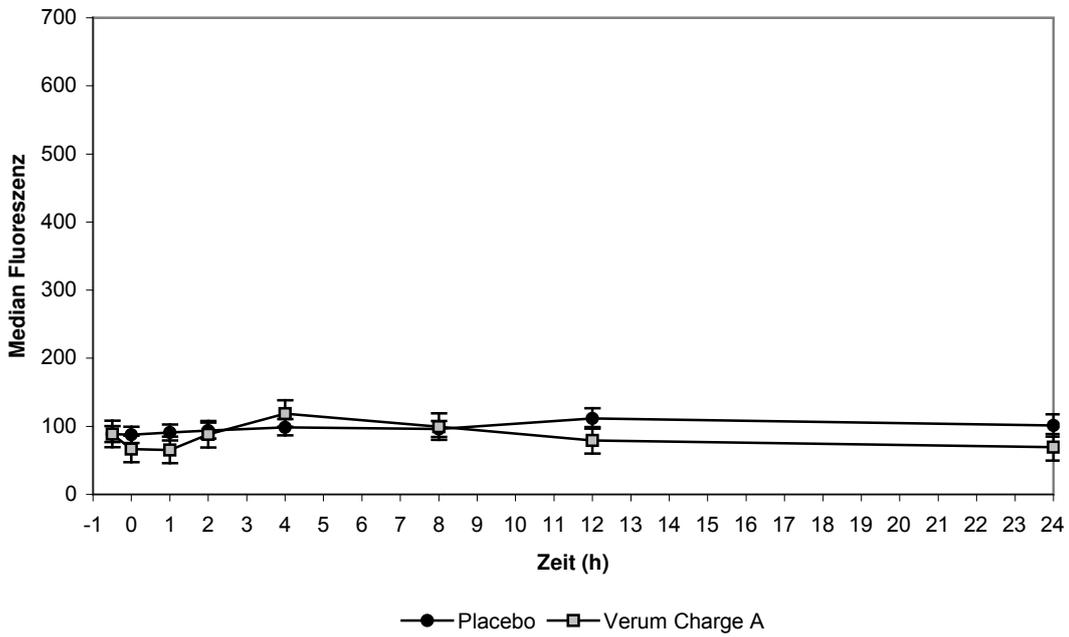


**Abb. 3.62.:** Bindung von Anti-Fibrinogen-Antikörper-FITC an Monozyten *ex vivo*. Verumgruppe mit Charge B (n=2) vs. Placebogruppe (n=9). Darstellung als Median der Fluoreszenz  $\pm$  S.E.M.

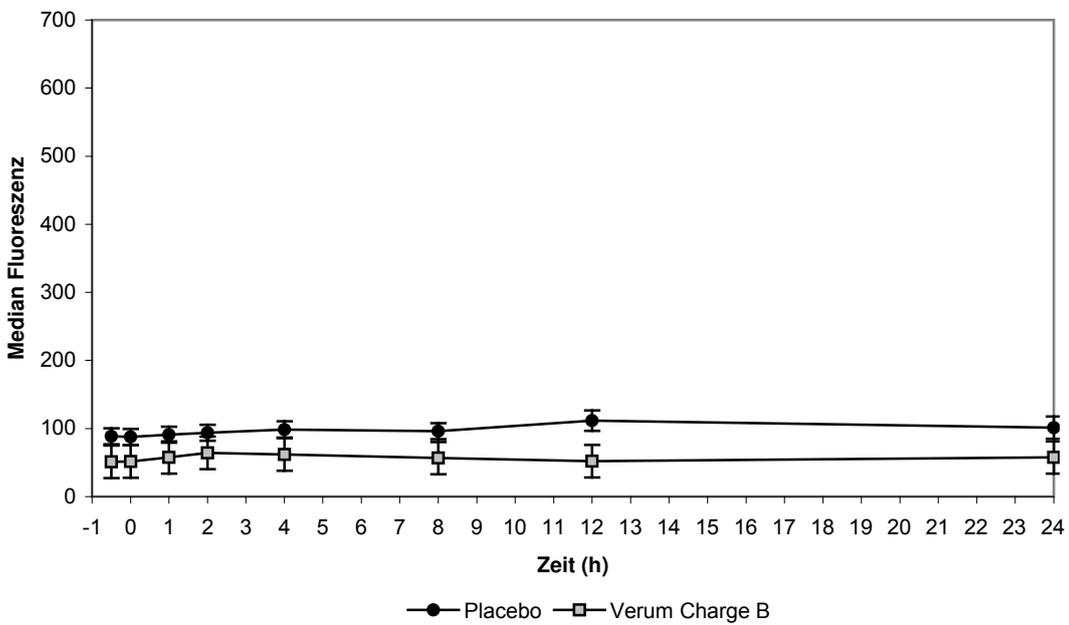
### 3.3.3. CD11b-Expression

In der Untersuchung der CD11b-Expression auf Monozyten zeigte sich weder in der Gruppe der Charge A noch in der Gruppe der Charge B zu irgendeinem der Versuchszeitpunkte ein Unterschied zur Placebogruppe.

In der Tendenz zeigte sich jedoch fast zu allen Versuchszeitpunkten eine etwas niedrigere CD11b-Expression auf Monozyten in den beiden Verumgruppen als in der Placebogruppe (Abb. 3.63., Abb. 3.64).



**Abb. 3.63.:** CD11b-Expression auf Monozyten *ex vivo*. Verumgruppe mit Charge A (n=3) vs. Placebogruppe (n=9). Darstellung als Median der Fluoreszenz  $\pm$  S.E.M.

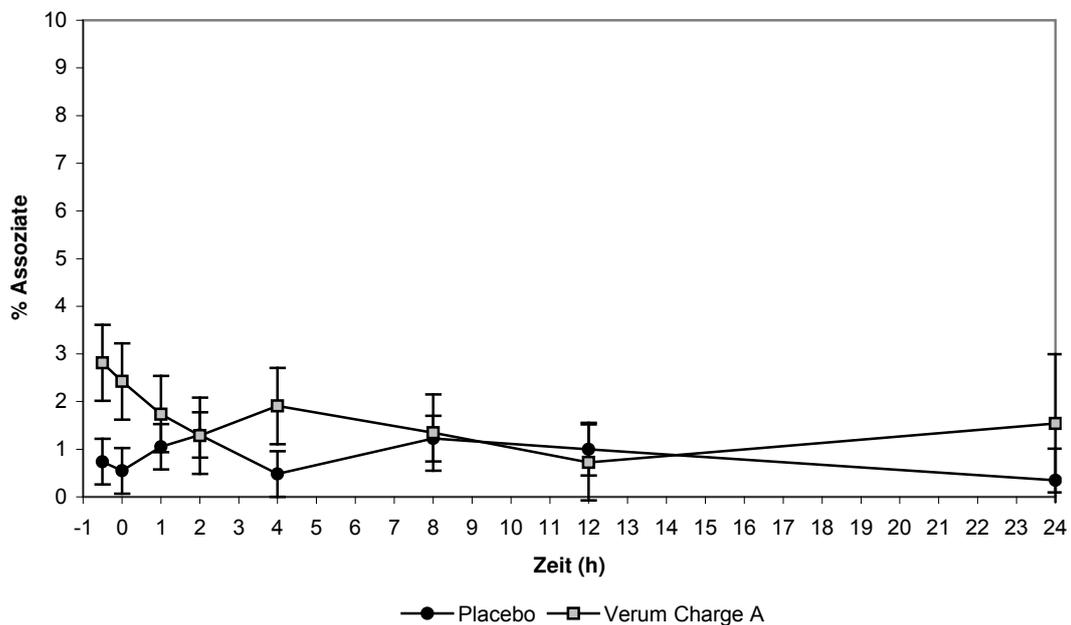


**Abb. 3.64.:** CD11b-Expression auf Monozyten *ex vivo*. Verumgruppe mit Charge B (n=2) vs. Placebogruppe (n=9). Darstellung als Median der Fluoreszenz  $\pm$  S.E.M.

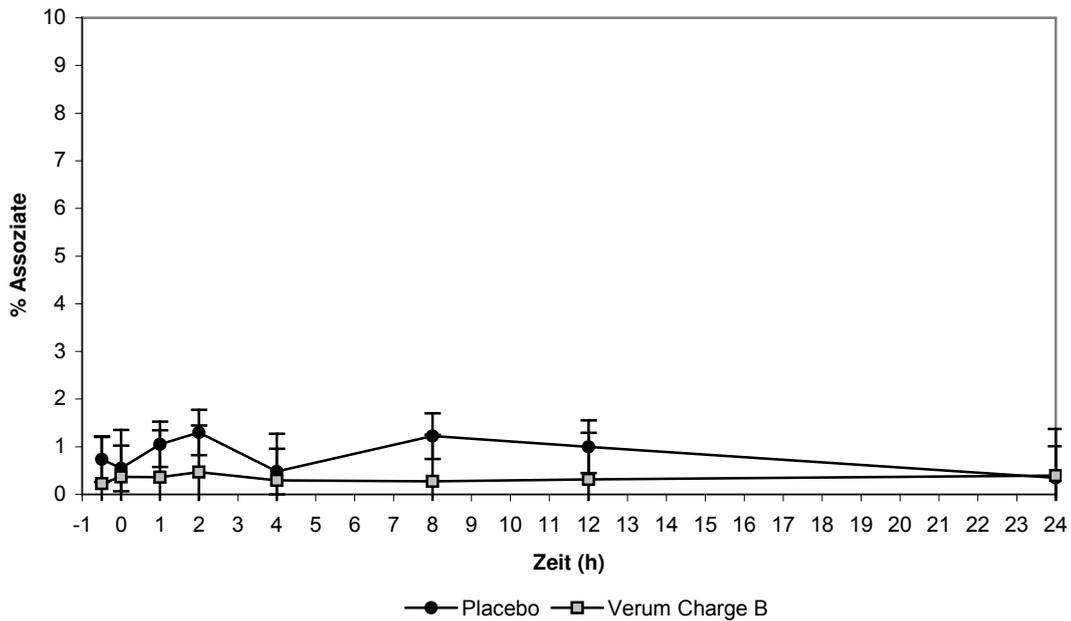
### 3.3.4. Monozyten-Thrombozyten-Assoziat

Bei der Untersuchung des Anteils von Thrombozyten-Monozyten-Assoziaten zeigte sich zur Baseline und zur Baseline ‚Verumeffekt‘ in beiden Versuchsgruppen kein Unterschied zur Placebogruppe.

Auch zu keinem der übrigen Messzeitpunkte stellte sich ein signifikanter Unterschied zur Placebogruppe dar (Abb. 3.65., Abb. 3.66.).



**Abb. 3.65.:** Monozyten-Thrombozyten-Assoziat *ex vivo*. Verumgruppe mit Charge A (n=3) vs. Placebogruppe (n=9). Darstellung als prozentualer Anteil der Assoziat an allen Monozyten  $\pm$  S.E.M.



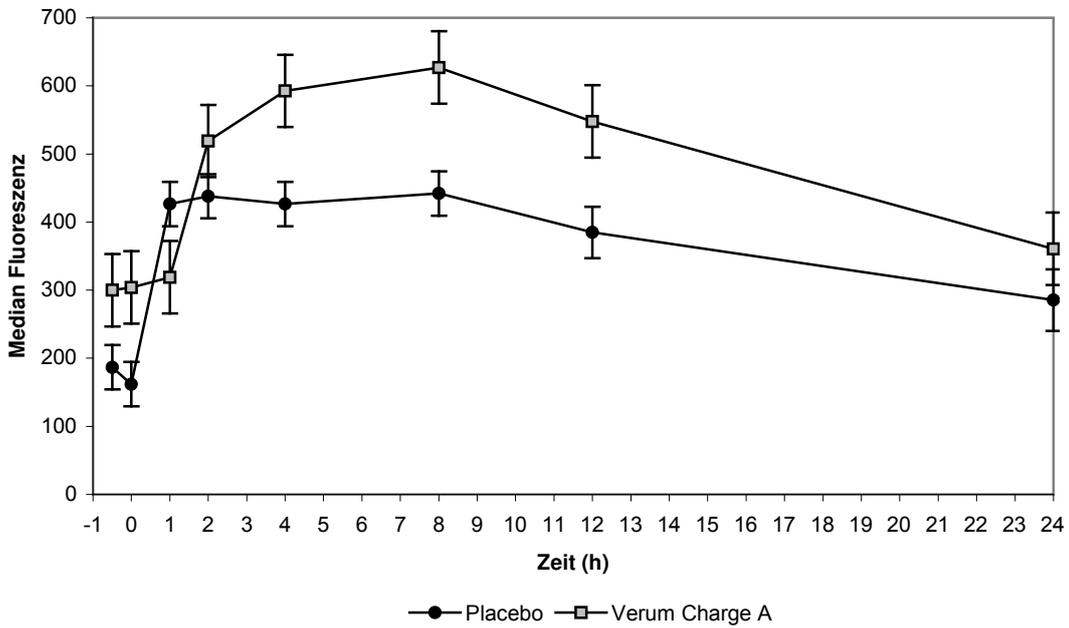
**Abb. 3.66.:** Monozyten-Thrombozyten-Assoziat *ex vivo*. Verumgruppe mit Charge B (n=2) vs. Placebogruppe (n=9). Darstellung als prozentualer Anteil der Assoziat an allen Monozyten  $\pm$  S.E.M.

### 3.4. Intergruppenvergleich: PMNL

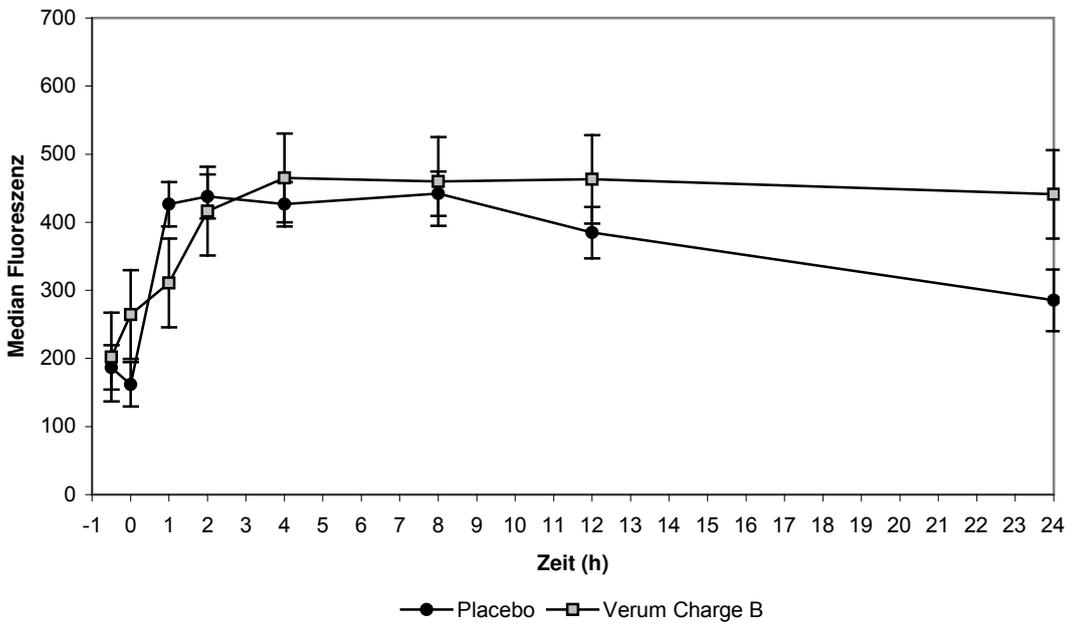
#### 3.4.1. Fibrinogen-Bindung

Es wurde die Anbindung von Fibrinogen an PMNL *ex vivo* untersucht. Zur Baseline und zur Baseline ‚Verumeffekt‘ gab es in beiden Versuchsgruppen keinen Unterschied zur Placebogruppe.

In den Gruppen der Verumchargen A und B ergab sich auch zu keinem der anderen Messzeitpunkte ein signifikanter Unterschied zur Placebogruppe. In der Gruppe der Charge A lagen die Werte tendenziell über denen der Placebogruppe (Abb. 3.67., Abb. 3.68.).



**Abb. 3.67.:** Bindung von Fibrinogen-FITC an PMNL *ex vivo*. Verumgruppe mit Charge A (n=3) vs. Placebogruppe (n=9). Darstellung als Median der Fluoreszenz  $\pm$  S.E.M.

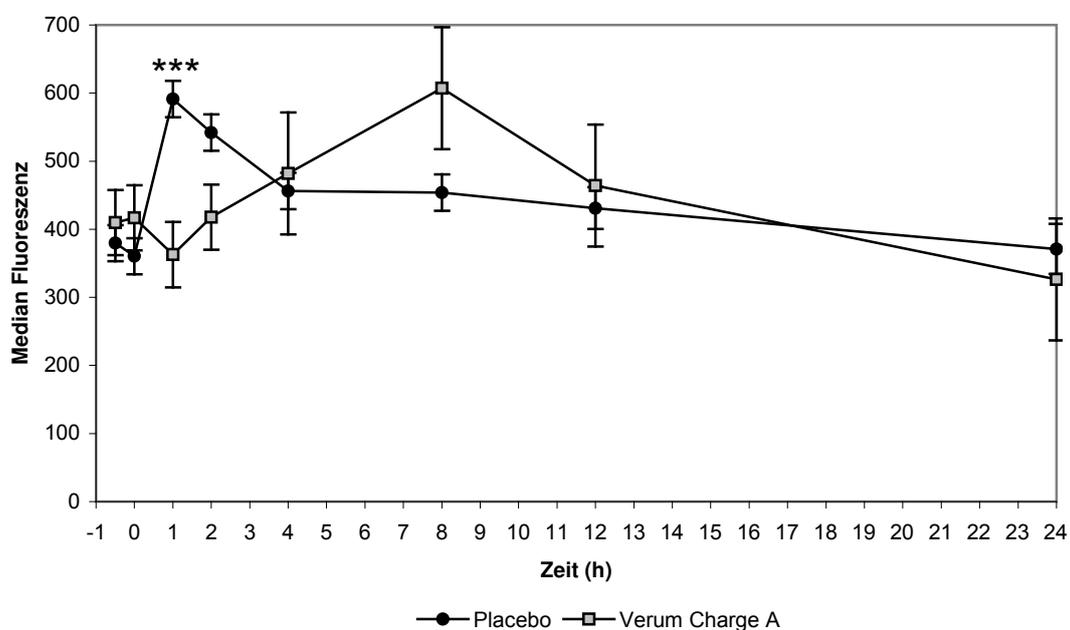


**Abb. 3.68.:** Bindung von Fibrinogen-FITC an PMNL *ex vivo*. Verumgruppe mit Charge B (n=2) vs. Placebogruppe (n=9). Darstellung als Median der Fluoreszenz  $\pm$  S.E.M.

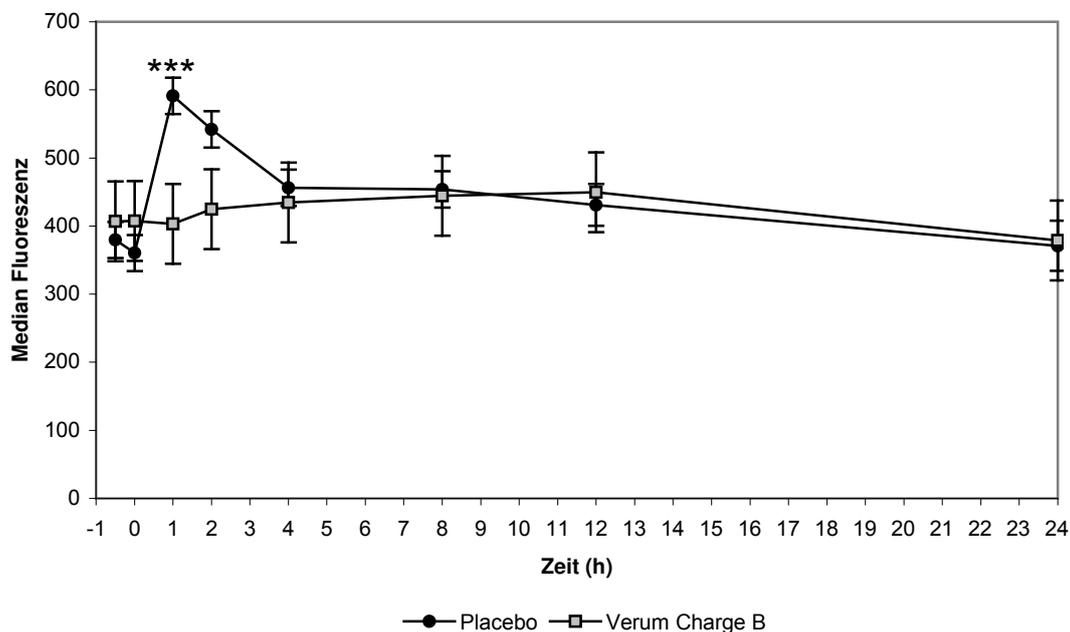
### 3.4.2. Fibrinogen-Antikörper-Bindung

Bei der Untersuchung der Bindung eines Anti-Fibrinogen-Antikörpers an PMNL fand sich zur Baseline und zur Baseline ‚Verumeffekt‘ in beiden Versuchsgruppen keinen Unterschied zur Placebogruppe.

In der Placebogruppe zeigte sich jeweils zum Messzeitpunkt 1h eine signifikant höhere Bindung des Antikörpers an PMNL als in den Gruppen der Verumchargen A und B, in denen der entsprechende Anstieg zum Zeitpunkt 1h nicht auftrat. Die übrigen Unterschiede erreichten nicht das Signifikanzniveau (Abb. 3.69., Abb. 3.70.).



**Abb. 3.69.:** Bindung von Anti-Fibrinogen-Antikörper-FITC an PMNL *ex vivo*. Verumgruppe mit Charge A (n=3) vs. Placebogruppe (n=9). Darstellung als Median der Fluoreszenz  $\pm$  S.E.M. Signifikanzen: \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

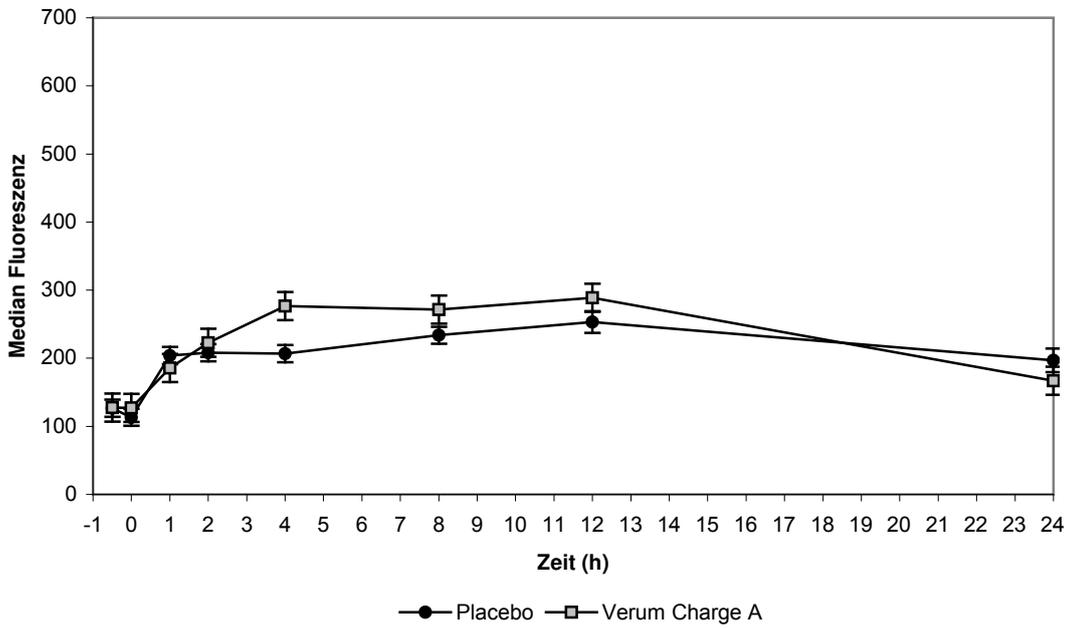


**Abb. 3.70.:** Bindung von Anti-Fibrinogen-Antikörper-FITC an PMNL *ex vivo*. Verumgruppe mit Charge B (n=2) vs. Placebogruppe (n=9). Darstellung als Median der Fluoreszenz  $\pm$  S.E.M. Signifikanzen: \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

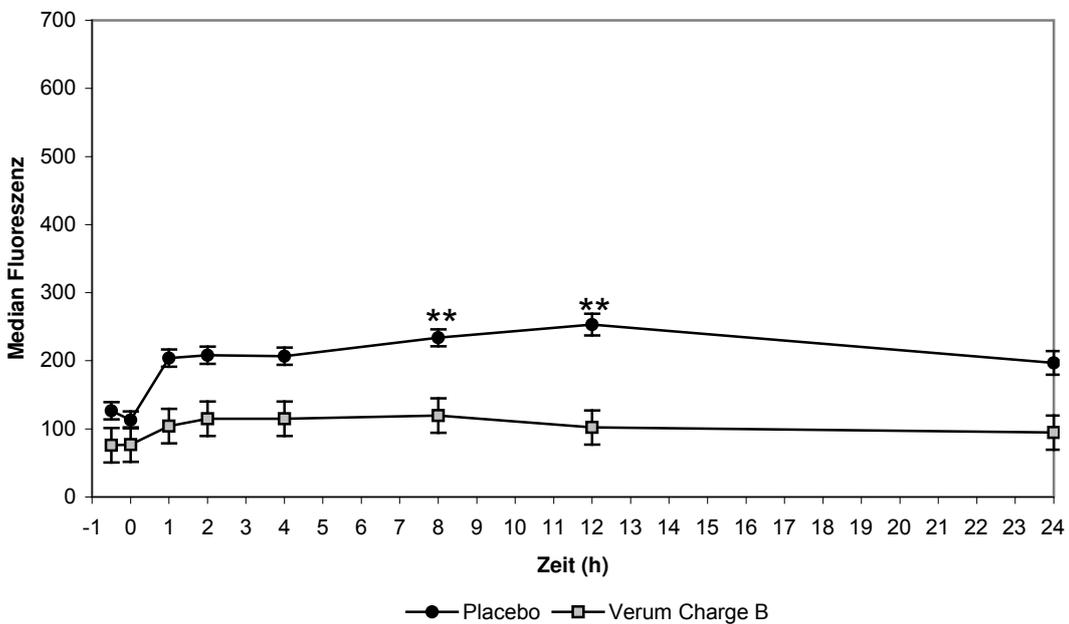
### 3.4.3. CD11b-Expression

Zur Baseline und zur Baseline ‚Verumeffekt‘ gab es in beiden Versuchsgruppen keinen Unterschied in der CD11b-Expression auf PMNL zur Placebogruppe.

In der Versuchsgruppe der Verumcharge A gab es auch zu den übrigen Messzeitpunkten keinen signifikanten Unterschied im Vergleich mit der Placebogruppe (Abb. 3.71.). In der Versuchsgruppe der Verumcharge B dagegen zeigte sich zu den Messzeitpunkten 8h und 12h eine signifikant niedrigere CD11b-Expression als in der Placebogruppe. Die übrigen Unterschiede erreichten nicht das Signifikanzniveau. Dennoch lagen auch hier die Messwerte der Verumgruppe tendenziell unter denen der Placebogruppe (Abb. 3.72.).



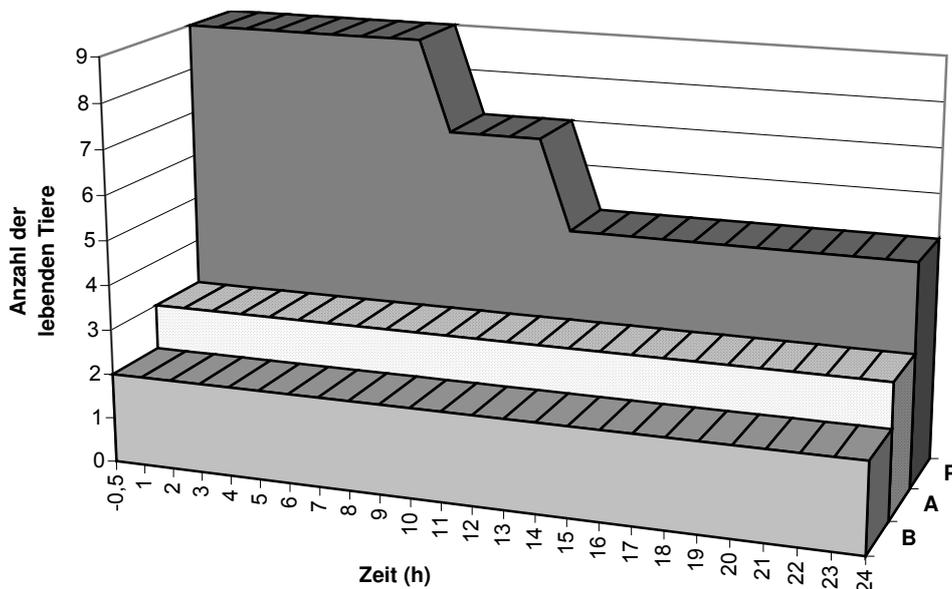
**Abb. 3.71.:** CD11b-Expression auf PMNL *ex vivo*. Verumgruppe mit Charge A (n=3) vs. Placebogruppe (n=9). Darstellung als Median der Fluoreszenz  $\pm$  S.E.M.



**Abb. 3.72.** CD11b-Expression auf PMNL *ex vivo*. Verumgruppe mit Charge B (n=2) vs. Placebogruppe (n=9). Darstellung als Median der Fluoreszenz  $\pm$  S.E.M. Signifikanzen: \*\*  $p < 0.01$ .

### 3.5. Intergruppenvergleich: Überleben

In den Verumgruppen der Chargen A (n=3) und B (n=2) überlebten alle Versuchstiere den gesamten Versuchszeitraum (0% Sterblichkeit). In der Placebogruppe (n=9) starben zwei Tiere nach der 8. Stunde (22,2% Sterblichkeit), zwei weitere Tiere starben nach der 12. Stunde (44,4% kumulierte Sterblichkeit). Die Unterschiede in der Sterblichkeit zwischen den Gruppen erreichten jedoch in einem Kaplan-Meier-Log-Rank-Test nicht das Signifikanzniveau (Abb. 3.73.).



**Abb. 3.73.:** Überleben der Schafe während des Versuchszeitraums. Dargestellt ist die Anzahl der lebenden Tiere zu den jeweiligen Messzeitpunkten in den einzelnen Versuchsgruppen. *P (dunkelgrau)*: Placebogruppe; *A (weiss)*: Verumgruppe der Charge A; *B (hellgrau)*: Verumgruppe der Charge B.

## 4. Diskussion

Sepsis, die Anwesenheit von Bakterien oder deren Produkten im Blutstrom und eine daraus resultierende überschießende systemische Entzündungsreaktion, gehört nach wie vor zur häufigsten Todesursache auf nicht-kardiologischen Intensivstationen (SANDS, 1997). Eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie, die zu einer Sepsis bzw. einem SIRS und deren Folgen führt, spielen die beiden eng miteinander verknüpften Vorgänge der Inflammation und der Hämostase. Insbesondere die Thrombozyten stellen dabei ein Bindeglied zwischen den beiden Systemen dar. Nach ihrer Aktivierung können diese sowohl die Blutgerinnung als auch die Entzündungsreaktion aktiv verstärken und steuern (AWAD, 2003; TAPPER, 2000; MAVROMMATIS, 2000). Über die disseminierte intravasale Gerinnung (DIC) mit Verbrauchskoagulopathie tragen die Blutplättchen außerdem zu einem bedeutenden Teil zur Ausprägung des Multiorganversagens bei und damit zur hohen Letalität des SIRS (SHARMA, 2003; IDELL, 2001). Die Aktivierungsvorgänge von Thrombozyten und Leukozyten sowie deren Interaktion im Verlauf eines SIRS standen daher im besonderen Interesse dieser Arbeit.

Das oligomere Glykoprotein Thrombospondin-1, welches unter anderem aus thrombozytären  $\alpha$ -Granula stammt, ist an der Rekrutierung ruhender Thrombozyten, deren Adhäsion und Aggregation maßgeblich beteiligt, kann aber auch antikoagulatorische Wirkungen haben (KEHREL, 1996; BONNEFOY, 2001; TULASNE, 2001; XIE, 2001). Zudem spielt es im Rahmen von Entzündungsreaktionen insbesondere des Lungengewebes eine entscheidende Rolle (LAWLER, 1998). In dieser Arbeit wurde untersucht, in wie weit Thrombospondin-1 auf die überschießende Aktivierung des Gerinnungssystems im Rahmen eines SIRS hemmend wirken kann und somit eine neue Therapieoption bei der Behandlung der schweren Sepsis und des septischen Schocks bietet. Außerdem sollte geprüft werden, ob sich bestimmte Parameter der Aktivierung von Thrombozyten und Leukozyten als frühe Prognoseparameter für den Verlauf der Sepsis bzw. des SIRS eignen.

Die Untersuchungen erfolgten in einer prospektiven, randomisierten, placebokontrollierten, verblindeten, tierexperimentellen Vorstudie. Allen Personen in direktem Kontakt mit den Tieren und allen an den Laboruntersuchungen beteiligten Personen war nicht bekannt, ob die Tiere Placebo oder Verum erhalten hatten.

#### 4.1. Sepsismodell am endotoxinämischen Schaf

Die Untersuchung erfolgte am endotoxinämischen chronisch instrumentierten Schaf. Durch eine 24stündige Dauerinfusion mit 10ng/kgKG/min Lipopolysaccharid (LPS) von *Salmonella typhimurium* wurde ein SIRS ausgelöst. Neben der Überwachung der hämodynamischen Parameter durch ein invasives Monitoring wurde zu acht Zeitpunkten der Funktionszustand von Thrombozyten und Leukozyten in durchflusszytometrischen Messungen bestimmt.

Das Schaf wurde als Versuchstier für das Sepsismodell ausgewählt, da die Schafe analog zu einem Menschen überwacht und behandelt werden konnten. Die Reaktionen auf die Endotoxingabe und die dafür nötige Dosierung sind bei Schaf und Mensch sehr ähnlich (BONE, 1998; VAN DEVENTER, 1990). Die intravenöse Endotoxingabe beim Schaf ist aus diesen Gründen ein etabliertes Modell in der Sepsisforschung (TRABER, 2000; PARKER, 2001).

Nach Induktion des SIRS zeigte sich bei nahezu allen Tieren erwartungsgemäß eine mehr oder weniger ausgeprägte Verschlechterung des Allgemeinzustands. Die Tiere fraßen nicht mehr und einige legten sich auf den Boden des Käfigs. Im weiteren Verlauf adaptierten sich einige der Tiere wieder an die Situation und begannen erneut zu fressen, während andere in dem verschlechterten Allgemeinzustand blieben. Die aufgetretenen Todesfälle während des Versuches standen in Zusammenhang mit einer respiratorischen Insuffizienz. Während des gesamten Versuchsablaufes wurden alle Tiere durch eine Tierärztin betreut. Bei einigen irreversibel präfinalen Tieren wurde aus ethischen Gründen eine vorzeitige Euthanasie durch die Tierärztin durchgeführt.

Durch die unabhängige Tierärztin mussten einige der Schafe, welche verdeckt vorerkrankt waren und zum Beispiel durch eine deutliche Erhöhung der Körpertemperatur auffielen, aus dem Versuch genommen werden und standen daher für die Durchführung und Auswertung des Versuches nicht mehr zur Verfügung. Andere Tiere zeigten bereits zur Baseline maximal erhöhte Aktivierungsparameter der Thrombozyten und Leukozyten ebenfalls als Ausdruck einer Vorerkrankung, so dass auch diese nachträglich aus der Auswertung ausgeschlossen werden mussten. Aufgrund dieser Umstände standen insbesondere in den Verumgruppen deutlich weniger Schafe für die Auswertung zur Verfügung als geplant; in der Verumgruppe der Charge A drei Tiere, in der Verumgruppe der Charge B nur zwei Schafe. In der

Verumgruppe der Charge B ist die Berechnung von statistischen Signifikanzen daher nicht zulässig. Die Ergebnisse können nur als mögliche Tendenz betrachtet werden.

## **4.2. Das Verum Thrombospondin-1**

Die am N-terminalen Ende des Thrombospondinmoleküls befindliche heparinbindende Domäne besitzt drei Aminosäuresequenzen, die mit hoher Affinität an Heparin und Heparansulfat-Proteoglykane binden. Dazu zählen die Sequenzen ARKGSGRR (Aminosäuren 22-29), MKKTRG (Aminosäuren 79-84) und TRDLASIALRLIAKGVN-DNF (Aminosäuren 170-189). Über diese Sequenzen kann Thrombospondin-1 auch an Heparansulfat-Proteoglykane auf Zelloberflächen und an oberflächengebundenes Fibrinogen binden. Dazu passt die Beobachtung, dass Heparin und Heparansulfat die Bindung von Thrombospondin-1 an Zelloberflächen verhindern können. Über diese Bindungen nimmt die heparinbindende Domäne eine wichtige Funktion in der Steuerung und Aktivierung der Thrombozyten-Thrombozyten-Interaktion durch Thrombospondin-1 wahr (CLEZARDIN, 1997; RABHI-SABILE, 1996). Die isolierte N-terminale Sequenz hat die gleichen Zellbindungseigenschaften wie ein intaktes Thrombospondinmolekül (CHEN, 1996). Thrombin ist in der Lage, ein 28kDa großes Fragment mit der heparinbindenden Domäne vom N-terminalen Ende abzuspalten. Der verbleibende Rest des Thrombospondinmoleküls verliert damit die Fähigkeit, an Heparin oder Heparansulfat-Proteoglykane zu binden (PANETTI, 1999; RABHI-SABILE, 1996).

Thrombospondin-1 kann unterschiedliche Konformationen einnehmen (DETWILER, 1992). Das in dieser Arbeit als Verum eingesetzte Thrombospondin-1 lag in zwei Chargen vor, die sich chemisch definiert unterschieden und während des Versuchs unterschiedliche Eigenschaften zeigten. Aus Schutzgründen kann auf den Unterschied der beiden Verumchargen hier nicht näher eingegangen werden.

## **4.3. Innergruppenvergleich: Placebo**

Um festzustellen, ob sich die gemessenen Parameter als frühe Prognoseparameter für den weiteren klinischen Verlauf der Sepsis bzw. des SIRS eignen, erfolgte die Aufteilung der Placebogruppe in zwei Untergruppen, welche dann miteinander

verglichen wurden. Es erfolgte eine Unterscheidung zwischen Schafen der Placebogruppe, welche den gesamten Versuchszeitraum überlebt hatten (n=5), und zwischen Schafen der Placebogruppe, welche vor dem Ende des Versuches am SIRS gestorben waren (n=4).

#### 4.3.1. Thrombozyten

Zu Beginn des SIRS zeigt sich in der überlebenden Placebogruppe eine höhere *ex vivo*-Anbindungsfähigkeit von Thrombospondin-1-FITC, Gerinnungsfaktor VIIa-FITC, von-Willebrand-Faktor-FITC, Gerinnungsfaktor XIII-FITC und von Fibrinogen-FITC. Zum Zeitpunkt 1h erreicht dieser Unterschied mit Ausnahme des Gerinnungsfaktors XIII in den jeweiligen Messreihen das Signifikanzniveau. Bei der Anbindung von Fibrinogen war auch der Unterschied zum Zeitpunkt 2h signifikant. Insgesamt zeigt sich hier erneut die Konsistenz der einzelnen Messparameter. Diese Ergebnisse sprechen angesichts der von LEVI (2004) und YAGUCHI (2004) beschriebenen Veränderungen der Thrombozyten während einer Sepsis/SIRS (vgl. Kap. 4.4.8.) dafür, dass in der überlebenden Placebogruppe Thrombozyten vorliegen, deren physiologische Funktion besser erhalten ist als in der gestorbenen Placebogruppe. Diese besser erhaltene Funktion im Verlauf des SIRS könnte eine Erklärung sein, warum diese Tiere die Erkrankung überlebten, während die anderen Tiere vorzeitig an den Folgen des SIRS verstarben. Thrombospondin-1-FITC, Gerinnungsfaktor VIIa-FITC, von-Willebrand-Faktor-FITC, Gerinnungsfaktor XIII-FITC und Fibrinogen-FITC könnten über den gleichen Mechanismus, der während der SIRS-Reaktion ausgelöst wird, an Thrombozyten binden. Die Messung der Anbindung von Thrombospondin-1-FITC, des Gerinnungsfaktors VIIa-FITC, des von-Willebrand-Faktors-FITC und insbesondere des Fibrinogen-FITC könnten sich daher als frühe Vorhersageparameter für die Prognose einer schweren Sepsis eignen. In einer klinischen Studie sollte diese Hypothese daher getestet werden.

Auch hier wurde die zusätzliche Aktivierbarkeit durch Kollagen und TRAP *in vitro* betrachtet, um die funktionelle Kapazität der Thrombozyten in den beiden Untergruppen zu vergleichen. Hier zeigten sich nur sehr geringe Unterschiede, welche nur zu einzelnen Messzeitpunkten signifikant wurden. Der Unterschied in der Anbindung des Gerinnungsfaktors VIIa zum Zeitpunkt 4h könnte im Vergleich zur Größenordnung der anderen Unterschiede ein isolierter Messfehler sein, der sich bei

der sehr kleine Gruppenstärke statistisch auswirkt. Insgesamt erhält man durch die *in vitro*-Aktivierung der Thrombozyten durch Kollagen und TRAP keine zusätzlichen Informationen bezüglich der Unterscheidung zwischen Tieren, die am SIRS versterben, und Tieren, welche das SIRS überleben. Die Untersuchung der *in vitro*-Aktivierbarkeit durch Kollagen oder TRAP scheint sich daher als Prognoseparameter einer Sepsis eher nicht zu eignen.

#### **4.3.2. Monozyten**

In der Fibrinogen-FITC-Bindung an Monozyten zeigte sich sowohl vor Beginn als auch nach Beginn des SIRS eine signifikant höhere Anbindung in der Placebogruppe der überlebenden Tiere als in der Placebogruppe der gestorbenen Tiere. Schon vor Beginn des SIRS scheint es in dem Bindungsverhalten der Monozyten einen Unterschied zu geben, der sich auf das Überleben einer schweren Sepsis/SIRS auswirken könnte. In der Anbindung des Fibrinogen-Antikörpers ergab sich zum Messzeitpunkt 1h eine signifikant höhere Anbindung an Monozyten als Ausdruck einer stärkeren Fibrinogenbindung *in vivo*. Tendenziell könnte dieser Parameter als Prognoseparameter geeignet sein und sollte daher ebenfalls in einer klinischen Studie verifiziert werden. Für die Expression des Rezeptors CD11b ergab sich ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Untergruppen. In der Gruppe der überlebenden Tiere zeigte sich eine signifikant niedrigere CD11b-Expression als in der Gruppe der gestorbenen Tiere. Die Monozyten waren im Verlauf des SIRS in der überlebenden Placebogruppe also weniger aktiviert als in der anderen Untergruppe. Die CD11b-Expression auf Monozyten scheint daher als guter Prognosefaktor in Frage zu kommen. Auch dies sollte in einer klinischen Studie überprüft werden. In der Ausbildung von Thrombozyten-Monozyten-Assoziaten ergab sich kein signifikanter Unterschied und auch keine eindeutige Tendenz zwischen den beiden Untergruppen. Das Ausmaß der Bildung von Thrombozyten-Monozyten-Assoziaten scheint daher als Prognosefaktor eher ungeeignet.

#### **4.3.3. PMNL**

In der Bindung von Fibrinogen-FITC an PMNL ließ sich zwischen der Placebogruppe der überlebenden Tiere und der Placebogruppe der gestorbenen Tiere kein

Unterschied nachweisen, so dass sich hier kein Prognosefaktor ableiten lässt. Das Ausmaß der Fibrinogenbindung *in vivo* dagegen, welches über die Bindung des Fibrinogen-Antikörpers erfasst wurde, war in der überlebenden Placebogruppe signifikant größer. Aus diesem Parameter könnte man daher vielleicht auf die Prognose einer Sepsis/SIRS schließen. In der CD11b-Expression auf PMNL zeigte sich eine hochsignifikant kleinere CD11b-Expression der überlebenden Placebogruppe im Vergleich mit den gestorbenen Tieren. Die PMNL der überlebenden Tiere waren, wie schon für die Monozyten beobachtet, deutlich weniger aktiviert, so dass sich auch dieser Parameter sehr gut als früher Prognoseparameter für den Verlauf einer schweren Sepsis eignen könnte. Beide Parameter sollen auch hier in klinischen Studien weiter untersucht werden.

## 4.4. Intergruppenvergleich: Thrombozyten

### 4.4.1. Baseline und Baseline ‚Verumeffekt‘

Zur Baseline wurde ein Ausgangswert vor Applikation des Verums und vor Beginn der LPS-Infusion erfasst. Erwartungsgemäß zeigte sich nach Ausschluß der offensichtlich vorerkrankten Tiere durch die unabhängige Tierärztin in nahezu allen Messreihen kein signifikanter Unterschied zwischen den Verumgruppen und der Placebogruppe, was die Konsistenz der Messergebnisse bestätigt. Lediglich bei der Untersuchung der Anbindung des Gerinnungsfaktors XIII an Thrombozyten und in der Anbindung von Thrombospondin-1 an Thrombozyten jeweils nach *in vitro*-Aktivierung fand sich bei vier einzelnen Messungen isoliert ein signifikanter Unterschied zwischen den Baselines. Da dieser Effekt isoliert und ohne Entsprechung in korrespondierenden Messungen blieb, muss hier von einer akzidentell artifiziellen Voraktivierung der Versuchsansätze ausgegangen werden.

Die Baseline ‚Verumeffekt‘ erfasst Veränderungen, welche nach Applikation des Verums, aber vor Beginn des SIRS aufgetreten sind. Bei den meisten der Messungen zeigte sich auch hier kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Verumgruppen und der Placebogruppe. Bei insgesamt 9 Einzelmesswerten dagegen zeigte sich in den Verumgruppen dagegen eine signifikant höhere Aktivierung als in der Placebogruppe. Dies zeigte sich bei der Bindung von Thrombospondin-1 der Charge A an Thrombozyten *ex vivo* in. Nach *in vitro*-Aktivierung zeigte sich auch in folgendenden Einzelmessungen ein Unterschied zur Baseline ‚Verumeffekt‘: in der Charge A in der

Bindung von Thrombospondin-1 nach Kollagen- und TRAP-Aktivierung, von Gerinnungsfaktor XIII nach Kollagen- und von-Willebrand-Faktor nach Ristocetin-Aktivierung. Das als Verum zugeführte Thrombospondin-1 der Charge A scheint schon vor Beginn des SIRS einen geringen aktivierenden Effekt auf die Thrombozyten zu haben, der sich zwar in den meisten Parametern nicht statistisch signifikant niederschlägt, aber in einigen Messreihen nachweisbar war. Das Verum der Charge B hat diesen aktivierenden Effekt nicht gezeigt. Verdeckte Vorerkrankungen der vom Züchter gelieferten Schafe erschwerten die Auswertung der Versuchsreihen erheblich.

#### 4.4.2. Thrombospondin-1-Bindung

Thrombospondin-1 kann unter anderem über die Rezeptoren Glykoprotein IV (CD36), IAP (CD47) und den Fibrinogen-Rezeptor Glykoprotein IIb/IIIa an Thrombozyten binden (BONNEFOY, 2001). Es wurde die Anbindung von *in vitro* zugesetztem mit FITC markiertem Thrombospondin-1 untersucht. Da das als Verum eingesetzte Thrombospondin-1 unmarkiert vorliegt, wurden in den durchflusszytometrischen Messungen nur die *in vitro* zugesetzten Thrombospondinmoleküle erfasst, nicht aber das *in vivo* befindliche als Verum genutzte Thrombospondin-1.

Nach der Induktion des SIRS waren die Thrombozyten so verändert, dass sie *in vitro* zugesetztes Thrombospondin-1 banden. In der Verumgruppe der Charge A zeigte sich im Vergleich zur Placebogruppe nach Beginn des SIRS eine signifikant höhere Bindung von *in vitro* zugesetztem Thrombospondin-1. Nach Aktivierung durch LPS besitzen die Blutplättchen unter Anwesenheit des Verums eine größere Fähigkeit Thrombospondin-1 zu binden. Worauf diese Fähigkeit beruht, muss noch geklärt werden. Dieser Effekt erreicht seinen Gipfel zum Messzeitpunkt 4h und fällt danach kontinuierlich auf das Niveau der Placebogruppe ab bis zum Zeitpunkt 12h, an dem kein Unterschied mehr zwischen der Verumgruppe und der Placebogruppe festzustellen ist. Dies korrespondiert mit der Halbwertszeit von *in vivo* vorliegendem Thrombospondin-1, welche bei etwa neun Stunden liegt (DAWES, 1983). Die Fähigkeit der gesteigerten Thrombospondin-1-Bindung ist vermutlich an die Anwesenheit des Verums gekoppelt. Sobald das Thrombospondin-1 aufgrund seiner biologischen Halbwertszeit nicht mehr in ausreichender Konzentration im Organismus vorliegt, lässt sich auch der oben geschilderte Effekt nicht mehr nachweisen und erreicht das Niveau der Placebogruppe.

In der Verumgruppe der Charge B dagegen gibt es nur einen geringen Unterschied zur Placebogruppe, welcher zu keinem Messzeitpunkt das Signifikanzniveau erreicht. Das Verum der Charge B ist nicht in der Lage, die erhöhte Bindungsfähigkeit für Thrombospondin-1 hervorzurufen.

#### **4.4.3. Annexin V-Bindung**

Annexin V hat eine hohe Bindungsaffinität zu negativ geladenen Phosphatidylserinen, welche nach Aktivierung von Blutplättchen in großen Mengen auf deren Oberfläche gelangen und dort eine prokoagulatorische Oberfläche ausbilden. Die Anbindung von *in vitro* zugesetztem Annexin V kann daher als Marker für eine starke Thrombozytenaktivierung dienen (DÖRMANN, 1998).

In der Verumgruppe der Charge A zeigte sich tendenziell, dass die Annexin-Anbindung zwischen der zweiten und zwölften Stunde unter der der Placebogruppe lag. Auch wenn dieser Unterschied nicht das Signifikanzniveau erreicht, scheinen unter Anwesenheit von Thrombospondin-1 der Charge A Thrombozyten vorzuliegen, die in der SIRS-Reaktion in geringerem Maße eine prokoagulatorische Oberfläche ausgebildet haben und damit auch weniger stark aktiviert wurde. Die Thrombozyten der Tiere, welche das Verum der Charge A erhalten hatten, waren während des SIRS nicht „prokoagulant“ aktiviert.

In der Verumgruppe der Charge B dagegen lag die Annexin-Bindung der Thrombozyten in den ersten zwei Stunden über der der Placebogruppe. Der Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant. Im weiteren zeitlichen Verlauf zeigte sich dann kein Unterschied mehr zur Placebogruppe.

#### **4.4.4. Gerinnungsfaktor VIIa-Bindung**

Der Gerinnungsfaktor VIIa hat neben seiner Rolle in der plasmatischen Gerinnungskaskade die Fähigkeit, unter Anwesenheit von Calciumionen direkt an aktivierte Thrombozyten zu binden, um an deren Oberfläche die Bildung von Thrombin zu bewirken. Da er nicht an ruhende Blutplättchen binden kann, kann die Untersuchung der *in vitro*-Bindung von FITC-markiertem Gerinnungsfaktor VIIa als Parameter für die Thrombozyten-Aktivierung dienen (LISMEN, 2003; LAU, 2003).

Nach Beginn des SIRS zeigte sich in der Verumgruppe der Charge A analog zur Thrombospondin-1-Bindung eine höhere Anbindungsfähigkeit für den Gerinnungsfaktor VIIa als in der Placebogruppe. Dieser Effekt hält ebenfalls bis zum Messzeitpunkt 8h an und fällt dann unter das Niveau der Placebogruppe, sobald die Konzentration des Verums im Organismus abfällt. Dieser Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen erreicht jedoch, vermutlich aufgrund der geringen Gruppenstärken, zu keinem Messzeitpunkt das Signifikanzniveau. Gerinnungsfaktoren binden für Calciumionen an negativ geladene Phospholipide der Thrombozytenmembran. Da aber keine gesteigerte Bindung von Annexin V beobachtet werden konnte, welche Phosphatidylserin auf der Plättchenoberfläche anzeigt, muss eine stärkere Anbindung an negativ geladene Phospholipide der Thrombozyten als Ursache für den Effekt ausgeschlossen werden. Die Fähigkeit, Gerinnungsfaktor VIIa während eines SIRS in Gegenwart von Thrombospondin-1 zu binden, muss daher eine andere, noch nicht geklärte Ursache haben.

In der Verumgruppe der Charge B dagegen lag die Anbindungsfähigkeit für den Gerinnungsfaktor VIIa tendenziell unter der der Placebogruppe. Auch dieser Unterschied wird zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikant, kann aber Hinweis darauf sein, dass das Verum der Charge B hier einen hemmenden Einfluss auf die Aktivität der Thrombozyten haben könnte. Auch dies korrespondiert mit den unterschiedlichen Eigenschaften von Thrombospondin-1 in der Charge A und denen von Thrombospondin-1 in der Charge B.

#### **4.4.5. Gerinnungsfaktor XIII-Bindung**

Der Gerinnungsfaktor XIII kann neben seiner Fähigkeit Fibringerinnsel quervernetzen, über das Glykoprotein IIb/IIIa an die Oberfläche von Blutplättchen binden (DARDIK, 2002).

In der Verumgruppe der Charge A zeigt sich nach Induktion des SIRS eine höhere Gerinnungsfaktor XIII-Bindung an Thrombozyten als in der Placebogruppe. Dieser Effekt fällt dann im Verlauf wieder ab und erreicht zum Zeitpunkt 12h das Niveau der Placebogruppe. Es liegen in der Verumgruppe Blutplättchen vor, welche mehr Faktor XIII binden. Dieser Verlauf ist analog zur gemessenen Thrombospondin-1- und Gerinnungsfaktor VIIa-Bindung. Unter Anwesenheit des Verums ist der oben geschilderte Effekt nachweisbar, und sobald das Verum in seiner Konzentration im

Organismus abfällt, lässt auch dieser Effekt nach. In der Verumgruppe der Charge B lässt sich eine ähnliche Tendenz nachweisen, allerdings weniger stark ausgeprägt. Da aber eine verstärkte Aktivierung der Thrombozyten mit Annexin V, CD62 und CD63 nicht beobachtet werden konnte, muss auch die verstärkte Anbindung von Gerinnungsfaktor XIII an Thrombozyten im Rahmen des SIRS nach Thrombospondin-1-Gabe auf einem noch nicht geklärten Phänomen beruhen, welches vermutlich bei allen analog beobachteten Effekten zu finden ist.

#### **4.4.6. von-Willebrand-Faktor-Bindung**

Der von-Willebrand-Faktor (vWF) besitzt in jedem seiner Monomere die Domäne A1. Diese dient als Bindungsstelle für das Glykoprotein Ib $\alpha$ , welches Teil des thrombozytären vWF-Rezeptors ist (RUGGERI, 2003). Über die Domäne C2 kann der von-Willebrand-Faktor auch an den aktivierten Rezeptor GPIIb/IIIa der Thrombozyten zu binden (SCHMUGGE, 2003).

Wie auch schon in der Anbindung von Thrombospondin-1 und der Gerinnungsfaktoren XIII und VIIa zeigt sich hier in der Verumgruppe der Charge A, dass nach Beginn des SIRS eine höhere Bindung des vWF an Thrombozyten stattfindet. Dieser Effekt hält auch hier nur bis zur zwölften Stunde an, um dann das Niveau der Placebogruppe zu erreichen. Auch die stärkere vWF-Anbindung ist wie die TSP-1-Bindung und die Bindung der Faktoren XIII und VIIa an die Anwesenheit von Thrombospondin-1 in einer bestimmten Konzentration gebunden. Nach Abfallen der Verumkonzentration im Organismus ist der Effekt der gesteigerten Bindungsfähigkeit nicht mehr nachweisbar. In der Verumgruppe der Charge B ist dieser Effekt ebenfalls angedeutet, erreicht aber nicht das Signifikanzniveau.

#### **4.4.7. Aktivierbarkeit *in vitro***

##### **4.4.7.1. Aktivierung durch Kollagen**

Um zusätzlich auch Informationen über die funktionelle Kapazität der Thrombozyten zu erhalten, d.h. die Fähigkeit zu einer weiteren Aktivierung bzw. Steigerung der Bindungsfähigkeit, erfolgte *in vitro* die zusätzliche Aktivierung durch Kollagen.

Zunächst wurde die Thrombospondin-1-Anbindung an Thrombozyten nach Aktivierung durch Kollagen untersucht. In der Placebogruppe zeigte sich, dass keine weitere *in*

*in vitro*-Aktivierung möglich war. Die Blutplättchen der Placebogruppe hatten keine funktionelle Kapazität mehr. Die Bindungsfähigkeit konnte nicht weiter gesteigert werden. In der Verumgruppe der Charge A dagegen ließ sich durch die Zugabe von Kollagen noch eine weitere Steigerung der Anbindungsfähigkeit für Thrombospondin-1-FITC erreichen, vor allem zu Beginn und gegen Ende des Versuchszeitraums. In der Verumgruppe der Charge A war die funktionelle Kapazität im Gegensatz zur Placebogruppe noch erhalten. In der Verumgruppe der Charge B zeigte sich ein ähnlicher Erhalt der funktionellen Kapazität im Gegensatz zur Placebogruppe. Allerdings war die funktionelle Kapazität hier nicht ganz so ausgeprägt, und der Unterschied ließ sich nur in den ersten vier Stunden des Versuches nachweisen. Beide Verumchargen sind in unterschiedlichem Ausmaß in der Lage, die funktionelle Kapazität der Thrombozyten im Verlauf des SIRS im Gegensatz zu unbehandelten Tieren zu erhalten.

In der Anbindung des Gerinnungsfaktors XIII an Thrombozyten nach *in vitro*-Aktivierung durch Kollagen zeigte sich in der Placebogruppe kein Zuwachs der Bindungsfähigkeit. Die Thrombozyten hatten in dieser Gruppe keine funktionelle Kapazität mehr. In beiden Verumgruppen hingegen zeigte sich eine gering erhaltene funktionelle Kapazität, vor allem in den ersten vier Stunden des Versuchszeitraumes, in dem sich durch Kollagen eine geringgradige Steigerung der Bindungsfähigkeit für Gerinnungsfaktor XIII-FITC erzielen ließ, auch wenn der Unterschied nur zu wenigen Zeitpunkten das Signifikanzniveau erreichte. Stärker ausgeprägt war der Erhalt der funktionellen Kapazität in der Verumgruppe der Chargen A.

In der Anbindung von Annexin V und des Gerinnungsfaktors VIIa an Thrombozyten nach *in vitro*-Aktivierung durch Kollagen zeigte sich zu keinem Zeitpunkt und in keiner Verumgruppe ein signifikanter oder tendenzieller Unterschied zur Placebogruppe. Es ließ sich kein Unterschied in der funktionellen Kapazität für die Anbindung von Annexin V und Faktor VIIa nachweisen.

#### 4.4.7.2. Aktivierung durch TRAP

Durch die Aktivierung mit *in vitro* zugesetztem *Thrombin-receptor activating peptide* (TRAP) ließ sich in der Placebogruppe zu keinem der Versuchszeitpunkte eine weitere Steigerung der Bindungsfähigkeit für Thrombospondin-1 erreichen. In den Verumgruppen der Chargen A und B zeigte sich tendenziell eine geringe erhaltene

funktionelle Kapazität bis zum Messzeitpunkt 8h. Das Signifikanzniveau erreichte dieser Unterschied jedoch nicht. Insgesamt lässt sich eine weitgehende Übereinstimmung der Befunde nach *in vitro*-Aktivierung mit TRAP und Kollagen finden. Nach Zugabe von Kollagen oder TRAP zeigte sich in den Verumgruppen eine gering bis mäßig erhaltene funktionelle Kapazität, während in der Placebogruppe keine zusätzliche Steigerung der Bindungsfähigkeit mehr zu erreichen war.

#### 4.4.7.3. Aktivierung durch Ristocetin A

Um die Fähigkeit der Thrombozyten zu untersuchen, nach *in vitro*-Aktivierung weiteren von-Willebrand-Faktor zu binden, erfolgte eine zusätzliche Aktivierung mit Ristocetin. In der Placebogruppe ließ sich wie auch schon nach *in vitro*-Aktivierung durch Kollagen und TRAP keine weitere Steigerung der Bindungsfähigkeit hervorrufen, die funktionelle Kapazität war erschöpft. In der Verumgruppe der Charge A zeigte sich tendenziell eine geringe zusätzliche funktionelle Kapazität zu den Versuchszeitpunkten 4h und 8h, ohne das Signifikanzniveau zu erreichen. In der Verumgruppe der Charge B zeigte sich kein Unterschied in der funktionellen Kapazität. Insgesamt ließ sich in allen Versuchsgruppen durch die Zugabe von Ristocetin, anders als durch Kollagen und TRAP, keine signifikante zusätzliche Steigerung der Bindungsfähigkeit *in vitro* hervorrufen.

#### 4.4.8. Zusammenfassung: Thrombozyten

Für das Lipopolysaccharid gramnegativer Bakterien konnte in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden, dass es sowohl in verschiedenen Tiermodellen als auch in menschlichem Vollblut zu einer verstärkten Thrombozytenaggregation führt (VINZENT, 2002). Zusätzlich werden Blutplättchen durch Immunglobuline, C-reaktives Protein, Komplementfaktoren und Interleukin-6 als Akut-Phase-Proteine, sowie durch freigesetzte Agonisten wie ADP und Serotonin aktiviert, so dass im Verlauf einer Sepsis bzw. eines SIRS aktivierte Thrombozyten in einem hyperaggregablem Zustand im Organismus zirkulieren (GAWAZ, 1997). Verschiedene Autoren zeigten jedoch, dass Blutplättchen von Sepsispatienten *in vitro* einen geringeren Aktivierungszustand als bei Gesunden aufweisen (LEVI, 2004; YAGUCHI, 2004). Dieser Effekt wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt. In allen Messreihen zeigte sich im Verlauf des SIRS

in der Placebogruppe keine Steigerung des *in vitro* untersuchten Aktivierungszustands bzw. der Bindungsfähigkeiten, sondern tendenziell eine allmähliche Abnahme der Substratanbindung *in vitro*. In der Untersuchung der Anbindung von Gerinnungsfaktor XIII und Gerinnungsfaktor VIIa erreichte diese Abnahme sogar das Signifikanzniveau (0h vs. 12h:  $p < 0.05$ ). Der Effekt der abnehmenden Bindungsfähigkeit von Thrombozyten im Rahmen des SIRS muss auf einem bisher noch nicht geklärten Phänomen beruhen. Diskutiert werden könnte, dass die hochaktivierten Thrombozyten bereits *in vivo* aggregiert haben und daher in *in vitro*-Experimenten nicht mehr mit anderen Substraten reagieren können (LEVI, 2004; YAGUCHI, 2004). Letztendlich müssen hier weitere Untersuchungen folgen, um die Ursache für diesen Effekt zu klären. Dass bei den Schafen tatsächlich ein schweres SIRS mit Thrombozytenaktivierung und Verbrauchskoagulopathie vorlag, zeigten der klinische Zustand, die sich regelhaft ausbildende schwere Thrombozytopenie (Daten nicht gezeigt) und die bei nahezu jedem Tier *post mortem* gefundenen teils massiven inneren Blutungen (blutige Pleuraergüsse, multiple petechiale Parenchymblutungen und Organhämatome).

Ein weiterer Effekt bei Sepsispatienten, der bereits in anderen Arbeiten beobachtet wurde, ist das verminderte Ansprechen der Thrombozyten auf Plättchenagonisten. Kollagen, ADP oder Adrenalin führen insbesondere in der Frühphase der Sepsis *in vitro* zu einer geringeren Aktivierung der Blutplättchen als bei Gesunden (BOLDT, 1997). Da die Adhäsionsmoleküle bei diesen Thrombozyten noch auf der Oberfläche exprimiert werden, sind dies keine „erschöpften“ Blutplättchen. Vielmehr kommt es bedingt durch die Sepsis zu einer funktionellen Störung wahrscheinlich auf Ebene des Arachidonsäure-Stoffwechsels. Außerdem scheinen die Inhaltsstoffe der  $\alpha$ -Granula und die Funktion der *dense bodies* ebenfalls bei Sepsispatienten verändert, so dass es zu einem verminderten Ansprechen auf Plättchenagonisten kommt (YAGUCHI, 2004; VINZENT, 2002). Auch dieser Befund wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt. In der Placebogruppe ließ sich sowohl nach *in vitro*-Aktivierung durch Kollagen als auch nach Aktivierung durch TRAP und Ristocetin bei keinem der untersuchten Parameter eine Zunahme der Aktivierung erreichen.

In der Verumgruppe der Charge A zeigte sich im Gegensatz zur Placebogruppe unter Anwesenheit von Thrombospondin-1 der Charge A eine gesteigerte Anbindung der

Substrate an die Thrombozyten. Für die Anbindung von Thrombospondin-1, Gerinnungsfaktor XIII und von-Willebrand-Faktor waren die Unterschiede statistisch signifikant. Aufgrund der biologischen Halbwertszeit von *in vivo* vorliegendem Thrombospondin von etwa neun Stunden (DAWES, 1983) zeigte sich dieser Effekt nur bis zur achten Stunde des Versuchszeitraums. Die Anwesenheit des Verums im Organismus erhält die Anbindungsfähigkeit der Thrombozyten für die Substrate, welche in der Placebogruppe durch das SIRS nicht mehr vorhanden ist. Legt man die Befunde aus den Arbeiten von YAGUCHI (2004) und VINZENT (2002) zugrunde, kann man hier folgern, dass bei den Tieren in dieser Untersuchung die Blutplättchen in ihrer normale Funktion weniger durch das SIRS beeinträchtigt waren. Dies wurde durch die Messung der Annexin V-Bindung bestätigt, in der sich zumindest tendenziell eine entsprechende Abnahme der Phosphatidylserin-Präsentation zeigte. Dies zeigt, dass sich die Thrombozyten tatsächlich weniger stark in einem prokoagulatorischen Zustand befanden. Auch in der Aktivierbarkeit *in vitro* als Ausmaß der funktionellen Kapazität zeigte sich ein Unterschied zur Placebogruppe. In der Verumgruppe der Charge A ließ sich durch Kollagen und TRAP eine höhere Anbindung von Thrombospondin-1 und Gerinnungsfaktor XIII als Ausdruck einer erhaltenen funktionellen Kapazität nachweisen. In der Anbindung von Gerinnungsfaktor VIIa und Annexin V zeigte sich kein Unterschied. Die Aktivierung durch Ristocetin zeigte nur eine tendenziell gesteigerte Anbindung von von-Willebrand-Faktor.

Es ergaben sich hier deutliche Hinweise darauf, dass die mit dem Thrombospondin-1 der Charge A behandelte Tiere geringer aktivierte Thrombozyten mit einer besser erhaltenen funktionellen Kapazität aufwiesen, auch wenn vermutlich aufgrund der geringen Gruppenstärke nicht alle Unterschiede das Signifikanzniveau erreichten. Die genaue Ursache der gesteigerten Bindungsfähigkeit der Thrombozyten für Thrombospondin-1, Gerinnungsfaktor VIIa, von-Willebrand-Faktor, Gerinnungsfaktor XIII und von Fibrinogen bei fehlender Aktivierung muss hier ungeklärt bleiben, da aus Schutzgründen nicht auf die Struktur des Verums eingegangen werden kann.

In der Verumgruppe der Charge B zeigte sich ein ähnlicher Effekt wie in der Gruppe der Charge A. Es fand sich eine signifikant stärkere Anbindungsfähigkeit für den Gerinnungsfaktor XIII und von-Willebrand-Faktor, tendenziell auch für Thrombospondin-1. Der Effekt war jedoch nicht so stark ausgeprägt und hielt auch nur bis zur vierten Stunde des Versuchszeitraums an. Wenn auch nicht so stark

ausgeprägt wie das Verum der Charge A, ist das Thrombospondin-1 der Charge B zumindest tendenziell in der Lage, die Funktion der Thrombozyten während des SIRS länger aufrecht zu erhalten. Nachdem die Konzentration des Verums aufgrund der kurzen biologischen Halbwertszeit unter einen bestimmten Spiegel gefallen ist, in diesem Falle nach der vierten Stunde, lässt dieser Effekt nach und die Messwerte erreichen das Niveau der Placebogruppe. Bei den Thrombozyten ließ sich *in vitro* durch Aktivierung mit Kollagen und TRAP zumindest in der Anbindung von Thrombospondin-1 ein Zuwachs der Bindungsfähigkeit erzielen. In der Anbindung von Gerinnungsfaktor XIII ergab sich nur ein sehr schwacher nicht signifikanter Anstieg. In der Anbindung von Annexin V, Gerinnungsfaktor VIIa und von-Willebrand-Faktor nach Aktivierung durch Ristocetin zeigte sich kein Zuwachs der Substratanbindung. Auch hier fand sich zumindest tendenziell eine geringere funktionelle Kapazität der Thrombozyten, welche im Vergleich zur Placebogruppe durch das Verum der Charge B im Verlauf des SIRS erhalten wird. Der Unterschied zur Verumgruppe der Charge A erklärt sich durch die veränderte Molekülstruktur des enthaltenen Thrombospondins-1.

## **4.5. Intergruppenvergleich: Leukozyten**

### **4.5.1. Bindung von exogenem Fibrinogen**

Monozyten und PMNL exprimieren auf ihrer Oberfläche das  $\beta_2$ -Integrin CD11b/CD18 (Mac-1). Es ist auch Rezeptor für Fibrinogen (RUBEL, 2002; LÖSCHE, 2001).

In der Verumgruppe der Charge A lag die Fibrinogen-Bindung an Monozyten zu Beginn des Versuches tendenziell über der in der Placebogruppe. Dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant. Ab dem Zeitpunkt 8h erreicht die Bindungsfähigkeit das Niveau der Placebogruppe. Dieser Befund passt zu den Ergebnissen der Substratbindung an Thrombozyten, in denen sich Unterschiede entsprechend der biologischen Halbwertszeit des als Verum eingesetzten Thrombospondins-1 nur bis zur achten Versuchstunde nachweisen ließen. In der Bindung von Fibrinogen an PMNL zeigte sich in der Placebogruppe ein deutlicher und rascher Anstieg der Bindungsfähigkeit nach Beginn des SIRS. Vermutlich liegt dieser Steigerung der Bindungsfähigkeit für Fibrinogen eine Konformationsänderung im PMNL-Fibrinogenrezeptor Mac-1 zugrunde, da die Dichte der Mac-1-Moleküle auf der PMNL-Membran nicht in gleicher Weise erhöht war. In der Verumgruppe der Charge A erfolgte dieser Anstieg etwa eine Stunde später (Baseline vs. 1h:  $p=0.96$ , Baseline vs.

2h:  $p=0.036$ ), erreicht dafür aber zumindest tendenziell höhere Werte. Das Auftreten der starken Bindungsfähigkeit der PMNL für Fibrinogen erfolgte in der Verumgruppe der Charge A signifikant später. Ab dem Zeitpunkt 8h kam es dann zu einem erneuten Abfall der Anbindungsfähigkeit, was auch hier der biologischen Halbwertszeit des Verums entsprechen könnte.

In der Verumgruppe der Charge B ergab sich nach der vierten Stunde des Versuches zumindest tendenziell eine etwas höhere Anbindung von Fibrinogen an Monozyten als in der Placebogruppe. Es könnten also eher stärker aktivierte Monozyten mit einer vermehrten CD11b-Expression vorgelegen haben. In der Anbindung von Fibrinogen an PMNL ergab sich kein signifikanter Unterschied. Dennoch erfolgte der Anstieg der Anbindung nach Beginn des SIRS auch hier tendenziell später als in der Placebogruppe.

#### **4.5.2. Bindung von endogenem Fibrinogen (Anti-Fibrinogen-Antikörper)**

In der Bindung des Anti-Fibrinogen-Antikörpers an Monozyten, welcher die *in vivo*-Bindung von Fibrinogen an die Leukozyten erfasst, zeigte sich in beiden Verumgruppen kein signifikanter Unterschied zur Placebogruppe. Lediglich in der Gruppe der Charge A zeigte sich zumindest tendenziell ab der achten Stunde des Versuches eine etwas geringere *in vivo*-Anbindung von Fibrinogen, was für das Vorliegen von weniger stark aktivierten Monozyten *in vivo* sprechen könnte. In der Bindung des Antikörpers an PMNL zeigte sich in der Placebogruppe direkt nach Beginn des SIRS eine hochsignifikante Zunahme (Baseline vs. 1h:  $p<0.001$ ). Hier zeigte sich die starke Veränderung der Bindungsfähigkeit der PMNL für Fibrinogen durch das SIRS. In beiden Verumgruppen dagegen fehlte dieser Anstieg. Stattdessen blieb die *in vivo*-Anbindung von Fibrinogen an PMNL auf unverändert niedrigem Niveau. Dieser Unterschied war statistisch hoch signifikant ( $p<0.001$ ). Beide Verumchargen könnten hier einen antiinflammatorischen Effekt auf PMNL gehabt haben.

#### **4.5.3. CD11b-Expression**

In der CD11b-Expression auf Monozyten zeigte sich in keiner der beiden Verumgruppen ein signifikanter Unterschied zur Placebogruppe. In der Verumgruppe

der Charge B lag die CD11b-Expression etwas unter der der Placebogruppe, so dass zumindest tendenziell weniger aktivierte Monozyten vorgelegen haben könnten. In der CD11b-Expression auf PMNL zeigte sich in der Placebogruppe direkt nach Beginn des SIRS wie auch schon in den anderen untersuchten Parametern ein signifikanter Anstieg (Baseline vs. 1h:  $p < 0.001$ ). Direkt nach Beginn eines SIRS kommt es vermittelt durch das Interleukin-8 zu einer vermehrten Expression des Integrins Mac-1, dessen Untereinheit CD11b ist (LEY, 2002; MONNERET, 2003). Daher läßt sich hier auch in dieser Arbeit die frühe Aktivierung der PMNL durch das SIRS nachweisen. In der Verumgruppe der Charge A findet sich dieser Anstieg ebenfalls, allerdings findet er hier signifikant später statt (Baseline vs. 1h:  $p = 0.9$ , Baseline vs. 2h:  $p = 0.1$ , Baseline vs. 4h:  $p = 0.008$ ). Die Aktivierung der PMNL setzt also unter Anwesenheit des Thrombospondins-1 der Charge A später ein. In der Verumgruppe der Charge B bleibt der Anstieg der CD11b-Expression nach Beginn des SIRS ganz aus. Zu den Zeitpunkten 8h und 12h ist dieser Unterschied statistisch signifikant. In der Verumgruppe der Charge A liegen PMNL vor, welche durch die SIRS weniger stark als für die Entzündungsreaktion zentrale Integrin Mac-1 exprimieren und somit weniger aktiviert sind. Zwischen dem Ausmaß der CD11b-Expression und der Schwere einer Sepsis bzw. eines SIRS besteht eine Korrelation (RUSSWURM, 2002), so dass sich hier nach Applikation des Verums der Charge A eine weniger schwere Sepsis nachweisen läßt. Warum dieser Effekt für Monozyten in dieser Untersuchung nicht nachweisbar war, muß hier ungeklärt bleiben.

#### **4.5.4. Monozyten-Thrombozyten-Assoziat**

Bei starker Aktivierung von Gerinnungssystem und Abwehrsystem kommt es zur Ausbildung von direkten Bindungen zwischen Thrombozyten und Monozyten, welche als Monozyten-Thrombozyten-Assoziat bezeichnet werden. Die Bildung solcher Assoziat ist vor allem vom Aktivierungszustand der Thrombozyten abhängig (LI, 2000).

In den Verumgruppen der Charge A und B zeigte sich kein Unterschied in der Ausbildung von Monozyten-Thrombozyten-Assoziaten zur Placebogruppe. Auf die Interaktion zwischen den beiden Zelltypen hat das Thrombospondin-1 der Chargen A und B keinen Einfluss.

#### 4.5.5. Zusammenfassung: Leukozyten

Nach dem Beginn einer durch das Eindringen von Mikroorganismen ausgelösten Sepsis bzw. SIRS kommt es nicht nur über die zytokinvermittelte Expression von *Tissue factor* auf Monozyten und Endothelzellen zu einer Aktivierung des Gerinnungssystems, sondern in erster Linie auch zu einer Abwehrreaktion der innate Immunabwehr (JOYCE 2004). Lipopolysaccharid führt über den leukozytären Rezeptor CD14 vor allem zu einer Aktivierung von Monozyten, aber auch von Makrophagen und PMNL (WATSON, 1994). Insbesondere die Monozyten sind entscheidend am Verlauf der Sepsis bzw. des SIRS beteiligt. Sie setzen unter anderem die proinflammatorischen Mediatoren TNF- $\alpha$ , Interleukin-1 und Interleukin-8 frei. Aber auch PMNL sind an den Vorgängen beteiligt und verstärken ihrerseits die Abwehrreaktion durch die Freisetzung von Interleukin-1, Interleukin-6, Interleukin-8, TNF- $\alpha$ , Proteinasen, Wasserstoffperoxid und freien Radikalen. So kommt es zur Beseitigung von eingedrungenen Mikroorganismen, aber auch zu Schädigungen von körpereigenen Geweben, wie Endothelzellen mit erhöhter Permeabilität und Zellen von Organparenchymen (TRAUTINGER, 1991; HOESEL, 2005).

Nach Auslösen des SIRS durch die Infusion von Lipopolysaccharid kam es erwartungsgemäß zu einer Aktivierung der Leukozyten. Insbesondere bei den PMNL, bei welchen es sich vor allem um die schnell reagierenden neutrophilen Granulozyten handelt, zeigte sich in der Placebogruppe schon innerhalb der ersten Stunde eine deutliche Zunahme in der Funktionsfähigkeit. Die CD11b-Expression und die Bindung von Fibrinogen an PMNL *in vivo* und *in vitro* steigerte sich signifikant und bestätigte damit die inflammatorische Antwort des Organismus auf das SIRS. Die untersuchten Werte sind daher empfindliche Parameter, um die Veränderung der Funktionsfähigkeit von PMNL nachzuweisen. Bei der Untersuchung der Monozyten mit Hilfe der gleichen Parameter ließ sich in der Placebogruppe keine Aktivitätsänderung der Monozyten nachweisen. Auch die Bildung von Monozyten-Thrombozyten-Assoziaten blieb im Verlauf des SIRS in der Placebogruppe weitgehend unverändert. Es zeigte sich, dass der Anteil der Monozyten-Thrombozyten-Assoziat im gesamten Verlauf des SIRS sehr niedrig war, obwohl die übrigen Parameter und der klinische Verlauf auf ein schweres SIRS hindeuteten. Diese Konstellation spricht dafür, dass ein schweres SIRS mit Multiorganversagen bei den Versuchstieren vorgelegen hat. Im Rahmen

eines Multiorganversagens lassen sich nur noch sehr wenige Monozyten-Thrombozyten-Assoziate im Blut nachweisen (GAWAZ, 1997; KIRSCHENBAUM, 2000). Im Rahmen eines Multiorganversagens binden die Monozyten-Thrombozyten-Assoziate verstärkt an die entzündlich veränderten Endothelzellen und werden so aus dem Blutstrom entfernt. Dies fördert wiederum die lokale Aktivierung der Gerinnung sowie der Entzündungsreaktion am Endothel, wodurch das Multiorganversagen begünstigt wird (ROY, 1994).

In der Verumgruppe der Charge A zeigten die PMNL im Vergleich zur Placebogruppe in den ersten Stunden des SIRS eine signifikant geringere Fibrinogenbindung *in vivo* sowie einen signifikant späteren Anstieg der Fibrinogenbindung *in vitro* und der CD11b-Expression. Die PMNL in der Verumgruppe waren also durch das SIRS weniger stark in ihrer Funktionsfähigkeit verändert als in Placebogruppe. Im weiteren Verlauf des Versuches zeigte sich dann in allen drei Parametern kein signifikanter Unterschied mehr zur Placebogruppe. Auch dieser Befund lässt sich durch die kurze biologische Halbwertszeit des als Verum eingesetzten Thrombospondins-1 erklären. Das Verum der Charge A scheint in der Lage zu sein, bei Anwesenheit im Organismus die Aktivierung der PMNL zu mindern beziehungsweise zu verzögern. Bei Betrachtung der CD11b-Expression und der Fibrinogenbindung *in vivo* und *in vitro* auf Monozyten sowie der Assoziatbildung zwischen Thrombozyten und Monozyten zeigte sich in keinem der Messparameter ein signifikanter Unterschied zwischen der Verumgruppe der Charge A und der Placebogruppe. Da schon der Verlauf der Messwerte in der Placebogruppe über den gesamten Zeitraum unverändert ist und auch in der Verumgruppe keine wesentlichen Änderungen aufgetreten sind, ist davon auszugehen, dass die hier gemessenen Parameter für die Beurteilung einer Sepsis bzw. eines SIRS zumindest im Schafmodell nicht geeignet sind.

In der Verumgruppe der Charge B fand sich im Beginn des SIRS eine geringere Fibrinogenbindung *in vivo* sowie am Ende des Versuchszeitraums eine niedrigere CD11b-Expression auf PMNL als in der Placebogruppe. Die Ergebnisse sind hier jedoch nicht so konsistent wie in der Verumgruppe der Charge A. Aufgrund der kleinen Gruppenstärke sind hier eine klare Aussage und eine statistische Auswertung nicht möglich. In der Untersuchung der Parameter auf Monozyten zeigte sich wie auch schon in der Verumgruppe der Charge A, dass weder in der Verumgruppe der Charge

B noch in der Placebogruppe über den Verlauf des Versuches signifikante Änderungen festzustellen waren. Die Untersuchung der Monozyten im Rahmen des SIRS scheint auch hier keine zusätzlichen Informationen über den Zustand des inflammatorischen Systems zu bieten.

#### **4.6. Intergruppenvergleich: Überleben**

In der Placebogruppe starben von neun Versuchstieren insgesamt vier vor dem Ende des Versuchszeitraumes. Zwei starben nach der zwölften Stunde, zwei zwischen der achten und zwölften Stunde des Versuches. Insgesamt zeigte sich hier eine kumulierte Sterblichkeit von 44%, was in etwa der Letalität der schweren Sepsis beim Menschen entspricht (BRUN-BOUISSON, 1995; LE GALL, 1995). In den Verumgruppen der Chargen A und B überlebten alle fünf Versuchstiere den gesamten Versuchszeitraum. Die Sterblichkeit in den Verumgruppen betrug 0%. Es zeigt sich somit nominell eine deutlich geringere Sterblichkeit in den Verumgruppen als in der Placebogruppe. In einem Kaplan-Meier-Log-Rank-Test erreichte dieser Unterschied jedoch nicht das Signifikanzniveau, vermutlich aufgrund der geringen Gruppenstärken. Dennoch zeigt sich hier zumindest tendenziell, dass das als Verum eingesetzt Thrombospondin-1 insgesamt das Überleben des SIRS verbessert haben könnte. Die vorgelegte Untersuchung ist diesbezüglich aufgrund der geringen Zahl der Versuchstiere nur als Voruntersuchung zu werten. Sie zeigt aber, dass es lohnenswert sein könnte, in einer größer angelegten Untersuchung der Frage erneut nachzugehen. Da die Unterschiede zur Placebogruppe in der Verumgruppe der Charge B deutlich geringer ausfielen als im Vergleich zur Verumgruppe der Charge A, sollte in einer größeren Studie nur das Verum der Charge A mit einer Placebogruppe verglichen werden.

## 5. Ausblick

Zur genaueren Erforschung des hier gezeigten Effektes, den das in seinem Konformationszustand definierte Thrombospondin-1 der Charge A im Rahmen eines SIRS hat, sollten weitere Untersuchungen folgen.

Eine tierexperimentelle Hauptstudie mit einem deutlich größeren Kollektiv als in der hier vorliegenden Arbeit sollte durchgeführt werden, um sichere Aussagen treffen zu können und auch kleinere Unterschiede besser nachweisen zu können. Diese Untersuchung kann sich dann auf die Untersuchungsparameter beschränken, welche in den in dieser Arbeit dargestellten Vorversuchen deutliche Unterschiede zum Placebo gezeigt haben. Es sollte nur das Thrombospondin-1 der Charge A Verwendung finden. Aufgrund der kurzen biologischen Halbwertszeit von Thrombospondin-1 *in vivo* sollte während einer solchen Untersuchung das Verum wiederholt in regelmäßigen Abständen appliziert werden, zum Beispiel alle vier oder acht Stunden.

Fernziel der hier vorliegenden Arbeit war langfristig das Aufdecken neuer Behandlungsstrategien für Sepsis-Patienten. Die Analogie zwischen dem Sepsismodell im Schaf und der menschlichen Sepsis verspricht eine gute Übertragbarkeit auf den Menschen. Nach Durchführung einer tierexperimentellen Hauptstudie mit positivem Ausgang, wäre eine Untersuchung an Sepsis-Patienten interessant, um den Effekt des Thrombospondin-1 auch beim Menschen direkt nachweisen zu können.

In der vorliegenden Arbeit konnten ebenfalls Parameter abgeleitet werden, welche sich gut als frühe Prognoseparameter einer schweren Sepsis bzw. eines *Systemic Inflammatory Response Syndrome* eignen könnten. Hier sollten ebenfalls diagnostische Untersuchungen an menschlichen Sepsis-Patienten durchgeführt werden.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

®	Eingetragenes Warenzeichen
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
µmol	Mikromol
ADAMTS13	A disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif
ADP	Adenosindiphosphat
APC	Aktiviertes Protein C
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
ARDS	Adult respiratory distress syndrome
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninic acid (Bicinchoninsäure)
Biotin-7-NHS	D-Biotinoyl-ε-Aminocapronsäure-N-Hydroxy-Succinimideester
BPB	Bromphenolblau
BSA	Bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
cm	Zentimeter
COX-1	Cyclooxygenase-1
CTD	C-terminale Domäne
Da	Dalton
DAG	Diazylglyzerid
DIC	Dissiminated intravascular coagulation (Disseminierte intravasale Gerinnung)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTE	Dithioerythritol
EDTA	Ethylen diamine tetraacetic acid (Ethylendiamintetraessigsäure)
EGF	Endothelial growth factor
F/P ratio	FITC/Protein ratio
FACS	Fluorescence activated cell sorter (Durchflusszytometer)

---

FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forward angle light scatter (Vorwärtsstreulicht)
FVIIa	Gerinnungsfaktor VIIa
FXIII	Gerinnungsfaktor XIII
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GP	Glykoprotein
GPRP	H-Gly-Pro-Arg-Pro-OH
HCl	Salzsäure
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HK	Kininogen
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykane
I.E.	Internationale Einheiten
i.m.	Intramuskulär
i.v.	Intravenös
IAA	Iodacetamid
IAP	Integrin-assoziiertes Protein
ICAM	Intracellular adhesion molecule
IKK	Inducible kinase komplex
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
IRAK-1	Interleukin-1-receptor-associated kinase
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
kgKG	Kilogramm Körpergewicht
LBP	Lipopolysaccharid binding protein (LPS-bindendes Protein)
LPS	Lipopolysaccharid (Endotoxin)
M	Molar
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
MAD	Mittlerer arterieller Druck
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
MIP-1 $\alpha$	Macrophage inflammatory protein-1 alpha
ml	Milliliter

---

mM	Millimolar
mol	Mol
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NEM	N-Ethylmalinimid
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor kappa B
ng	Nanogramm
NHS	N-Hydroxysuccinimidester
NIK	Nck-interacting kinase
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NTD	N-terminale Domäne
OD	Oligomerisations-Domäne
PAF	Platelet activating factor
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor 1
PAR	Proteinase-activated receptor
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PDGF	Platelet derived growth factor
PE	R-Phycoerythrin
PECAM	Platelet/Endothelial cell adhesion molecule
PerCP	Peridin-Chlorophyll-a-Protein
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PK	Plasma-Kallikrenin
PLT	Plättchen (Thrombozyten)
PMNL	Polymorphnukleäre Leukozyten
PMSF	Phenylmethylsulphonylfluorid
PPP	Platelet-poor plasma (plättchenarmes Plasma)
Prokoll	Prokollagen-Domäne
PRP	Platelet-rich plasma (plättchenreiches Plasma)
PSGL	P-Selektin-Glykoprotein-Ligand
RANTES	Regulated upon normal T-cell expressed and secreted
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)

---

S.E.M.	Standard error of the mean (Standardfehler)
SCS	Surface connected system (offenes kanalikuläres Membransystem)
SDS	Sodiumdodecylsulfat (Natriumlaurylsulfat)
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
SSC	Sideward angle light scatter (Seitwärtsstreulicht)
TAFI	Thrombin activatable fibinolysis factor
TAK-1	Transforming growth factor $\beta$ -activating kinase-1
TBS	TRIS-buffered saline (TRIS-gepufferte Salzlösung)
TEMED	N, N, N', N'-Tetra-Methyl-Ethylendiamin
TF	Tissue factor
TFPI	Tissue factor pathway inhibitor
TGF	Transforming growth factor
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
tPA	Tissue plasminogen activator
TRAF-1	TNF-Receptor-associated factor 1
TRAP	Thrombin receptor activating peptide
TSP	Thrombospondin
TSR	Thrombospondin-typische repeats
U	Unit
uPA	Urokinase-type plasminogen activator
vWF	von-Willebrand-Faktor
WWU	Westfälische Wilhelms-Universität

## 7. Literaturverzeichnis

1. ADAMS JC: Thrombospondins: multifunctional regulators of cell interactions. *Annu Rev Cell Dev Biol* (2001); 17: 25-51
2. ANGUS DC, LINDE-ZWIRBLE WT, LIDICKER J, CLERMONT G, CARCILLO J, PINSKY MR: Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* (2001); 29(7): 1303-1310
3. ANILKUMAR N, ANNIS DS, MOSHER DF, ADAMS JC: Trimeric assembly of the C-terminal region of thrombospondin-1 or thrombospondin-2 is necessary for cell spreading and fascin spike organisation. *J Cell Sci* (2002); 115: 2357-2366
4. ARMSTRONG L, MEDFORD ARL, HUNTER KJ, UPPINGTON KM, MILLAR AB: Differential expression of toll-like receptor (TLR)-2 and TLR-4 on monocytes in human sepsis. *Clin Exp Immunol* (2004); 136: 312-319
5. AWAD SS: State-of-the-art therapy for severe sepsis and multisystem organ dysfunction. *Am J Surg* (2003); 186(5A): 23-30
6. BERECKZY Z, KATONA É, MUSZBEK L: Fibrin stabilization (factor XIII), fibrin structure and thrombosis. *Pathophysiol Haemost Thromb* (2003/2004); 33: 430-437
7. BERNARD GR, VINCENT JL, LATERRE PF, LAROSA SP, SHAINAUT JF, LOPEZ-RODRIGUEZ A, STEINGRUB JS, GARBER GE, HELTERBRAND JD, ELY EW, FISHER CJ JR.: Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* (2001); 344(10): 699-709
8. BOLDT J, MÜLLER M, ROTHE A, LENZEN P, HEMPELMANN G: Does continuous heparinization influence platelet function in the intensive care patient? *Int Care Med* (1997); 23: 567-573
9. BONE HG, WAURICK R, VAN AKEN H, BOOKE M, PRIEN T, MEYER J: Comparison of the haemodynamic effects of nitric oxide synthase inhibition and nitric oxide scavenging in endotoxaemic sheep. *Int Care Med* (1998); 24: 48-54

10. BONNEFOY A, DAENENS K, FEYS HB, DE VOS R, VANDERVOORT P, VERMYLEN J, LAWLER J, HOYLAERTS MF: Thrombospondin-1 controls vascular platelet recruitment and thrombus adherence in mice by protecting (sub)endothelial VWF from cleavage by ADAMTS13. *Blood* (2006); 107: 955-964
11. BONNEFOY A, HANTGAN R, LEGRAND C, FROJMOVIC MM: A model of platelet aggregation involving multiple interactions of thrombospondin-1, fibrinogen, and GPIIb/IIIa receptor. *J Biol Chem* (2001); 276(8): 5605-5612
12. BOOKE M, HINDER F, MCGUIRE R, TRABER LD, TRABER DL.: Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase: Effects on hemodynamics and regional blood flow in healthy and septic sheep. *Crit Care Med* (1999); 27(1): 162-167
13. BORREGAARD N, COWLAND JB: Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* (1997); 89(10): 3503-3521
14. BOUCHARD BA, TRACY PB: Platelets, leukocytes, and coagulation. *Curr Opin Hematol* (2001); 8: 263-269
15. BRUN-BOUISSON C, FOR THE FRENCH ICU GROUP FOR SEVERE SEPSIS: Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults: a multicenter prospective study in intensiv care units. *JAMA* (1995); 274: 968-974
16. CHEN H, SOTTILE J, STRICKLAND DK, MOSHER DF: Binding and degradation of thrombospondin-1 mediated through heparan sulfate proteoglycans and low-density-lipoprotein receptor-related protein: localization of the functional activity to the trimeric N-terminal heparin-binding region of thrombospondin-1. *Biochem J* (1996); 318: 959-963
17. CHERTOV O, YANG D, HOWARD OMZ, OPPENHEIM JJ.: Leukocyte granule proteins mobilize innate host defenses and adaptive immune response. *Immunological Reviews* (2000); 177: 68-78
18. CICCHETTI G, ALLEN PG, GLOGAUER M: Chemotactic signaling pathways in neutrophils: from receptor to actin assembly. *Crit Rev Oral Biol Med* (2002); 13(3): 220-228

19. CLEZARDIN P, LAWLER J, AMIRAL J, QUENTIN G, DELMAS P: Identification of cell adhesive active sites in the N-terminal domain of thrombospondin-1. *Biochem J* (1997); 32(1): 819-827
20. COOPER TG: *Biochemische Arbeitsmethoden* (1981); De Gruyter Verlag, Berlin
21. CREASEY AA, REINHART K: Tissue factor pathway inhibitor activity in severe sepsis. *Crit Care Med* (2001); 29(7): 126-129
22. DA COSTA MARTINS P, VAN DEN BERK N, ULFMAN LH, KOENDERMAN L, HORDIJK PL, ZWAGINGA JJ: Platelet-monocyte complexes support monocyte adhesion to endothelium by enhancing secondary tethering and cluster formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2004); 24: 193-199
23. DARDIK R, SHENKMAN B, TAMARIN I, ESKARAEV R, HARSFALVI J, VARON D, INBAL A: Factor XIII mediates adhesion of platelets to endothelial cells through  $\alpha_v\beta_3$  and glycoprotein IIb/IIIa integrins. *Thrombosis Research* (2002); 105: 317-323
24. DAVIES A, GREEN C, HUTTON J: Severe Sepsis: A European estimate of the burden of the disease in ICU. *Int Care Med* (2001); 27(Suppl): 284
25. DAVIS C, FISCHER J, LEY K, SAREMBOCK IJ: The role of inflammation in vascular injury and repair. *J Thromb Haemost* (2003); 1: 1699-1709
26. DAWES J, CLEMETSON KJ, GOGSTAD GO, MCGREGOR J, CLEZARDIN J, PROWSE CV, PEPPER DS: A radioimmunoassay for thrombospondin, used in a comparative study of thrombospondin, beta-thromboglobulin and platelet factor 4 in healthy volunteers. *Thromb Res* (1983); 29(6): 569-581
27. DE GAETANO G, CERLETTI C, EVANGELISTA V: Recent advances in platelet-polymorphnuclear leukocyte interaction. *Haemostasis* (1999); 29: 41-49
28. DE GROOT PG, SIXMA JJ: Glykoproteinrezeptoren der Thrombozytenmembran: Biochemie, Molekularbiologie und Physiologie. In: Müller-Berghaus G, Pötzsch B (Hrsg): *Hämostaseologie* (1999); Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, pp 15-26

29. DETWILER TC, CHANG AC, SPEZIALE MV, BROWNE PC, MILLER JJ, CHEN K: Complexes of thrombin with proteins secreted by activated platelets. *Semin Thromb Hemost* (1992); 18(1): 60-66
30. DÖRMANN D, KARDOEUS J, ZIMMERMANN RE, KEHREL B: Flow cytometric analysis of agonist-induced annexin V, factor Va and factor Xa binding to human platelets. *Platelets* (1998); 9: 171-177
31. EHLERS R, USTINOV V, CHEN Z, ZHANG X, RAO R, LUSCINSKAS FW, LOPEZ J, PLOW E, SIMON DL: Targeting platelet-leukocyte interactions: Identification of the integrin Mac-1 binding site for the platelet counter receptor Glycoprotein Ib $\alpha$ . *J Exp Med* (2003); 198(7): 1077-1088
32. EIGENBROT C, KIRCHHOFER D: New insight into how tissue factor allosterically regulates factor VIIa. *Trends Cardiovasc Med* (2002); 12: 19-26
33. EVANGELISTA V, MANARINI S, COLLIER BS, SMYTH SS: Role of P-selectin,  $\beta_2$ -integrins, and Src tyrosine kinases in mouse neutrophil-platelet adhesion. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* (2003); 1: 1048-1054
34. FITZGERALD JR, FOSTER TJ, COX D: The interaction of bacterial pathogens with platelets. *Nat Rev Microbiol* (2006); 4(6): 445-457
35. GAWAZ M, DICKFELD T, BOGNER C, FATEH-MAGHADAM S, NEUMANN FJ: Platelet function in septic multiple organ dysfunction syndrome. *Int Care Med* (1997); 23: 379-385
36. GAWAZ M: *Das Blutplättchen* (1999); Thieme Verlag, Stuttgart
37. GLAUSER MP: Pathophysiologic basis of sepsis: considerations for future strategies of intervention. *Crit Care Med* (2000); 28(Suppl): 4-8
38. GORIS RJA, BOEKHORST TP, NUYTINCK JKS, GIMBRERE JS: Multiple organ failure. Generalized autodestructive inflammation? *Arch Surg* (1985); 120: 1109-1115
39. GOTO S, SALOMON DR, IKEDA Y, RUGGERI ZM: Characterization of the unique binding mechanism mediating the shear-dependent binding of soluble von Willebrand Factor to platelets. *J Biol Chem* (1995); 270(40): 23352-23361

40. GUHA M, MACKMAN M: LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal* (2001); 13(2): 85-94
41. HANDIN RI: Bleeding and thrombosis. In: Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL et al.: *Harrison's principles of internal medicine* (2001 a); McGraw-Hill, New York San Francisco Washington DC, pp 354-360
42. HANDIN RI: Disorders of the platelet and vessel wall. In: Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL et al.: *Harrison's principles of internal medicine* (2001 b); McGraw-Hill, New York San Francisco Washington DC, pp 745-750
43. HARBRECHT U: Die Thrombozytenaggregation: Physiologie und Biochemie. In: Müller-Berghaus G, Pötzsch B (Hrsg): *Hämostaseologie* (1999); Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, pp 27-35
44. HARRIS RL, MUSER DM, BLOOM K, GATHE J, RICE L, SUGERMAN B, WILLIAMS TW JR., YOUNG EJ: Manifestations of sepsis. *Arch Intern Med* (1987);147: 1895-1906
45. HARTWIG J, ITALIANO J: The birth of the platelet. *J Thromb Haemost* (2003); 1: 1580-1586
46. HINDER F, STUBBE HD, VAN AKEN H, WAURICK R, BOOKE M, MEYER J: Role of nitric oxide in sepsis-associated pulmonary edema. *Am J Respir Crit Care Med* (1999); 159: 252-257
47. HOESEL LM, NEFF TA, NEFF SB, YOUNGER JG, OLLE EW, GAO H, PIANKO MJ, BERNACKI KD, SARMA JV, WARD PA: Harmful and protective roles of neutrophils in sepsis. *Shock* (2005); 24(1): 40-47
48. HOFSTEENGE J, HUWILER KG, MACEK B, HESS D, LAWLER J, MOSHER DF, PETER-KATALINIC J: C-mannosylation and o-fucosylation of the thrombospondin type 1 module. *J Biol Chem* (2001); 276(9): 6485-6498
49. HU H, VARON D, HJEMDAHL P, SAVION N, SCHULMAN S, LI N: Platelet-leukocyte aggregation under shear stress: Differential involvement of selectins and integrins. *Thromb Haemost* (2003); 90: 679-687

50. IDELL S: Anticoagulants for acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* (2001); 164: 517-520
51. JACKSON SP, MISTRY N, YUAN Y: Platelets and the injured vessel wall – „rolling into action“. *Trends Cardiovasc Med* (2001); 10: 192-197
52. JEN CJ, CHEN H, LAI K, USAMI S: Changes in cytosolic calcium concentration and cell morphology in single platelets adhered to fibrinogen-coated surface under flow. *Blood* (1996); 87(9): 3775-3782
53. JOYCE DE, NELSON DR, GRINNELL BW: Leukocyte and endothelial cell interactions in sepsis: relevance of the protein C pathway. *Crit Care Med* (2004); 32(Suppl): 280-286
54. JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J, SCHIEBLER TH: *Histologie* (1996); Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York
55. JURK K, CLEMETSON KJ, DE GROOT PG, BRODDE MF, STEINER M, SAVION N, VARON D, SIXMA JJ, VAN AKEN H, KEHREL BE: Thrombospondin-1 mediates platelet adhesion at high shear via glycoprotein Ib (GPIb): an alternative/backup mechanism to von Willebrand factor. *FASEB J* (2003); 17(11): 1490-1492
56. JURK K, KEHREL BE: Die zentrale Rolle der Thrombozyten im neuen Verständnis der Hämostase. *Hämostaseologie* (2005); 25: 35-46
57. KEHREL B, FLICKER E, WIGBELS B, OSTERFELD M, VAN DE LOO J, LUSCHER EF: Thrombospondin measured in whole blood – an indicator of platelet activation. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* (1996); 7: 202-205
58. KEHREL B, WIERWILLE S, CLEMETSON KJ, ANDERS O, STEINER M, KNIGHT CG, FARNDAL RW, OKUMA M, BARNES MJ: Glycoprotein VI is a major collagen receptor for platelet activation: It recognizes the platelet-activating quaternary structure of collagen, whereas CD36, glycoprotein IIb/IIIa, and von Willebrand factor do not. *Blood* (1998); 91(2): 491-499
59. KEHREL BE: Blutplättchen: Biochemie und Physiologie. *Hämostaseologie* (2003); 23: 149-158

60. KIRSCHENBAUM LA, AZIZ M, ASTIZ ME, SAHA DC, RACKOW EC: Influence of rheologic changes and platelet-neutrophil interactions on cell filtration in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* (2000); 161: 1602-1607
61. KULKARNI AB, HUH CG, BECKER D, GEISER A, LYGH T M, FLANDERS KC, ROBERTS AB, SPORN MB, WARD JM, KARLSSON S: Transforming growth factor  $\beta$ 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci USA* (1993); 90: 770-774
62. LAGADEC P, DEJOUX O, TICCHIONI M, COTTREZ F, JOHANSEN M, BROWN EJ, BERNARD A: Involvement of a CD47-dependent pathway in platelet adhesion on inflamed vascular endothelium under flow. *Blood* (2003); 101: 4836-4843
63. LAU HKF: The interaction between platelets and factor VII/VIIa. *Transf Apheresis Sci* (2003); 28: 279-283
64. LAWLER J, SUNDAY M, THIBERT V, DUQUETTE M, GEORGE EL, RAYBURN H, HYNES RO: Thrombospondin-1 is required for normal murine pulmonary homeostasis and its absence causes pneumonia. *J Clin Invest* (1998); 101(5): 982-992
65. LAWLER J: Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J Cell Mol Med* (2002); 6(1): 1-12
66. LE GALL JR, LEMESHOW S, SAULNIER F: A new simplified acute physiology score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *JAMA* (1993); 270: 2957-2963
67. LECKIE MJ, BRYAN SA, KHAN J, DEWAR A, AIKMAN SL, MCGRATH J, OKRONGLY DA, BURMAN JF, BARNES PJ, HANSEL TT: Automated quantitation of circulating neutrophil and eosinophil activation in asthmatic patients. *Thorax* (2000); 55: 471-477
68. LEVI M, DE JONGE E, VAN DER POLL T, TEN CATE H: Novel approaches to the management of disseminated intravascular coagulation. *Crit Care Med* (2000); 28(9): 20-24

69. LEVI M: Platelets at a crossroad of pathogenic pathways in sepsis. *J Thromb Haemost* (2004); 2: 2094-2095
70. LEY K: Integration of inflammatory signals by rolling neutrophils. *Immunological Reviews* (2002); 186: 8-18
71. LI N, HU H, LINDQVIST M, WIKSTROM-JONSSON E, GOODALL AH, HJEMDAHL P: Platelet-leucocyte cross-talk in whole blood. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2000); 20: 2707-2708
72. LISMAN T, MOSCHATSIS S, ADELMEIJER J, NIEUWENHUIS HK, DE GROOT PG: Recombinant factor VIIa enhances deposition of platelets with congenital or acquired  $\alpha_{IIb}\beta_3$  deficiency to endothelial cell matrix and collagen under conditions of flow via tissue factor-independent thrombin generation. *Blood* (2003); 101: 1864-1870
73. LLEWELYN M, COHEN J: New insights into the pathogenesis and therapy of sepsis and septic shock. *Curr Clin Top Infect Dis* (2001); 21: 148-171
74. LOISA P, RINNE T, LAINE S, HURME M, KAUKINEN S: Anti-inflammatory cytokine response and the development of multiple organ failure in severe sepsis. *Acta Anaesthesiol Scand* (2003); 47: 319-325
75. LÖSCHE W, TEMMLER U, REDLICH H, VICKERS J, KRAUSE S, SPANGENBERG P: Inhibition of leukocyte chemiluminescence by platelets: role of platelet-bound fibrinogen. *Platelets* (2001); 12: 15-19
76. MAJLUF-CRUZ A, MANNS JM, UKNIS AB, YANG X, COLMAN RW, HARRIS RB, FRAZIER W, LAWLER J, DE LA CADENA RA: Residues F16-g33 and A784-N823 within thrombospondin-1 play a major role in binding human neutrophils: Evaluation by two novel binding assays. *J Lab Clin Med* (2000); 136: 292-302
77. MAVROMMATIS AC, THEODORIDIS T, ORFANIDOU A, ROUSSOS C, CHRISTOPOLOU-KOKKINO V, ZAKYNTHINOS S: Coagulation system and platelets are fully activated in uncomplicated sepsis. *Crit Care Med* (2000); 28(2): 451-457

78. MCCALLUM CD, HAPAK RC, NEUENSCHWANDER PF, MORRISSEY JH, JOHNSON AE: The location of the active site of blood coagulation factor VIIa above the membrane surface and its reorientation upon association with Tissue Factor. *J Biol Chem* (1996); 271(45): 28168-28175
79. MEMBERS OF THE AMERICAN COLLEGE OF CHEST PHYSICIANS/SOCIETY OF CRITICAL CARE MEDICINE CONSENSUS COMMITTEE: American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: Definition of sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* (1992); 20: 864-874
80. MICHELSON AD, BARNARD MR, KRUEGER LA, FRELINGER AL 3<sup>RD</sup>, FURMAN MI: Evaluation of platelet function by flow cytometry. *Methods* (2000); 21: 259-270
81. MONNERET G, ARPIN M, VENET F, MAGHNI K, DABARD AL, PACHOT A, LEPAPE A, BIENVENU J: Calcitonin gene related peptide and N-procalcitonin modulate CD11b upregulation in lipopolysaccharide activated monocytes and neutrophils. *Intensive Care Med* (2003); 29: 923-928
82. MORGENSTERN E: Morphologie der Thrombozyten. In: Müller-Berghaus G, Pötzsch B (Hrsg): *Hämostaseologie* (1999); Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, pp 3-14
83. MOSESSON MM: Fibrinogen und Fibrin. In: Müller-Berghaus G, Pötzsch B (Hrsg): *Hämostaseologie* (1999); Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, pp 285-290
84. MULLER KOBOLD AC, TULLEKEN JE, ZIJLSTRA JG, SLUITER W, HERMANS W, KALLENBERG CG, TERVAERT JW: Leukocyte activation in sepsis; correlations with disease state and mortality. *Intensive Care Med* (2000); 26: 883-892
85. NALDINI A, BERNINI C, PUCCI A, CARRARO F: Thrombin-mediated Il-10 up-regulation involves protease-activated receptor (PAR)-1 expression in human mononuclear leukocytes. *J Leukoc Biol* (2005); 78: 736-744

86. NIEMANN S, SPEHR N, VAN AKEN H, MORGENSTERN E, PETERS G, HERRMANN E, KEHREL BE: Soluble fibrin is the main mediator of *Staphylococcus aureus* adhesion to platelets. *Circulation* (2004); 110: 193-200
87. PANETTI TS, KUDRYK BJ, MOSHER DF: Interaction of recombinant procollagen and properdin modules of thrombospondin-1 with heparin and fibrinogen/fibrin. *J Biol Chem* (1999); 274(1): 430-437
88. PARKER SJ, WATKINS PE: Experimental models of gram-negative sepsis. *Br J Surg* (2001); 1: 22-30
89. PATERSON RL, WEBSTER NR: Sepsis and the systemic inflammatory response syndrome. *J R Coll Surg Edinb* (2000); 45(3): 178-182
90. PETERS MJ, DIXON G, TOTOWICZ KT, HATCH DJ, HEYDERMAN RS, KLEIN NJ: Circulating platelet-neutrophil complexes represent a subpopulation of activated neutrophils primed for adhesion, phagocytosis and intracellular killing. *Br J Haematol* (1999); 106: 391-399
91. PIER GB: Molecular mechanisms of microbial pathogenesis. In: Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL et al. (Hrsg): *Harrison's principles of internal medicine* (2001); McGraw-Hill, New York San Francisco Washington DC, pp 767-774
92. PIMANDA JE, GANDERTON T, MAEKAWA A, YAP CL, LAWLER J, KERSHAW J, CHESTERMAN CN, HOGG PJ: Role of thrombospondin-1 in control of von willebrand factor multimer size in mice. *J Biol Chem* (2004); 279(20): 21439-21448
93. RABHI-SABILE A, PIDARD D, LAWLER J, RENESTO P, CHIGNARD M, LEGRAND C: Proteolysis of thrombospondin during cathepsin-G-induced platelet aggregation: functional role of the 165-kDa carboxy-terminal fragment. *FEBS Letters* (1996); 386: 82-86
94. RAFFAEL A, NEBE CT, VALET G: Grundlagen der Durchflußzytometrie. In: Schmitz G, Rothe G (Hrsg): *Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik* (1994); Schattauer Verlag, Stuttgart New York, pp 3-49

95. REED GL, FITZGERALD ML, POLGÁR J: Molecular mechanisms of platelet exocytosis: insight into the „secret“ life of thrombocytes. *Blood* (2000); 96 (10): 3334-3342
96. REINHART K, BRUNKHORST FM, BONE HG, GERLACH H, GRÜNDLING M, KREYMANN G, KUJATH P, MARGGRAF G, MAYER K, MEIER-HELLMANN A, PECKELSEN C, PUTENSEN C, STÜBER F, QUINTEL M, RAGALLER M, ROSSAINT R, WEILER N, WELTE T, WERDAN K: Diagnose und Therapie der Sepsis. *Intensivmed* (2006); 43: 369-384
97. ROY C, DORINSKY PM: Multiple organ dysfunction syndrome: pathogenesis and approach to therapy. *Semin Respir Crit Care Med* (1994); 15: 325-334
98. RUBEL C, FERNÁNDEZ GC, ALVES RF, GOMEZ S, BOMPADRE MB, COSO OA, ISTURIZ MA, PALERMO MS: Soluble fibrinogen modulates neutrophil functionality through the activation of an extracellular signal-regulated kinase-dependent pathway. *J Immunol* (2002); 168: 3527-3535
99. RUGGERI ZM: Von Willebrand factor. *Curr Opin Hematol* (2003); 10: 142-149
100. RUSSWURM S, VICKERS J, MEIER-HELLMANN A, SPANGENBERG P, BREDLE D, REINHART K, LÖSCHE W: Platelet and leukocyte activation correlate with the severity of septic organ dysfunction. *Shock* (2002); 17(4): 263-268
101. SANDS KE, BATES DW, LANKEN PN, GRAMAN PS, HIBBERG PL, KAHN KL, PARSONNET J, PANZER R, ORAV EJ, SNYDMAN DR, BLACK E, SCHWARTZ JS, MOORE R, JOHNSON BL JR., PLATT R: Epidemiology of sepsis-syndrome in 8 academic centers. *JAMA* (1997); 278(3): 234-240
102. SAUMET A, DE JESUS N, LEGRAND C, DUBERNARD V: Association of thrombospondin-1 with the actin cytoskeleton of human thrombin-activated platelets through an  $\alpha_{IIb}\beta_3$ - or CD36-independent mechanism. *Biochem J* (2002); 363: 473-482
103. SCAPINI P, LAPINET-VERA JA, GASPERINI S, CALZETTI F, BAZZONI F, CASSATELLA MA: The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunological Reviews* (2000); 177: 195-203

104. SCHMUGGE M, RAND ML, FREEDMAN J: Platelets and von Willebrand factor. *Transfus Apheresis Sci* (2003); 28: 269-277
105. SCHUSTER HP, MÜLLER-WERDAN U: Definition und Diagnose von Sepsis und Multiorganversagen. In: Schuster HP, Werdan K (Hrsg): *Intensivtherapie bei Sepsis und Multiorganversagen* (2000); Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, pp 3-26
106. SHARMA S, KUMAR A: Septic shock, multiple organ failure, and adult respiratory distress syndrome. *Curr Opin Pulm Med* (2003); 9: 199-209
107. SMITH PK, KROHN RI, HERMANSON GT, MALLIA AK, GARTNER FH, PROVENZANO MD, FUJIMOTO EK, GOEKE NM, OLSON BJ, KLENK DC: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* (1985); 150: 76-85
108. SUZUKI K, MASAWA N, TAKATARNA M: The pathogenesis of cerebrovascular lesions in hypertensive rats. *Med Electron Microsc* (2001); 34: 230-239
109. TAPPER H, HERWALD H: Modulation of hemostatic mechanisms in bacterial infectious diseases. *Blood* (2000); 96(7): 2329-2337
110. TRABER DL: Animal models: the sheep. *Crit Care Med* (2000); 28(2): 591-592
111. TRAUTINGER F, HAMMERLE AF, PÖSCHL G, MICKSCHE M: Respiratory burst capability of polymorphonuclear neutrophils and TNF- $\alpha$  serum levels in relationship to the development of septic syndrome in critically ill patients. *J Leukoc Biol* (1991); 49: 449-454
112. TULASNE D, JUDD BA, JOHANSEN M, ASAZUMA N, BEST D, BROWN EJ, KAHN M, KORETZKY GA, WATSON SP: C-terminal peptide of thrombospondin-1 induces platelet aggregation through the Fc receptor  $\gamma$ -chain-associated signaling pathway and by agglutination. *Blood* (2001); 98: 3346-3352
113. TZIMA E, WALKER JH: Platelet annexin V: the ins and outs. *Platelets* (2000); 11: 245-251

114. VAN DEVENTER SJ, BULLER HR, TEN CATE JW, AARDEN LA, HACK CE, STURK A: Experimental endotoxemia in humans: analysis of cytokine release and coagulation, fibrinolytic, and complement pathways. *Blood* (1990); 76(12): 2520-2526
115. VINCENT JL, YAGUSHI A, PRADIER O: Platelet function in sepsis. *Crit Care Med* (2002); 30(5)(Suppl.): 313-317
116. WATSON RWG, REDMOND HP, BOUCHIER-HAYES D: Role of endotoxin in mononuclear phagocyte-mediated inflammatory response. *J Leukoc Biol* (1994); 56: 95-103
117. WESTPHAL M, STUBBE H, SIELENKÄMPER AW, BALL C, VAN AKEN H, BORGULYA R, BONE HG: Effects of titrated arginine vasopressin on hemodynamic variables and oxygen transport in healthy and endotoxemic sheep. *Crit Care Med* (2003); 31(5): 1502-1508
118. WETTERÖ J, ASKENDAL A, TENGVALL P, BENGTSSON T: Interactions between surface-bound actin and complement, platelets, and neutrophils. *J Biomed Mater Res* (2003); 66A: 162-175
119. XIA Z, WONG T, LIU Q, KASIRER-FRIEDA A, BROWN E, FROJMOVIC MM: Optimally functional fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled fibrinogen for quantitative studies of binding to activated platelets and platelet aggregation. *Br J Haematol* (1996); 93: 204-214
120. XIE L, CHESTERMAN CN, HOGG PJ: Control of von Willebrand factor multimer size by thrombospondin-1. *J Exp Med* (2001); 193(12): 1341-1349
121. YAGUCHI A, LOBO FLM, VINCENT JL, PRADIER O: Platelet function in sepsis. *J Thromb Haemost* (2004); 2: 2096-2102
122. YAMASHIRO S, KAMOHARA H, WANG JM, YANG D, GONG WH, YOSHIMURA T: Phenotypic and functional change of cytokine-activated neutrophils: inflammatory neutrophils are heterogeneous and enhance adaptive immune responses. *J Leukoc Biol* (2001); 69: 698-704

- 
123. YEH FL, SHEN HD, FANG RH: Deficient transforming growth factor  $\beta$  and interleukin-10 response contribute to the septic death of burned patients. *Burns* (2002); 28: 632-637

## Danksagung

Für die Überlassung des außerordentlich interessanten und vielseitigen Themas und die intensive Betreuung während der gesamten Zeit danke ich Frau Prof. Dr. rer. nat. Beate Kehrel, Abteilung für Experimentelle und Klinische Hämostaseologie des Universitätsklinikums Münster.

Für die allzeit gute und freundschaftliche Zusammenarbeit und die gegenseitige Unterstützung, ohne die diese Arbeit sicher nicht möglich gewesen wäre, danke ich Frau Daniela Stolte, Ärztin.

Für die Betreuung und die Durchführung der Versuchsabläufe im Tierstall danke ich Herrn Dr. med. Uli-Rüdiger Jahn, Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin des Universitätsklinikums Münster, und Frau Mareike Kim, Tierärztin.

Bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung für Experimentelle und Klinische Hämostaseologie des Universitätsklinikums Münster bedanke ich mich für die herzliche und unkomplizierte Aufnahme ins Laborteam. Ein ganz besonderer Dank für zahlreiche Einführungen in die Thematik und jederzeit Rat und Tat gilt Frau Dr. rer. nat. Kerstin Jurk und Frau Dr. rer. nat. Silke Niemann, sowie Herrn Dr. rer. nat. Martin Brodde. Bei allen freiwilligen Probanden bedanke ich mich für die Bereitschaft zur Blutspende.

Für die Bereitstellung von Schafsblutproben danke ich den Arbeitsgruppen und Mitarbeitern der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung des Universitätsklinikums Münster und Frau Gudrun Finger, Tierärztin.

Für wertvolle Hilfestellungen bei der statistischen Auswertung bedanke ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Martin Westphal, Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin des Universitätsklinikums Münster, und bei Herrn Dipl.-Psych. Michael Unrath.

Für unentwegte Unterstützung und unzählige Aufmunterungen während aller Phasen der Fertigstellung dieser Arbeit gilt mein Dank außerdem allen Freunden und meiner Familie, welche mir vieles ermöglicht hat.

## Lebenslauf

<b>Name:</b>	Timo Pauli	
<b>Geburtsdatum und -ort:</b>	27.07.1977	Osnabrück
<b>Eltern:</b>	Tilman Pauli Angelika geb. Lonzer	
<b>Schulbildung:</b>	1983 – 1987	Grundschule „Hüggelschule“ Hasbergen
	1987 – 1989	Orientierungsstufe „Dom“ Osnabrück
	1989 – 1996	Gymnasium „Carolinum“ Osnabrück
<b>Zivildienst:</b>	01.07.1996 – 31.07.1997	Individuelle Schwerstbehinderten- Betreuung, ev.-ref. Diakonie Osnabrück
<b>Hochschulstudium:</b>	10.1997 – 10.1998	Psychologie, Universität Osnabrück
	10.1998	Beginn Studium Humanmedizin, West- fälische Wilhelms-Universität Münster
	09.2000	Ärztliche Vorprüfung
	09.2001	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	09.2003	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	10.2003 – 10.2004	Praktisches Jahr (Neurologie, Innere Medizin, Chirurgie), Klinikum Minden
	11.2004	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	06.12.2004	Approbation als Arzt
<b>Berufliche Tätigkeit:</b>	01.01.2005 – 30.06.2006	Assistenzarzt, Medizinische Klinik, St. Bonifatius-Hospital Lingen
	seit 01.07.2006	Assistenzarzt, Neurologische Klinik, Klinikum Minden

Minden, 22.05.2007

(Timo Pauli)



## Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster · 48128 Münster

### Gegen Empfangsbekanntnis

Herrn  
 Dr. med. Uli-Rüdiger Jahn  
 Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie  
 und operative Intensivmedizin der  
 Westf. Wilhelms-Universität Münster  
 Albert-Schweitzer-Str. 33

48149 Münster

Dienstgebäude  
 Domplatz 1-3  
 Telefon: (0251) 411-0  
 Durchwahl: 2110  
 Zimmer: 431  
 Frau Möllers

Aktenzeichen  
 23.0835.1.0 (G 57/99)

24. Juni 1999

Betr.: Tierschutz;  
 hier: Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Bezug: Ihr Antrag vom 18.05.1999

### G e n e h m i g u n g s b e s c h e i d :

Sehr geehrter Herr Dr. Jahn,

gemäß § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 25. Mai 1998 (BGBl. I. S. 1105) wird Ihnen die Genehmigung zur Durchführung nachstehenden Versuchsvorhabens erteilt:

**Einfluss der Integrin-Inhibition mit INT-IHB und KES-VI auf Hämodynamik und Gasaustausch bei experimenteller Endotoxinämie beim wachen, chronisch instrumentierten Schaf.**

Leiter des Versuchsvorhabens sind:

Herr  
 Dr. med. Jörg Meyer  
 Klinik und Poliklinik für  
 Anästhesiologie und operative  
 Intensivmedizin der  
 Westf. Wilhelms-Universität  
 Albert-Schweitzer-Str. 33

48149 Münster

Frau  
 Dr. rer. nat Beate Kehrel  
 Klinik und Poliklinik für  
 Anästhesiologie und operative  
 Intensivmedizin - Abteilung für  
 experimentelle und klinische  
 Hämostaseologie der  
 Westf. Wilhelms-Universität  
 Albert-Schweitzer-Str. 33

48149 Münster

Grünes Umweltschutztelefon: (0251) 411-3300

e-mail: poststelle@bezreg-muenster.nrw.de ● X-400: C=de, A=dbp, P=dvs-nrw, O=bezreg-muenster, S=poststelle ● Telefax (0251) 411-2525

Konten der Regierungshauptkasse Münster:

Landeszentralbank Niederlassung Münster BLZ: 400 000 00 Konto: 40 001 520

Westdeutsche Landesbank Girozentrale Münster BLZ: 400 500 00 Konto: 61 820

Öffentliche Verkehrsmittel - Buslinien 1 . 5 . 6 . 17 bis Haltestelle Prinzipalmarkt und 2 . 10 . 11 . 14 . 21 . 64 bis Domplatz

Stellvertretender Leiter des Versuchsvorhabens ist:

Herr  
Dr. med. Uli-Rüdiger Jahn  
Klinik und Poliklinik für  
Anästhesiologie und operative  
Intensivmedizin der  
Westf. Wilhelms-Universität  
Albert-Schweitzer-Str. 33  
48149 Münster

Diese Genehmigung gilt bis zum 31.01.2001.

Zur Durchführung des Versuchsvorhabens dürfen folgende Tiere verwendet werden:

30 Schafe.

**Auflagen:**

Mit dem Versuchsvorhaben darf erst nach Vorliegen dieser Genehmigung begonnen werden.

Sofern der Leiter des Versuchsvorhabens oder sein Stellvertreter wechselt, ist mir dieser Wechsel unverzüglich anzuzeigen.

Diese Genehmigung wird zurückgenommen, wenn bei der Erteilung die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht gegeben waren.

Sie wird widerrufen, wenn die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht mehr gegeben sind und dem Mangel nicht innerhalb einer von mir zu bestimmenden Frist abgeholfen wird; sie kann widerrufen werden, wenn ihre Bedingungen und Auflagen nicht erfüllt werden oder den Vorschriften des § 9 Abs. 2 TierSchG wiederholt oder grob zuwidergehandelt worden ist.

Ein Antrag auf Verlängerung der Genehmigung ist rechtzeitig vor Ablauf der Frist bei mir zu stellen.

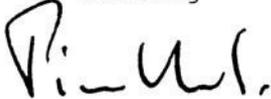
Das das Versuchsvorhaben überwiegend im öffentlichen Interesse erfolgt, wird von der Erhebung einer Verwaltungsgebühr Abstand genommen.

**Rechtsbehelfsbelehrung:**

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Widerspruch erhoben werden. Der Widerspruch ist bei mir unter der oben genannten Anschrift schriftlich oder zur Niederschrift einzureichen.

Sollte die Frist durch das Verschulden eines von Ihnen Bevollmächtigten versäumt werden, so würde dessen Verschulden Ihnen zugerechnet werden.

Mit freundlichen Grüßen  
Im Auftrag



Dr. Piontkowski