

# Die Wirkung von Clopidogrel auf die Expression inflammationsrelevanter Gene im Endotoxin-Modell der Maus

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Friedrich Wilhelm Weber  
geboren am 24.06.1987 in Kreuztal

Gutachter

1. Doz. Dr. Wolfgang Lösche, Jena
2. Prof. Dr. Ekkehard Schlußner, Jena
3. Prof. Dr. Peter Presek, Halle (Saale)

Tag der öffentlichen Verteidigung: ... 18. Dezember 2012 .....

# Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
Actb	Aktin $\beta$
ADP	Adenosindiphosphat
AMI	Akuter Myokardinfarkt
ASS	Acetylsalicylsäure
bp	Base pair(s)
CAP	Community aquired pneumonia
CASP	Colon ascendens stent peritonitis
cDNA	Complementary DNA
CCL	C-C motif ligand
CCR	C-C motif receptor
CLI	Cecal ligation and incision
CLP	Cecal ligation and puncture
COX	Cyclooxygenase
CRP	C-reaktives Protein
CXCL	C-X-C motif ligand
CXCR	C-X-C motif receptor
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIC	Disseminated intravascular coagulation
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonucleotides
dT	Desoxythymidin
E. coli	Escherichia coli
ENA-78	Epithelial neutrophil-activating peptide 78
G6PD	Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GITC	Guanidin Isothiocyanat

Abkürzung	Erklärung
GP	Glykoprotein
GRO $\alpha$	Growth-regulated protein $\alpha$
Gusb	Gen welches für $\beta$ -Glucuronidase kodiert
Hb	Hämoglobin ( g/dL)
Hif	Hypoxia-inducible factor
Hk	Hämatokrit (%)
Hmbs	Hydroxymethylbilane synthase
HMGB 1	High-motility group box 1
HPRT-1	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1
i.p.	Intraperitoneal
Il / IL	Interleukin
IQR	Interquartil range
IRAK	IL-1 receptor-associated kinase
LPS	Lipopolysaccharid
MCV	Mean corpuscular volume ( fL)
Mif-1 $\alpha$	Macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$
MS	Multiple Sklerose
Myd88	Myeloid differentiation primary response gene 88
MyD88	Myeloid differentiation primary response protein 88
NaCl	Natriumchlorid
NC-Zellen	Natürliche zytotoxische Zellen
OD	Optische Dichte
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PCI	Peritoneal contamination and infection
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMVs	Platelet-derived microparticles
ROS	Reactive Oxygen Species
PRR	Pattern recognition receptor
PTT	Partial Thromboplastin Time
RANTES	Regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted
RNA	Ribonucleic acid

Abkürzung	Erklärung
RT	Reverse transcriptase
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
Taq-Polymerase	Thermus aquaticus-Polymerase
TF	Tissue factor
TIR	Toll/Interleukin-1 receptor
$T_m$	Schmelztemperatur ( °C)
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor- $\alpha$
TxA <sub>2</sub>	Thromboxan A2
Eigene Abkürzungen	
CK	Clopidogrel + Kontrolle (= Versuchsgruppe mit Clopidogrel und NaCl i.p.)
CS	Clopidogrel + LPS (= Versuchsgruppe mit Clopidogrel und LPS i.p.)
GOI	Gene of Interest (= untersuchte Gene)
HK	Housekeeper (= Referenzgen)
K	Kontrolle (= Versuchsgruppe ohne Clopidogrel und mit NaCl i.p.)
S	LPS (= Versuchsgruppe ohne Clopidogrel und mit LPS i.p.)

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2 Einleitung</b>	<b>3</b>
2.1 Sepsis . . . . .	3
2.1.1 Historische Entwicklung . . . . .	3
2.1.2 Definition . . . . .	4
2.1.3 Epidemiologie . . . . .	4
2.1.4 Pathophysiologie . . . . .	6
2.1.5 Diagnose . . . . .	8
2.1.6 Therapie . . . . .	9
2.1.7 Die Rolle der Thrombozyten bei Sepsis . . . . .	9
2.2 Thrombozyten als Inflammationszellen . . . . .	10
2.3 Thrombozytenaggregationshemmer . . . . .	13
2.3.1 Wirkungsweise . . . . .	13
2.3.2 Benefit von Thrombozytenaggregationshemmern bei systemischer Inflammation und Sepsis . . . . .	14
<b>3 Ziele der Arbeit</b>	<b>17</b>
<b>4 Material und Methoden</b>	<b>19</b>
4.1 Material . . . . .	19
4.1.1 Gewebeproben . . . . .	19
4.1.2 Kits und Enzyme . . . . .	19
4.1.3 Geräte . . . . .	19
4.1.4 Oligonukleotide für Real-Time-PCR . . . . .	20
4.2 Methoden . . . . .	21
4.2.1 Anfertigung der Gewebepreparate . . . . .	21
4.2.2 Hämatologie . . . . .	22
4.2.3 RNA Isolation . . . . .	23

4.2.4	Primerdesign . . . . .	24
4.2.5	Reverse Transkription . . . . .	25
4.2.6	Real-Time-PCR . . . . .	26
4.2.7	Spektrofotometrie . . . . .	28
4.2.8	Aufreinigung des PCR-Produkts . . . . .	29
4.2.9	RNA-Gelelektrophorese . . . . .	29
4.2.10	DNA-Gelelektrophorese . . . . .	30
4.2.11	Wahl der Referenzgene . . . . .	30
4.2.12	Auswertung der Real-Time-PCR . . . . .	31
4.2.13	Statistik . . . . .	32
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>34</b>
5.1	Hämatologie . . . . .	34
5.2	Qualitätskontrolle . . . . .	34
5.2.1	RNA-Isolation . . . . .	35
5.2.2	RNA-Gelelektrophorese . . . . .	38
5.2.3	Schmelzkurvenanalyse . . . . .	39
5.2.4	DNA-Gelelektrophorese . . . . .	40
5.3	Wahl der Referenzgene . . . . .	41
5.4	Ergebnisse der PCR . . . . .	41
5.4.1	Herz . . . . .	42
5.4.2	Leber . . . . .	44
5.4.3	Hirn . . . . .	46
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>48</b>
<b>7</b>	<b>Schlussfolgerung</b>	<b>60</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>62</b>
	<b>Anhang</b>	<b>75</b>

# 1 Zusammenfassung

## Wissenschaftlicher Hintergrund

Der Begriff der Sepsis wurde schon ca. 400 v. Chr. geprägt. Trotz der langen Geschichte dieses Krankheitsbildes stellt die Sepsis auch heute noch eine große Herausforderung in der Medizin dar. Nach neueren Untersuchungen ist die Sepsis, nach der koronaren Herzkrankheit und dem akuten Myokardinfarkt, die dritthäufigste Todesursache in Deutschland. Die Sepsis ist das Ergebnis einer Infektion gepaart mit der komplexen systemischen Entzündungsreaktion des Wirtsorganismus auf dieselbe. Pathogene und deren Produkte (PAMPS) triggern die systemische Wirtsantwort (SIRS) durch Aktivierung des unspezifischen Immunsystems. Immunkompetente Zellen, pro- und anti-inflammatorische Zytokine sind die Hauptverantwortlichen der systemischen Entzündungsreaktion. Es gibt verschiedene Mechanismen, in deren Folge die systemische Entzündungsreaktion zum Versagen multipler Organsysteme führen kann. Dazu zählen endotheliale Dysfunktionen, Hämostasestörungen, Barrierestörungen, endokrine Dysfunktionen und die Apoptoseinduktion.

Thrombozyten spielen eine entscheidende Rolle für die Pathogenese des SIRS und der Sepsis. Die entzündungsabhängige Aktivierung der Thrombozyten kann zur thrombotischen Mikroangiopathie und disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) führen, oder durch Interaktion mit dem Immunsystem Einfluss auf die Entzündungsreaktion nehmen. Thrombozyten verfügen über eine Vielzahl von Möglichkeiten die Funktion des Immunsystems zu beeinflussen.

Es gibt verschiedene Arten von Thrombozytenaggregationshemmern, die vor allem zur Sekundärprävention kardio-, zerebro- und periphervaskulärer Erkrankungen eingesetzt werden. In tierexperimentellen und retrospektiven Studien konnte ein Benefit für die Gabe von Thrombozytenaggregationshemmern, wie Clopidogrel und Aspirin, bei systemischer Entzündung gezeigt werden. Die Gabe der Thrombozytenaggregationhemmer führte u. a. zu einem geringeren Thrombozytenabfall, einer verminderten Fibrindeposition und zu einer Änderung der Genexpression in den peripheren Blutzellen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung eines möglichen Einflusses von Clopi-



dogrel auf die Expression inflammationsrelevanter Gene im Endotoxin-Modell der Maus.

## **Methodik**

Die zu untersuchenden Mäuse wurden randomisiert den vier Versuchsgruppen zugeteilt: **1.** K-Gruppe: normales Trinkwasser für 5 Tage, dann i. p. NaCl **2.** S-Gruppe: normales Trinkwasser für 5 Tage, dann i. p. LPS **3.** CK-Gruppe: 5 Tage Trinkwasser mit Clopidogrel, dann i. p. NaCl **4.** CS-Gruppe: 5 Tage Trinkwasser mit Clopidogrel, dann i. p. LPS. Anschließend erfolgte eine Blutentnahme sowie die Extraktion von Herz, Leber und Hirn. Nach RNA-Isolation erfolgte die Analyse der Genexpression mittels Real-Time-PCR. Analysiert wurden fünf ausgewählte Gene (Il-6, Il-10, Hif1a, Myd88, PAI-1) die jeweils eine wichtige Rolle für die systemische Entzündungsreaktion spielen. Als Normierungsbasis für die Ergebnisse der Real-Time-PCR dienten zuvor ausgewählte und auf ihre Tauglichkeit geprüfte Referenzgene. Zusätzlich wurden aus dem Blut der Versuchstiere verschiedene hämatologische Parameter bestimmt. Um eine hohe Güte der Versuchsergebnisse zu gewährleisten, erfolgte eine umfangreiche Qualitätskontrolle.

## **Ergebnisse und Diskussion**

Versuchstiere mit LPS-Injektion (S) zeigen signifikant geringere Thrombozytenzahlen als Tiere ohne LPS-Injektion (K). Dieser LPS-induzierte Thrombozytenabfall kann durch die Gabe von Clopidogrel (CS) verhindert werden. Weiterhin zeigt sich bei fast allen Genen in Herz, Leber und Hirn eine massive Zunahme der Transkriptionsaktivität nach LPS-Injektion. Clopidogrel führt nur bei einzelnen Genen in Herz und Leber zu geringen Veränderungen der Genexpression. Nur bei Hif1a in der Leber führt Clopidogrel zu einer geringen Abschwächung der, durch LPS-Injektion, gesteigerten Transkriptionsaktivität. Über den P2Y<sub>12</sub> Rezeptor führt Clopidogrel zu einer relativ spezifischen Thrombozytenhemmung. Die Modulation der Genexpression durch Clopidogrel erfolgt thrombozytenabhängig. Zusätzlich hemmt Clopidogrel die Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion. In der vorliegenden Arbeit hat Clopidogrel fast keine Wirkung auf die organspezifische Genexpression. Somit scheinen Thrombozyten bzw. Thrombozyten-Leukozyten-Interaktionen keine Auswirkung auf die Genexpression in den Organen zu haben. Der Benefit von Clopidogrel bei Sepsis ist demnach möglicherweise vor allem auf die anti-thrombotische Wirkkomponente der Medikamente zurückzuführen. Dennoch spricht die Widerlegung der Hypothese, dass Clopidogrel die Expression entzündungsrelevanter Gene beeinflusst, nicht gegen eine Anwendung von Thrombozytenaggregationshemmern zur Prävention und Therapie der Sepsis in der Klinik.

# 2 Einleitung

## 2.1 Sepsis

### 2.1.1 Historische Entwicklung

In einer Arbeit von Kreymann und Wolf (1996) wird die Geschichte der Sepsis ausführlich beschrieben. Schon ca. 400 v. Chr. beschrieb Hippokrates eine Krankheit, die nach Verwundung als Fieber beginnt und häufig mit dem Tod endet. Verantwortlich machte er faulende Materie und prägte damit sowohl den Begriff der Sepsis (griech.  $\sigma\eta\pi\omega$  = "faul werden"), als auch die pathophysiologische Vorstellung der Entstehung dieser bis zur Mitte des 19. Jahrhunderts. Ibn Sina beschrieb um 1000 n. Chr. ein Krankheitsbild, bei dem die Fäulnis des Blutes ein kontinuierliches Fieber bedingt. Boerhaave, ein holländischer Anatom und Pathologe, postulierte 1751 die Existenz einer „schädlichen Substanz“ die aerogen Wunden infizieren kann und so zu einer systemischen Erkrankung führt. Auch die Einführung der Händedesinfektion durch Ignaz Semmelweis im Jahre 1847 fußte auf der Vorstellung, dass die Übertragung putrider Gifte krankheitsauslösend ist. Erst die Einführung der modernen Mikrobiologie um 1860 durch Koch und Pasteur schaffte eine Grundlage für eine rationale Erklärung der Sepsis. 1885 definierte Ziegler in seinem Lehrbuch der Pathologie die Sepsis als „Vergiftung des Organismus durch Toxine, Toxalbumine, Fermente und andere Produkte bakteritischer Zersetzung, also eine septische Intoxikation“. 1906 schrieb Lehnartz, damaliger ärztlicher Direktor des Allgemeinen Krankenhauses Eppendorf in Hamburg, in seiner Monografie „Die septischen Erkrankungen“, dass man unter Sepsis alle durch Eiterkokken und andere Bakterien bedingten Allgemeinerkrankungen versteht und kein Zusammenhang mit Fäulnis besteht. Die Entdeckung der Penicilline 1928 durch Fleming und die Weiterentwicklung des intensivmedizinischen Monitorings in den 70-80er Jahren sind wichtige Meilensteine in der Entwicklung der Sepsisbehandlung. Eine erste moderne Definition der Sepsis lieferte Bone 1991. Er beschrieb die Sepsis als Invasion von Mikroorganismen und/oder ihrer Toxine in den Blutstrom, gepaart mit der systemischen Reaktion des Organismus auf

diese (Kreymann und Wolf 1996).

### 2.1.2 Definition

Die Sepsis imponiert als komplexe, systemische Entzündungsreaktion des Wirtsorganismus auf eine Infektion. Derzeit gibt es keinen Parameter, der allein zur Diagnose der Sepsis führen kann (Hagel und Brunkhorst 2011). Grundlage der heutzutage verwendeten Sepsisdefinition stellen nach wie vor die 1992 verabschiedeten Diagnosekriterien (Tabelle 2.1) der Konsensuskonferenz des American College of Chest Physicians (ACCP) und der Society of Critical Care Medicine (SCCM) dar (The ACCP/SCCM Consensus Committee 1992). Wichtig zu bemerken ist, dass in ca. 30 % aller Fälle kein mikrobiologischer Infektionsnachweis geführt werden kann. Häufig weisen Patienten ein „systemic inflammatory response syndrome“ (SIRS) mit multiplen Organdysfunktionen auf, ohne dass ein kausaler Zusammenhang mit einer Infektion nachweisbar ist (Reinhart et al. 2010).

2001 kam es zu einer erneuten Konferenz, in deren Rahmen ein Staging-Konzept für die Sepsis (PIRO), bestehend aus den vier Kriterien Prädisposition (P), Infektion (I), Immunantwort (R für „Response“) und Organdysfunktion (O), vorgestellt wurde, um den neuen pathophysiologischen Erkenntnissen Rechnung zu tragen (Levy et al. 2003). Derzeit hat die PIRO-Klassifikation keine klinische Relevanz, da erst große epidemiologische Untersuchungen ihren Nutzen zeigen müssen (Gerlach 2006).

### 2.1.3 Epidemiologie

Trotz der Entwicklung moderner Monitoring- und Therapieverfahren stellt die Sepsis aufgrund hoher Mortalitätsraten und steigender Inzidenz weltweit nach wie vor eine große Herausforderung in der Medizin dar (Angus et al. 2001, Martin et al. 2003). Im Jahre 2003 hat das Kompetenznetz Sepsis (SepNet) eine deutschlandweite, repräsentative Querschnittsstudie initiiert, um erstmals verlässliche Daten bezüglich der Häufigkeit und Mortalität der schweren Sepsis und des septischen Schocks in Deutschland zu generieren (Engel et al. 2007). Die Erhebung erfolgte auf 454 Intensivstationen an 310 zufällig ausgewählten Krankenhäusern in ganz Deutschland. Besonderer Fokus wurde auf die Repräsentation verschiedener Größen und Versorgungstypen der Krankenhäuser gelegt. Die aufgrund der erhobenen Daten geschätzte Prävalenz der Sepsis auf allen deutschen Intensivstationen beträgt 11 - 14 %, die Prävalenz der schweren Sepsis 10 - 12 %. Der Infektfokus war bei 63 % der Patienten ein Atemwegsinfekt, bei 25 % intraabdominelle

**Tabelle 2.1: Diagnosekriterien für Sepsis, schwere Sepsis und septischen Schock**

---

**I. Nachweis der Infektion**

Diagnose einer Infektion über den mikrobiologischen Nachweis oder durch klinische Kriterien.

**II. Systemic inflammatory host response (SIRS) (mind. 2 Kriterien)**

- Fieber ( $\geq 38$  °C) oder Hypothermie ( $\leq 36$  °C) bestätigt durch eine rektale oder intravasale oder vesikale Messung
- Tachykardie: Herzfrequenz  $\geq 90$  /min
- Tachypnoe (Frequenz  $\geq 20$  /min) o. Hyperventilation ( $\text{PaCO}_2 \leq 4,3$  kPa)
- Leukozytose ( $\geq 12000$  / $\text{mm}^3$ ) oder Leukopenie ( $\leq 4000$  / $\text{mm}^3$ ) oder  $\leq 10$  % unreife Neutrophile im Differentialblutbild

**III. Akute Organdysfunktion (mind. 1 Kriterium)**

- Akute Enzephalopathie: eingeschränkte Vigilanz, Desorientiertheit, Unruhe, Delirium.
- Relative oder absolute Thrombozytopenie: Abfall der Thrombozyten um mehr als 30 % innerhalb von 24 Stunden oder Thrombozytenzahl  $\leq 100000$  / $\text{mm}^3$ . Eine Thrombozytopenie durch akute Blutung oder immunologische Ursachen muss ausgeschlossen sein.
- Arterielle Hypoxämie:  $\text{PaO}_2 \leq 10$  kPa unter Raumluft oder ein  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ -Verhältnis von  $\leq 33$  kPa unter Sauerstoffapplikation. Eine manifeste Herz- oder Lungenerkrankung muss als Ursache der Hypoxämie ausgeschlossen sein.
- Renale Dysfunktion: Eine Diurese von  $\leq 0,5$  mL/kg/h für wenigstens 2 Stunden trotz ausreichender Volumensubstitution und/oder ein Anstieg des Serumkreatinins  $> 2x$  oberhalb des lokal üblichen Referenzbereiches.
- Metabolische Azidose: Base Excess  $-5$  mmol/L oder eine Laktatkonzentration  $> 1,5x$  oberhalb des lokal üblichen Referenzbereiches.

---

**Sepsis:** Kriterien I und II

**Schwere Sepsis:** Kriterien I, II und III

**Septischer Schock:** Kriterien I und II sowie für wenigstens 1 Stunde ein systolischer arterieller Blutdruck  $\leq 90$  mmHg bzw. ein mittlerer arterieller Blutdruck  $\leq 65$  mmHg oder notwendiger Vasopressoreinsatz, um den systolischen arteriellen Blutdruck  $\geq 90$  mmHg oder den arteriellen Mitteldruck  $\geq 65$  mmHg zu halten. Die Hypotonie besteht trotz adäquater Volumengabe und ist nicht durch andere Ursachen zu erklären.

---

*Diagnosekriterien entsprechend den ACCP/SCCM Konsensus-Konferenz Kriterien (The ACCP/SCCM Consensus Committee 1992) modifiziert nach Reinhart et al (2010).*

Infektionen und bei 7% urogenitale Infektionen. Die Gesamtmortalität bei Patienten mit einer schweren Sepsis lag bei 55%. Die geschätzte absolute Neuerkrankungsrate der Sepsis liegt für ganz Deutschland bei 110.000 - 154.000 Fällen pro Jahr. Damit stellen die septischen Erkrankungen die siebthäufigste Krankenhausentlassdiagnose unter den lebensbedrohlichen Erkrankungen dar. Mit ca. 40.000 - 57.000 Todesfällen sind septische Erkrankungen, nach der koronaren Herzkrankheit (KHK) und dem akuten Myokardinfarkt, die dritthäufigste Todesursache in Deutschland. Diese Zahlen stehen im Kontrast zu den offiziellen Zahlen des Statistischen Bundesamtes, laut denen ca. 39.000 Menschen an Sepsis erkranken und ca. 6.000 versterben. Daraus ergibt sich, dass die Inzidenz und die Mortalität der Sepsis in Deutschland um das 4- bzw. 10-fache unterschätzt wird (Engel et al. 2007).

#### 2.1.4 Pathophysiologie

Sepsis ist definiert als Ergebnis aus Infektion und Wirtsantwort. Pathogene und deren Produkte („Pathogen-associated molecular patterns“, kurz: PAMPs) triggern die systemische Wirtsantwort (Bochud und Calandra 2003). Das Erregerspektrum der Sepsis ist sowohl von der Lokalisation der Infektion (z. B. Pneumonie, Harnwegsinfekt, Peritonitis), als auch von verschiedenen Wirtsfaktoren (z. B. antibiotische Vorbehandlung, Immunsuppression, Vorerkrankungen) abhängig. Zu den häufigsten Erregern der Sepsis zählen Staphylokokken, Streptokokken und gramnegative Darmbakterien (u. a. *Escherichia coli*, Klebsiellen, *Enterobacter*, *Proteus*, *Pseudomonas aeruginosa*). Neben Bakterien gehören auch Viren und Pilze zum Keimspektrum der Sepsis (Hauber und Zabel 2009). Die Triggerung der Wirtsantwort erfolgt über eine Aktivierung des unspezifischen Immunsystems durch die PAMPs. Zu den PAMPs zählen beispielsweise Exotoxine, bakterielle DNA und Membranbestandteile. Diese werden von immunkompetenten Zellen über spezifische Rezeptoren („pattern recognition receptors“, kurz: PRR) erkannt. Das durch die Bindung der PAMPs an die PRRs ausgelöste Aktivierungsmuster resultiert in einer Wirtsantwort in Form des „systemic inflammatory response syndrome“ (SIRS) (Bochud und Calandra 2003). Durch die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden kommt es zur Expression proinflammatorischer Zytokine wie  $\text{TNF-}\alpha$  und  $\text{Il-1}$ . Ein wichtiger Bestandteil der intrazellulären Signalkaskade ist MyD88, welches als Adapterprotein für fast alle Toll-like-Rezeptoren dient. Die Signaltransduktion mittels MyD88 ist bedeutend für die Induktion einer hyperinflammatorischen Antwort und die Entwicklung von Gewebeschäden bei der Sepsis (Weighardt und Holzmann 2007). Eine bedeutende Rolle scheint  $\text{Hif-1 } \alpha$ , ein Regulator der Energiehomöostase, für die Regulation von Makrophagen und Neutrophilen

während der Sepsis zu spielen. Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert die Expression von Hif-1  $\alpha$  in Makrophagen, was zur Synthesesteigerung pro-inflammatorischer Zytokine führen kann (Zinkernagel et al. 2007). Die Aktivierung der Monozyten und Makrophagen führt gemeinsam mit der Ausschüttung früher proinflammatorischer Zytokine zur Synthese weiterer Zytokine und Entzündungsmediatoren, u. a. : Il-6, -8, -10 und HMGB-1, mit teils pro- und anti-inflammatorischen Wirkungen (Riedemann et al. 2003). Vor allem die Ausschüttung von IL-6 führt zur Veränderung der hepatischen Genexpression. Diese sogenannte Akute-Phase-Reaktion führt zur verminderten Synthese von Albumin und zur gesteigerten Synthese von sogenannten Akute-Phase-Proteinen (z. B. C-reaktives Protein,  $\alpha$ -Makroglobulin) (Pannen und Robotham 1995). In mehreren Studien konnte ein Zusammenhang zwischen dem Plasmaspiegel von Il-6 und dem Outcome septischer Patienten festgestellt werden. Zusätzlich scheint Il-6 ein Marker für die Schwere der Sepsis zu sein (Reinhart et al. 2002). Neben der proinflammatorischen Zytokinantwort scheint auch die Ausschüttung anti-inflammatorischer Zytokine (Il-4, Il-10) und die daraus resultierende Immunsuppression Einfluss auf die ungünstige Prognose der Sepsis zu haben (Bauer et al. 2006). Marchant et al. (1994) stellten fest, dass septische Patienten eine gesteigerte Produktion von IL-10 aufweisen. Die systemische Entzündungsreaktion ist Auslöser verschiedener Mechanismen, die in ihrer Gesamtheit das Versagen multipler Organsysteme nach sich ziehen. Zu diesen gehören die endotheliale Dysfunktion, Hämostasestörungen, Barrierestörungen, Apoptoseinduktion und endokrine Dysfunktion.

Für die endotheliale Dysfunktion werden vor allem die stressinduzierbaren, vasoaktiven Mediatoren Stickstoffmonoxid (NO), Kohlenstoffmonoxid (CO) und Endothelin-1 verantwortlich gemacht (Bateman et al. 2003, Cobb 2001, Rensing et al. 2002). Zusätzlich führt die Expression leukozytärer Adhäsionsmoleküle zur Akkumulation von Leukozyten an den Gefäßwänden. Durch die Freisetzung zytotoxischer Mediatoren, oder mechanischer Behinderung des Blutflusses, kommt es zur Störung der Mikrozirkulation und der Organperfusion (Paxian et al. 2003, Rensing et al. 2002).

Im Rahmen einer Sepsis kommt es zu einer systemischen Hämostaseaktivierung. Darüber hinaus kommt es zur Interaktion von Inflammationsreaktion und Gerinnungssystem (Esmon 2008). Das Ausmaß der Gerinnungsstörung korreliert stark mit der Prognose septischer Patienten (Dempfle et al. 2004). Es gibt viele verschiedene Mechanismen, die zu einer gestörten Hämostase während der Sepsis beitragen können. Zu diesen gehören Störungen des plasmatischen Gerinnungssystems, des thrombozytären Systems, der Fibrinolyse und der endothelialen Funktion. In der Folge kann es zur Ausbildung einer disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) kommen (Bauer et al. 2006). Die Akti-

vierung des plasmatischen Gerinnungssystems erfolgt vor allem durch die Aktivierung von Thrombozyten und Leukozyten, sowie durch eine Aktivierung des Endothels. Des Weiteren kommt es im Rahmen einer Sepsiserkrankung zum schnellen Abfall der Thrombozytenzahlen (Akca et al. 2002, Sharma et al. 2007, Vandijck et al. 2010). Erst kürzlich wurde die vWF-cleaving-Protease (ADAMTS-13) entdeckt, welche eine spezifische Proteolyse supramolekularer Multimere (sm-vWF) katalysiert und bei Patienten mit Sepsis und SIRS eine geringere Aktivität aufweist (Bockmeyer et al. 2008). Toxine und Entzündungsmediatoren führen zu einer pro-thrombogenen Aktivierung der Gefäßwände, in deren Folge es zur verstärkten Expression von TF auf den Endothelzellen und in der subendothelialen Matrix kommt (Bauer et al. 2006). Eine Erhöhung des Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (PAI-1) korreliert mit der Prognose der Sepsis, und ist Ausdruck einer gehemmten Fibrinolyse (Levi et al. 2003).

In Folge einer verminderten Perfusion im Rahmen von Sepsis/SIRS kann es zur Schädigung der mukosalen Barriere des Gastrointestinaltraktes und der Atemwege kommen. Die Translokation von Bakterien/PAMPs könnte im Sinne eines Circulus vitiosus die Aktivierung des unspezifischen Immunsystems verstärken (Bahrami et al. 1996). Darüber hinaus würde eine Translokation von Bakterien/PAMPs das septiforme Bild primär abakterieller Insulte (Polytrauma, Pankreatitis) erklären (Marshall et al. 1993).

Neben den hypoxieinduzierten Zelluntergängen wird die Rolle der Apoptoseinduktion als mitverantwortlicher Mechanismus am Multiorganversagen diskutiert (Cobb et al. 2000, Paxian et al. 2003).

Die schwere Sepsis kann zur gestörten Ausschüttung von Hormonen führen (Insulin, Vasopressin, Kortisol). Die Beeinträchtigung der endokrinen Funktionen des Körpers ist ein weiterer, pathophysiologisch bedeutsamer Faktor für die Entwicklung schwerer Organdysfunktionen (Bauer et al. 2006).

### **2.1.5 Diagnose**

Zu den klinischen Symptomen der Sepsis gehören Fieber, Schüttelfrost, Hypothermie, Leukozytose und eine Linksverschiebung im Differenzialblutbild. Bei Sepsisverdacht sind Blutkulturen zum Nachweis der Infektion und der Erregerresistenz anzulegen. Verschiedene laborchemische Parameter können im Zusammenhang mit der klinischen Symptomatik wichtige Indikatorfunktion besitzen, z.B. Gerinnungsparameter (Quick, PTT, Thrombozyten) und Entzündungsparameter (Laktat, Leukozyten). Zum Ausschluss einer schweren Sepsis, bzw. zur Sicherung der Diagnose, wird der frühe Nachweis von Prokalzitinin im Serum empfohlen (Reinhart et al. 2010, Hagel und Brunkhorst 2011).

## 2.1.6 Therapie

Bei der Sepsistherapie müssen drei verschiedene Grundtypen unterschieden werden: 1. Kausale Therapie 2. Supportive Therapie und 3. Adjunktive Therapie. Wichtigster Bestandteil der kausalen Therapie ist die Fokussanierung und die antimikrobielle Therapie. Diese sollte frühestmöglich beginnen. Zu den Maßnahmen der Supportivtherapie gehören hämodynamische Stabilisierung (Volumentherapie, Inotropika), Nierenersatzverfahren, Air-way-Management und Beatmung. Die adjunktive Therapie beinhaltet Maßnahmen, die zusätzlich zur kausalen und supportiven Therapie zur Versorgung des Patienten angewandt werden. Hierzu zählen unter anderem der Einsatz von Glukokortikoiden und aktiviertem Protein C (Reinhart et al. 2010, Hagel und Brunkhorst 2011).

## 2.1.7 Die Rolle der Thrombozyten bei Sepsis

Thrombozyten spielen eine wichtige Rolle für die Pathogenese des SIRS und der Sepsis. Dies wird allein schon durch die Tatsache verdeutlicht, dass die Thrombozytopenie ein häufiges Merkmal der Sepsis darstellt (Levi 2005). Sepsispatienten auf der Intensivstation zeigen einen typischen Verlauf der Thrombozytenzahl, der durch einen Abfall der Thrombozyten am vierten Tag gekennzeichnet ist (Akca et al. 2002). Die Schwere der Sepsis korreliert mit dem Abfall der Thrombozytenzahl (Mavrommatis et al. 2000). Nach der entzündungsabhängigen Aktivierung der Thrombozyten durch Endotoxin (Zielinski et al. 2002) oder Entzündungsmediatoren (z. B. PAF) (Zimmerman et al. 2002) können Thrombozyten über zwei Hauptmechanismen Einfluss auf den Verlauf der Sepsis und des Multiorganversagens nehmen (Abbildung 2.1). Die unkontrollierte Aktivierung der Thrombozyten kann zur thrombotischen Mikroangiopathie und disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) führen. Die Gerinnungsaktivierung führt in Kombination mit einer Hypoperfusion, in Folge der mediatorinduzierten endothelialen Dysfunktion, zur Gewebehypoxie (Bauer et al. 2006). Es konnte gezeigt werden, dass der P-Selektinspiegel während des SIRS erhöht ist (Levi 2005). Die Expression von P-Selektin auf der Thrombozytenmembran fördert nicht nur die Adhärenz von Thrombozyten an Leukozyten und Endothelzellen, sondern führt auch zur verstärkten Expression von Tissue factor (TF) auf Monozyten (Shebuski und Kilgore 2002). Es wurde nachgewiesen, dass Tissue factor in Thrombozyten enthalten ist und durch Aktivierung dieser ausgeschüttet wird (Zillmann et al. 2001). Scholz et al. (2002) und Lösche et al. (2004) haben in ihren Arbeiten gezeigt, dass für den Transport von TF zwischen Thrombozyten und Monozyten, Mikrovesikel eine entscheidende Rolle spielen. Tissue factor gehört zu den Initiatoren



der Blutgerinnung und führt zur weiteren Thrombozytenaktivierung (Levi 2005). Des Weiteren vereinfachen aktivierte Thrombozyten die Synthese des Prothrombinase- und Tenase-Komplex, indem sie eine geeignete Phospholipidschicht bereitstellen (Levi 2010). Außerdem verfügen Thrombozyten über vielfältige Möglichkeiten Einfluss auf das Immunsystem zu nehmen (Abschnitt 2.2). Beispielsweise führt die Aktivierung von Thrombozyten zur Ausschüttung vieler verschiedener Signalmoleküle, die sowohl die eigene, als auch die Funktion anderer Zellen beeinflussen können (Heffner 1997).

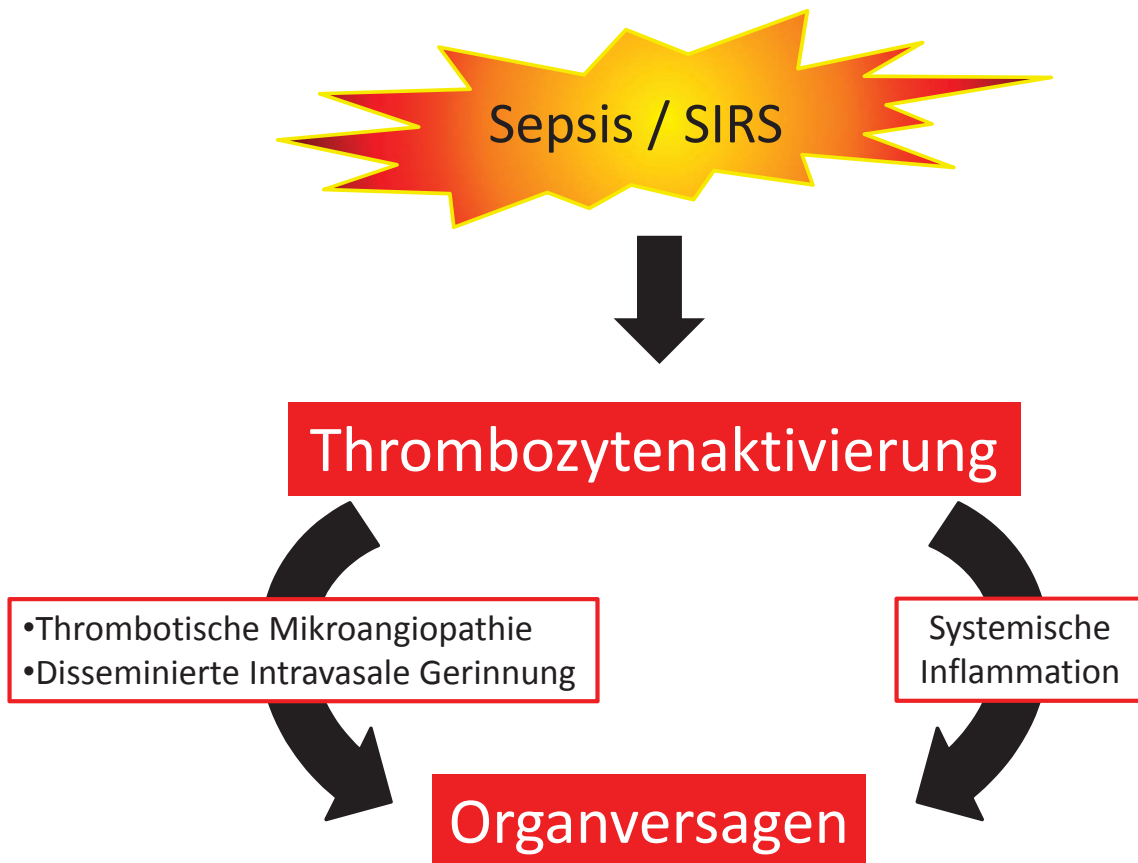


Abbildung 2.1: Die Rolle der Thrombozyten in der Pathogenese der Sepsis

## 2.2 Thrombozyten als Inflammationszellen

Die Funktionen der Thrombozyten im menschlichen Organismus gehen weit über die klassischen Aufgaben der Hämostase und der Reparatur beschädigter Gefäße hinaus (Weyrich et al. 2003). Zunehmend gewinnen Thrombozyten auch als Inflammationszellen an Bedeutung. Dabei verfügen sie über vielfältige Mechanismen, mit deren Hilfe sie

die Immun- und Entzündungsantwort modulieren können (Tabelle 2.2). Die direkte Interaktion mit Pathogenen erfolgt über verschiedene Rezeptoren (z. B. Toll-like-Rezeptoren,  $Fc_\epsilon$ -Rezeptoren), die zur Aktivierung der Thrombozyten führen können. Verschiedene Oberflächenproteine (z. B. P-Selektin) ermöglichen den direkten Kontakt von Thrombozyten mit Leukozyten und Endothelzellen. Dies fördert die Adhäsion und Transmigration der Leukozyten ins Entzündungsgebiet. Gleichzeitig werden Thrombozyten mit in das jeweilige Gewebe getragen, wo sie Einfluss auf die Funktion der Leukozyten nehmen. Die Oberflächenproteine der Thrombozyten vermitteln nicht nur den physischen Kontakt, sondern ermöglichen auch die Beeinflussung der Zellfunktion von Granulo- und Monozyten. Die Sekretion antimikrobieller Substanzen (Thrombocidine) ermöglicht das direkte Abtöten von Bakterien durch Porenbildung. Zusätzlich können Thrombozyten verschiedener Chemokine, Zytokine und Lipidmediatoren sezernieren, die in unterschiedlicher Weise die Entzündungsantwort beeinflussen (Literaturangaben in Tabelle 2.2). Die Rolle der Thrombozyten als Inflammationszellen spiegelt sich auch in der Pathogenese verschiedener Krankheitsbilder wieder. Thrombozyten-Leukozyten-Interaktionen spielen u. a. eine Rolle beim Akuten Koronarsyndrom, bei Lungenentzündung, Zystischer Fibrose, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, entzündlichen Hautkrankheiten, Glomerulonephritis (Totani und Evangelista 2010) und der Sepsis (Li et al. 2011).

**Tabelle 2.2: *Thrombozyten als Inflammationszellen***

Mechnismus	Funktion	Literaturangabe
<b>Interaktion mit Pathogenen</b>		
Toll-like-Rezeptoren	Erkennung von Pathogenen durch PAMPs	Jurk und Kehrel (2008)
$Fc_\epsilon$ -Rezeptoren	Erkennung von IgE gebundenen Protozoen	Jurk und Kehrel (2008)
„C-type lectin-like“ Rezeptor-2	Internalisierung von HIV-1	Jurk und Kehrel (2008)

*Fortsetzung auf der nächsten Seite*

**Tabelle 2.2: Thrombozyten als Inflammationszellen (Fortsetzung)**

Mechnismus	Funktion	Literaturangabe
<b>thrombozytäre Chemokine</b>		
$\beta$ -Thromboglobulin/CXCL7	Chemotaxis + Aktivierung von Neutrophilen	Flad und Brandt (2010)
Platelet factor 4/CXCL4	Rekrutierung und Aktivierung von Monozyten/Neutrophilen	Flad und Brandt (2010)
RANTES/CCL5	Rekrutierung von Monozyten, Lymphozyten, Eosinophilen, Basophilen, NC-Zellen und dendritischen Zellen	Flad und Brandt (2010)
Mif-1 $\alpha$ /CCL3	–	Klinger et al. (1995)
GRO $\alpha$ /CXCL1	–	Power et al. (1995)
ENA-78/CXCL5	–	Power et al. (1995)
<b>thrombozytäre Chemokinrezeptoren</b>		
CCR1/3/4	Aggregation und Adhäsion durch CCL5 und CCL17	Gear und Camerini (2003)
CXCR4	Aggregation und Adhäsion durch CCL17, CCL22 und CXCL12	Gear und Camerini (2003)
<b>Thrombozytenaktivierung durch Chemokine</b>		
(CCL17, CCL22, CXCL12)	Aktivierung der Thrombozyten in Anwesenheit von ADP	Gear und Camerini (2003)
<b>Thrombocidine</b>		
(CXCL7, CCL5, CXCL4, TC-1/2)	direkte Tötung von Bakterien	Flad und Brandt (2010)
<b>Aktivierung des Komplementsystems</b>		
(alternativer Weg: durch P-Selektin, klassischer Weg: C1q-Rezeptor)	Fokussierung der Komplementaktivität auf das Entzündungsgeweb	Peerschke et al. (2008) Peerschke et al. (2010)

*Fortsetzung auf der nächsten Seite*

**Tabelle 2.2: Thrombozyten als Inflammationszellen (Fortsetzung)**

Mechnismus	Funktion	Literaturangabe
<b>Zell-Zell-Interaktionen</b>		Weyrich und Zimmerman
mit Mono- und Granulozyten	Rekrutierung und Immigration von Inflammationszellen, Veränderung der zellulären Funktionen (Chemo-/Zytokinproduktion, Produktion von ROS, Genexpressionsänderungen)	(2004), Smyth et al. (2009), Semple et al. (2011), Russwurm et al. (2002), Clark et al. (2007)
mit Endothelzellen	Expression von Chemo-/Zytokinen und Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen	
mit Thrombozyten	erhöht die Ausschüttung immunmodulatorischer Mediatoren in Thrombozyten	

*Dargestellt sind verschiedene Mechanismen mit deren Hilfe Thrombozyten das Immunsystem beeinflussen können. Abkürzungen: ADP = Adenosindiphosphat, CXCL = C-X-C motif ligand, CCL = C-C motif ligand CCR/CXCR = CCL/CXCL receptor, GRO $\alpha$  = growth-regulated protein  $\alpha$ , ENA-78 = epithelial neutrophil-activating peptide 78, Mif-1 $\alpha$  = Macrophage inflammatory protein 1  $\alpha$ , NC-Zellen = natürliche zytotoxische Zellen, PAMPs = pathogen-associated molecular patterns, RANTES = "regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted"*

## 2.3 Thrombozytenaggregationshemmer

### 2.3.1 Wirkungsweise

Es gibt verschiedene Arten von Thrombozytenaggregationshemmern. Zu den am häufigsten verwendeten gehören: Acetylsalicylsäure, Thienopyridine und Glykoprotein IIb/IIIa-Inhibitoren, die sich in ihrer jeweiligen Wirkungsweise unterscheiden (Abbildung 2.2). Acetylsalicylsäure (Aspirin) ist der am häufigsten verwendete Thrombozytenaggregationshemmer. Aspirin ist ein nicht-kompetitiver Hemmer der Cyclooxygenase-1 und -2 (COX-1/2). Dadurch hemmt Aspirin u. a. die Synthese von Thromboxan A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) in Thrombozyten, welches normalerweise zur Vasokonstriktion und zur weiteren Aktivierung von Thrombozyten führt. Durch die irreversible Hemmung der Cyclooxygenase hält der anti-thrombozytäre Effekt ca. sieben Tage, bis zur Neusynthese der Thrombozyten, an (McNicol und Israels 2003).

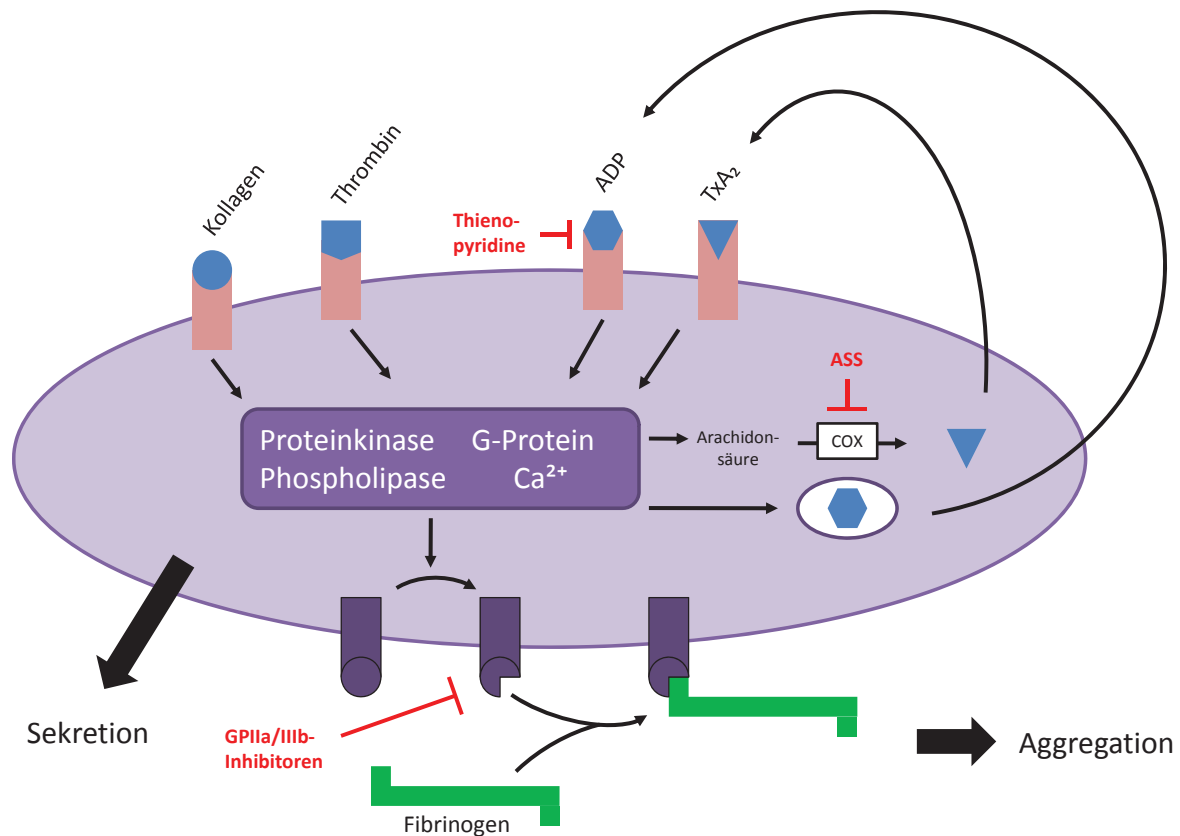
Clopidogrel und Ticlopidin gehören zur Gruppe der Thienopyridine. Beide Substanzen führen, nach hepatischer Metabolisierung, zu einer selektiven, nicht-kompetitiven Hemmung des P2Y<sub>12</sub> ADP Oberflächenrezeptors der Thrombozyten. Die Hemmung des P2Y<sub>12</sub> Rezeptors verhindert die ADP-abhängige Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten. Ähnlich wie Aspirin, führen die Thienopyridine zu einer irreversiblen Hemmung der Thrombozyten. Aufgrund des besseren Wirkprofils hat Clopidogrel Ticlopidin weitestgehend ersetzt (McNicol und Israels 2003).

Die Glykoprotein IIb/IIIa-Inhibitoren kann man in drei verschiedene Substanzklassen unterteilen: monoklonale Antikörper (Abciximab), zyklische Peptide (Eptifibatide) und Peptidmimetika (Tirofiban). Alle zielen auf die Hemmung des Glykoprotein IIb/IIIa (Integrin  $\alpha$ IIb/ $\beta$ 3) ab. Die Aktivierung der Thrombozyten führt zur konformationellen Änderung des Glykoprotein IIb/IIIa, welche dessen Affinität zu Fibrinogen erhöht. Die Bindung von Fibrinogen führt zur Reorganisation des Zytoskeletts und ist essenziell für die Thrombozytenaggregation (McNicol und Israels 2003).

### **2.3.2 Benefit von Thrombozytenaggregationshemmern bei systemischer Inflammation und Sepsis**

Thrombozytenaggregationshemmer werden gewöhnlich zur Sekundärprävention kardiovaskulärer, zerebrovaskulärer und thrombotischer Erkrankungen eingesetzt (McNicol und Israels 2003). Die Tatsache, dass Thrombozyten auch als inflammatorische Zellen an Bedeutung gewinnen (Abschnitt 2.2), führt zu der Frage, ob Thrombozytenaggregationshemmer positive Wirkungen auf inflammationsabhängige Krankheitsbilder, wie die Sepsis, haben. Bisher gibt es nur wenige Studien, die sich mit einer möglichen antiinflammatorischen Wirkkomponente der Thrombozytenaggregationshemmer beschäftigen.

Tierexperimentelle Arbeiten an Ratten und Affen konnten zeigen, dass Antikörper gegen den GP IIa/IIIb-Rezeptor die Endotoxin-induzierten Organschäden und die Letalität senken können (Pu et al. 2001, Taylor et al. 1997). Bei Endotoxin-behandelten Mäusen führte die Gabe von Clopidogrel zur verminderten thrombozytenabhängigen Aktivierung von Neutrophilen (Evangelista et al. 2005). Hagiwara et al. (2011) konnten in einem LPS-Modell der Ratte zeigen, dass Clopidogrel die LPS-induzierte systemische Entzündungsreaktion abmildert. Clopidogrel-behandelte Mäuse zeigten signifikant geringer ausgeprägte Organschäden an Leber und Lunge. Zusätzlich senkte Clopidogrel den LPS-induzierten Anstieg der proinflammatorischen Proteine TNF- $\alpha$ , IL-6 und HMGB1



**Abbildung 2.2: Mechanismen der medikamentösen Thrombozyteninhibition**

Dargestellt, sind verschiedene Wege der Thrombozytenaktivierung und die Angriffspunkte der häufigsten Thrombozytenaggregationshemmer (rot). Abkürzungen: ADP = Adenosindiphosphat, ASS = Acetylsalicylsäure, COX = Cyclooxygenase, GP = Glykoprotein, TxA<sub>2</sub> = Thromboxan A<sub>2</sub>

(Hagiwara et al. 2011). Im PCI-Modell (peritoneal contamination and infection) der Sepsis in Mäusen konnte Clopidogrel den Sepsis-assoziierten Abfall der Thrombozyten verhindern (Seidel et al. 2009).

Winning et al. (2009) haben in einer tierexperimentellen Studie die Wirkung von Clopidogrel in Mäusen untersucht. Dazu wurde den Mäusen Clopidogrel verabreicht und anschließend ein Endotoxinschock mittels intraperitonealer LPS-Injektion ausgelöst. Es zeigte sich auch hier, dass Clopidogrel den LPS-induzierten Abfall der Thrombozyten verhindern kann. Clopidogrel-vorbehandelte Mäuse zeigten zudem eine um 50 % reduzierte pulmonale Fibrinablagerung im Vergleich zu unbehandelten Mäusen. Weiterhin konnten Winning et al. mittels MicroArray-Analyse 25 Gene in den peripheren Blutzellen identifizieren, die in Abhängigkeit von der Clopidogrelbehandlung eine veränderte Genexpression aufwiesen.

Parallel dazu, untersuchten Winning et al (2009) in einer retrospektiven Studie einen

möglichen Benefit thrombozytenhemmender Medikamente für die Entwicklung eines Organversagens in Folge einer Infektion. Analysiert wurden die Daten von 224 Patienten mit CAP (community acquired pneumonia), die innerhalb von 5 Jahren stationär behandelt wurden. Ca. 20% der Patienten erhielten, vor Krankenhauseinweisung, Acetylsalicylsäure oder Clopidogrel. Patienten, die mit Thrombozytenaggregationshemmern vorbehandelt wurden, entwickelten signifikant seltener Organversagen und benötigten seltener intensivstationäre Behandlung. In der altersabhängigen Subgruppenanalyse erzielten vorbehandelte Patienten eine signifikant geringere Krankenhausliegedauer, als Patienten ohne thrombozytenhemmende Vorbehandlung.

In einer zweiten retrospektiven Studie untersuchten Winning et al. (2010) den Einfluss von Thrombozytenaggregationshemmern auf das Outcome kritisch kranker Patienten, die innerhalb von 24 Stunden nach stationärer Aufnahme auf die Intensivstation verlegt wurden. In die Studie wurden Daten von 615 Patienten eingeschlossen, von denen ca. 25% thrombozytenhemmende Medikamente (Acetylsalicylsäure, Clopidogrel) vor Aufnahme einnahmen. Patienten mit thrombozytenhemmender Vorbehandlung zeigten deutliche Unterschiede im Verlauf der Thrombozytenzahlen, verglichen mit Patienten ohne Vorbehandlung. Sowohl der initiale Abfall mit einem Maximum am Tag 3, als auch der überschießende Wiederanstieg der Thrombozytenzahlen an den Tagen 8-10 konnte durch Vorbehandlung mit Thrombozyteninhibitoren abgedämpft werden. Durch verschiedene Subgruppenanalysen konnte gezeigt werden, dass vor allem Patienten ohne chirurgische Behandlung und Patienten mit neurochirurgischer Behandlung von einer thrombozytenhemmenden Vorbehandlung profitieren. Wichtig zu bemerken ist auch, dass die Vorbehandlung mit Thrombozytenaggregationshemmern keine nachteiligen Auswirkungen in den Subgruppen mit erhöhtem Blutungsrisiko hatte.

Auch andere Studien deuten darauf hin, dass Thrombozytenaggregationshemmer antiinflammatorische Wirkungen haben. So konnte gezeigt werden, dass Acetylsalicylsäure die Entzündungsreaktionen, gekennzeichnet durch einen erhöhten Plasmaspiegel von C-reaktivem Protein (CRP), in Patienten mit zerebrovaskulären und kardiovaskulären Erkrankungen hemmen kann (Ridker et al. 1997, Ikonomidis et al. 1999). Auch der Einsatz von Clopidogrel ist assoziiert mit einer Reduktion des CRP-Plasmaspiegels bei verschiedenen Krankheitsbildern. Dazu gehören u. a. Diabetes, Nierentransplantation, kardiovaskuläre und zerebrovaskuläre Krankheitsbilder (Li et al. 2011).

## 3 Ziele der Arbeit

In vorangegangenen Arbeiten konnte ein Benefit von Clopidogrel und anderen Thrombozytenaggregationshemmern für den Verlauf von systemischen Entzündungsreaktionen und Sepsis, sowohl im Tiermodell (Winning et al. 2009, Seidel et al. 2009), als auch beim Menschen (Winning et al. 2009, Winning et al. 2010) festgestellt werden. Clopidogrel hemmt den entzündungsinduzierten Thrombozytenabfall. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass Clopidogrel neben der anti-hämostatischen Komponente auch über andere Mechanismen wirken kann. Clopidogrel beeinflusst die Genexpression von 25 verschiedenen Genen in den peripheren Blutzellen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist der Nachweis eines möglichen Einflusses von Clopidogrel auf die organspezifische Genexpression in den Zielorganen der Sepsis: Herz, Leber und Hirn. Die Genexpressionsanalyse erfolgt mittels Real-Time-PCR anhand fünf ausgewählter Gene (Tabelle 3.1), die jeweils eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der systemischen Entzündungsreaktion spielen. Zunächst erfolgt die Testung der ausgewählten Gene auf deren Eignung als Indikatorgene der systemische Entzündungsreaktion und der Sepsis im Endotoxin-Modell der Maus. Anschließend wird der Einfluss von Clopidogrel auf die Genexpression der einzelnen Indikatorgene untersucht.

Die Genexpressionsanalyse mittels Real-Time-PCR erfordert geeignete Referenzgene, damit eine valide Aussage über das Expressionsniveau der untersuchten Gene gemacht werden kann. Da es bisher kein einzelnes Referenzgen für den universellen Einsatz in allen Organen gibt, besteht ein weiteres Ziel der Arbeit, in der Identifikation und Selektion geeigneter Referenzgenkandidaten für den jeweiligen Organtyp.



**Tabelle 3.1: *Untersuchte Gene und deren Produkte***

Gen			Protein		
Name	Symbol	Chr.	Name	Symbol	Funktion
Interleukin 6	Il-6	5	Interleukin-6	IL-6	Zytokin
Interleukin 10	Il-10	1	Interleukin-10	IL-10	Zytokin
Hypoxia inducible factor 1, alpha subunit	Hif1a	12	Hypoxia-inducible factor 1-alpha	HIF1- $\alpha$	Transkriptionsfaktor, Regulator der Energieh�omostase
Myeloid differentiation primary response gene 88	Myd88	9	Myeloid differentiation primary response protein	MyD88	Intrazelluläres Adapterprotein, Signaltransduktion
Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1	PAI-1	5	Plasminogen activator inhibitor 1	PAI-1	Hemmung der Fibrinolyse

*Dargestellt sind die Namen und Symbole der untersuchten Gene und deren Produkte, gemäß den Angaben des National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Abkürzungen: Chr. = Chromosom*

# 4 Material und Methoden

## 4.1 Material

### 4.1.1 Gewebeproben

Die Gewebeproben wurden aus Herz, Leber und Hirn von Balb/c Mäusen (Harlan-Winkelmann GmbH, Bochern) gewonnen. Zusätzlich erfolgte eine Blutentnahme. Zu Beginn der Versuche lag ein genehmigter Tierschutzantrag vor (Nr. 02-037/08 gemäß dem Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz vom 04.09.2008).

### 4.1.2 Kits und Enzyme

RNA-Isolation	RNeasy <sup>®</sup> Mini Kit, Qiagen GmbH
PCR-Produktaufreinigung	MinElute <sup>®</sup> PCR Purification Kit, Qiagen GmbH
Elektrophorese	Experion <sup>™</sup> RNA StdSens Kit, Bio-Rad Experion <sup>™</sup> DNA 1K Analysis Kit, Bio-Rad
Reverse Transkription	RevertAid <sup>™</sup> First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas
Real-Time-PCR	Brilliant II SYBRPlavix <sup>®</sup> Green QPCR Master Mix, Stratagene

### 4.1.3 Geräte

UV-Vermessung	NanoDrop ND-1000 Spektrofotometer, Thermo Scientific
Elektrophorese	Experion <sup>™</sup> automated electrophoresis system, Bio-Rad
RNA-Isolation	QIAcube <sup>®</sup> , Qiagen GmbH
Thermocycler	PTC-200 Peltier Thermal Cycler, MJ Research
Real-Time-PCR	Rotor-Gene <sup>™</sup> 6000, Corbett Life Science, Quiagen GmbH
Hämatologie	POCH 100iV Diff, Sysmex

#### 4.1.4 Oligonukleotide für Real-Time-PCR

Name	Primer-Sequenz (5'→3')	Hersteller
Il-6		
forward	CAAAGCCAGAGTCCTTCAGAG	biomers.net
reverse	GCCACTCCTTCTGTGACTCC	biomers.net
Il-10		
forward	TCTATTCTAAGGCTGGCCACA	biomers.net
reverse	TCTCTTCCCAAGACCCATGA	biomers.net
Hif1a		
forward	GCCTTAAGCTGTCTGCCACT	biomers.net
reverse	TTTTCGCTTCCTCTGAGCAT	biomers.net
Myd88		
forward	AGTCTCCCCTCAGTGTCTGG	biomers.net
reverse	CACTTGACCCAGGTTGCTTT	biomers.net
PAI-1		
forward	AGCAGAGAGGGAAAAGGGGCTGT	biomers.net
reverse	CCACTGCTCACATACAGCAGCCG	biomers.net
Actb		
forward	GCTCTTTTCCAGCCTTCCTT	biomers.net
reverse	CGGATGTCAACGTCACACTT	biomers.net
G6PD		
forward	CACCACTGCTGCACAAGATT	biomers.net
reverse	TGGAAGCCCACTCTCTTCAT	biomers.net
GAPDH		
forward	CAACAGCAACTCCCACTCTTC	biomers.net
reverse	GGTCCAGGGTTTCTTACTCCTT	biomers.net
Gusb		
forward	GAAACCCGCCGCATATTAC	biomers.net
reverse	CCCCAGGTCTGCATCATATT	biomers.net
Hmbs		
forward	GAAATCATTGCTATGTCCACCA	biomers.net
reverse	GCGTTTTCTAGCTCCTTGGTAA	biomers.net
HPRT-1		
forward	TGACACTGGCAAAACAATGCA	biomers.net
reverse	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT	biomers.net

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Anfertigung der Gewebepreparate

#### Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten Balb/c Mäuse (Harlan-Winkelmann GmbH, Bochern) im Alter von 8 - 12 Wochen mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 23 - 28 g. Die Haltung der Mäuse erfolgte unter Standard-Labor-Bedingungen (Raumtemperatur  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , Luftfeuchtigkeit 40 - 60 %, 14/10 h Hell-Dunkel-Zyklus) in den Tierhaltungsräumen der Serviceeinheit für Kleinnager im Forschungszentrum Lobeda. Die Trinkwasser- und Nahrungsversorgung erfolgte *ad libitum*. Nach Durchführung aller Experimente wurden die Tierkadaver, gemäß den gültigen Arbeitsvorschriften, entsorgt. Ein genehmigter Tierschutzantrag lag zu Beginn der Versuche vor (Nr. 02-037/08, gemäß dem Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz vom 04.09.2008).

#### LPS-induzierter Endotoxinschock

Der Endotoxinschock wurde mittels Lipopolysaccharid (LPS) gramnegativer Bakterien (*Escherichia coli*, Serotyp 0111:B4) vorgenommen. Dazu wurde den nicht-narkotisierten Mäusen 200  $\mu\text{L}$  einer 2 mg/ $\mu\text{L}$  LPS-Lösung intraperitoneal gespritzt. Dies führt zur Auslösung eines inflammatorischen Schockgeschehens und zu einer Aktivierung der Entzündungskaskade in Abwesenheit mikrobieller Erreger (Karima et al. 1999). Eine Verschlechterung des klinischen Zustands der Mäuse ließ sich einige Stunden nach LPS-Gabe feststellen. Zu diesem gehören das Aufstellen der Nackenhaare, tränende Augen und eine deutliche Trägheit im Vergleich zu gesunden Tieren.

#### Versuchsgruppen

Die Mäuse wurden randomisiert den folgenden vier Versuchsgruppen zugeteilt:

**LPS (S):** 5 Tage normales Trinkwasser, dann i.p. LPS wie oben beschrieben (n = 9)

**Kontrolle (K):** 5 Tage normales Trinkwasser, dann i.p. 0,9 % sterile NaCl-Lösung (n = 9)

**Clopidogrel + LPS (CS):** 5 Tage Trinkwasser mit Clopidogrel (187,5 mg/L), dann i.p. LPS wie oben beschrieben (n = 13)

**Clopidogrel + Kontrolle (CK):** 5 Tage Trinkwasser mit Clopidogrel (187,5 mg/L), dann i.p. 0,9 % sterile NaCl-Lösung (n = 12)

Der Thrombozytenaggregationshemmer Clopidogrel (Plavix®) wurde von der Sanofi-Aventis GmbH Deutschland (Frankfurt a. M.) zur Verfügung gestellt.

### Blut- und Organentnahme

Die Blut- und Organentnahme erfolgte 6 Stunden nach LPS-Injektion bzw. Beobachtungsbeginn in Narkose. Die Narkose wurde durch intraperitoneale Injektion von 0,2 mL Ketaminhydrochlorid-Lösung (Ketavet® 50 mg/mL, Pfizer) herbeigeführt. Nach Fixierung der Maus auf dem Rücken wurde die Brust- und Bauchhöhle eröffnet (Abbildung 4.1). Die Blutentnahme erfolgte durch Punktion der Vena cava caudalis mittels einer Lithium-Heparin-Monovette (Sarstedt GmbH, Nürnbergrecht). Anschließend wurden Lunge, Herz, Leber und Nieren entnommen. Abschließend wurde der Schädel eröffnet und das Gehirn entnommen. Alle Organe wurden getrennt in Aliquoten bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

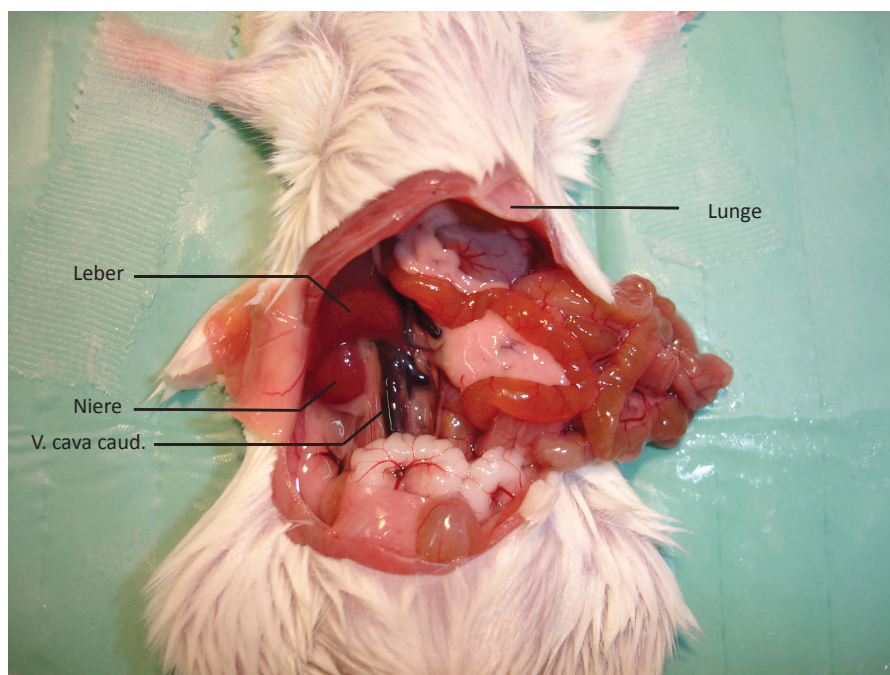


Abbildung 4.1: *Operationssitus einer Maus der unbehandelten LPS-Gruppe (S)*

### 4.2.2 Hämatologie

Zur Bestimmung der hämatologischen Parameter wurde der Analyseautomat POCH 100iV Diff (Sysmex, Norderstedt) eingesetzt. Die Auszählung der korpuskulären Blut-

bestandteile erfolgt dabei mittels der Impedanzmethode von Wallace H. Coulter. Die Blutprobe wird aspiriert und gelangt verdünnt in das Messsystem des Geräts. Dieses besteht aus zwei Kammern, welche über eine winzige Öffnung miteinander verbunden sind. An jeder Seite der Öffnung befindet sich jeweils eine Elektrode, zwischen denen ein kontinuierlicher Strom fließt. Bei Durchtritt der einzelnen Blutzellen verändert sich der Widerstand des Stromkreises, wodurch ein elektrischer Impuls generiert wird. Die Impulshöhe charakterisiert das Zellvolumen der verschiedenen Zelltypen. Ein Mantelstrom, der die Blutzellen umgibt, verhindert eine Rezirkulation und Überlagerung der einzelnen Zellen. Die Berechnung des Hämatokrits erfolgt anhand des Erythrozytenvolumens durch Aufsummierung der Impulshöhen. Zur Bestimmung der Hämoglobin-Konzentration wird ein Reagenz, welches quartäre Ammoniumsalze enthält, eingesetzt. Dies führt zur Lyse der Erythrozytenmembran. Das freiwerdende Hämoglobin oxidiert zu Methämoglobin, und kann fotometrisch bei einem Absorptionsmaximum von 550 nm erfasst werden.

### 4.2.3 RNA Isolation

Der Prozess der RNA-Isolation aus solidem Gewebe besteht aus mehreren Arbeitsschritten. Zunächst erfolgt der Aufschluss der einzelnen Gewebe durch den kombinierten Einsatz von chemischer Lyse und Scherstress. Danach wird die RNA von den restlichen Zellbestandteilen separiert. Hierfür wurde das RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit von Qiagen (Qiagen GmbH, Hilden) eingesetzt. Alle Arbeitsschritte wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Von den Organen wurden Organschnitte mit einer Masse von 20 - 35 mg angefertigt. Dies geschah unter kontinuierlicher Kühlung auf Trockeneis, um eine Degradation der RNA zu verhindern. Den Organschnitten wurde in einem ersten Schritt 0,6 mL Lysepuffer zugegeben, der als denaturierendes Reagenz Guanidin Isothiocyanat (GITC) enthält. Zusammen mit dem Reduktionsmittel  $\beta$ -Mercaptoethanol inaktiviert GITC endogene RNAsen, welche die Integrität der RNA gefährden können. Im Anschluss erfolgte der mechanische Zellaufschluss, bzw. die Homogenisierung des Gewebes. Dazu wurden die nun partiell lysierten Organfragmente in der Kugelmühle bei 10000 rpm und 30 Hz für 4 Minuten gemahlen. Nach Abzentrifugierung der losen Zellbestandteile wurde der Überstand mit 70%igem Ethanol gemischt. Dies optimiert die Bindungsverhältnisse für die anschließende Separation der RNA. Danach wurde die RNA mittels Silicalgelmembran gebunden und in drei Durchgängen mit ethanolhaltigen Waschlösungen gereinigt. Abschließend wurde die RNA mit 30  $\mu$ L Nuklease-freiem Wasser eluiert und bei 60 °C für 5 Minuten denaturiert.

Für die Isolation der RNA aus dem Hirn der Mäuse wurde zusätzlich der QIAzol Lysis

Reagent (Qiagen GmbH, Hilden) benutzt, um den Erstaufschluss aus dem besonders lipidreichen Hirngewebe zu erleichtern.

#### 4.2.4 Primerdesign

Das korrekte Primerdesign ist ein wichtiger Faktor für den Versuchsaufbau, um zuverlässige und aussagekräftige Daten zu erhalten. Dabei hat das Primerdesign sowohl Einfluss auf die Effizienz der PCR-Amplifikation, als auch auf die Spezifität der zu isolierenden Zielsequenz. Inkorrekt konstruierte Primer können zu einer Vielzahl von Fehlern führen (Primerdimere, unspezifische PCR-Produkte, „stem loop interference“, Schmelztemperaturunterschiede), in deren Folge es zu einer Fehlinterpretation der Ergebnisse kommen kann. Diese Fehler können durch richtiges Primerdesign a priori vermieden werden (Li und Brownley 2010).

Alle Primer wurden mit Hilfe eines Primerdesign-Programmes ([primer3.sourceforge.net](http://primer3.sourceforge.net)) erstellt. Zunächst wurde die entsprechende Transkriptsequenz einer Gendatenbank entnommen ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)). Diese wurde in die Designsoftware eingespeist, welche mit Hilfe der folgenden Kriterien die jeweiligen Sequenzen für den *forward*- und *reverse*-Primer erstellt:

- Obligate Kriterien:
  - max. Mispriming: 6 bp
  - max. Eigen-Komplementarität: 4 bp
  - keine SNPs in der Bindungssequenz des Primers
  - Transkriptgröße 80 - 200 bp
  - Annealing-Temperatur  $\geq 60$  °C
  - Differenz der Annealing-Temperatur  $< 2$  °C
  
- Optimale Kriterien:
  - Primerlänge:  $22 \pm 2$  bp
  - Primerpaare möglichst gleich groß
  - Exonspanning
  - Intronspanning

Die so erstellten Sequenzen der *forward*- und *reverse*-Primer wurden mit einer weiteren Software auf Co-Amplifikate überprüft ([blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)). Nach erfolgreicher Testung wurden die Primer bei *biomers.com* bestellt.

## 4.2.5 Reverse Transkription

Die Umschreibung der RNA in cDNA erfolgte mit Enzymen und Reagenzien des RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, St. Leon-Rot). Um die gesamte RNA in cDNA umzuschreiben, wurde mit einer Kombination aus Oligo(*dT*)<sub>18</sub>-Primer und Random Hexamer Primer gearbeitet. Die Oligo(*dT*)<sub>18</sub>-Primer lagern sich selektiv an den poly(A)-Schwanz des 3' Ende der mRNA an, während sich die Random Hexamer Primer nicht-spezifisch an die Template-RNA binden. Zur Verhinderung der RNA-Degradation durch proteolytischen Abbau wurde RiboLock™ RNase Inhibitor eingesetzt. Als transkribierendes Enzym wurde die in *Escherichia coli* exprimierte M-MuLV Reverse Transkriptase verwendet, welche eine signifikant geringere RNase H Aktivität als die AMV Reverse Transkriptase aufweist.

Folgender Ansatz wurde für die Reverse Transkription verwendet:

1 µg RNA	in 9,8 µL DEPC
Oligo( <i>dT</i> ) <sub>18</sub> -Primer (0,5 µg/µL)	1,2 µL
Random Hexamer Primer (0,2 µg/µL)	1 µL
<hr/>	
	12 µL

Anschließend wurden die Proben für 5 Minuten bei 65 °C denaturiert und bei 4 °C für mindestens 2 Minuten inkubiert. Den abgekühlten Proben wurde der Main-Inkubationsmix zugegeben. Dieser setzte sich wie folgt zusammen:

5X Reaction Buffer	4 µL
dNTP Mix (10 mmol)	2 µL
RiboLock™ RNase Inhibitor (20 u/µL)	1 µL
RevertAid RT (200 u/µL)	1 µL
<hr/>	
	8 µL

Die Reverse Transkription mit einem Reaktionsvolumen von 20 µL erfolgte im Thermocycler (PTC-200 Peltier Thermal Cycler, MJ Research) nach folgendem Ablauf:



Primeranlagerung und Synthese	25 °C	5 min
	42 °C	60 min
Denaturierung	70 °C	5 min
Kühlung		

Die synthetisierte cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

## 4.2.6 Real-Time-PCR

### Funktionsweise der Real-Time-PCR

Die Real-Time-PCR besteht aus zwei einzelnen Reaktionsschritten: der Amplifikation und der Quantifizierung. Die Amplifikation der Nukleinsäure basiert auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion. Diese besteht aus drei Schritten, die in mehreren Zyklen wiederholt werden: Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation.

Die Quantifizierung erfolgt mit Hilfe der Fluoreszenzmessung. Das Fluoreszenzsignal entsteht durch Anregung des Cyanin-Farbstoffs Sybr-Green. Dieser interkaliert selektiv mit doppelsträngiger DNA. Somit nimmt das Fluoreszenzsignal proportional zur DNA-Menge zu. Die Messung des Fluoreszenzsignals erfolgt nach jedem Zyklus.

### Gerätespezifikationen

Für die Real-Time-PCR wurde der RotorGene™-6000 von Corbett Life Science verwendet. Dieser besitzt im Vergleich zu handelsüblichen Geräten einen rotierenden Probenständer, welcher sich konstant mit 400 rpm dreht. Jedes Probengefäß wird dabei durch dieselbe Lichtquelle angeregt ( $470 \pm 10$  nm) und detektiert ( $510 \pm 5$  nm), wodurch die optische Varianz minimiert wird. Die permanente Rotation verhindert ebenfalls Temperaturunterschiede zwischen den einzelnen Proben. Mit einer maximalen Aufheizgeschwindigkeit von 15 °C/s und einer maximalen Abkühlgeschwindigkeit von 20 °C/s konnten schnelle Übergänge zwischen Denaturierung, Hybridisierung und Elongation erreicht werden.

### Pipetierschema

Es wurde mit einem Reaktionsvolumen von 20 µL gearbeitet:

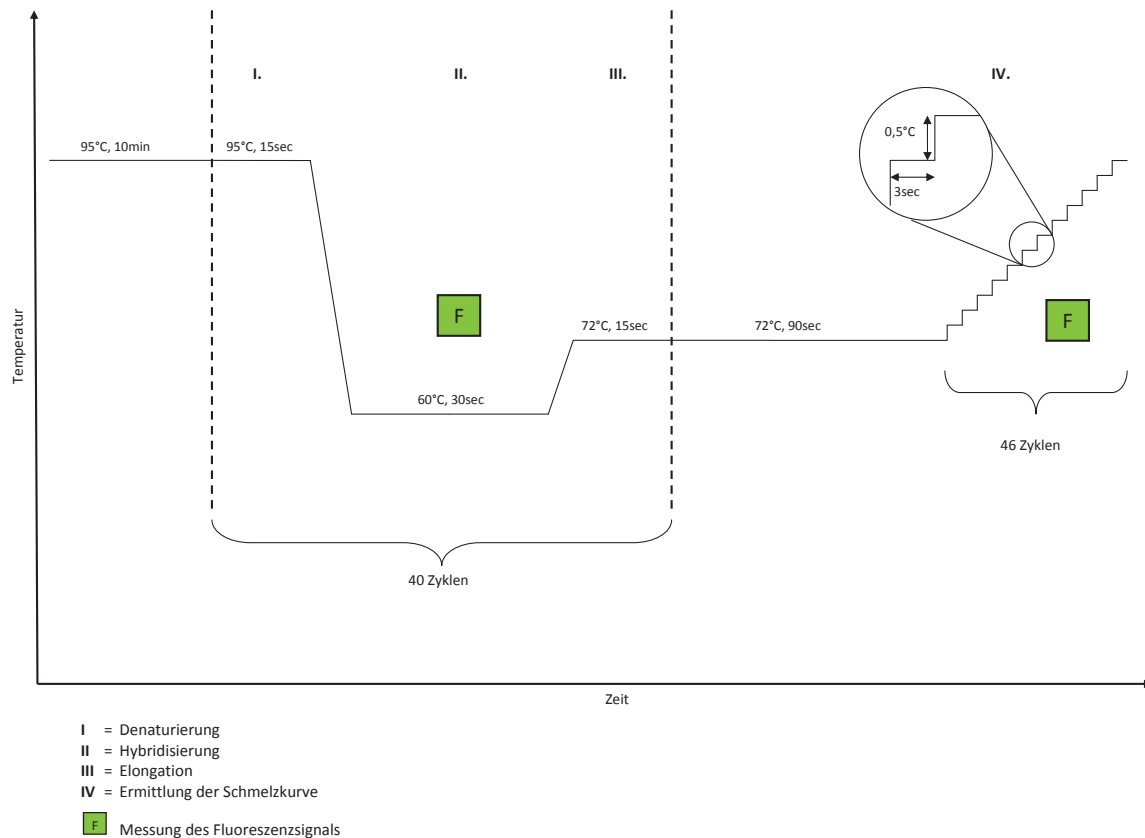
Sybr Green Supermix	10 $\mu\text{L}$
Primermix	5 $\mu\text{L}$
Probe (12,5 ng/ $\mu\text{L}$ )	5 $\mu\text{L}$
	20 $\mu\text{L}$

## Programmablauf

Der Programmablauf orientiert sich an den Angaben des Herstellers und den Richtlinien von Pfaffl (Pfaffl 2001). Der Programmablauf besteht aus zwei großen Teilen und dauert insgesamt 112 Minuten (Abbildung 4.2). Im ersten Teil wird die cDNA vervielfältigt. Der erste Teil besteht aus 40 Zyklen, bei dem jeder Zyklus aus den drei Phasen *Denaturierung der cDNA*, *Anlagerung der Primer* und *Verlängerung der Komplementstränge* zusammengesetzt ist. Nach jeder Elongation wird das Fluoreszenzsignal aufgezeichnet. Im zweiten Teil des Programmablaufs wird die Schmelzkurve generiert. Dies geschieht durch stufenweise Erwärmung der cDNA von 59 °C auf 72 °C unter kontinuierlicher Fluoreszenzmessung (Abbildung 4.2, IV.). Der temperaturabhängige Zerfall der doppelsträngigen DNA geht mit einer proportionalen Minderung des Fluoreszenzsignals einher. Die Temperatur, bei der die größte Änderung der Fluoreszenzintensität registriert wird, nennt man *Schmelztemperatur* ( $T_m$ ). Die Schmelzkurvenanalyse gibt Aufschluss über die Selektivität der Polymerase-Ketten-Reaktion und kann ein eventuell entstandenes unspezifisches Reaktionsprodukt anzeigen.

## Erstellung der Standardkurve

Um die Anzahl der absoluten Transkripte zu berechnen, wurde bei jedem Real-Time-PCR-Lauf eine Standardkurve eingesetzt, basierend auf einer Verdünnungsreihe spezifischer PCR-Produkte bekannter Konzentration. Zur Erstellung der Standardkurve wurde zunächst gepoolte Maus RNA mittels Reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Diese wurde verwendet um von jedem Gen bzw. Primerpaar einen 5-fachen PCR-Ansatz (5 · 20  $\mu\text{L}$ ) anzufertigen. Nach abgelaufener Real-Time-PCR wurde das fertige PCR-Produkt aufgereinigt, um alle unspezifischen Produkte herauszufiltern (Abschnitt 4.2.8). Das aufgereinigte PCR-Produkt diente dann als Matrize zur Erstellung der Standardkurve. Dazu wurde eine 10-fache Verdünnungsreihe mit insgesamt sechs verschiedenen Konzentrationen eingesetzt, beginnend mit 10 ng/ $\mu\text{L}$ . Um eine möglichst akkurate Gerade zu erhalten, wurde jede Konzentration 3-fach eingesetzt.



**Abbildung 4.2: Schematischer Programmablauf der Real-Time-PCR**  
 Dargestellt sind die verschiedenen Phasen der Real-Time-PCR, in Abhängigkeit von Temperatur und Zeit.

## 4.2.7 Spektrofotometrie

Die Messung der Konzentration von RNA und cDNA erfolgte spektrofotometrisch (NanoDrop ND-1000 Spektrofotometer, Thermo Scientific). Grundlage der Messung stellt das Lambert-Beersche Gesetz ( $A = E \cdot b \cdot c$ ) dar, welches den Zusammenhang zwischen der Absorption von Licht und der Konzentration eines absorbierenden Inhaltsstoffs in Flüssigkeiten erklärt. Die Aufzeichnung des Absorptionsspektrums erfolgte im Wellenlängenbereich von 220 - 350 nm. Als Extinktionskoeffizienten wurden die generell akzeptierten Werte von 50 L/mol · cm für DNA und 40 L/mol · cm für RNA benutzt. Aufgrund der gerätespezifischen Spaltbreite ( $b$ ) von 1 mm bzw. 0,2 mm konnte ein minimales Probenvolumen von 1  $\mu$ L eingesetzt werden. Die Konzentration der Nukleinsäuren wird auf Basis der Absorption bei 260 nm berechnet. Zusätzlich wurden die Verhältnisse  $\frac{OD_{260}}{OD_{230}}$  und  $\frac{OD_{260}}{OD_{280}}$  bestimmt. Der erste Wert gibt Aufschluss über eine eventuelle Verunreinigung der Proben mit niedermolekularen Verbindungen. Dieser Wert sollte zwischen 2,0 und 2,5

liegen. Das Verhältnis der  $OD_{260}$  zur  $OD_{280}$  wird bestimmt durch Proteinverunreinigungen, da vor allem die aromatischen Aminosäuren der Proteine einen Absorptions-Peak im Bereich von 280 nm verursachen. Dieser Quotient sollte mindestens 1,7 betragen, damit die Probe als „rein“ gelten kann.

#### 4.2.8 Aufreinigung des PCR-Produkts

Zur Erstellung der Standardkurve (Abschnitt 4.2.6) wurde reines PCR-Produkt benötigt. Die Aufreinigung der DNA aus dem PCR-Ansatz erfolgte mit dem MinElute<sup>®</sup> PCR Purification Kit von Qiagen entsprechend dem Herstellerprotokoll. Die grundlegende Funktionsweise des Kits ist die Adsorption der DNA-Fragmente (70 bp - 4 kbp) in Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen an die Silicagel-Membran. Überschüssige Primer, Taq-Polymerase und andere Verunreinigungen binden nicht an die Membran und werden weggespült. Nach der Elution mit DEPC-Wasser erhält man stark aufgereinigtes und konzentriertes PCR-Produkt.

Es wurde mit einem Ansatz von 600  $\mu$ L gearbeitet. Dieser bestand aus 100  $\mu$ L PCR-Ansatz und 500  $\mu$ L Binding Buffer. Nach einminütiger Zentrifugierung der Spinsäule bei  $17,900 \times g$  wurden 750  $\mu$ L ethanolhaltiger Waschbuffer appliziert. Nach zwei weiteren Zentrifugierungsschritten wurde die DNA mit 10  $\mu$ L DEPC-Wasser eluiert.

#### 4.2.9 RNA-Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurde ein automatisiertes Elektrophoresesystem von Bio-Rad benutzt. Dieses vereint die Schritte der Separation, Detektion und Datenanalyse in einem Gerät. Hauptbestandteil des Systems sind Chips, auf denen einzelne Probengefäße über Mikrokanäle mit Separationskanälen und Bufferwells verbunden sind. Die Mikrokanäle sind mit einer Gel-Färbe-Lösung gefüllt, welche zwei wichtige Aufgaben erfüllt. Zum einen dient sie als Siebmatrix, welche für eine Separation der RNA in Abhängigkeit von ihrer Größe und Ladung sorgt. Zum anderen interkalieren die in der Gellösung enthaltenen Farbstoffe mit der wandernden RNA in den Separationskanälen, was entscheidend für die spätere Detektion ist. Am Ende der Separationskanäle regt ein Laser selektiv die an der RNA gebundenen Farbstoffe an. Das Fluoreszenzlicht wird mit einer Fotodiode detektiert. Elektroden in der Elektrophorese-Station erzeugen eine Spannung in den Mikrokanälen. Die Software erstellt aus der Fluoreszenzintensität versus der Zeit ein Elektropherogramm und ein virtuelles Gelbild. Zur Kompensation von Variationen zwischen den Proben und Faktoren, welche die Migrationsgeschwindigkeit beeinflussen

(pH, Farbstoffkonzentration, Probenvolumen, etc.), dient ein Marker (50 bp) im Loadingbuffer, anhand dessen die Proben ausgerichtet werden.

Für die Bestimmung der RNA-Integrität wurde der Experion<sup>TM</sup>RNA StdSens Chip verwendet, welcher mit einer minimalen Konzentration von 5 ng/ $\mu$ L arbeitet. Alle Arbeitsschritte wurden entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurden zunächst die Mikrokanäle des RNA-Chips mit der Gel-Färbe-Lösung geprimt. Dies geschah mit einer speziellen Priming-Station, welche mittels Luftdruck die Mikrokanäle mit Gel füllt. Anschließend wurde die Proben-RNA wie auch die RNA-Leiter bei 70 °C für fünf Minuten im Thermocycler denaturiert. Nach Beladung des Chips mit den Proben (1  $\mu$ L) und Loading-Buffer (5  $\mu$ L), wurde der Chip in der dafür vorgesehenen Vortex-Station gemischt. Abschließend wurde der Chip in die Elektrophorese-Station eingesetzt.

#### 4.2.10 DNA-Gelelektrophorese

Die DNA-Gelelektrophorese erfolgte ebenfalls mit dem Experion<sup>TM</sup>Elektrophorese System. Hierfür wurde der Experion<sup>TM</sup>DNA 1K Chip für die elektrophoretische Auftrennung und Detektion von DNA genutzt. Die Arbeitsschritte der DNA-Gelelektrophorese entsprechen denen der RNA-Gelelektrophorese (Abschnitt 4.2.9) und wurden entsprechend den Angaben des Herstellerprotokolls durchgeführt. Analysiert wurde jeweils das PCR-Produkt einer Probe aus jedem Real-Time-PCR-Lauf.

#### 4.2.11 Wahl der Referenzgene

Um Fehler in der präanalytischen Phase, die vor der eigentlichen Real-Time-PCR entstehen können, zu minimieren, sind die Expressionsdaten auf Referenzgene bezogen worden. Mögliche Fehlerquellen stellen dabei die spektrofotometrische Konzentrationsbestimmung der RNA und die unterschiedliche Effizienz beim Umschreiben der RNA in DNA mittels Reverser Transkription dar. Referenzgene (=Housekeeper-Gene) sind idealerweise dadurch charakterisiert, dass sie zu jeder Zeit und jedem Gewebe im gleichen Ausmaß exprimiert werden. Da dieses Kriterium von keinem einzelnen Referenzgen erfüllt wird, wurde für die Organe Herz und Leber das geometrische Mittel der Genexpressionswerte von drei Referenzgenen als Normalisierungsbasis gewählt. Dazu wurden aus einer Gruppe von sechs getesteten Referenzgenen (*G6PD*, *GAPDH*, *Actb*, *Gusb*, *Hmbs*, *HPRT-1*) für jedes Organ individuell, die drei Referenzgene mit der stabilsten Expression identifiziert. Für das Hirn konnte in Vorversuchen schon gezeigt werden, dass die

Kombination der Referenzgene *Gusb* und *Hmbs* eine geeignete Normalisierungsbasis darstellt (Gebhardt 2010). Die Auswahl der Referenzgene erfolgte mittels der zwei Microsoft Excel-Applets *geNorm* und *Normfinder*, welche auf zwei unterschiedlichen Rechenmodellen basieren. Bei *geNorm* erfolgt die Berechnung der Expressionsstabilität ( $M$ ) eines Referenzgens als Durchschnitt (Formel 4.3) der paarweisen Varianz ( $V$ ) (Formel 4.1 und 4.2) zweier Referenzgene. Durch schrittweisen Ausschluss der Gene mit den höchsten  $M$ -Werten erhält man die gewünschte Anzahl der stabilsten Referenzgene (Vandesompele et al. 2002).

$$A_{jk} = \left\{ \log_2 \left( \frac{a_{1j}}{a_{1k}} \right), \log_2 \left( \frac{a_{2j}}{a_{2k}} \right), \dots, \log_2 \left( \frac{a_{mj}}{a_{mk}} \right) \right\} = \left\{ \log_2 \left( \frac{a_{ij}}{a_{ik}} \right) \right\}_{i=1 \rightarrow m} \quad (4.1)$$

$$V_{jk} = \text{std.dev}(A_{jk}) \quad (4.2)$$

$$M_j = \frac{\sum_{k=1}^n V_{jk}}{n-1} \quad (4.3)$$

Der *Normfinder*-Algorithmus berechnet die Variation der Kandidatengene in einer direkten Gegenüberstellung. Er berücksichtigt dabei, sowohl die Variation der Genexpression zwischen einzelnen Referenzgenkandidaten, als auch die Variation zwischen den Versuchsgruppen. Als Ergebnis ordnet *Normfinder* jedem Referenzgenkandidaten einen Stabilitätswert zu, der sich aus der Kombination beider Abweichungsmaße zusammensetzt. Anhand dieses Wertes kann eine Rangliste der stabilsten Referenzgene erstellt werden (Andersen et al. 2004).

#### 4.2.12 Auswertung der Real-Time-PCR

Die Ratios der Expressionshöhen (Genexpressionsratio) für die Auswertung der Rohdaten wurden in Anlehnung an die Formel von Pfaffl (2001) berechnet:

$$\text{Ratio} = \frac{\left( \frac{E_{\text{Zielgen}}}{100} + 1 \right)^{\Delta C_t(\text{Zielgen})(\text{Kontrolle-Probe})}}{\left( \frac{E_{\text{Referenzgen}}}{100} + 1 \right)^{\Delta C_t(\text{Referenzgen})(\text{Kontrolle-Probe})}}$$

Zur Berechnung diente die effizienzkorrigierte, absolute Anzahl an Transkripten. Die Effizienz des jeweiligen PCR-Laufs konnte mit der jeweiligen Standardkurve ermittelt

werden. Zunächst erfolgte die Berechnung zweier Quotienten: der *Housekeeper-Ratio* (HK-Ratio) und der *Gene of Interest-Ratio* (GOI-Ratio).

Die GOI-Ratio berechnet sich aus dem Verhältnis der Transkriptanzahl ( $T$ ) einer Probe ( $i$ ) der Versuchsgruppe ( $j = S, CK$  oder  $CS$ ) zum Mittelwert der Transkriptzahlen der Kontrollgruppe ( $T_{GOI_K}$ ) für das jeweilige Gen ( $GOI = Il-6, Il-10, Myd88, Hif1a$  und  $PAI-1$ ) (Formel 4.4).

Die HK-Ratio wird analog zur GOI-Ratio für die ausgewählten Referenzgene ( $HK = HPRT-1, Gusb, GAPDH, Hmbs$ ) ermittelt (Formel 4.5).

Die Genexpressionsratio ergibt sich aus dem Verhältnis der GOI-Ratios zum geometrischen Mittel der, für das jeweilige Gen bestimmten, HK-Ratios (Formel 4.6). Zur Normalisierung der Daten, wurden die Genexpressionsratios  $\log_2$ -transformiert.

$$\text{GOI-Ratio} = \frac{T_{GOI_{ij}}}{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n T_{GOI_K}} \quad (4.4)$$

$$\text{HK-Ratio} = \frac{T_{HK_{ij}}}{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n T_{HK_K}} \quad (4.5)$$

$$\text{Genexpressionsratio} = \frac{\text{GOI-Quotient}}{\sqrt[n]{\prod_{i=1}^n \text{HK-Quotient}}} \quad (4.6)$$

### 4.2.13 Statistik

Alle ermittelten Werte sind als prozentuale Häufigkeit oder als Median und Range bzw. als Interquartilsabstand (IQR) angegeben. Aufgrund des relativ geringen Stichprobenumfangs wurden nichtparametrische Tests zum Vergleich der Versuchsgruppen eingesetzt. Diese setzen keine Normalverteilung und Varianzhomogenität voraus. Der Kruskal-Wallis-Test wurde zum Mittelwertvergleich zwischen den Gruppen durchgeführt. Im Falle der Ablehnung der globalen Nullhypothese ( $H_0$ : Die Versuchsgruppen sind gleich), erfolgten die paarweisen Einzelvergleiche zwischen den jeweiligen Versuchsgruppen als zweiseitiger Mann-Whitney-U-Test. Waren für die Fragestellung nur bestimmte Tests interessant, wurde auf die globale Signifikanztestung verzichtet und die direkten Einzelvergleiche mittels Mann-Whitney-U-Test angestrebt. Zur Vermeidung der  $\alpha$ -Fehlerkumulierung erfolgte in beiden Fällen die Signifikanztestung mit angepasstem Signifikanz-

niveau nach der Bonferroni-Holm-Korrektur.

Das globale Signifikanzniveau wurde mit 95 % ( $p < 0,05$ ) definiert. Die Berechnung, Auswertung und Testung erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS 18 und der Tabellenkalkulation Microsoft Excel 2007. Die Auswahl der geeigneten statistischen Methoden erfolgte in Zusammenarbeit mit den Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Statistik, Informatik und Dokumentation des Universitätsklinikums Jena.



# 5 Ergebnisse

## 5.1 Hämatologie

Im Folgenden sind die Ergebnisse der hämatologischen Untersuchung 6 Stunden nach LPS-Injektion und Beobachtungsbeginn dargestellt. Diese umfassen die Thrombozytenzahl, die Erythrozytenzahl, die Hämoglobinkonzentration, den Hämatokrit sowie das durchschnittliche Erythrozytenvolumen (MCV) (Tabelle 5.1). Die Thrombozytenzahl ist in der unbehandelten LPS-Gruppe (S) signifikant geringer als in der unbehandelten Kontrollgruppe (K). Der Thrombozytenverbrauch kann Ausdruck einer unkontrollierten Thrombozytenaktivierung im Sinne einer disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) sein. Die mit Clopidogrel behandelten Tiere der LPS-Gruppe (CS) weisen eine signifikant höhere Zahl an Thrombozyten als die Tiere der unbehandelten LPS-Gruppe (S) auf. Auch bezüglich der Erythrozytenzahl und des Hämatokrits erzielt die CS-Gruppe signifikant höhere Werte als die S-Gruppe. Im Hinblick auf die Hämoglobinkonzentration und das Mean Corpuscular Volume unterscheiden sich die vier Versuchsgruppen nicht.

## 5.2 Qualitätskontrolle

Die Qualitätskontrolle umfasst die Beurteilung der RNA hinsichtlich Konzentration und Reinheit, sowie die Überprüfung der Spezifität der Polymerase-Ketten-Reaktion. Zur Charakterisierung der RNA erfolgte die fotometrische Konzentrationsbestimmung und die Berechnung der OD-Quotienten. Die Integrität der RNA wurde mittels automatisierter RNA-Gelelektrophorese kontrolliert. Im Anschluss an die Real-Time-PCR erfolgte die elektrophoretische Vermessung des PCR-Produkts.

**Tabelle 5.1: Ergebnisse der hämatologischen Untersuchung 6 Stunden nach LPS-Injektion und Beobachtungsbeginn**

	Versuchsgruppen			
	Kontrolle (K)	LPS (S)	Kontrolle + Clopidogrel (CK)	LPS + Clopidogrel (CS)
n	5	5	6	6
Thrombozyten ( $10^3 \mu\text{L}$ )	558 (404 - 805)	413 (299 - 475)*	806 (407 - 947)	656,5 (495 - 826)†
Erythrozyten ( $10^3 \mu\text{L}$ )	8,27 (5,28 - 9,44)	8,00 (7,37 - 9,01)	8,73 (8,08 - 9,85)	9,80 (8,20 - 10,89)†
Hb (g/dL)	14,3 (10,8 - 16,8)	14,7 (12,9 - 17,1)	13,7 (12,2 - 14,4)	15,1 (13,6 - 16,6)
Hk (%)	35,1 (22,2 - 40,4)	33,7 (31,2 - 37,6)	37,1 (34,0 - 40,5)	41,5 (35,4 - 45,3)†
MCV (fL)	42,4 (42,0 - 42,8)	42,1 (41,7 - 42,8)	41,9 (41,1 - 43,9)	42,3 (41,6 - 43,3)

Dargestellt sind die hämatologischen Parameter der vier verschiedenen Versuchsgruppen.

\* Signifikanz zwischen Kontrollgruppe (K) und unbehandelter LPS-Gruppe (S) ( $p < 0,05$ ).

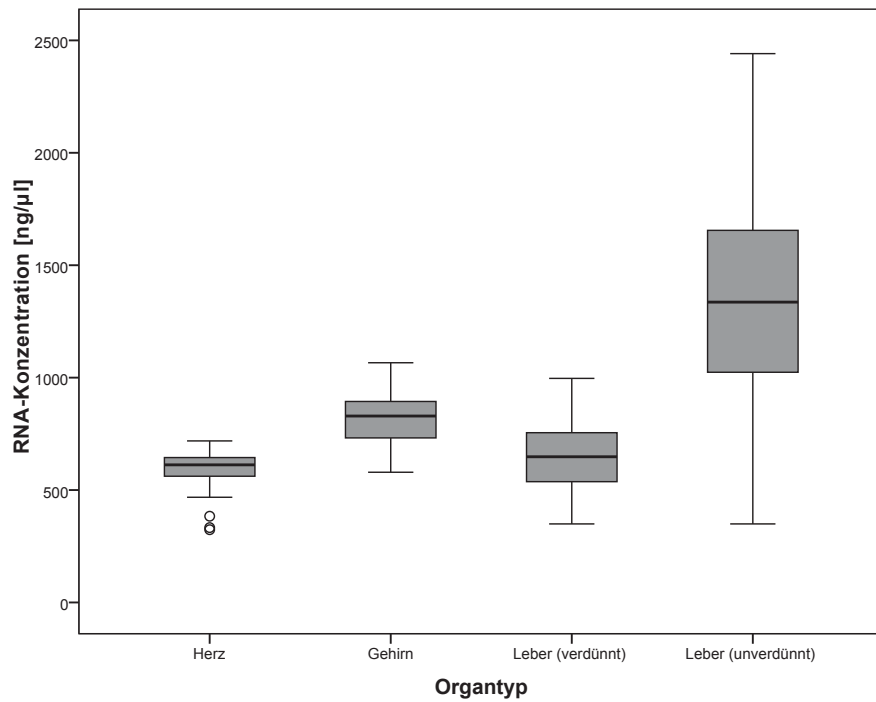
† Signifikanz zwischen unbehandelter LPS-Gruppe (S) und behandelter LPS-Gruppe (CS) ( $p < 0,05$ ). Abkürzungen: n = Probenanzahl, Hb = Hämoglobinkonzentration, Hk = Hämatokrit, MCV = Mean Corpuscular Volume (Durchschnittliches Erythrozytenvolumen)

### 5.2.1 RNA-Isolation

Bei allen RNA-Isolaten der drei Organe Herz, Leber und Gehirn ergibt die fotometrische 3-fach Vermessung eine Konzentration von mindestens 100 ng/ $\mu\text{L}$  (Abbildung 5.1). Somit erfüllen alle Proben die Mindestanforderung bezüglich der Konzentration für die Überschreibung der RNA in cDNA. Bei der RNA-Isolation aus dem Herz wird bezüglich der Konzentration ein Median von 612,0 ng/ $\mu\text{L}$ , ein Minimum von 323,7 ng/ $\mu\text{L}$  und ein Maximum von 718,5 ng/ $\mu\text{L}$  erreicht.

Der Median der RNA-Konzentration des Gehirns liegt mit 829,4 ng/ $\mu\text{L}$  etwas über dem der Leber. Die geringste Konzentration eines Hirnisolats beträgt 579,2 ng/ $\mu\text{L}$ , die höchste Konzentration 1066,2 ng/ $\mu\text{L}$ .

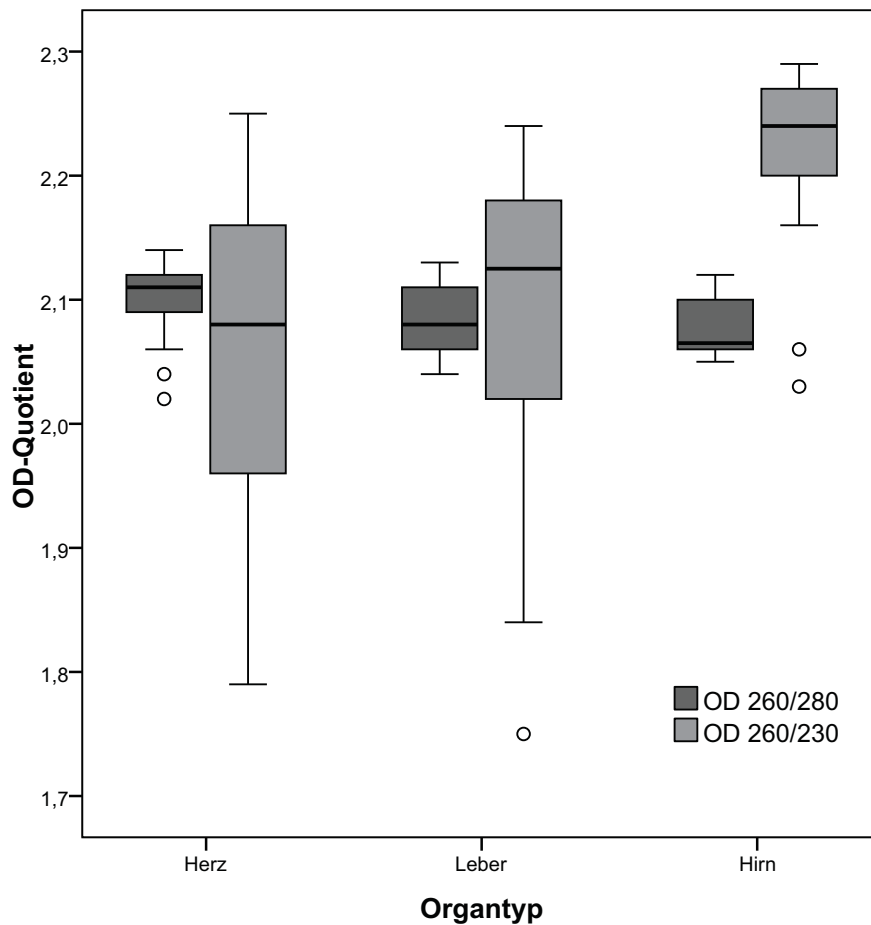
Der RNA-Gehalt der Leber ist deutlich größer verglichen mit Herz und Gehirn. Bei den Leberisolaten ergibt sich ein Median von 1335,9 ng/ $\mu\text{L}$ , ein Minimum von 349,3 ng/ $\mu\text{L}$  und ein Maximum von 2441,1 ng/ $\mu\text{L}$ . Um Fehler, die durch den unterschiedlichen RNA-Gehalt der Proben entstehen können, zu vermeiden, wurden alle Leberisolate mit einer RNA-Konzentration größer 1000 ng/ $\mu\text{L}$  im Verhältnis 1:2 mit DEPC-Wasser verdünnt. Nach Verdünnung der RNA-Proben gleichen sich die Werte bezüglich des Medians (648,0 ng/ $\mu\text{L}$ ), der minimalen (349,3 ng/ $\mu\text{L}$ ) und der maximalen RNA-Konzentration (996,7 ng/ $\mu\text{L}$ ) den Werten der anderen Organtypen an.



**Abbildung 5.1:** *RNA-Konzentrationen in ng/μL der drei Zielorgane: Herz, Leber und Hirn.*

*Aufgrund der sehr hohen Konzentrationen der Leber-RNA-Isolate wurden alle Proben mit einer Konzentration über 1000 ng/μL verdünnt. Dies verhindert Fehler durch ungleichen RNA-Gehalt der Proben und gewährleistet die Vergleichbarkeit der Organe.*

Bezüglich des  $\frac{OD_{260}}{OD_{280}}$ -Quotienten unterscheiden sich Herz, Leber und Lunge nur unwesentlich (Median Herz: 2,10; Leber: 2,08; Hirn: 2,07). Beim  $\frac{OD_{260}}{OD_{230}}$ -Quotienten sind die Ergebnisse heterogener. Während bei Herz und Leber der Median (Herz: 2,08; Leber: 2,12) und die Spannweite (Herz: 0,46; Leber: 0,54) vergleichbar sind, ist der Median beim Gehirn mit 2,24 deutlich größer und die Spannweite mit 0,26 deutlich kleiner als in den beiden anderen Organen. Im Hinblick auf die Reinheit, charakterisiert durch die beiden Quotienten  $\frac{OD_{260}}{OD_{230}}$  und  $\frac{OD_{260}}{OD_{280}}$ , entsprechen alle RNA-Isolate der drei Organe den Mindestanforderungen der cDNA-Synthese. Diese fordern Werte von mindestens 1,7 für den  $\frac{OD_{260}}{OD_{230}}$ -Quotienten und 2,0 für den  $\frac{OD_{260}}{OD_{280}}$ -Quotienten (Abbildung 5.2).

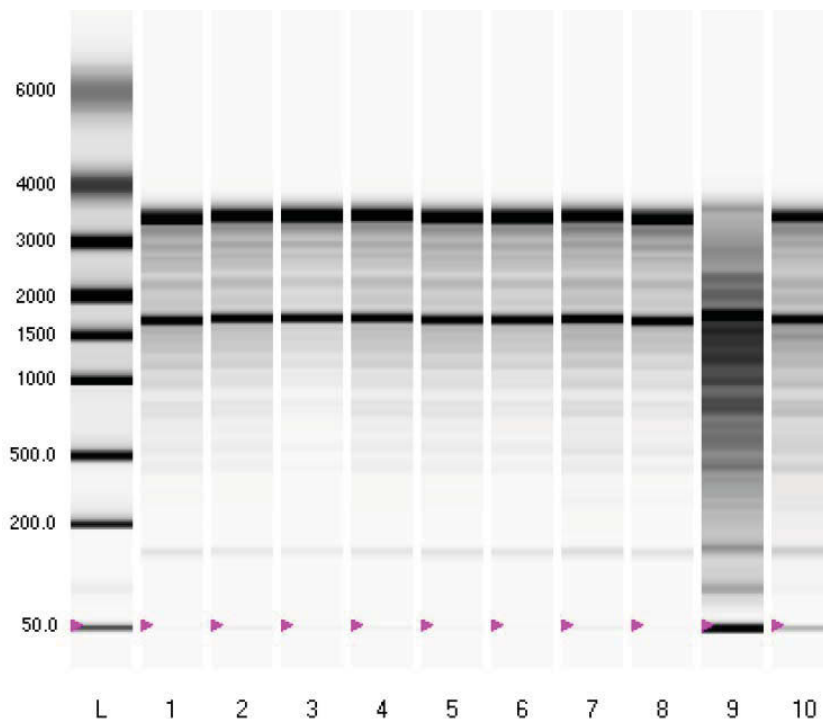


**Abbildung 5.2: OD 260/280 und OD 260/230 der drei Organtypen im Vergleich**

Dargestellt ist der Quotient der Optischen Dichte gemessen bei 260 nm und 280 nm, bzw. bei 260 nm und 230 nm. Beide Quotienten erlauben eine Aussage über die Reinheit und mögliche Verunreinigungen der RNA-Isolate.

## 5.2.2 RNA-Gelelektrophorese

Die RNA-Gelelektrophorese dient der Kontrolle der RNA-Integrität. Bei unbeschädigter RNA ergibt sich ein typisches Bandenmuster mit zwei prominenten Banden, der 28S- und der 18S-Bande. Im Regelfall weist die 28S-Bande aufgrund der Basenverteilung eine größere Intensität als die 18S-Bande auf. Kommt es während der RNA-Isolation oder Lagerung zur Degradierung der RNA, kann in der Gelelektrophorese eine sogenannte Schlierenbildung beobachtet werden. Die Gelelektrophorese zeigt bei fast allen RNA-Proben eine klare 28S- und 18S-Bande und somit keine Anzeichen für eine Degradierung der RNA. Nur das RNA-Isolat der Probe 3 aus der unbehandelten Kontrollgruppe (K3) der Leber wurde aufgrund fehlender 28S-Bande und Schlierenbildung unterhalb der 18S-Bande wiederholt isoliert (Abbildung 5.3).

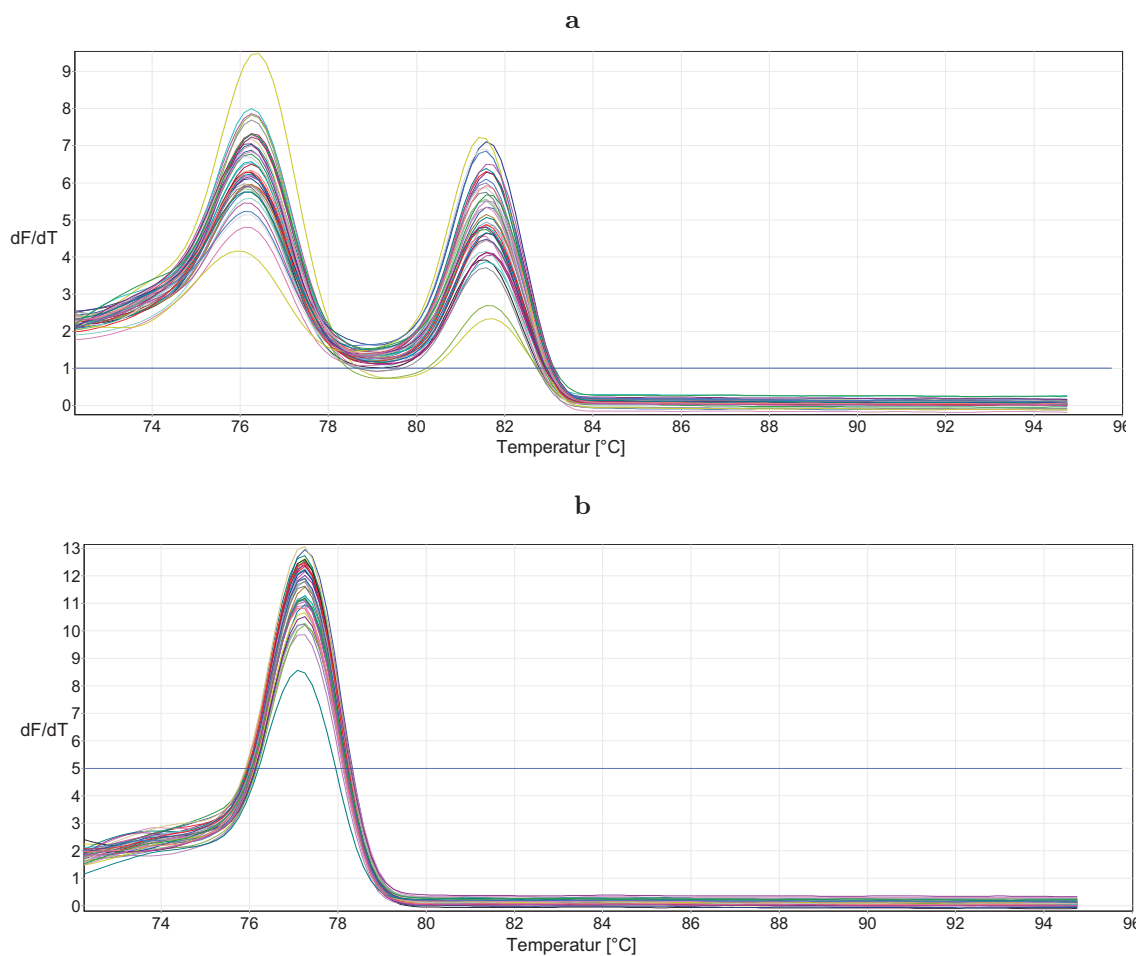


**Abbildung 5.3:** *Beispiel einer RNA-Gelelektrophorese der Leberisolate*

Die Proben 1–8 und die Probe 10 zeigen zwei klar abgrenzbare Banden, eine obere 28S-Bande und eine untere 18S-Bande. Die Probe 9 zeigt keine eindeutige 28S-Bande, jedoch eine deutliche Schlierenbildung unterhalb der 18S-Bande als Zeichen der RNA-Degradierung. Abkürzungen: L = Leiter (RNA-Leiter zur Größenbestimmung der Banden) 1=K6 2=K7 3=K8 4=K1 5=K2 6=K9 7=S1 8=S2 9=K3 10=CK11, ► = 50 bp Marker zur Ausrichtung der einzelnen Elektrophoreseläufe

### 5.2.3 Schmelzkurvenanalyse

Mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse kann die Anwesenheit von unspezifischem PCR-Produkt ausgeschlossen werden und somit die Spezifität der Polymerase-Ketten-Reaktion kontrolliert werden. Die Analyse der Schmelzkurven ergibt im Falle des Referenzgens *G6PD* einen Kurvenverlauf mit zwei Maxima (Abbildung 5.4 a). Dieses Kurvenbild spricht für das Vorliegen unspezifischen PCR-Produkts, welches beispielsweise durch Primerdimerisierung entstehen kann. Nach Ersetzen des *G6PD*-Primers zeigt sich ein eingipfeliger Kurvenverlauf entsprechend den Schmelzkurven der restlichen Gene (Abbildung 5.4 b). Kurven mit nur einem Maximum entsprechen einem regulären PCR-Durchlauf ohne Bildung von unspezifischem PCR-Produkt.

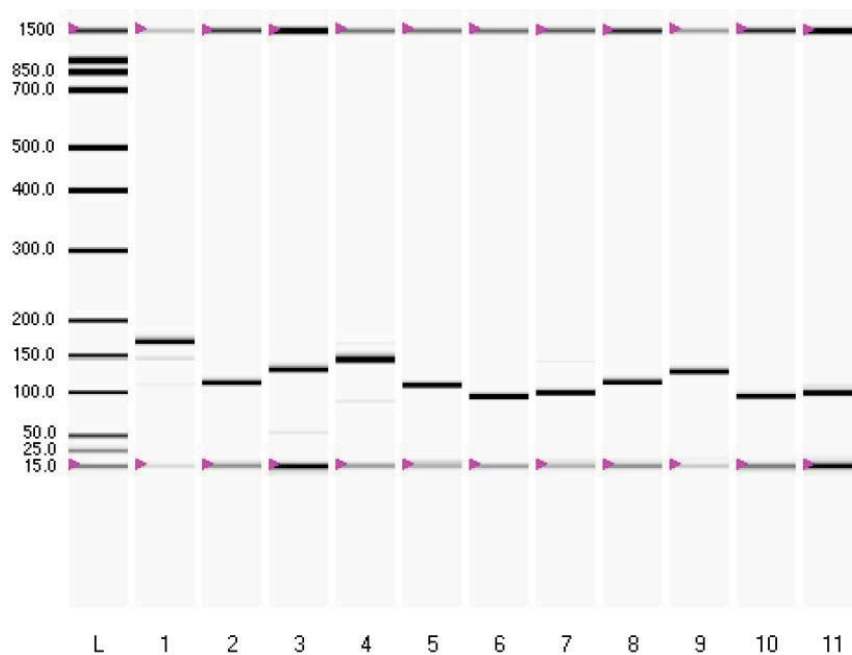


**Abbildung 5.4: Schmelzkurvenanalyse**

Aufgezeigt wird die Fluoreszenzintensitätsänderung pro Zeit in Abhängigkeit der Temperatur **a** Zweigipfeliger Verlauf - Zeichen für das Vorhandensein von unspezifischem PCR-Produkt, **b** Eingipfeliger Verlauf - spezifisches PCR-Produkt, keine Primer-Dimere

## 5.2.4 DNA-Gelelektrophorese

Neben der Schmelzkurvenanalyse stellt die DNA-Gelelektrophorese eine zweite Methode zur Überprüfung der PCR-Reaktion dar. Kontrolliert wird, ob die Größe des PCR-Produkts mit der, während der Primer-Synthese, kalkulierten Größe korreliert. Zum Zweiten wird das Bandenmuster analysiert. Eine einzelne, kräftige Bande spricht für das Vorliegen von spezifischem PCR-Produkt. Die DNA-Gelelektrophoresen der PCR-Produkte aller untersuchten Gene zeigen singuläre Banden, die mit der zu erwartenden Größe des PCR-Produkts korrelieren (Abbildung 5.5).



**Abbildung 5.5:** *Beispiel einer DNA-Gelelektrophorese (Organ: Herz).*

Mittels DNA-Gelelektrophorese erfolgt die Größenbestimmung des PCR-Produkts im Anschluss an die Real-Time-PCR. Entspricht das PCR-Produkt nicht der erwarteten Größe oder werden mehrere Banden für eine Probe dargestellt, sind das Hinweise für Fehler im Versuchsablauf. Abkürzungen: L = Ladder (DNA-Leiter zur Größenbestimmung der Banden) 1=GAPDH 2=GusB 3=Il-10 4=Il-6 5=Myd88 6=Actb 7=Hmbs 8=G6PD 9=PAI-1 10=HPRT-1 11=Hif1a, ► = Oberer (1500 bp) und unterer (15 bp) Marker zur Ausrichtung der einzelnen Elektrophoreseläufe

## 5.3 Wahl der Referenzgene

Die Wahl der Referenzgene erfolgt nach Berechnung der jeweiligen Expressionsstabilität ( $M$ ) mittels *geNorm* und dem Stabilitätswert mittels *Normfinder* für jeden Referenzgenkandidaten. Aufgrund des unterschiedlichen Berechnungsalgorithmus ist die Reihenfolge der am stabilsten exprimierten Gene unterschiedlich für beide Programme (vgl. Abschnitt 4.2.11). Dennoch sind die Ergebnisse beider Programme tendenziell ähnlich (Tabelle 5.2). Für das Herz ermitteln beide Programme *Hmbs*, *GAPDH* und *HPRT-1* als die am stabilsten exprimierten Gene. Für die Leber finden sich dieselben vier Kandidatengene auf den Plätzen eins bis vier, wenn auch in unterschiedlicher Reihenfolge. Als Normalisierungsbasis für die Leber werden die bestplatzierten drei Gene des *geNorm*-Algorithmus gewählt: *Gusb*, *GAPDH* und *Hmbs*. Für das Hirn werden die Gene *Gusb* und *Hmbs* als Referenzgene genutzt. In Vorversuchen konnte bereits gezeigt werden, dass diese Kombination eine geeignete Normierungsbasis darstellt (Gebhardt 2010).

**Tabelle 5.2: Ergebnisse der Referenzgenwahl**

		Herz		Leber			
Stabilitätswert		Expressionsstabilität (M)		Stabilitätswert	Expressionsstabilität (M)		
0,112	<i>Hmbs</i>	0,285	<i>GAPDH</i> , <i>HPRT-1</i>	0,119	<i>GAPDH</i>	0,344	<i>Gusb</i> , <i>GAPDH</i>
0,136	<i>HPRT-1</i>	0,362	<i>Hmbs</i>	0,220	<i>HPRT-1</i>	0,365	<i>Hmbs</i>
0,196	<i>GAPDH</i>	0,431	<i>Actb</i>	0,263	<i>Hmbs</i>	0,457	<i>HPRT-1</i>
0,200	<i>G6PD</i>	0,497	<i>G6PD</i>	0,290	<i>Gusb</i>	0,563	<i>Actb</i>
0,283	<i>Actb</i>	0,559	<i>Gusb</i>	0,307	<i>G6PD</i>	0,663	<i>G6PD</i>
0,358	<i>Gusb</i>			0,384	<i>Actb</i>		

*Dargestellt sind die Referenzgenkandidaten für Herz und Leber, geordnet nach der individuellen Expressionsstabilität. Die Berechnung der beiden Werte erfolgte mittels der Programme geNorm und Normfinder. Je kleiner die Werte, desto stabiler werden die Gene exprimiert.*

## 5.4 Ergebnisse der PCR

Zur Untersuchung der Wirkung von Clopidogrel auf die Genexpression im Endotoxinmodell der Maus wurden vier Versuchsgruppen gebildet. Zur Simulation eines entzündlichen Schockgeschehens erfolgte eine intraperitoneale Lipopolysaccharid-Injektion. Tiere der Behandlungsgruppen erhielten Clopidogrel als Trinkwasserzusatz. Nach Entnahme der drei Zielorgane Herz, Leber und Hirn, sowie erfolgreicher RNA-Isolation, erfolgte die Umschreibung der RNA in cDNA. Anschließend wurde die Genexpression der Gene



Il-6, Il-10, Hif1a, Myd88 und PAI-1 mittels Real-Time-PCR analysiert. Die Genexpression der Versuchsgruppen wurde mit der unbehandelten Kontrollgruppe verglichen. Als Normierungsbasis diente das geometrische Mittel der am stabilsten exprimierten Referenzgene, die zuvor aus einem Panel von 6 Genen extrahiert wurden. Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse sind als Boxblots mit Median und Interquartilabstand (IQR) dargestellt. Die Signifikanzprüfung erfolgte mittels Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-U Test ( $p < 0,05$ ).

### 5.4.1 Herz

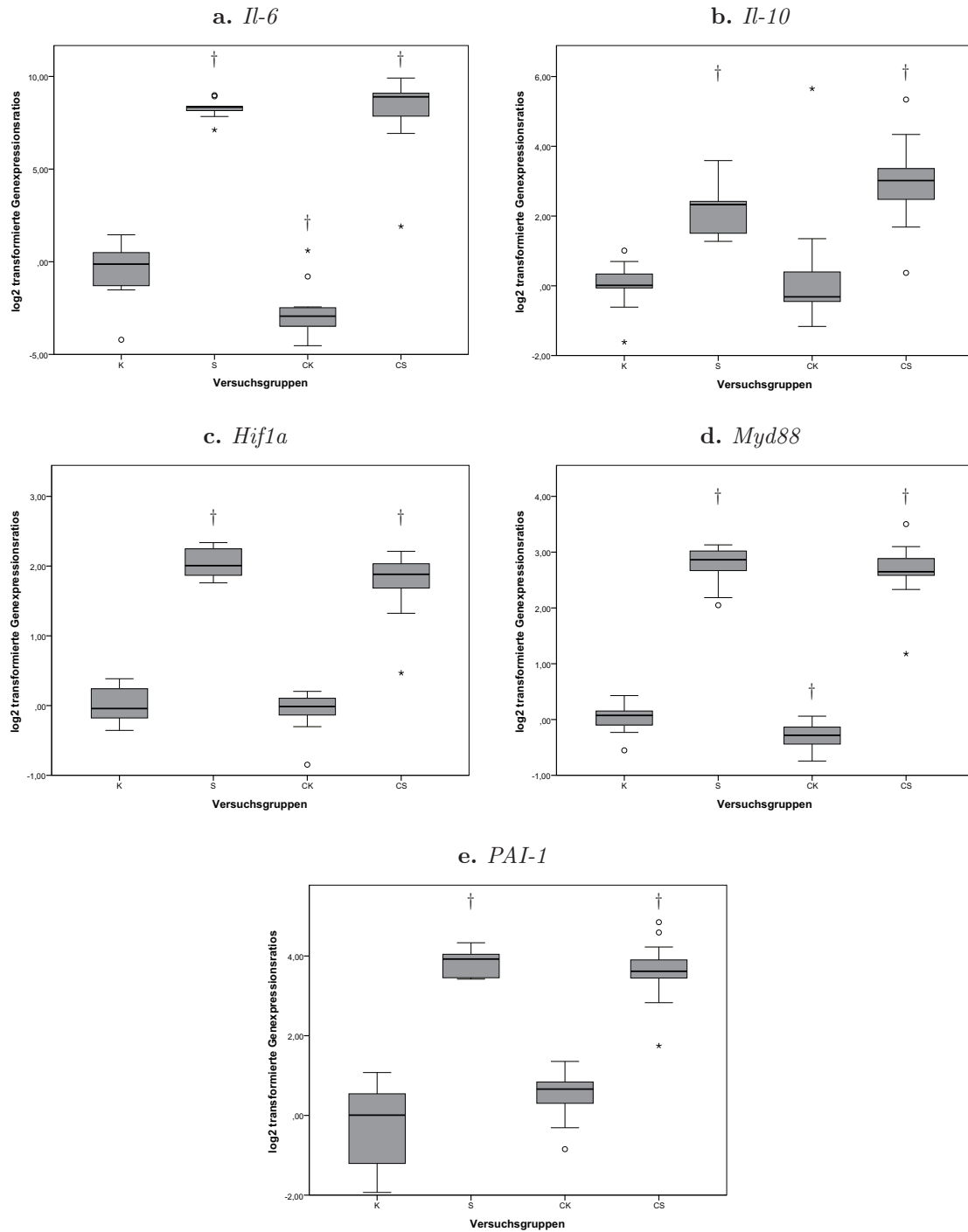
Sowohl die LPS-Gruppe (S), als auch die mit Clopidogrel behandelte LPS-Gruppe (CS) weisen für Il-6 eine starke Zunahme der Transkriptionsaktivität mit dem Faktor 324 bzw. 478 im Vergleich zur Kontrollgruppe (K) auf. Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen besteht jedoch nicht. Bei der mit Clopidogrel behandelten Kontrollgruppe (CK) wird Il-6 vermindert exprimiert (Faktor: 8) (Abbildung 5.6 a).

Il-10 wird in der CS-Gruppe und der S-Gruppe verstärkt exprimiert. Die CS-Gruppe weist eine 8-fache, die S-Gruppe eine 5-fache Transkriptionssteigerung im Vergleich zur K-Gruppe auf. Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen kann nicht festgestellt werden. Die CK-Gruppe weist keine veränderte Regulation im Vergleich zur K-Gruppe auf. (Abbildung 5.6 b).

S- und CS-Gruppe weisen beide eine Erhöhung der Transkriptionsaktivität mit dem Faktor 4 für das Gen Hif1a auf. Ein signifikanter Unterschied beider Gruppen besteht nicht. Die CK-Gruppe weist bezüglich des Hif1a Gens keine differenzierte Regulation auf. (Abbildung 5.6 c).

In der CS- und S-Gruppe ist Myd88 signifikant stärker exprimiert als in der K-Gruppe (Faktor 6-7). Im direkten Vergleich beider Gruppen gibt es keinen deutlichen Unterschied. Die CK-Gruppe ist im Vergleich zur K-Gruppe in geringem Maße (Faktor 1,2) reprimiert (Abbildung 5.6 d).

CS-Gruppe und S-Gruppe exprimieren PAI-1 deutlich stärker als die K-Gruppe (Faktor 12 und 15). Ein signifikanter interindividueller Unterschied zwischen beiden Gruppen besteht nicht. Im Vergleich zur K-Gruppe ist die Expression von PAI-1 in der CK-Gruppe unverändert (Abbildung 5.6 e).



**Abbildung 5.6: Genexpression im Herz sechs Stunden nach LPS-Injektion und Beobachtungsbeginn**

Dargestellt ist die Genexpression der vier Versuchsgruppen im Herz, bezogen auf die Kontrollgruppe (Ratios). Normiert wurde auf die Referenzgene *Hmbs*, *GAPDH* und *HPRT-1*. † signifikant im Vergleich zur K-Gruppe ( $p < 0,05$ ). Abkürzungen: K = Kontrolle, S = LPS, CK = Kontrolle + Clopidogrel, CS = LPS + Clopidogrel

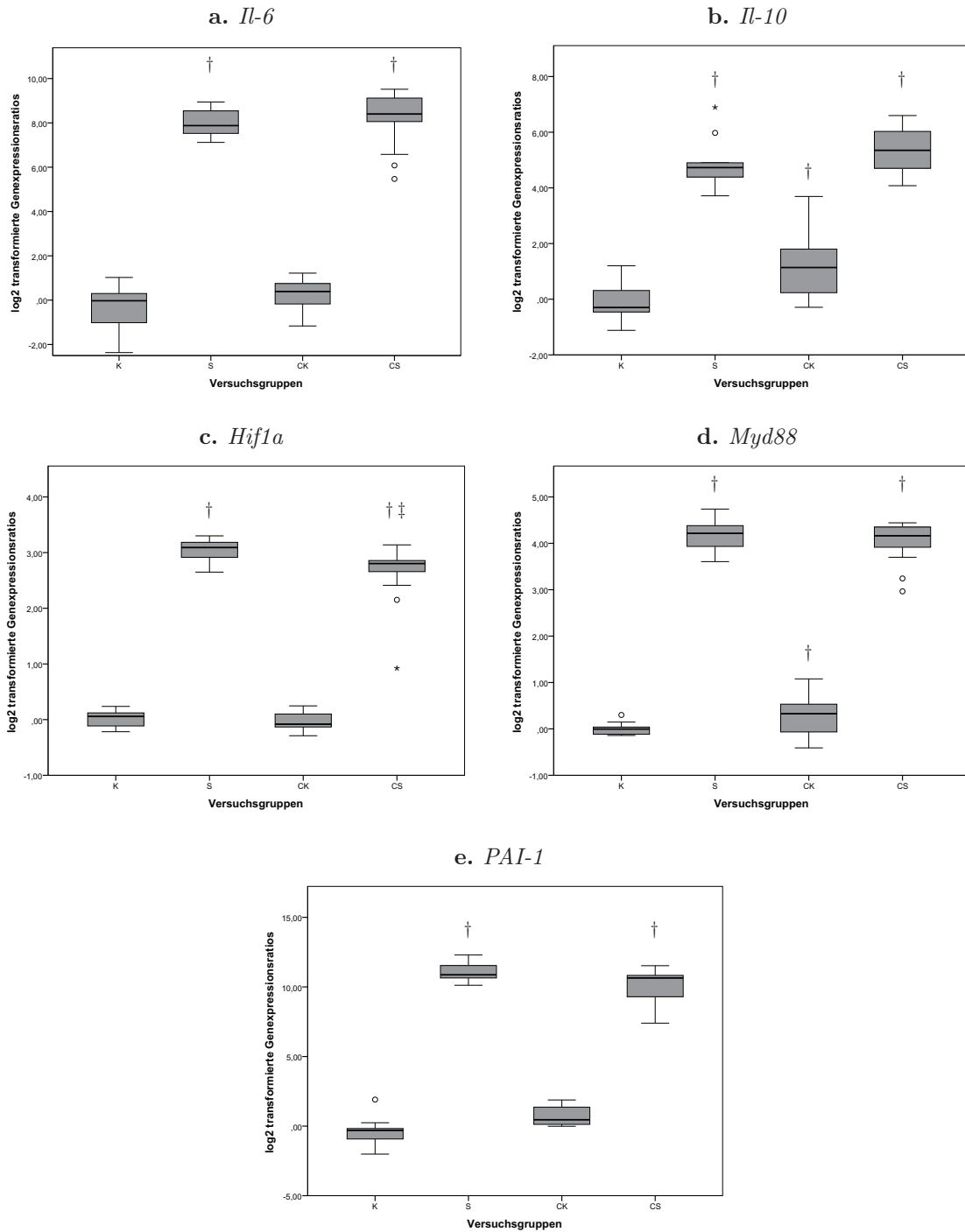
## 5.4.2 Leber

Sowohl bei der mit Clopidogrel behandelten LPS-Gruppe (CS-Gruppe), als auch bei der unbehandelten LPS-Gruppe (S-Gruppe) kann eine starke Zunahme der Transkriptionsaktivität für Il-6 verzeichnet werden. Im Falle der CS-Gruppe wird Il-6 338-fach stärker exprimiert als in der unbehandelten Kontrollgruppe (K-Gruppe), während es in der S-Gruppe 236-fach stärker exprimiert wird. Beim Vergleich beider Versuchsgruppen ergibt sich kein signifikanter Unterschied. Die mit Clopidogrel behandelte Kontrollgruppe (CK-Gruppe) weist im Vergleich zur K-Gruppe keine differenzierte Regulation für Il-6 auf (Abbildung 5.7 a).

In der S- und CS-Gruppe wird Il-10 um den Faktor 27 bzw. 41 stärker exprimiert als in der K-Gruppe. Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen besteht nicht. Il-10 weist für die CK-Gruppe eine 2,2-fache Zunahme der Transkriptionsaktivität auf (Abbildung 5.7 b).

Hif1a wird in der S-Gruppe und der CS-Gruppe verstärkt exprimiert (Faktor 8,5 bzw. 7). Der Unterschied zwischen beiden Gruppen ist signifikant ( $p < 0,05$ ). Die CK-Gruppe zeigt keine veränderte Transkriptionsaktivität im Vergleich zur K-Gruppe (Abbildung 5.7 c).

S- und CS-Gruppe sind für Myd88 im Vergleich zur K-Gruppe hochreguliert. Beide weisen eine ca. 18-fach höhere Transkriptionsaktivität auf. Ein signifikanter Unterschied zwischen CS- und S-Gruppe kann nicht festgestellt werden. Die CK-Gruppe ist im Vergleich zur K-Gruppe bezüglich Myd88 nicht unterschiedlich reguliert (Abbildung 5.7 d). Das PAI-1 Gen weist in der S- und CS-Gruppe eine extreme Zunahme der Transkriptionsaktivität auf. Sie beläuft sich im Falle der S-Gruppe auf das 1870-fache, und der CS-Gruppe auf das 1600-fache der Transkriptionsaktivität der K-Gruppe. Dennoch besteht kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Die CK-Gruppe weist im Vergleich zur K-Gruppe keinen Unterschied in der Transkriptionsaktivität auf (Abbildung 5.7 e).



**Abbildung 5.7: Genexpression in der Leber sechs Stunden nach LPS-Injektion und Beobachtungsbeginn**

Dargestellt ist die Genexpression der vier Versuchsgruppen in der Leber, bezogen auf die Kontrollgruppe (Ratios). Normiert wurde auf die Referenzgene *Gusb*, *GAPDH* und *Hmbs*. † signifikant im Vergleich zur K-Gruppe ( $p < 0,05$ ). ‡ signifikant im Vergleich zur S-Gruppe ( $p < 0,05$ ). Abkürzungen: K = Kontrolle, S = LPS, CK = Kontrolle + Clopidogrel, CS = LPS + Clopidogrel

### 5.4.3 Hirn

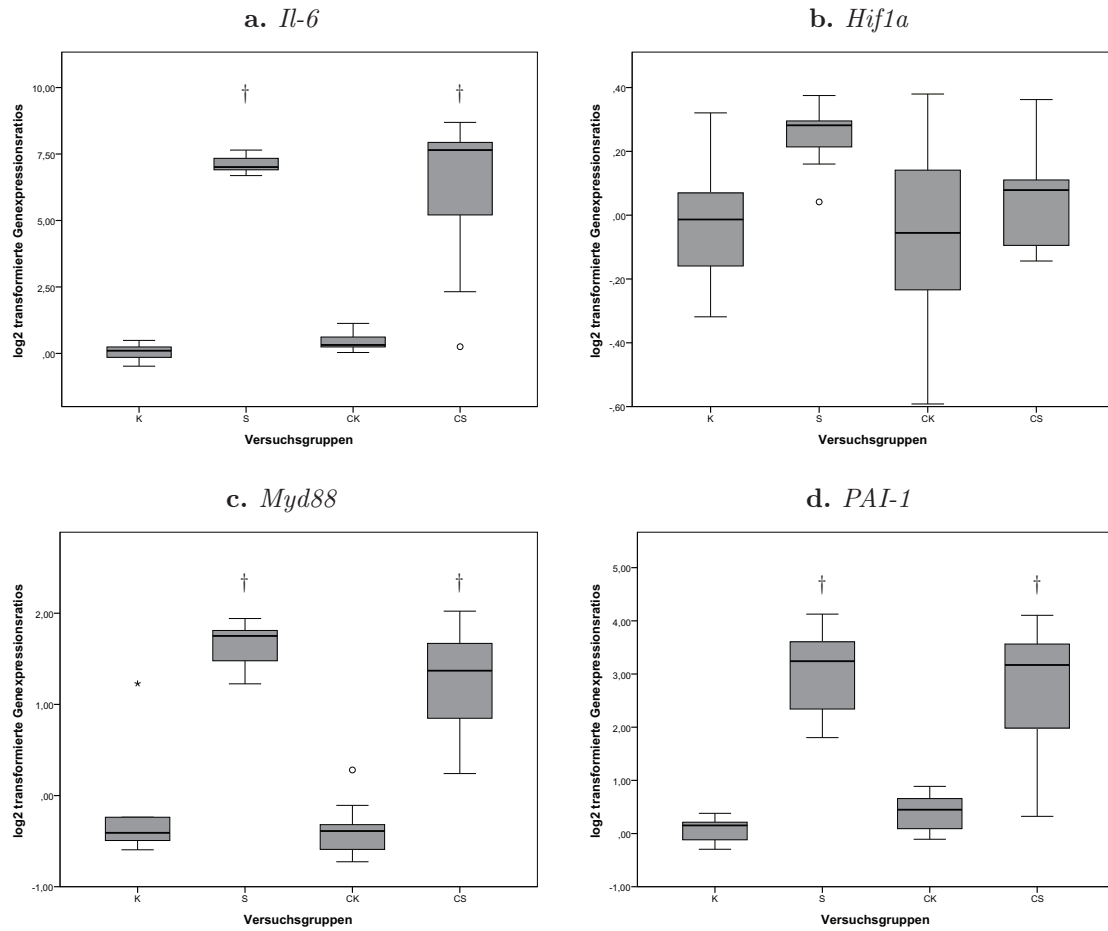
Für das Gen Il-6 findet sich sowohl in der unbehandelten LPS-Gruppe (S-Gruppe) als auch in der mit Clopidogrel behandelten LPS-Gruppe (CS-Gruppe) eine starke Hochregulation der Genexpression. In der S-Gruppe ist die Transkriptionsaktivität um den Faktor 129 gesteigert. In der CS-Gruppe ist die Genexpression von Il-6 um das 201-fache im Vergleich zur K-Gruppe gesteigert. Beim Vergleich der Genexpression der S- und CS-Gruppe findet sich kein signifikanter Unterschied. Die mit Clopidogrel behandelte Kontrollgruppe (CK-Gruppe) weist keine veränderte Genregulation im Vergleich zur K-Gruppe auf (Abbildung 5.8 a).

Auf die Analyse der Genexpression von Il-10 im Gehirn wurde verzichtet, da die Transkriptzahl für sämtliche Versuchsgruppen nur knapp oberhalb der Nachweisgrenze der Real-Time-PCR lag. Eine valide Aussage über die Veränderung der Genexpression lässt sich aufgrund der geringen Anzahl von Transkripten nicht machen.

Hif1a weist im Gehirn weder für die CK-Gruppe noch für die S- und CS-Gruppe eine signifikante Änderung der Transkriptionsaktivität im Vergleich zur K-Gruppe auf (Abbildung 5.8 b).

Myd88 ist in der S-Gruppe verstärkt exprimiert (Faktor 3,4). Auch bei der CS-Gruppe findet sich eine Zunahme der Transkriptionsaktivität mit dem Faktor 2,6. Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen kann nicht nachgewiesen werden. Myd88 ist in der CK-Gruppe im Vergleich zur K-Gruppe nicht differenziert exprimiert (Abbildung 5.8 c).

S-Gruppe und CS-Gruppe exprimieren das Gen PAI-1 stärker als die K-Gruppe (Faktor 9,4 bzw. 9). Interindividuelle Unterschiede beider Gruppen sind nicht signifikant. Die CK-Gruppe zeigt im Vergleich zur K-Gruppe keine veränderte Regulation (Abbildung 5.8 d).



**Abbildung 5.8: Genexpression im Hirn sechs Stunden nach LPS-Injektion und Beobachtungsbeginn**

Dargestellt ist die Genexpression der vier Versuchsgruppen im Hirn, bezogen auf die Kontrollgruppe (Ratios). Normiert wurde auf die Referenzgene *Gusb* und *Hmbs*. † signifikant ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zur K-Gruppe. K = Kontrolle, S = LPS, CK = Kontrolle + Clopidogrel, CS = LPS + Clopidogrel

## 6 Diskussion

Thrombozyten spielen eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie der Sepsis. Im Falle einer systemischen Entzündungsreaktion kommt es zur unspezifischen Aktivierung der Thrombozyten (Levi 2005, Gawaz et al. 1995). Aktivierte Thrombozyten können über zwei unterschiedliche Mechanismen zum Progress der Entzündungsreaktion und zur Entwicklung eines Multiorganversagens beitragen (Levi 2005). Die klassische hämostatische Funktion der Thrombozyten kann im Falle einer unkontrollierten Thrombozytenaktivierung zur thrombotischen Mikroangiopathie und disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) führen. Daneben können Thrombozyten über Entzündungsmediatoren und Wachstumsfaktoren direkten Einfluss auf die Entzündungsreaktion nehmen.

Die positive Wirkung aggregationshemmender Medikamente auf den Verlauf des Sepsisgeschehens konnte bisher nur in wenigen Studien belegt werden. Im Tiermodell verhindert Clopidogrel den LPS-induzierten Abfall der Thrombozytenzahl (Winning et al. 2009, Seidel et al. 2009). Bei Patienten mit einem Risiko für die Entwicklung eines Multiorganversagens haben Thrombozytenaggregationshemmer einen positiven Einfluss auf den Outcome (Winning et al. 2009, Winning et al. 2010). Neben der Verbesserung der rheologischen Eigenschaften des Blutes wirkt Clopidogrel auch über andere Mechanismen auf den Organismus. Ungeklärt ist, ob die positive Wirkung der Thrombozytenaggregationshemmer ausschließlich auf die Hemmung der thrombotischen und inflammatorischen Thrombozytenfunktion im Blutkreislauf zurückzuführen ist, oder, ob die Hemmung der Thrombozyten sekundäre Auswirkungen auf verschiedene Organe verhindert, die im Verlauf der Sepsis geschädigt werden.

### Bewertung der Ergebnisse

Die vorliegende Doktorarbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob Clopidogrel einen Einfluss auf die Expression inflammationsrelevanter Gene in den Zielorganen der Sepsis hat. Zu diesem Zweck erfolgte die quantitative Untersuchung der Genexpression mittels

Real-Time-PCR in Herz, Leber und Hirn. Zur Simulation der systemischen Entzündungsreaktion wurde das LPS-Modell der Maus verwendet. Dazu wurde den Mäusen 200  $\mu$ L LPS-Lösung (2 mg/ $\mu$ L) intraperitoneal verabreicht. Die Clopidogrelapplikation erfolgte vor Entzündungsinduktion durch Trinkwasserbeisetzung (187,5 mg/L).

Die Ergebnisse bestätigen die positive Wirkung von Clopidogrel auf die Thrombozytenzahl. Zusätzlich kann der immense Einfluss des Entzündungsgeschehens auf die Genexpression inflammationsrelevanter Gene gezeigt werden. Die Hypothese, dass Clopidogrel die Transkriptionsaktivität der untersuchten Gene in Herz, Leber und Hirn im Sepsisgeschehen beeinflusst, kann nicht bestätigt werden.

Die Ergebnisse der Thrombozytenzählung zeigen, dass es sechs Stunden nach LPS-Injektion zu einem signifikanten Abfall der Thrombozytenzahl bei den Tieren der S-Gruppe im Vergleich zu Tieren der K-Gruppe kommt (Tabelle 5.1). Gleichzeitig kann eine massive Expressionszunahme der untersuchten Gene in Herz, Leber und Hirn nach Entzündungsinduktion festgestellt werden (Abschnitt 5.4). Der Faktor der Verstärkung der Genexpression unterscheidet sich, abhängig von untersuchtem Gen und Organ. Die stärkste Zunahme findet sich bei dem Gen PAI-1 in der Leber mit einem Faktor von 1600-1870. Die Expression der Zytokingene Il-6 und -10 in Herz und Leber ist ebenfalls stark erhöht. Im Hirn fällt die Erhöhung der Genexpression insgesamt geringer aus als in den Organen Herz und Leber. Eine Ausnahme bildet das Hirn für die Gene Il-10 und Hif1a. Il-10 wird im Hirn nicht exprimiert. Die Menge an Transkript liegt an der unteren Nachweisgrenze der Real-Time-PCR. Das Gen Hif1a wird im Gehirn exprimiert, jedoch weist keine der Versuchsgruppen eine veränderte Transkriptionsaktivität im Vergleich zur K-Gruppe auf.

Clopidogrel verhindert den LPS-induzierten Abfall der Thrombozyten (Tabelle 5.1). Jedoch scheint Clopidogrel nur unwesentlichen Einfluss auf die Genexpression der untersuchten Gene in Herz, Leber und Hirn zu haben. Im Herz sind die Gene Il-6 und Myd88 in der CK-Gruppe im geringen Maße reprimiert. In der Leber weisen Il-10 und PAI-1 in der CK-Gruppe eine größere Transkriptionsaktivität als in der K-Gruppe auf. Im Hirn hat Clopidogrel keinen Einfluss auf die Genexpression. Die Änderungen der Transkriptionsaktivität durch Clopidogrel sind im Vergleich zur Änderung der Transkriptionsaktivität durch LPS-Injektion deutlich geringer ausgeprägt.

Clopidogrel scheint keinen bedeutenden Einfluss auf die LPS-induzierte Steigerung der Transkriptionsaktivität zu haben. Einzige Ausnahme stellt das Gen Hif1a in der Leber dar. Die Steigerung der Transkriptionsaktivität ist in der CS-Gruppe signifikant geringer



als in der S-Gruppe. Dennoch weist die CS-Gruppe noch eine 6-fache Steigerung der Transkriptionsaktivität im Vergleich zur K-Gruppe auf.

## Diskussion des Thrombozytenabfalls

Eine Verminderung der Thrombozytenzahl kommt häufig bei Patienten mit SIRS oder Sepsis vor und korreliert mit einem schlechten Outcome bei kritisch kranken Patienten (Akca et al. 2002, Sharma et al. 2007, Vandijck et al. 2010). Die Aktivierung von Thrombozyten im peripheren Blut gehört zu den klassischen Merkmalen des/der SIRS/Sepsis (Vincent et al. 2002, Levi 2005). Durch die unkontrollierte Thrombozytenaktivierung kommt es zum Verbrauch der Thrombozyten. Mögliche Folgen sind thrombotische Mikroangiopathie und disseminierte intravasale Gerinnung (DIC), welche zum Multiorganversagen beitragen können (Levi et al. 2010). Neben dem Verbrauch der Thrombozyten durch die DIC, können auch andere Faktoren für die Entstehung einer Thrombozytopenie eine Rolle spielen. Im LPS-Modell der Maus konnte gezeigt werden, dass der Toll-like-Rezeptor 4 (TLR 4) mitverantwortlich für die Entfernung der Thrombozyten aus der Blutzirkulation ist (Andonegui et al. 2005, Aslam et al. 2006). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine LPS-Injektion bei der Maus zur Akkumulation von Thrombozyten in Leber und Lunge führt, auf die eine Retranslokation der Thrombozyten in die Blutzirkulation folgt. Aspirin, ebenfalls ein Thrombozytenaggregationshemmer, führt zur verminderten Akkumulation der Thrombozyten in den Organen und fördert den Rücktransport der Thrombozyten aus den Organen ins Blut (Ohtaki et al. 2002).

Aus den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit geht eindeutig hervor, dass Clopidogrel den Abfall der Thrombozyten, ausgelöst durch die LPS-Injektion, verhindern kann (vgl. Abschnitt 5.1). Damit werden Ergebnisse früherer Studien bestätigt. So konnte gezeigt werden, dass Clopidogrel sowohl im LPS-Modell (Winning et al. 2009) als auch im PCI-Modell der Maus (Seidel et al. 2009), einen Abfall der Thrombozyten verhindern kann. Im Gegensatz dazu, scheint eine Behandlung mit Clopidogrel im Endotoxin-Modell beim Schwein keine Auswirkung auf die Anzahl der Thrombozyten zu haben (Lipcsey et al. 2005).

Kritisch kranke Patienten mit systemischen Entzündungszeichen zeigen einen typischen Verlauf der Thrombozytenzahl. Nach einem initialen Abfall der Thrombozyten kommt es, im Falle des Überlebens, zu einem überschießenden Wiederanstieg, der die vorheri-

gen Basalwerte übersteigt (Akca et al. 2002). Winning et al. (2010) konnten in einer retrospektiven Studie zeigen, dass Clopidogrel sowohl den initialen Abfall, als auch den überschießenden Wiederanstieg der Thrombozytenzahl, signifikant abschwächt.

Ein Anstieg des Hämatokrits und der Hämoglobinkonzentration nach LPS-Injektion, im Sinne eines Capillary-Leak-Syndrom, wie es in einer ähnlichen Studie beschrieben wird (Seidel et al. 2009), kann nicht beobachtet werden.

## Diskussion der Genexpressionsdaten

Bei den untersuchten Genen Il-6, Il-10, Hif1a, Myd88 und PAI-1 zeigt sich eine deutliche Zunahme der Transkriptionsaktivität nach Entzündungsinduktion durch LPS-Injektion. Diese Ergebnisse zeigen, dass alle fünf Gene als Indikatorgene der systemischen Entzündungsreaktion und der Sepsis im Endotoxin-Modell der Maus dienen können. Die Expressionssteigerung ist unterschiedlich stark ausgeprägt, abhängig vom untersuchten Gen und Organ. Lediglich Il-10 und Hif1a im Gehirn wurden nicht bzw. nicht verstärkt exprimiert.

Untersucht wurden fünf inflammationsrelevante Gene: Il-6, Il-10, Hif1a, Myd88 und PAI-1. Das Il-6 Gen kodiert für das gleichnamige Zytokin IL-6. IL-6 ist der Namensgeber einer großen Familie von Zytokinen, die aus vielen verschiedenen Molekülen besteht (Taga und Kishimoto 1997). IL-6 kann sowohl mit Zellen, die den membranständigen IL-6 Rezeptor exprimieren, interagieren (classical IL-6 signaling), als auch mit solchen, die ihn nicht exprimieren (IL-6 transsignaling) (Schuett et al. 2009). Bei letzterer Form bildet IL-6 einen Komplex mit dem löslichen IL-6 Rezeptor, bevor es an die jeweilige Zelloberfläche bindet (Jones et al. 2005). Dadurch ist es IL-6 möglich mit einer großen Anzahl unterschiedlicher Zellen verschiedener Organe zu interagieren. Im Herz kann IL-6 über verschiedene Mechanismen sowohl zur Entwicklung, als auch zur Destabilisierung atherosklerotischer Plaques beitragen, und spielt somit eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie kardiovaskulärer Erkrankungen (Yudkin et al. 2000, Schuett et al. 2009). In der Folge von Verletzungen und Entzündungen ist IL-6 neben anderen proinflammatorischen Zytokinen ein entscheidender Trigger für die Auslösung der Akute-Phase-Reaktion (Heinrich et al. 1990) in der Leber, und sorgt für die Ausschüttung und Neusynthese von Akute-Phase-Proteinen (Heinrich et al. 1998). Eine zerebrale

Ischämie induziert die Expression von IL-6 in Astrozyten (Maeda et al. 1994). Darüber hinaus scheint die Menge intrathekal produzierten IL-6 mit der Größe des Infarktgebiets zu korrelieren (Tarkowski et al. 1995). Auch nach einer Subarachnoidalblutung finden sich erhöhte intrathekale Werte von IL-6 (Sarrafczadeh et al. 2010).

IL-10 ist wie IL-6 ein Zytokin und wird durch das gleichnamige Gen (IL-10) kodiert. IL-10 hemmt die Synthese von verschiedenen proinflammatorischen Zytokinen und scheint als neutralisierende Komponente sowohl die Dauer, als auch die Intensität von Entzündungsprozessen zu verringern (Kaur et al. 2009). Verschiedene Studien konnten zeigen, dass eine Verbesserung der Herzfunktion, infolge verschiedener Medikamente, mit einer Erhöhung von IL-10 einhergeht (Giomarelli et al. 2003, Azab et al. 2002, Adamopoulos et al. 2003). Außerdem konnte im Mausmodell des Herzversagens ein positiver Effekt für die Gabe von rekombinanten IL-10 festgestellt werden (Kaur et al. 2009). Verschiedene Studien deuten auf eine Beteiligung von IL-10 an der Pathophysiologie verschiedener Lebererkrankungen hin (Zhang und Wang 2006). Eine Zunahme von IL-10 im Gehirn wurde im Zusammenhang mit mehreren Krankheiten festgestellt, unter anderem: MS, AIDS, Alzheimer, Apoplex, Tumoren und Traumata (Vitkovic et al. 2001).

Hif1- $\alpha$  entsteht durch Transkription und Translation des Hif1a Gens. Hif1- $\alpha$  ist ein nukleärer Transkriptionsfaktor, der für die Regulation der Sauerstoffhomöostase im Gewebe verantwortlich ist (Wang et al. 1995). Über 70 verschiedene Gene werden durch den Hif-Komplex reguliert, welche ihrerseits die Anpassung des Organismus an Hypoxie/Ischämie vermitteln (Semenza 2009). Hif1 besteht aus einer konstitutiv exprimierten  $\beta$ -Untereinheit und einer sauerstoffabhängig exprimierten  $\alpha$ -Untereinheit (Wang et al. 1995, Semenza 2009). Die Aktivität von Hif1 wird über die Balance zwischen Synthese und Degradierung der  $\alpha$ -Untereinheit reguliert. Die Synthese der  $\alpha$ -Untereinheit wird durch Entzündungsmediatoren geregelt (Frede et al. 2006), während die Degradierung über eine sauerstoffabhängige Ubiquitinierung gesteuert wird (Sutter et al. 2000). Die Beteiligung von Hif1- $\alpha$  an diversen kardialen Erkrankungen konnte in verschiedenen Studien nachgewiesen werden. Zu diesen Erkrankungen zählen unter anderem: Akute Ischämie/Myokardinfarkt, kardiale Hypertrophie, Pulmonale und systemische Hypertension, Kardiomyopathie und Herzversagen (Czibik 2010). Auch in der Leber spielt Hif1- $\alpha$  eine wesentliche Rolle in der Pathophysiologie verschiedener Erkrankungen, die im Zusammenhang mit einem hypoxischen Zustand stehen (Rosmorduc und Housset 2010). Darüber hinaus scheint die Aktivität von Hif1- $\alpha$  auch sauerstoffunabhängig durch Entzündungszustände wie Sepsis und Endotoxinämie reguliert zu sein (Scharte et al. 2006). Konkret scheint Hif1- $\alpha$  Einfluss auf die Entwicklung des akuten Leberversagens, infolge

eines septischen Multiorganversagens, zu nehmen. In diesem Zusammenhang wird auch die medikamentöse Anwendung von Hif1- $\alpha$ -Aktivatoren diskutiert (Huang et al. 2011). In Neuronen wird Hif1- $\alpha$  eine essenzielle Rolle in den Vorgängen der Neuroinflammation zugeschrieben. Damit stellt Hif1- $\alpha$  im Hirn ein potenzielles Target für die Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen dar (Yeh et al. 2008).

Myd88 kodiert für ein Adapterprotein (MyD88), welches an die TIR-Domäne verschiedener Rezeptoren bindet und die zelluläre Antwort verschiedener Agonisten koordiniert (O'Neill und Bowie 2007). Nach Bindung eines TIR Rezeptorkomplexes kommt es zur Aktivierung intrazellulärer Kinasen (IRAK), welche in der Folge weitere Kinasen und Transkriptionsfaktoren phosphorylieren. Im Tierexperiment konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit einer genetischen Deletion von Myd88 kleinere Infarktgebiete im AMI-Modell entwickeln (Feng et al. 2008). In diesem Zusammenhang wird die Eignung von MyD88 als pharmakologisches Target für die Prävention von Herzversagen in der Folge eines AMI diskutiert (Tassell et al. 2010). In der Leber spielt MyD88 im Zusammenhang mit der Familie der Toll-like Rezeptoren eine entscheidende Rolle für die Entwicklung einer Vielzahl von Erkrankungen, unter anderem: Endotoxin-induzierte Leberschädigung, Infektionen (*L. monocytogenes*, Malaria, Hepatitis B und C) und Leberfibrose (Seki und Brenner 2008). Jedoch scheint im Kontrast zum Herz MyD88 keine Rolle für eine ischämische Leberschädigung zu spielen (Zhai et al. 2004). Auch im Hirn ist MyD88 an der Entstehung und Aufrechterhaltung verschiedener Krankheiten beteiligt, z. B. nicht-septischer Hirnschäden (Koedel et al. 2007), bakterieller Meningitis (Koedel et al. 2010) und des ischämischen Hirnschadens (Wang et al. 2009).

PAI-1 kodiert für das gleichnamige Protein. PAI-1 gehört zu der Gruppe der Inhibitoren, die die Aktivierung von Plasminogen in das aktive Plasmin regulieren, und ist somit Bestandteil des Gerinnungsapparats (Sprengers und Kluft 1987). PAI-1 wird von verschiedenen Zelltypen und Geweben produziert, unter anderem: vom Fettgewebe (Samad et al. 1996), Endothelium (Loskutoff et al. 1986) und von Hepatozyten (Chomiki et al. 1994). Ein großer Teil von PAI-1 wird in Thrombozyten produziert (Brogren et al. 2004) und gespeichert (Declerck et al. 1988). Die PAI-1 Produktion wird sowohl durch Zytokine (Emeis und Kooistra 1986, Sawdey et al. 1989), als auch Wachstumsfaktoren und Hormone (Sawdey et al. 1989, Smith et al. 2004) stimuliert. Im Herz ist PAI-1 an der Entwicklung der koronaren Herzkrankheit beteiligt (Huber et al. 2001, Vaughan 2005). In der Leber und anderen Organen spielt PAI-1 eine wichtige Rolle für die Entwicklung einer Fibrose (Ghosh und Vaughan 2011). Im Gehirn scheint PAI-1 neuroprotektive Eigenschaften in Folge von ischämischen Hirnschäden zu haben (Hultman et al. 2010).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass Clopidogrel nur einen unwesentlichen Einfluss auf die Expression der untersuchten Gene hat. Mit Ausnahme des Gens *Hif1a* in der Leber, führt die Gabe von Clopidogrel nicht zu einer Abmilderung der, durch LPS-Injektion ausgelösten Steigerung der Genexpression. Somit scheint, zumindest für die untersuchten Gene, die Beeinflussung der Genexpression nicht der verantwortliche Mechanismus für die, an anderer Stelle beschriebenen, positiven Wirkungen von Clopidogrel zu sein.

Clopidogrel ist ein irreversibler Antagonist des P2Y<sub>12</sub> Rezeptors aus der Gruppe der Thienopyridine (Storey 2006). Der P2Y<sub>12</sub> Rezeptor wird spezifisch auf Thrombozyten exprimiert. Einzige bisher bekannte Ausnahme stellen Mikrogliazellen im ZNS dar (Tozaki-Saitoh et al. 2008). Clopidogrel hemmt den P2Y<sub>12</sub> Rezeptor selektiv (Herbert und Savi 2003). Clopidogrel hemmt die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation durch irreversible Inhibition der Bindung von ADP und dem P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor der Thrombozytenoberfläche (Herbert und Savi 2003). Die positive Wirkung der Thrombozytenaggregationshemmer in der klinischen Anwendung konnte in verschiedenen Studien belegt werden. Zu den größten gehören die CAPRIE- (CAPRIE-Steering-Committee 1996) und CURE-Studie (Yusuf et al. 2001), in denen die aggregationshemmende Wirkung von Clopidogrel sowohl für Patienten mit Atherosklerose, als auch für Patienten mit instabiler Angina pectoris untersucht wurde.

Auch die positiven Effekte aggregationshemmender Medikamente auf die systemische Entzündungsreaktion konnten in verschiedenen Studien belegt werden. Diese umfassen sowohl tierexperimentelle Arbeiten (Winning et al. 2009, Seidel et al. 2009, Hagiwara et al. 2011), als auch retrospektive Studien (Winning et al. 2009, Winning et al. 2010). Dennoch ist der Wirkungsmechanismus von Plättchenaggregationshemmern auf eine systemische Entzündung nicht vollständig verstanden (Hagiwara et al. 2011). Derzeit werden mehrere verschiedene Mechanismen diskutiert, die die anti-inflammatorische Wirkung von Clopidogrel und anderer aggregationshemmender Medikamente erklären können. Zu diesen gehören:

*1. Die Hemmung der thrombozytenabhängigen endothelialen Dysfunktion.*

Endotheliale Läsionen gehören zu den frühen Zeichen einer systemischen Entzündungsreaktion und können eine Ursache für das Organversagen bei Sepsis darstellen (Czabanka et al. 2007). Thrombozyten können direkt und indirekt zur Endothelschädigung beitragen. Zu dem indirekten Mechanismus gehört beispielsweise die Fähigkeit der Thrombo-

zyten bakterielle Produkte via Toll-like-Rezeptor neutrophilen Zellen zu präsentieren. Dies führt zur rapiden Produktion von Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  und Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die in der Folge zu endothelialen Schädigungen führen können (Aslam et al. 2006, Clark et al. 2007). Thrombozyten können auch direkt das Endothel schädigen. Dies geschieht beispielsweise durch Exosome (Gambim et al. 2007). Auch bei direkter Bindung bakterienbeladener Thrombozyten an die Endothelzellen kann die Apoptose durch ROS-Bildung und den Caspase-Pathway ausgelöst werden (Kuckleburg et al. 2008). Thrombozytenaggregationshemmer haben positive Auswirkungen auf die endotheliale Dysfunktion. Dies konnte sowohl im Tierversuch (Pu et al. 2001, Walther et al. 2004), als auch im Patienten (Kharbanda et al. 2002) gezeigt werden.

#### *2. Verminderung von Fibrin- und Thrombozytenakkumulation.*

LPS-Injektion führt zur Fibrinablagerung im Lungengewebe der Maus. Clopidogrel kann diese Akkumulation von Fibrin abmildern (Winning et al. 2009). Im Modell für chronisches Nierenversagen der Ratte führt Clopidogrel, neben einer verringerten Immigration von Makrophagen und Expression von Entzündungsmarkern, auch zu einer vermindernden Ablagerung von Fibrin im Nierengewebe (Tu et al. 2008). In diesem Zusammenhang wird diskutiert, ob Thrombozyten mit einer Fibrinakkumulation in Organen assoziiert sind. Ohtaki et al. (2002) konnten in ihrer Studie zeigen, dass eine LPS-Injektion in einer Akkumulation von Thrombozyten, gemessen am Serotonin Spiegel, in Lunge und Leber resultiert. Diese konnte durch die Gabe von Acetylsalicylsäure effektiv abgemildert werden.

#### *3. Hemmung der Zytokinproduktion.*

In einer Studie von Hagiwara et al. (2011) konnte gezeigt werden, dass Clopidogrel, neben der Hemmung LPS-induzierter Schäden in Lunge und Leber, auch zur Senkung pro-inflammatorischer Marker führt. Zu diesen zählen die Zytokine IL-6 und TNF- $\alpha$ , sowie High-motility group box 1 (HMGB 1). HMGB 1 ist ein Zytokin-ähnlicher Mediator der LPS-induzierten Sterblichkeit bei Mäusen (Wang et al. 1999).

#### *4. Modulation der Genexpression in peripheren Blutzellen.*

Winning et al. (2009) konnten zeigen, dass Clopidogrel zur veränderten Expression inflammationsrelevanter Gene in peripheren Blutzellen im Endotoxin-Modell der Maus führt. Bei Tieren mit Clopidogrelvorbehandlung wurden 25 Gene im Vergleich zu unbehandelten Tieren reprimiert. Diese Gene kodierten unter anderem für Zytokine und Zytokin-Rezeptoren, Komplementfaktoren und Immunoglobine, Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren.

#### *5. Hemmung der Interaktion von Thrombozyten und Granulo-/Monozyten.*

Thrombozyten und PMVs können Mono- und Granulozyten binden und deren Genexpression modulieren (Russwurm et al. 2002, Setzer et al. 2006). Verschiedene Studien deuten darauf hin, dass Patienten mit Sepsis und Organversagen eine verstärkte Thrombozyten-Leukozyten Interaktion aufweisen (Russwurm et al. 2002, Gawaz et al. 1995). Bei der Maus kann Clopidogrel die Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion senken (Evangelista et al. 2005). Auch bei Patienten mit kardiovaskulärer Erkrankung, oder nach Nierentransplantation senkt Clopidogrel die Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion (Steinhubl et al. 2007, Graff et al. 2005).

Clopidogrel hemmt relativ spezifisch Thrombozyten über den P2Y<sub>12</sub> ADP-Rezeptor. Die Modulation der Genexpression peripherer Blutzellen durch Clopidogrel wird thrombozytenabhängig vermittelt (Evangelista et al. 2005, Winning et al. 2009). Zusätzlich hemmt Clopidogrel die Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion, welche vorzugsweise im peripheren Blut stattfindet. Da eine Behandlung mit Clopidogrel fast keine Auswirkung auf die Genexpression in den untersuchten Organen hat, scheinen Thrombozyten bzw. Thrombozyten-Leukozyten-Interaktionen keine Auswirkung auf die Genexpression der Organe zu haben. Ein Benefit von Clopidogrel und anderer Thrombozytenaggregationshemmer bei Sepsis ist demnach möglicherweise vor allem auf die anti-thrombotische Wirkkomponente der Medikamente zurückzuführen.

Zusammenfassend muss nach Bewertung der Ergebnisse der Genexpression die Hypothese, dass Clopidogrel einen direkten oder indirekten Einfluss auf die Expression der fünf untersuchten Gene in Herz, Leber und Hirn hat, abgelehnt werden.

## Limitationen

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse zeigen, dass Clopidogrel keinen bedeutenden Einfluss auf die Expression der fünf untersuchten Gene hat. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass Clopidogrel eventuell die Genexpression anderer organspezifischer Gene beeinflussen kann. Zur Untersuchung dieser Fragestellung müsste eine Genexpressionsanalyse des gesamten Transkriptoms der jeweiligen Organe, beispielsweise mittels MicroArray, erfolgen.

Des Weiteren hat jede Zelle die Möglichkeit durch Veränderungen auf translationaler Ebene, unabhängig vom Expressionsniveau des jeweiligen Gens, Einfluss auf die synthetisierte Proteinmenge zu nehmen. Um einen möglichen Einfluss von Clopidogrel auf die Regulation der Translation nachzuweisen, müsste die quantitative Mengenbestimmung

der jeweiligen Proteine in den jeweiligen organspezifischen Zellen erfolgen.

Auch das verwendete Tiermodell weist verschiedene Limitationen auf. Unabhängig vom verwendeten Modell, ist bisher kein präklinisches Tiermodell in der Lage die Komplexität der menschlichen Sepsis vollständig zu replizieren (Dyson und Singer 2009). Zu den allgemeinen Fehlerquellen, die die Übertragbarkeit von Tierexperimenten auf den Patienten erschweren, gehören unter anderem die allgemeinen Unterschiede zwischen Menschen und Versuchstieren: Schwere der Sepsis, Alter, Geschlecht und Komorbiditäten (Dyson und Singer 2009). Zusätzliche Störfaktoren stellen die unterschiedlichen physikalischen und medikamentösen Therapieverfahren dar, die ein diagnostizierter Sepsispatient im Laufe seines Klinikaufenthalts erhält. Dazu zählen Beatmung, Flüssigkeitsersatz, Antibiotikabehandlung, hämodynamisches Monitoring und Sedation.

Grob kann man drei Gruppen von tierexperimentellen Sepsismodellen unterscheiden (de Figueiredo et al. 2008): Endotoxin-Modelle, Modelle mit intravaskulärer Bakterieninfusion und Peritonitis-Modelle. In der vorliegenden Arbeit wird ein Endotoxin-Modell der Maus, basierend auf einer intraperitonealen LPS-Injektion, verwendet. Eine Entzündungsquelle liegt nicht vor. Das Endotoxin-Modell ist das am häufigsten verwendete Tiermodell in der Literatur. Auch heutzutage wird es immer noch in der klinischen Forschung eingesetzt (Alkharfy et al. 2011, Wu et al. 2011). Es ist gut standardisiert und lässt sich leicht reproduzieren (de Figueiredo et al. 2008). Obwohl erhöhte Serumlevel von Endotoxin mit der Entwicklung, Schwere und Mortalität der Sepsis assoziiert sind (Piper et al. 1996, Fink und Heard 1990) und eine Endotoxingabe Sepsis-ähnliche Symptome beim Menschen auslöst (Fink und Heard 1990), gibt es charakteristische Unterschiede zwischen den jeweiligen Entzündungsreaktionen. So konnte gezeigt werden, dass es große Unterschiede in der LPS-Sensitivität zwischen Mensch und Maus gibt (Copeland et al. 2005). Des Weiteren unterscheiden sich die Dynamik der Entzündungsreaktion hinsichtlich der Zytokinlevel. Während ein Endotoxin-Bolus bei Versuchstieren zu einem kurzzeitigen, steilen Anstieg proinflammatorischer Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6) führt (Remick und Ward 2005), kommt es beim sepsiserkrankten Menschen zu einem geringeren Zytokinanstieg, der jedoch länger anhält. Ein weiterer Kritikpunkt betrifft die Hämodynamik. Endotoxin führt häufig zu hypodynamen Zuständen, während Patienten mit Sepsis eher einen hyperdynamen Zustand zeigen (Dyson und Singer 2009). Bei Sepsismodellen, die auf der intravaskulären Infusion von lebenden Bakterien basieren, gibt es ähnlich, wie beim Endotoxin-Modell keinen septischen Fokus. Folgen der Infusion sind sofortiger kardiovaskulärer Kollaps und ein frühzeitiger Tod; Symptome,



die für die menschliche Sepsis eher untypisch sind (de Figueiredo et al. 2008). Die injizierten Bakterien können sich in der Regel weder replizieren noch können Kolonien gebildet werden (Buras et al. 2005). In der Folge führt die Bakterienlyse eher zu einer Toxämie als zu einer Infektion (Buras et al. 2005). Auch der Pathomechanismus stimmt nicht mit den Vorgängen bei der Sepsis überein, da im Patienten nicht solche großen Bakterienmassen zirkulieren (de Figueiredo et al. 2008).

Bei den Peritonitismodellen der Sepsis werden mehrere verschiedene Verfahren unterschieden: Cecal ligation and puncture (CLP), Cecal ligation and incision (CLI) und Colon ascendens stent peritonitis (CASP). Der große Nachteil der Peritonitismodelle besteht in dem größeren experimentellen Aufwand und der schwierigen Kontrolle der Schwere der septischen Belastung, die zu einer hohen Variabilität in der Progression und im Überleben der Sepsis führt. Gonnert et al. (2011) haben ein Peritonitismodell entwickelt, das auf der Injektion einer menschlichen Stuhlsuspension basiert. Dies ermöglicht eine gute Standardisierung bei gleichzeitig geringem experimentellen Aufwand. Durch die Peritonitisinduktion kommt es, neben der Entwicklung einer Entzündungsreaktion, zu hämodynamischen und biochemischen Veränderungen, die den Vorgängen der menschlichen Sepsis sehr ähnlich sind (de Figueiredo et al. 2008). Die Zytokinlevel beim CLP-Modell sind im Vergleich zum Endotoxin-Modell niedriger und entsprechen somit eher den klinischen Beobachtungen (Remick et al. 2000, Villa et al. 1995).

Trotz der beschriebenen Kritikpunkte wurde in der vorliegenden Arbeit ein Endotoxin-Modell verwendet, um die Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen der vorangegangenen Studie (Winning et al. 2009) zu gewährleisten.

Obwohl die Real-Time-PCR eine etablierte Methode zur Genexpressionsanalyse darstellt, handelt es sich um ein komplexes Verfahren, das aus vielen aufeinanderfolgenden Arbeitsschritten besteht. Zuerst müssen die zu untersuchenden Organe präpariert werden und die RNA aus den Geweben extrahiert werden. Anschließend erfolgt die Übersetzung der RNA in cDNA, gefolgt von dem eigentlichen Real-Time-PCR-Lauf. Jeder der Arbeitsschritte stellt eine potenzielle Fehlerquelle dar. Um die Fehleranzahl in den Versuchen möglichst gering zu halten, erfolgte eine ausgiebige Qualitätskontrolle (vgl. Abschnitt 5.2). Um die Vergleichbarkeit der PCR-Ergebnisse zu gewährleisten, wurde weitestgehend nach den Richtlinien von Bustin et al. (2009) gearbeitet.

## Mögliche Ansätze für weitere Forschung und klinische Anwendung

Obwohl die Hypothese, dass Clopidogrel Einfluss auf die Expression der untersuchten Gene in Herz, Leber und Hirn im Endotoxin-Modell der Maus hat, nicht bestätigt werden konnte, sprechen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht gegen die Anwendung von Thrombozytenaggregationshemmern in der Klinik bei Patienten mit einem hohen Risiko für Sepsis und Organversagen. Der in vorangegangenen Studien beschriebene positive Effekt von Clopidogrel auf die Thrombozytenzahl konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls bestätigt werden (Winning et al. 2009, Seidel et al. 2009, Winning et al. 2010). In Zusammenhang mit den Ergebnissen früherer Studien wäre für die weitere Erforschung eines möglichen Benefits der Thrombozytenaggregationshemmer für den Verlauf von SIRS, Sepsis und des multiplen Organversagens eine prospektive Studie wünschenswert. Eine solche Studie ist in der Arbeitsgruppe von J. Winning und W. Lösche geplant (persönliche Mitteilung). Angelegt wird die Studie als randomisierte Doppelblindstudie mit Patienten, die wegen einer Pneumonie stationär aufgenommen werden. Nach Einschluss erhalten Patienten entweder für 7 Tage 100 mg Acetylsalicylsäure oder, für 7 Tage ein Placebo. Als Endpunkte sind Anzeichen für Sepsis und Organversagen definiert.

## 7 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Clopidogrel auf die Expression inflammationsrelevanter Gene in den Organen Herz, Leber und Hirn im Endotoxin-Modell der Maus untersucht. Bei den LPS-behandelten Mäusen zeigte sich eine signifikante Zunahme der Expressionsaktivität fast aller Gene in den untersuchten Organen. Im Gegensatz dazu, scheint die Gabe von Clopidogrel keinen bedeutenden Einfluss auf die Genexpression in den untersuchten Organen zu haben. Dies gilt sowohl für Tiere mit LPS- und Clopidogrelbehandlung, als auch für solche Tiere mit ausschließlicher Clopidogrelbehandlung. Clopidogrel führt zu einer relativ spezifischen Hemmung der Thrombozyten. Die Modulation der Genexpression durch Clopidogrel erfolgt thrombozytenabhängig. Zusätzlich hemmt Clopidogrel die Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten. Da Clopidogrel, in der vorliegenden Arbeit, fast keine Wirkung auf die organspezifische Genexpression hat, scheinen auch Thrombozyten bzw. Thrombozyten-Leukozyten-Interaktionen keine Auswirkung auf die Genexpression in den Organen zu haben. Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass der, in verschiedenen Studien, beschriebene Benefit von Clopidogrel wahrscheinlich nicht auf eine direkte oder indirekte Beeinflussung der Genexpression in den Zielorganen der Sepsis zurückzuführen ist. Da nur ausgewählte inflammationsrelevante Gene analysiert wurden, müsste zur weiteren Klärung der Fragestellung, eine Analyse des gesamten Genoms der jeweiligen Organe mittels MicroArray-Technologie erfolgen.

Dennoch spiegelt sich der Benefit für die Behandlung mit Clopidogrel auch in den Ergebnissen der hämatologischen Untersuchung in der vorliegenden Arbeit wieder. Clopidogrel verhindert den entzündungsabhängigen Abfall der Thrombozyten, in Übereinstimmung mit Ergebnissen vorheriger Studien. Die Ablehnung der Hypothese, dass Clopidogrel Einfluss auf die Expression inflammationsrelevanter Gene hat, stellt keinen Widerspruch für einen klinischen Einsatz der Thrombozytenaggregationshemmer dar. Zusammen mit den Ergebnissen vorheriger Studien, gibt es genügend Hinweise, die eine weitere Untersuchung der Thrombozytenaggregationshemmer für den Einsatz in der Klinik rechtfertigen. Zur weiteren Erforschung eines möglichen Einsatzes von Thrombozytenaggrega-

tionshemmern in der Prävention und Therapie von Sepsis und Multiorganversagen, ist eine prospektive Studie notwendig.

# Literaturverzeichnis

- Adamopoulos S, Parissis JT, Paraskevaïdis I, Karatzas D, Livanis E, Georgiadis M, Karavolias G, Mitropoulos D, Degiannis D, Kremastinos DT. 2003. Effects of growth hormone on circulating cytokine network, and left ventricular contractile performance and geometry in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J*, 24(24):2186–2196.
- Akca S, Haji-Michael P, de Mendonça A, Suter P, Levi M, Vincent JL. 2002. Time course of platelet counts in critically ill patients. *Crit Care Med*, 30(4):753–756.
- Alkharfy KM, Al-Daghri NM, Al-Attas OS, Alokail MS. 2011. The protective effect of thymoquinone against sepsis syndrome morbidity and mortality in mice. *Int Immunopharmacol*, 11(2):250–254.
- Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res*, 64(15):5245–5250.
- Andonegui G, Kerfoot SM, McNagny K, Ebbert KVJ, Patel KD, Kubes P. 2005. Platelets express functional Toll-like receptor-4. *Blood*, 106(7):2417–2423.
- Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. 2001. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*, 29(7):1303–1310.
- Aslam R, Speck ER, Kim M, Crow AR, Bang KWA, Nestel FP, Ni H, Lazarus AH, Freedman J, Semple JW. 2006. Platelet Toll-like receptor expression modulates lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia and tumor necrosis factor-alpha production in vivo. *Blood*, 107(2):637–641.
- Azab SRE, Rosseel PMJ, de Lange JJ, Groeneveld ABJ, van Strik R, van Wijk EM, Scheffer GJ. 2002. Dexamethasone decreases the pro- to anti-inflammatory cytokine ratio during cardiac surgery. *Br J Anaesth*, 88(4):496–501.
- Bahrami S, Redl H, Yao YM, Schlag G. 1996. Involvement of bacteria/endotoxin translocation in the development of multiple organ failure. *Curr Top Microbiol Immunol*, 216:239–258.

- Bateman RM, Sharpe MD, Ellis CG. 2003. Bench-to-bedside review: microvascular dysfunction in sepsis—hemodynamics, oxygen transport, and nitric oxide. *Crit Care*, 7(5):359–373.
- Bauer M, Brunkhorst F, Welte T, Gerlach H, Reinhart K. 2006. Sepsis - Aktuelle Aspekte zu Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie. *Anaesthesist*, 55:835–845.
- Bochud PY, Calandra T. 2003. Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment. *BMJ*, 326(7383):262–266.
- Bockmeyer CL, Claus RA, Budde U, Kentouche K, Schneppenheim R, Lösche W, Reinhart K, Brunkhorst FM. 2008. Inflammation-associated ADAMTS13 deficiency promotes formation of ultra-large von Willebrand factor. *Haematologica*, 93(1):137–140.
- Brogren H, Karlsson L, Andersson M, Wang L, Erlinge D, Jern S. 2004. Platelets synthesize large amounts of active plasminogen activator inhibitor 1. *Blood*, 104(13):3943–3948.
- Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M. 2005. Animal models of sepsis: setting the stage. *Nat Rev Drug Discov*, 4(10):854–865.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*, 55(4):611–622.
- CAPRIE-Steering-Committee. 1996. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). CAPRIE Steering Committee. *Lancet*, 348(9038):1329–1339.
- Chomiki N, Henry M, Alessi MC, Anfosso F, Juhan-Vague I. 1994. Plasminogen activator inhibitor-1 expression in human liver and healthy or atherosclerotic vessel walls. *Thromb Haemost*, 72(1):44–53.
- Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, Patel KD, Chakrabarti S, McAvoy E, Sinclair GD, Keys EM, Allen-Vercoe E, Devinney R, Doig CJ, Green FHY, Kubes P. 2007. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med*, 13(4):463–469.
- Cobb JP. 2001. Nitric oxide synthase inhibition as therapy for sepsis: a decade of promise. *Surg Infect (Larchmt)*, 2(2):93–100; discussion 100–1.
- Cobb JP, Buchman TG, Karl IE, Hotchkiss RS. 2000. Molecular biology of multiple organ dysfunction syndrome: injury, adaptation, and apoptosis. *Surg Infect (Larchmt)*, 1(3):207–13; discussion 214–5.

- Copeland S, Warren HS, Lowry SF, Calvano SE, Remick D, Inflammation, the Host Response to Injury Investigators. 2005. Acute inflammatory response to endotoxin in mice and humans. *Clin Diagn Lab Immunol*, 12(1):60–67.
- Czabanka M, Peter C, Martin E, Walther A. 2007. Microcirculatory endothelial dysfunction during endotoxemia—insights into pathophysiology, pathologic mechanisms and clinical relevance. *Curr Vasc Pharmacol*, 5(4):266–275.
- Czibik G. 2010. Complex role of the HIF system in cardiovascular biology. *J Mol Med*, 88(11):1101–1111.
- Declerck PJ, Alessi MC, Verstreken M, Kruithof EK, Juhan-Vague I, Collen D. 1988. Measurement of plasminogen activator inhibitor 1 in biologic fluids with a murine monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay. *Blood*, 71(1):220–225.
- Dempfle CE, Wurst M, Smolinski M, Lorenz S, Osika A, Olenik D, Fiedler F, Borggrefe M. 2004. Use of soluble fibrin antigen instead of D-dimer as fibrin-related marker may enhance the prognostic power of the ISTH overt DIC score. *Thromb Haemost*, 91(4):812–818.
- Dyson A, Singer M. 2009. Animal models of sepsis: why does preclinical efficacy fail to translate to the clinical setting? *Crit Care Med*, 37(1 Suppl):S30–S37.
- Emeis JJ, Kooistra T. 1986. Interleukin 1 and lipopolysaccharide induce an inhibitor of tissue-type plasminogen activator in vivo and in cultured endothelial cells. *J Exp Med*, 163(5):1260–1266.
- Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, Gruendling M, Huhle G, Jaschinski U, John S, Mayer K, Oppert M, Olthoff D, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Stuber F, Weiler N, Welte T, Bogatsch H, Hartog C, Loeffler M, Reinhart K. 2007. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med*, 33(4):606–618.
- Esmon CT. 2008. Crosstalk between inflammation and thrombosis. *Maturitas*, 61(1-2):122–131.
- Evangelista V, Manarini S, Dell’Elba G, Martelli N, Napoleone E, Santo AD, Lorenzet PSR. 2005. Clopidogrel inhibits platelet-leukocyte adhesion and platelet-dependent leukocyte activation. *Thromb Haemost*, 94(3):568–577.
- Feng Y, Zhao H, Xu X, Buys ES, Raher MJ, Bopassa JC, Thibault H, Scherrer-Crosbie M, Schmidt U, Chao W. 2008. Innate immune adaptor MyD88 mediates neutrophil recruitment and myocardial injury after ischemia-reperfusion in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 295(3):H1311–H1318.
- de Figueiredo LFP, Garrido AG, Nakagawa N, Sannomiya P. 2008. Experimental models of sepsis and their clinical relevance. *Shock*, 30 Suppl 1:53–59.

- Fink MP, Heard SO. 1990. Laboratory models of sepsis and septic shock. *J Surg Res*, 49(2):186–196.
- Flad HD, Brandt E. 2010. Platelet-derived chemokines: pathophysiology and therapeutic aspects. *Cell Mol Life Sci*, 67(14):2363–2386.
- Frede S, Stockmann C, Freitag P, Fandrey J. 2006. Bacterial lipopolysaccharide induces HIF-1 activation in human monocytes via p44/42 MAPK and NF-kappaB. *Biochem J*, 396(3):517–527.
- Gambim MH, de Oliveira do Carmo A, Marti L, Veríssimo-Filho S, Lopes LR, Janiszewski M. 2007. Platelet-derived exosomes induce endothelial cell apoptosis through peroxynitrite generation: experimental evidence for a novel mechanism of septic vascular dysfunction. *Crit Care*, 11(5):R107.
- Gawaz M, Fateh-Moghadam S, Pilz G, Gurland HJ, Werdan K. 1995. Platelet activation and interaction with leucocytes in patients with sepsis or multiple organ failure. *Eur J Clin Invest*, 25(11):843–851.
- Gear ARL, Camerini D. 2003. Platelet chemokines and chemokine receptors: linking hemostasis, inflammation, and host defense. *Microcirculation*, 10(3-4):335–350.
- Gebhardt A. 2010. RNA-Isolation und Erstellung von Expressionsmustern entzündungsrelevanter Gene mittels Real-Time-PCR in einem Sepsismodel der Maus: Untersuchungen zum Einfluss des Thrombozytenfunktionsinhibitor Clopidogrel [Diplomarbeit]. FH Jena.
- Gerlach H. 2006. From Roger Bone to PIRO. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*, 41(1):32–34.
- Ghosh AK, Vaughan DE. 2011. PAI-1 in Tissue Fibrosis. *J Cell Physiol*, Epub ahead of print.
- Giomarelli P, Scolletta S, Borrelli E, Biagioli B. 2003. Myocardial and lung injury after cardiopulmonary bypass: role of interleukin (IL)-10. *Ann Thorac Surg*, 76(1):117–123.
- Gonnert FA, Recknagel P, Seidel M, Jbeily N, Dahlke K, Bockmeyer CL, Winning J, Lösche W, Claus RA, Bauer M. 2011. Characteristics of clinical sepsis reflected in a reliable and reproducible rodent sepsis model. *Im Druck*.
- Graff J, Harder S, Wahl O, Scheuermann EH, Gossmann J. 2005. Anti-inflammatory effects of clopidogrel intake in renal transplant patients: effects on platelet-leukocyte interactions, platelet CD40 ligand expression, and proinflammatory biomarkers. *Clin Pharmacol Ther*, 78(5):468–476.
- Hagel S, Brunkhorst F. 2011. Sepsis. *Intensivmed*, 48:57–73.



- Hagiwara S, Iwasaka H, Hasegawa A, Oyama M, Imatomi R, Uchida T, Noguchi T. 2011. Adenosine diphosphate receptor antagonist clopidogrel sulfate attenuates LPS-induced systemic inflammation in a rat model. *Shock*, 35(3):289–292.
- Hauber H, Zabel P. 2009. Pathophysiologie und Keimpektrum der Sepsis. *Internist*, 50:779–787.
- Heffner JE. 1997. Platelet-neutrophil interactions in sepsis—platelet guilt by association? *Intensive Care Med*, 23(4):366–368.
- Heinrich PC, Behrmann I, Müller-Newen G, Schaper F, Graeve L. 1998. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J*, 334 (Pt 2):297–314.
- Heinrich PC, Castell JV, Andus T. 1990. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J*, 265(3):621–636.
- Herbert JM, Savi P. 2003. P2Y<sub>12</sub>, a new platelet ADP receptor, target of clopidogrel. *Semin Vasc Med*, 3(2):113–122.
- Huang LJ, Chuang IC, Dong HP, Yang RC. 2011. Hypoxia-Inducible Factor-1  $\alpha$  Regulates the Expression of the Mitochondrial ATPase Inhibitor Protein (IF1) in Rat Liver. *Shock*, Epub ahead of print.
- Huber K, Christ G, Wojta J, Gulba D. 2001. Plasminogen activator inhibitor type-1 in cardiovascular disease. Status report 2001. *Thromb Res*, 103 Suppl 1:S7–19.
- Hultman K, Blomstrand F, Nilsson M, Wilhelmsson U, Malmgren K, Pekny M, Kousted T, Jern C, Tjärnlund-Wolf A. 2010. Expression of plasminogen activator inhibitor-1 and protease nexin-1 in human astrocytes: Response to injury-related factors. *J Neurosci Res*, 88(11):2441–2449.
- Ikonomidis I, Andreotti F, Economou E, Stefanadis C, Toutouzas P, Nihoyannopoulos P. 1999. Increased proinflammatory cytokines in patients with chronic stable angina and their reduction by aspirin. *Circulation*, 100(8):793–798.
- Jones SA, Richards PJ, Scheller J, Rose-John S. 2005. IL-6 Transsignaling: The In Vivo Consequences. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 25:241–253.
- Jurk K, Kehrel BE. 2008. The role of platelets in haemostasis, thrombosis, immune defense and inflammation. *Dtsch Med Wochenschr*, 133(21):1130–1135.
- Karima R, Matsumoto S, Higashi H, Matsushima K. 1999. The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. *Mol Med Today*, 5(3):123–132.
- Kaur K, Dhingra S, Slezak J, Sharma AK, Bajaj A, Singal PK. 2009. Biology of TNF $\alpha$  and IL-10, and their imbalance in heart failure. *Heart Fail Rev*, 14(2):113–123.

- Kharbanda RK, Walton B, Allen M, Klein N, Hingorani AD, MacAllister RJ, Vallance P. 2002. Prevention of inflammation-induced endothelial dysfunction: a novel vasculo-protective action of aspirin. *Circulation*, 105(22):2600–2604.
- Klinger MH, Wilhelm D, Bubel S, Sticherling M, Schröder JM, Kühnel W. 1995. Immunocytochemical localization of the chemokines RANTES and MIP-1 alpha within human platelets and their release during storage. *Int Arch Allergy Immunol*, 107(4):541–546.
- Koedel U, Klein M, Pfister HW. 2010. New understandings on the pathophysiology of bacterial meningitis. *Curr Opin Infect Dis*, 23(3):217–223.
- Koedel U, Merbt UM, Schmidt C, Angele B, Popp B, Wagner H, Pfister HW, Kirschning CJ. 2007. Acute brain injury triggers MyD88-dependent, TLR2/4-independent inflammatory responses. *Am J Pathol*, 171(1):200–213.
- Kreymann G, Wolf M. 1996. History and definition of sepsis—do we need new terminology? *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*, 31(1):9–14.
- Kuckleburg CJ, Tiwari R, Czuprynski CJ. 2008. Endothelial cell apoptosis induced by bacteria-activated platelets requires caspase-8 and -9 and generation of reactive oxygen species. *Thromb Haemost*, 99(2):363–372.
- Levi M. 2005. Platelets in sepsis. *Hematology*, 10 Suppl 1:129–131.
- Levi M. 2010. The coagulant response in sepsis and inflammation. *Hamostaseologie*, 30(1):10–2, 14–6.
- Levi M, Keller TT, van Gorp E, ten Cate H. 2003. Infection and inflammation and the coagulation system. *Cardiovasc Res*, 60(1):26–39.
- Levi M, Schultz M, van der Poll T. 2010. Disseminated intravascular coagulation in infectious disease. *Semin Thromb Hemost*, 36(4):367–377.
- Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G, Conference ISD. 2003. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med*, 29(4):530–538.
- Li K, Brownley A. 2010. Primer design for RT-PCR. *Methods Mol Biol*, 630:271–299.
- Li Z, Yang F, Dunn S, Gross AK, Smyth SS. 2011. Platelets as immune mediators: their role in host defense responses and sepsis. *Thromb Res*, 127(3):184–188.
- Lipcsey M, Larsson A, Olovsson M, Sjölin J, Eriksson MB. 2005. Early endotoxin-mediated haemostatic and inflammatory responses in the clopidogrel-treated pig. *Platelets*, 16(7):408–414.

- Loskutoff DJ, Ny T, Sawdey M, Lawrence D. 1986. Fibrinolytic system of cultured endothelial cells: regulation by plasminogen activator inhibitor. *J Cell Biochem*, 32(4):273–280.
- Lösche W, Scholz T, Temmler U, Oberle V, Claus RA. 2004. Platelet-derived microvesicles transfer tissue factor to monocytes but not to neutrophils. *Platelets*, 15(2):109–115.
- Maeda Y, Matsumoto M, Hori O, Kuwabara K, Ogawa S, Yan SD, Ohtsuki T, Kinoshita T, Kamada T, Stern DM. 1994. Hypoxia/reoxygenation-mediated induction of astrocyte interleukin 6: a paracrine mechanism potentially enhancing neuron survival. *J Exp Med*, 180(6):2297–2308.
- Marchant A, Devière J, Byl B, Groote DD, Vincent JL, Goldman M. 1994. Interleukin-10 production during septicaemia. *Lancet*, 343(8899):707–708.
- Marshall JC, Christou NV, Meakins JL. 1993. The gastrointestinal tract. The „undrained abscess“ of multiple organ failure. *Ann Surg*, 218(2):111–119.
- Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. 2003. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*, 348(16):1546–1554.
- Mavrommatis AC, Theodoridis T, Orfanidou A, Roussos C, Christopoulou-Kokkinou V, Zakynthinos S. 2000. Coagulation system and platelets are fully activated in uncomplicated sepsis. *Crit Care Med*, 28(2):451–457.
- McNicol A, Israels SJ. 2003. Platelets and anti-platelet therapy. *J Pharmacol Sci*, 93(4):381–396.
- Ohtaki Y, Shimauchi H, Yokochi T, Takada H, Endo Y. 2002. In vivo platelet response to lipopolysaccharide in mice: proposed method for evaluating new antiplatelet drugs. *Thromb Res*, 108(5-6):303–309.
- O’Neill LAJ, Bowie AG. 2007. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 7(5):353–364.
- Pannen BH, Robotham JL. 1995. The acute-phase response. *New Horiz*, 3(2):183–197.
- Paxian M, Bauer I, Rensing H, Jaeschke H, Mautes AEM, Kolb SA, Wolf B, Stockhausen A, Jeblick S, Bauer M. 2003. Recovery of hepatocellular ATP and „pericentral apoptosis“ after hemorrhage and resuscitation. *FASEB J*, 17(9):993–1002.
- Peerschke EI, Yin W, Ghebrehiwet B. 2010. Complement activation on platelets: implications for vascular inflammation and thrombosis. *Mol Immunol*, 47(13):2170–2175.
- Peerschke EIB, Yin W, Ghebrehiwet B. 2008. Platelet mediated complement activation. *Adv Exp Med Biol*, 632:81–91.

- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29(9):e45.
- Piper RD, Cook DJ, Bone RC, Sibbald WJ. 1996. Introducing Critical Appraisal to studies of animal models investigating novel therapies in sepsis. *Crit Care Med*, 24(12):2059–2070.
- Power CA, Clemetson JM, Clemetson KJ, Wells TN. 1995. Chemokine and chemokine receptor mRNA expression in human platelets. *Cytokine*, 7(6):479–482.
- Pu Q, Wiel E, Corseaux D, Bordet R, Azrin MA, Ezekowitz MD, Lund N, Jude B, Vallet B. 2001. Beneficial effect of glycoprotein IIb/IIIa inhibitor (AZ-1) on endothelium in *Escherichia coli* endotoxin-induced shock. *Crit Care Med*, 29(6):1181–1188.
- Reinhart K, Bayer O, Brunkhorst F, Meisner M. 2002. Markers of endothelial damage in organ dysfunction and sepsis. *Crit Care Med*, 30(5 Suppl):S302–S312.
- Reinhart K, Brunkhorst FM, Bone HG, Bardutzky J, Dempfle CE, Forst H, Gastmeier P, Gerlach H, Gründling M, John S, Kern W, Kreymann G, Krüger W, Kujath P, Marggraf G, Martin J, Mayer K, Meier-Hellmann A, Oppert M, Putensen C, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Seifert H, Spies C, Stüber F, Weiler N, Weimann A, Werdan K, Welte T, Society GS, of Intensive Care GIA, Medicine E. 2010. Prevention, diagnosis, therapy and follow-up care of sepsis: 1st revision of S-2k guidelines of the German Sepsis Society (Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG)) and the German Interdisciplinary Association of Intensive Care and Emergency Medicine (Deutsche Interdisziplinäre Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI)). *Ger Med Sci*, 8:Doc14.
- Remick DG, Newcomb DE, Bolgos GL, Call DR. 2000. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. *Shock*, 13(2):110–116.
- Remick DG, Ward PA. 2005. Evaluation of endotoxin models for the study of sepsis. *Shock*, 24 Suppl 1:7–11.
- Rensing H, Bauer I, Zhang JX, Paxian M, Pannen BHJ, Yokoyama Y, Clemens MG, Bauer M. 2002. Endothelin-1 and heme oxygenase-1 as modulators of sinusoidal tone in the stress-exposed rat liver. *Hepatology*, 36(6):1453–1465.
- Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. 1997. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med*, 336(14):973–979.
- Riedemann NC, Guo RF, Ward PA. 2003. The enigma of sepsis. *J Clin Invest*, 112(4):460–467.
- Rosmorduc O, Housset C. 2010. Hypoxia: a link between fibrogenesis, angiogenesis, and carcinogenesis in liver disease. *Semin Liver Dis*, 30(3):258–270.

- Russwurm S, Vickers J, Meier-Hellmann A, Spangenberg P, Bredle D, Reinhart K, Lösche W. 2002. Platelet and leukocyte activation correlate with the severity of septic organ dysfunction. *Shock*, 17(4):263–268.
- Samad F, Yamamoto K, Loskutoff DJ. 1996. Distribution and regulation of plasminogen activator inhibitor-1 in murine adipose tissue in vivo. Induction by tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide. *J Clin Invest*, 97(1):37–46.
- Sarrafzadeh A, Schlenk F, Gericke C, Vajkoczy P. 2010. Relevance of cerebral interleukin-6 after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurocrit Care*, 13(3):339–346.
- Sawdey M, Podor TJ, Loskutoff DJ. 1989. Regulation of type 1 plasminogen activator inhibitor gene expression in cultured bovine aortic endothelial cells. Induction by transforming growth factor-beta, lipopolysaccharide, and tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem*, 264(18):10396–10401.
- Scharte M, Han X, Uchiyama T, Tawadrous Z, Delude RL, Fink MP. 2006. LPS increases hepatic HIF-1alpha protein and expression of the HIF-1-dependent gene aldolase A in rats. *J Surg Res*, 135(2):262–267.
- Scholz T, Temmler U, Krause S, Heptinstall S, Lösche W. 2002. Transfer of tissue factor from platelets to monocytes: role of platelet-derived microvesicles and CD62P. *Thromb Haemost*, 88(6):1033–1038.
- Schuett H, Luchtefeld M, Grothusen C, Grote K, Schieffer B. 2009. How much is too much? Interleukin-6 and its signalling in atherosclerosis. *Thromb Haemost*, 102(2):215–222.
- Seidel M, Winning J, Claus RA, Bauer M, Lösche W. 2009. Beneficial effect of clopidogrel in a mouse model of polymicrobial sepsis. *J Thromb Haemost*, 7(6):1030–1032.
- Seki E, Brenner DA. 2008. Toll-like receptors and adaptor molecules in liver disease: update. *Hepatology*, 48(1):322–335.
- Semenza GL. 2009. Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiology (Bethesda)*, 24:97–106.
- Semple JW, Italiano JE, Freedman J. 2011. Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol*, 11(4):264–274.
- Setzer F, Oberle V, Bläss M, Möller E, Russwurm S, Deigner HP, Claus RA, Bauer M, Reinhart K, Lösche W. 2006. Platelet-derived microvesicles induce differential gene expression in monocytic cells: a DNA microarray study. *Platelets*, 17(8):571–576.
- Sharma B, Sharma M, Majumder M, Steier W, Sangal A, Kalawar M. 2007. Thrombocytopenia in septic shock patients—a prospective observational study of incidence, risk factors and correlation with clinical outcome. *Anaesth Intensive Care*, 35(6):874–880.

- Shebuski RJ, Kilgore KS. 2002. Role of inflammatory mediators in thrombogenesis. *J Pharmacol Exp Ther*, 300(3):729–735.
- Smith LH, Coats SR, Qin H, Petrie MS, Covington JW, Su M, Eren M, Vaughan DE. 2004. Differential and opposing regulation of PAI-1 promoter activity by estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta in endothelial cells. *Circ Res*, 95(3):269–275.
- Smyth SS, McEver RP, Weyrich AS, Morrell CN, Hoffman MR, Arepally GM, French PA, Dauerman HL, Becker RC, Participants PC. 2009. Platelet functions beyond hemostasis. *J Thromb Haemost*, 7(11):1759–1766.
- Sprengers E, Kluft C. 1987. Plasminogen activator inhibitors. *Blood*, 69:381–387.
- Steinhubl SR, Badimon JJ, Bhatt DL, Herbert JM, Lüscher TF. 2007. Clinical evidence for anti-inflammatory effects of antiplatelet therapy in patients with atherothrombotic disease. *Vasc Med*, 12(2):113–122.
- Storey RF. 2006. Biology and pharmacology of the platelet P2Y<sub>12</sub> receptor. *Curr Pharm Des*, 12(10):1255–1259.
- Sutter CH, Laughner E, Semenza GL. 2000. Hypoxia-inducible factor 1alpha protein expression is controlled by oxygen-regulated ubiquitination that is disrupted by deletions and missense mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(9):4748–4753.
- Taga T, Kishimoto T. 1997. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol*, 15:797–819.
- Tarkowski E, Rosengren L, Blomstrand C, Wikkelso C, Jensen C, Ekholm S, Tarkowski A. 1995. Early intrathecal production of interleukin-6 predicts the size of brain lesion in stroke. *Stroke*, 26(8):1393–1398.
- Tassell BWV, Seropian IM, Toldo S, Salloum FN, Smithson L, Varma A, Hoke NN, Gelwix C, Chau V, Abbate A. 2010. Pharmacologic inhibition of myeloid differentiation factor 88 (MyD88) prevents left ventricular dilation and hypertrophy after experimental acute myocardial infarction in the mouse. *J Cardiovasc Pharmacol*, 55(4):385–390.
- Taylor FB, Coller BS, Chang AC, Peer G, Jordan R, Engellener W, Esmon CT. 1997. 7E3 F(ab')<sub>2</sub>, a monoclonal antibody to the platelet GPIIb/IIIa receptor, protects against microangiopathic hemolytic anemia and microvascular thrombotic renal failure in baboons treated with C4b binding protein and a sublethal infusion of *Escherichia coli*. *Blood*, 89(11):4078–4084.
- The ACCP/SCCM Consensus Committee. 1992. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med*, 20(6):864–874.

- Totani L, Evangelista V. 2010. Platelet-leukocyte interactions in cardiovascular disease and beyond. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30(12):2357–2361.
- Tozaki-Saitoh H, Tsuda M, Miyata H, Ueda K, Kohsaka S, Inoue K. 2008. P2Y12 receptors in spinal microglia are required for neuropathic pain after peripheral nerve injury. *J Neurosci*, 28(19):4949–4956.
- Tu X, Chen X, Xie Y, Shi S, Wang J, Chen Y, Li J. 2008. Anti-inflammatory renoprotective effect of clopidogrel and irbesartan in chronic renal injury. *J Am Soc Nephrol*, 19(1):77–83.
- Vandesompele J, Preter KD, Pattyn F, Poppe B, Roy NV, Paepe AD, Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, 3(7):RESEARCH0034.
- Vandijck DM, Blot SI, Waele JJD, Hoste EA, Vandewoude KH, Decruyenaere JM. 2010. Thrombocytopenia and outcome in critically ill patients with bloodstream infection. *Heart Lung*, 39(1):21–26.
- Vaughan DE. 2005. PAI-1 and atherothrombosis. *J Thromb Haemost*, 3(8):1879–1883.
- Villa P, Sartor G, Angelini M, Sironi M, Conni M, Gnocchi P, Isetta AM, Grau G, Buurman W, van Tits LJ. 1995. Pattern of cytokines and pharmacomodulation in sepsis induced by cecal ligation and puncture compared with that induced by endotoxin. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2(5):549–553.
- Vincent JL, Yagushi A, Pradier O. 2002. Platelet function in sepsis. *Crit Care Med*, 30(5 Suppl):S313–S317.
- Vitkovic L, Maeda S, Sternberg E. 2001. Anti-inflammatory cytokines: expression and action in the brain. *Neuroimmunomodulation*, 9(6):295–312.
- Walther A, Czabanka M, Gebhard MM, Martin E. 2004. Glycoprotein IIB/IIIa-inhibition and microcirculatory alterations during experimental endotoxemia—an intravital microscopic study in the rat. *Microcirculation*, 11(1):79–88.
- Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. 1995. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(12):5510–5514.
- Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L, Manogue KR, Faist E, Abraham E, Andersson J, Andersson U, Molina PE, Abumrad NN, Sama A, Tracey KJ. 1999. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science*, 285(5425):248–251.
- Wang X, Stridh L, Li W, Dean J, Elmgren A, Gan L, Eriksson K, Hagberg H, Mallard C. 2009. Lipopolysaccharide sensitizes neonatal hypoxic-ischemic brain injury in a MyD88-dependent manner. *J Immunol*, 183(11):7471–7477.

- Weighardt H, Holzmann B. 2007. Role of Toll-like receptor responses for sepsis pathogenesis. *Immunobiology*, 212(9-10):715–722.
- Weyrich AS, Lindemann S, Zimmerman GA. 2003. The evolving role of platelets in inflammation. *J Thromb Haemost*, 1(9):1897–1905.
- Weyrich AS, Zimmerman GA. 2004. Platelets: signaling cells in the immune continuum. *Trends Immunol*, 25(9):489–495.
- Winning J, Neumann J, Kohl M, Claus RA, Reinhart K, Bauer M, Lösche W. 2010. Antiplatelet drugs and outcome in mixed admissions to an intensive care unit. *Crit Care Med*, 38(1):32–37.
- Winning J, Reichel J, Eisenhut Y, Hamacher J, Kohl M, Deigner HP, Claus RA, Bauer M, Lösche W. 2009. Anti-platelet drugs and outcome in severe infection: clinical impact and underlying mechanisms. *Platelets*, 20(1):50–57.
- Wu G, Li X, Deng X, Fan X, Wang S, Shen Z, Xi T. 2011. Protective effects of antimicrobial peptide S-thanatin against endotoxic shock in mice introduced by LPS. *Peptides*, 32(2):353–357.
- Yeh SH, Hung JJ, Gean PW, Chang WC. 2008. Hypoxia-inducible factor-1alpha protects cultured cortical neurons from lipopolysaccharide-induced cell death via regulation of NR1 expression. *J Neurosci*, 28(52):14259–14270.
- Yudkin JS, Kumari M, Humphries SE, Mohamed-Ali V. 2000. Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis*, 148(2):209–214.
- Yusuf S, Zhao F, Mehta SR, Chrolavicius S, Tognoni G, Fox KK, in Unstable Angina to Prevent Recurrent Events Trial Investigators C. 2001. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N Engl J Med*, 345(7):494–502.
- Zhai Y, da Shen X, O’Connell R, Gao F, Lassman C, Busuttil RW, Cheng G, Kupiec-Weglinski JW. 2004. Cutting edge: TLR4 activation mediates liver ischemia/reperfusion inflammatory response via IFN regulatory factor 3-dependent MyD88-independent pathway. *J Immunol*, 173(12):7115–7119.
- Zhang LJ, Wang XZ. 2006. Interleukin-10 and chronic liver disease. *World J Gastroenterol*, 12(11):1681–1685.
- Zielinski T, Wachowicz B, Saluk-Juszczak J, Kaca W. 2002. Polysaccharide part of *Proteus mirabilis* lipopolysaccharide may be responsible for the stimulation of platelet adhesion to collagen. *Platelets*, 13(7):419–424.



- Zillmann A, Luther T, Müller I, Kotzsch M, Spannagl M, Kauke T, Oelschlägel U, Zahler S, Engelmann B. 2001. Platelet-associated tissue factor contributes to the collagen-triggered activation of blood coagulation. *Biochem Biophys Res Commun*, 281(2):603–609.
- Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM, Stafforini DM. 2002. The platelet-activating factor signaling system and its regulators in syndromes of inflammation and thrombosis. *Crit Care Med*, 30(5 Suppl):S294–S301.
- Zinkernagel AS, Johnson RS, Nizet V. 2007. Hypoxia inducible factor (HIF) function in innate immunity and infection. *J Mol Med*, 85(12):1339–1346.

# Anhang

## Danksagung

Ich danke

- Herrn PD Dr. med. Wolfgang Lösche für die Vergabe des Promotionsthemas, seine wertvollen fachlichen Anregungen, seine umfangreiche Unterstützung und die aufmunternden Worte die entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.
- Herrn PD. Dr. rer. nat. Ralf Claus für die Möglichkeit meine Dissertation im Funktionsbereich der Experimentellen Anästhesiologie der Klinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie der Universitätsklinik Jena anzufertigen.
- den Herren Dr. rer. nat. Peter Recknagel, Dipl. Ing. Florian Glaser, Dr. rer. nat. Matthias Sieber und Frau Edith Walther für die methodische Betreuung und Hilfestellung bei allen aufkommenden Problemen.
- Herrn Dipl. Ing. Alexander Gebhardt für die gute Zusammenarbeit und Hilfe bei der Durchführung der experimentellen Arbeiten, sowie Frau Madlen Seidel für die Überlassung der Organpräparate.
- Herrn Dr. rer. pol. Thomas Lehmann vom Institut für Medizinische Statistik, Informatik und Dokumentation des Universitätsklinikums Jena für die Hilfe bei der Auswahl und Anwendung der statistischen Methoden.
- allen wissenschaftlichen Mitarbeitern, MTAs, Doktoranden und Diplomanden des Funktionsbereich der Experimentellen Anästhesiologie für die kollegiale und stets freundliche Zusammenarbeit.
- meinen Eltern.

# Tabellarischer Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Friedrich Wilhelm Weber  
Geburtsdatum: 24. Juni 1987  
Geburtsort: Kreuztal  
Staatsangehörigkeit: Deutsch  
Anschrift: Jenertal 1, 07749 Jena  
Familienstand: ledig

## Schulbildung

08/1993 – 06/1997 Katholische Grundschule Hohenstein, Olpe  
08/1997 – 06/2003 Städtisches Gymnasium Olpe  
08/2003 – 06/2004 Banff Mountain Academy, Alberta (Kanada)  
*Abschluss: Alberta Highschool Diploma*  
08/2004 – 06/2006 Städtisches Gymnasium Olpe  
*Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (1,8)*

## Studium

WS 2006/07 – SS 08 Universität des Saarlandes  
Studium der Humanmedizin  
WS 2006/07 – SS 08 Semmelweis Universität Budapest, Ungarn  
Studium der Humanmedizin  
*Abschluss: 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (1,1),  
anerkannt durch LPA Saarbrücken*  
Seit WS 2008/09 Friedrich-Schiller-Universität Jena  
Studium der Humanmedizin

## Praxiserfahrung

06 – 08/2006 + 08/2007 Pflegepraktikum – St. Martinus Hospital Olpe  
03/2009 Famulatur Innere Medizin – St. Josephs Jospital Lennestadt  
02/2010 Famulatur Praxis für Allgemeinmedizin – Olpe  
07/2010 Famulatur Anästhesiologie – Gemeinschaftskrankenhaus Bonn  
09/2010 Famulatur Praxis für Chirurgie – Siegen

## Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. med. Wolfgang Lösche, Dr. rer. nat. Peter Recknagel, Dr. rer. pol. Thomas Lehmann, Dipl. Ing. Alexander Gebhard, Dipl. Ing. Florian Glaser, Dr. rer. nat. Matthias Sieber, Madlen Seidel und Edith Walther,
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
- dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und
- dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, am 18. Dezember 2012

Friedrich Wilhelm Weber, Verfasser