

Aus der

Universitätsklinik für Anaesthesiologie und Intensivmedizin

**Einfluss thrombozytärer Proteine auf eine akute  
Lungenschädigung in zwei murinen in-vivo Modellen**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Dignus, Philipp David**

**2022**



Aus der

Universitätsklinik für Anaesthesiologie und Intensivmedizin

**Einfluss thrombozytärer Proteine auf eine akute  
Lungenschädigung in zwei murinen in-vivo Modellen**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Dignus, Philipp David**

**2022**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. P. Rosenberger  
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. F. Grünebach

Tag der Disputation: 08.09.2022

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>8</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>11</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>12</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>14</b>
1.1 Acute respiratory distress syndrome.....	14
1.1.1 Ätiologie des ARDS.....	15
1.1.2 Epidemiologie des ARDS .....	16
1.1.3 Pathologie des ARDS.....	16
1.1.4 Therapie des ARDS.....	18
1.2 Pathophysiologie des ARDS.....	19
1.2.1 Aktivierung durch PAMPs und DAMPs.....	21
1.2.2 Endotheliale Aktivierung.....	22
1.2.3 Leukozytenauswanderung.....	23
1.3 Rolle der Thrombozyten im ARDS.....	27
1.3.1 Interaktion zwischen Thrombozyten und PMN .....	27
1.3.2 Plättchen-Neutrophilen-Komplexe .....	28
1.3.3 Untersuchungen zu Thrombozyten im akuten Lungenschaden.	31
1.4 Ziel der Arbeit .....	33
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>34</b>
2.1 Materialliste.....	34
2.1.1 Allgemeine Gerätschaften .....	34
2.1.2 Allgemeine Verbrauchsmaterialien.....	35
2.1.3 Chemikalien.....	36
2.1.4 Tiermodelle.....	37
2.1.5 Zellzahlmessung .....	39
2.1.6 ELISA .....	40
2.1.7 Messung Protein und Myeloperoxidase.....	41
2.1.8 Histologie.....	41
2.1.9 Immunhistochemie .....	42
2.2 Versuchstiere.....	43
2.3 Methoden.....	44

2.3.1	Lipopolysaccharid-Inhalations-Modell .....	44
2.3.2	Modell des beatmungsinduzierten Lungenschadens.....	45
2.3.3	Probenentnahme .....	46
2.3.4	Zellzahl in der BAL .....	47
2.3.5	Zytokinkonzentrationen in der BAL.....	47
2.3.6	Proteinkonzentration in der BAL.....	49
2.3.7	Myeloperoxidase-Konzentration in der BAL .....	49
2.3.8	Histologie.....	50
2.3.9	Immunhistochemische Färbung .....	50
2.4	Datenauswertung und Statistische Tests.....	51
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>52</b>
3.1	Einfluss von GPIb .....	52
3.1.1	LPS-Inhalations-Modell .....	52
3.1.2	VILI-Modell .....	56
3.2	Einfluss des von-Willebrand-Faktor .....	60
3.2.1	LPS-Inhalations-Modell .....	60
3.2.2	VILI-Modell .....	65
3.3	Einfluss von GPIIb/IIIa .....	70
3.3.1	LPS-Inhalations-Modell .....	70
3.3.2	VILI-Modell .....	75
3.4	Einfluss von P-Selektin .....	80
3.4.1	LPS-Inhalations-Modell .....	80
3.4.2	VILI-Modell .....	84
3.5	Einfluss von GPVI.....	88
3.5.1	LPS-Inhalations-Modell .....	88
3.5.2	VILI-Modell .....	92
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>97</b>
4.1	Diskussion der Methoden .....	97
4.2	Diskussion der Ergebnisse .....	101
4.2.1	Einfluss von GPIb.....	101
4.2.2	Einfluss von vWF.....	103
4.2.3	Einfluss von GPIIb/IIIa.....	104
4.2.4	Einfluss von P-Selektin.....	106

4.2.5	Einfluss von GPVI .....	108
4.2.6	Diskussion der Zytokinkonzentrationen .....	110
4.2.7	Diskussion der Protein-Konzentrationen .....	111
4.3	Schlussfolgerung der Diskussion .....	112
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>113</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>115</b>
<b>7</b>	<b>Erklärung zum Eigenanteil.....</b>	<b>130</b>
<b>8</b>	<b>Veröffentlichungen.....</b>	<b>131</b>

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> (A) Selektinvermittelte Annäherung (B) Feste Bindung durch Integrine.....	29
<b>Abbildung 2:</b> Bindungen zwischen Endothel und PMN.....	30
<b>Abbildung 3:</b> Thrombozyten als Brücke zwischen Endothel und PMN .....	31
<b>Abbildung 4:</b> Versuchsablauf LPS-Modell .....	45
<b>Abbildung 5:</b> Versuchsablauf VILI-Modell.....	46
<b>Abbildung 6:</b> Zellzahl in BAL (A), MPO-Konzentration in BAL (B) und PNC-Anzahl in immunhistochemischen Schnitten (C) nach NaCl- bzw. LPS-Inhalation in WT- und GPIb-IL-4tg-Tieren .....	52
<b>Abbildung 7:</b> Immunhistochemische Färbung von Lungenschnitten nach NaCl- bzw. LPS-Inhalation in WT- und GPIb-IL-4tg-Tieren. Markierung der PMNs mit einem Ly6G-Antikörper und der Thrombozyten mit einem CD41-Antikörper; (A) WT + NaCl (B) WT + LPS (C) GPIb-IL-4tg + NaCl (D) GPIb-IL-4tg + LPS .....	53
<b>Abbildung 8:</b> Konzentration von IL-6 (A), TNF- $\alpha$ (B), IL-1 $\beta$ (C) und Protein (D) in der BAL nach NaCl- bzw. LPS-Inhalation in WT- und GPIb-IL-4tg-Tieren .....	55
<b>Abbildung 9:</b> Zellzahl in BAL (A), MPO-Konzentration in BAL (B) und PNC-Anzahl in immunhistochemischen Schnitten (C) nach Ventilation mit 15 bzw. 45 mbar in WT- und GPIb-IL-4tg-Tieren .....	56
<b>Abbildung 10:</b> Immunhistochemische Färbung von Lungenschnitten nach Ventilation mit 15 bzw. 45 mbar in WT- und GPIb-IL-4tg-Tieren. Markierung der PMNs mit einem Ly6G-Antikörper und der Thrombozyten mit einem CD41-Antikörper; (A) WT mit 15 mbar (B) WT mit 45 mbar (C) GPIb-IL-4tg mit 15mbar (D) GPIb-IL-4tg mit 45mbar.....	57
<b>Abbildung 11:</b> Konzentration von IL-6 (A), TNF- $\alpha$ (B), IL-1 $\beta$ (C) und Protein (D) in der BAL nach Ventilation mit 15 bzw. 45 mbar in WT- und GPIb-IL-4tg-Tieren .....	59
<b>Abbildung 12:</b> Zellzahl in BAL (A), MPO-Konzentration in BAL (B) und PNC-Anzahl in immunhistochemischen Schnitten (C) nach NaCl- bzw. LPS-Inhalation in WT- und vWF <sup>-/-</sup> -Tieren.....	60
<b>Abbildung 13:</b> Immunhistochemische Färbung von Lungenschnitten nach NaCl- bzw. LPS-Inhalation in WT und vWF <sup>-/-</sup> -Tieren. Markierung der PMNs mit einem Ly6G-Antikörper und der Thrombozyten mit einem CD41-Antikörper; (A) WT + NaCl (B) WT + LPS (C) vWF <sup>-/-</sup> + NaCl (D) vWF <sup>-/-</sup> + LPS.....	62
<b>Abbildung 14:</b> Konzentration von IL-6 (A), TNF- $\alpha$ (B), IL-1 $\beta$ (C) und Protein (D) in der BAL nach NaCl- bzw. LPS-Inhalation in WT- und vWF <sup>-/-</sup> -Tieren.....	64

<b>Abbildung 15:</b> Zellzahl in BAL (A), MPO-Konzentration in BAL (B) und PNC-Anzahl in immunhistochemischen Schnitten (C) nach Ventilation mit 15 bzw. 45 mbar in WT- und vWF <sup>-/-</sup> -Tieren .....	65
<b>Abbildung 16:</b> Immunhistochemische Färbung von Lungenschnitten nach Ventilation mit 15 bzw. 45 mbar in WT- und vWF <sup>-/-</sup> -Tieren. Markierung der PMNs mit einem Ly6G-Antikörper und der Thrombozyten mit einem CD41-Antikörper; (A) WT mit 15 mbar (B) WT mit 45 mbar (C) vWF <sup>-/-</sup> mit 15 mbar (D) vWF <sup>-/-</sup> mit 45 mbar .....	67
<b>Abbildung 17:</b> Konzentration von IL-6 (A), TNF- $\alpha$ (B), IL-1 $\beta$ (C) und Protein (D) in der BAL nach Ventilation mit 15 bzw. 45 mbar in WT- und vWF <sup>-/-</sup> -Tieren.....	69
<b>Abbildung 18:</b> Zellzahl in BAL (A), MPO-Konzentration in BAL (B) und PNC-Anzahl in immunhistochemischen Schnitten (C) nach NaCl- bzw. LPS-Inhalation in WT- und CD41-YFP-Tieren.....	70
<b>Abbildung 19:</b> Immunhistochemische Färbung von Lungenschnitten nach NaCl- bzw. LPS-Inhalation in WT- und CD41-YFP-Tieren. Markierung der PMNs mit einem Ly6G-Antikörper und der Thrombozyten mit einem CD41-Antikörper; (A) WT + NaCl (B) WT + LPS (C) CD41-YFP + NaCl (D) CD41-YFP + LPS.....	72
<b>Abbildung 20:</b> Konzentrationen von IL-6 (A), TNF- $\alpha$ (B), IL-1 $\beta$ (C) und Protein (D) in der BAL nach NaCl- bzw. LPS-Inhalation in WT- und CD41-YFP-Tieren .....	74
<b>Abbildung 21:</b> Zellzahl in BAL (A), MPO-Konzentration in BAL (B) und PNC-Anzahl in immunhistochemischen Schnitten (C) nach Ventilation mit 15 bzw. 45 mbar in WT- und CD41-YFP-Tieren.....	75
<b>Abbildung 22:</b> Immunhistochemische Färbung von Lungenschnitten nach Ventilation mit 15 bzw. 45 mbar in WT- und CD41-YFP-Tieren. Markierung der PMNs mit einem Ly6G-Antikörper und der Thrombozyten mit einem CD41-Antikörper; (A) WT mit 15 mbar (B) WT mit 45 mbar (C) CD41-YFP mit 15 mbar (D) CD41-YFP mit 45 mbar.....	77
<b>Abbildung 23:</b> Konzentration von IL-6 (A), TNF- $\alpha$ (B), IL-1 $\beta$ (C) und Protein (D) in der BAL nach Ventilation mit 15 bzw. 45 mbar in WT- und CD41-YFP-Tieren .....	79
<b>Abbildung 24:</b> Zellzahl in BAL (A), MPO-Konzentration in BAL (B) und PNC-Anzahl in immunhistochemischen Schnitten (C) nach NaCl- bzw. LPS-Inhalation in WT- und CD62P <sup>-/-</sup> -Tieren .....	80
<b>Abbildung 25:</b> Immunhistochemische Färbung von Lungenschnitten nach NaCl- bzw. LPS-Inhalation in WT- und CD62P <sup>-/-</sup> -Tieren. Markierung der PMNs mit einem Ly6G-Antikörper und der Thrombozyten mit einem CD41-Antikörper; (A) WT + NaCl (B) WT + LPS (C) CD62P <sup>-/-</sup> + NaCl (D) CD62P <sup>-/-</sup> + LPS .....	81

<b>Abbildung 26:</b> Konzentration von IL-6 (A), TNF- $\alpha$ (B), IL-1 $\beta$ (C) und Protein (D) in der BAL nach NaCl- bzw. LPS-Inhalation in WT- und CD62P <sup>-/-</sup> -Tieren.....	83
<b>Abbildung 27:</b> Zellzahl in BAL (A), MPO-Konzentration in BAL (B) und PNC-Anzahl in immunhistochemischen Schnitten (C) nach Ventilation mit 15 bzw. 45 mbar in WT- und CD62P <sup>-/-</sup> -Tieren .....	84
<b>Abbildung 28:</b> Immunhistochemische Färbung von Lungenschnitten nach Ventilation mit 15 bzw. 45 mbar in WT- und CD62P <sup>-/-</sup> -Tieren. Markierung der PMNs mit einem Ly6G-Antikörper und der Thrombozyten mit einem CD41-Antikörper; (A) WT mit 15 mbar (B) WT mit 45 mbar (C) CD62P <sup>-/-</sup> mit 15 mbar (D) CD62P <sup>-/-</sup> mit 45 mbar ....	86
<b>Abbildung 29:</b> Konzentration von IL-6 (A), TNF- $\alpha$ (B), IL-1 $\beta$ (C) und Protein (D) in der BAL nach Ventilation mit 15 bzw. 45 mbar in WT- und CD62P <sup>-/-</sup> -Tieren.....	87
<b>Abbildung 30:</b> Zellzahl in BAL (A), MPO-Konzentration in BAL (B) und PNC-Anzahl in immunhistochemischen Schnitten (C) nach NaCl- bzw. LPS-Inhalation in WT- und GPVI <sup>-/-</sup> -Tieren .....	88
<b>Abbildung 31:</b> Immunhistochemische Färbung von Lungenschnitten nach NaCl- bzw. LPS-Inhalation in WT- und GPVI <sup>-/-</sup> -Tieren. Markierung der PMNs mit einem Ly6G-Antikörper und der Thrombozyten mit einem CD41-Antikörper; (A) WT + NaCl (B) WT + LPS (C) GPVI <sup>-/-</sup> + NaCl (D) GPVI <sup>-/-</sup> + LPS .....	90
<b>Abbildung 32:</b> Konzentration von IL-6 (A), TNF- $\alpha$ (B), IL-1 $\beta$ (C) und Protein (D) in der BAL nach NaCl- bzw. LPS-Inhalation in WT- und GPVI <sup>-/-</sup> -Tieren.....	91
<b>Abbildung 33:</b> Zellzahl in BAL (A), MPO-Konzentration in BAL (B) und PNC-Anzahl in immunhistochemischen Schnitten (C) nach Ventilation mit 15 bzw. 45 mbar in WT- und GPVI <sup>-/-</sup> -Tieren .....	92
<b>Abbildung 34:</b> Immunhistochemische Färbung von Lungenschnitten nach Ventilation mit 15 bzw. 45 mbar in WT- und GPVI <sup>-/-</sup> -Tieren. Markierung der PMNs mit einem Ly6G-Antikörper und der Thrombozyten mit einem CD41-Antikörper; (A) WT mit 15 mbar (B) WT mit 45 mbar (C) GPVI <sup>-/-</sup> mit 15 mbar (D) GPVI <sup>-/-</sup> mit 45 mbar.....	94
<b>Abbildung 35:</b> Konzentration von IL-6 (A), TNF- $\alpha$ (B), IL-1 $\beta$ (C) und Protein (D) in der BAL nach Ventilation mit 15 bzw. 45 mbar in WT- und GPVI <sup>-/-</sup> -Tieren.....	96

## **Tabellenverzeichnis**

<b>Tabelle 1:</b> Schweregradeinteilung des ARDS nach Oxygenierungsindex .....	15
<b>Tabelle 2:</b> Ätiologie des ARDS .....	15
<b>Tabelle 3:</b> Allgemeine Gerätschaften .....	34
<b>Tabelle 4:</b> Allgemeine Verbrauchsmaterialien .....	35
<b>Tabelle 5:</b> Chemikalien .....	36
<b>Tabelle 6:</b> Material Tiermodelle.....	37
<b>Tabelle 7:</b> Material Zellzahlmessung .....	39
<b>Tabelle 8:</b> Material ELISA.....	40
<b>Tabelle 9:</b> Material Messung Protein und Myeloperoxidase .....	41
<b>Tabelle 10:</b> Material Histologie .....	41
<b>Tabelle 11:</b> Material Immunhistochemie .....	42
<b>Tabelle 12:</b> Offizielle Linienbezeichnungen und verwendete Abkürzungen.....	44
<b>Tabelle 13:</b> Menge an Capture-Antikörper.....	47
<b>Tabelle 14:</b> Menge an Detektion-Antikörper .....	48

## Abkürzungsverzeichnis

ADP	<i>Adenosindiphosphat</i>
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrome</i>
BAL	<i>Bronchoalveoläre Lavage</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD62E	<i>E-Selektin</i>
CD62L	<i>L-Selektin</i>
CD62P	<i>P-Selektin</i>
CO <sub>2</sub>	<i>Kohlenstoffdioxid</i>
COVID-19	<i>coronavirus disease 2019</i>
CXCL7	<i>CXC Chemokin <math>\beta</math>-thromboglobulin</i>
DAMP	<i>damage-associated molecular pattern</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ESAM	<i>endothelial cell-selective adhesion molecule</i>
FiO <sub>2</sub>	<i>inspiratorische Sauerstofffraktion</i>
GPCR	<i>G-Protein-gekoppelte Chemokin-Rezeptoren</i>
GPIb	<i>Glykoprotein Ib</i>
GPIIb/IIIa	<i>Glykoprotein IIb/IIIa</i>
GPVI	<i>Glykoprotein VI</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule-1</i>
ICAM-2	<i>intercellular adhesion molecule-2</i>
IgG	<i>ImmunglobulinG</i>
IL-1 $\beta$	<i>Interleukin-1<math>\beta</math></i>
IL-6	<i>Interleukin-6</i>
IL-8	<i>Interleukin-8</i>
JAM	<i>junctional adhesion molecules</i>
LFA-1	<i>lymphocyte function associated antigen-1</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>
Ly6G	<i>Lymphocyte antigen 6 complex locus G6D</i>
Mac-1	<i>macrophage-1 antigen</i>

MPO	<i>Myeloperoxidase</i>
NaCl	<i>Natriumchlorid</i>
NET	<i>Neutrophil Extracellular Traps</i>
PAF	<i>platelet activating factor</i>
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PaO <sub>2</sub>	<i>arterieller Sauerstoffpartialdruck</i>
PBS-	<i>Phosphate Buffered Saline-</i>
PECAM-1	<i>platelet/endothelial cell adhesion molecule-1</i>
PF4	<i>platelet factor 4</i>
PMN	<i>Polymorphkernige Neutrophile Granulozyten</i>
PNC	<i>platelet-neutrophil-complex</i>
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
PSGL1	<i>P-Selectin glycoprotein ligand 1</i>
SARS-CoV-2	<i>severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2</i>
SEM	<i>Standard error of the mean (Standardfehler)</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor- <math>\beta</math></i>
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNF- $\alpha$	<i>Tumornekrosefaktor-<math>\alpha</math></i>
TRALI	<i>Transfusion-related acute lung injury</i>
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
VILI	<i>ventilator-induced lung injury</i>
VLA-4	<i>very late antigen-4</i>
vWF	<i>von-Willebrand-Faktor</i>
WT	<i>Wildtyp</i>

# 1 Einleitung

## 1.1 Acute respiratory distress syndrome

Das *acute respiratory distress syndrome* (ARDS) ist ein intensivmedizinisches Krankheitsbild, das erstmals 1967 von Ashbaugh et al. beschrieben wurde [1].

Das typische klinische Bild der Erkrankung besteht aus einem plötzlichen Beginn der Symptomatik mit beidseitigen pulmonalen Infiltraten und einer Hypoxämie (verminderter Oxygenierungsindex/Horowitz-Index).

Die aktuell gültige Berlin-Definition von 2012 hat die von der American European Consensus Conference (AECC) im Jahre 1994 aufgestellten ARDS-Kriterien spezifiziert und eine für Klinik und Forschung sinnvolle Einteilung aufgestellt [2]. Das ARDS wird durch die Berlin-Definition über folgende Unterpunkte charakterisiert und beschrieben:

- Zeitlicher Beginn: Ein ARDS tritt meistens innerhalb von 72 Stunden, jedoch spätestens sieben Tage nach einem Schädigungsereignis auf. Zur Definition des ARDS wurde deshalb ein Zeitraum von 7 Tagen gewählt, innerhalb dessen die Symptome entweder nach einem stattgefundenen Schädigungsereignis, nach einer neu aufgetreten respiratorischen Symptomatik oder nach einer akuten Verschlechterung einer bereits bestehenden respiratorischen Symptomatik auftreten müssen.
- Bildgebung: In der Bildgebung sind bilaterale pulmonale Verschattungen durch Ödeme grundlegend, diese müssen entweder im Röntgen-Thorax oder in einer Computertomographie nachweisbar sein und dürfen nicht ausschließlich durch Ergüsse, Atelektasen oder Lymphknoten erklärbar sein.
- Ödemgenese: Es muss sichergestellt werden, dass diese Ödeme nicht durch eine Herzinsuffizienz oder eine Hypervolämie entstanden sind.
- Oxygenierung: Der Quotient aus arteriellem Sauerstoffpartialdruck ( $\text{PaO}_2$ ) und inspiratorischer Sauerstofffraktion ( $\text{FiO}_2$ ) bestimmt den Oxygenierungsindex. Er gibt das Ausmaß der Oxygenierungsstörung wieder, wonach die Einteilung des ARDS in drei Schweregrade erfolgt (**Tabelle 1**).

**Tabelle 1:** Schweregradeinteilung des ARDS nach Oxygenierungsindex

Oxygenierungsindex PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub>	Schweregrad
200 - 300 mmHg	Leicht
100 - 200 mmHg	Mittel
≤ 100 mmHg	Schwer

### 1.1.1 Ätiologie des ARDS

Die Ätiologie des ARDS lässt sich in zwei Gruppen unterteilen. Es gibt einerseits *direkte* Ursachen, bei denen die Schädigung primär in der Lunge erfolgt (z.B. Pneumonie) und andererseits *indirekte* Ursachen, bei denen ein Ereignis, das primär ein anderes Organsystem betrifft, sich nachfolgend systemisch auf die Lunge auswirkt (z.B. Sepsis) (**Tabelle 2**).

**Tabelle 2:** Ätiologie des ARDS

Direkt	Indirekt
<i>Häufig</i>	<i>Häufig</i>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pneumonie</li> <li>• Magensaftaspiration</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sepsis</li> <li>• Schweres Trauma mit Schock („Schocklunge“) und hohem Transfusionsbedarf</li> </ul>
<i>Selten</i>	<i>Selten</i>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lungenkontusion</li> <li>• Fettembolie</li> <li>• Inhalationstrauma</li> <li>• Reperfusionsödem nach Lungentransplantation oder Embolektomie</li> <li>• Beinahe-Ertrinken</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kardiopulmonaler Bypass</li> <li>• Medikamente</li> <li>• Akute Pankreatitis</li> <li>• Bluttransfusionen</li> </ul>

Tabelle nach [3]

### 1.1.2 Epidemiologie des ARDS

Die meisten Fälle entfallen auf ein moderates ARDS (50%), gefolgt vom schweren ARDS (28%) und einem milden ARDS (22%). Die Letalität ist stadienabhängig. Sie liegt bei rund 45% bei einem schweren ARDS, während sie bei moderatem bzw. mildem ARDS nur bei circa 32% bzw. 27% liegt. Ein Übergang zwischen den einzelnen Stadien ist möglich, so gehen 27% der milden Formen in eine moderate Form und 13% der moderaten in eine schwere Form über [2].

Die Angaben zur Prävalenz und Inzidenz des ARDS sind je nach Studie sehr unterschiedlich. In einer isländischen Studie wurde eine Inzidenz von 6,76 Fällen pro 100.000 Einwohner angegeben [4], eine amerikanische Studie hingegen zeigte einen Inzidenzwert von 81 Fällen pro 100.000 Einwohner [5]. Eine mögliche Erklärung für diese großen Unterschiede ist das Fehlen eines eindeutigen diagnostischen Tests, unter anderem ist die Beurteilung der radiologischen Untersuchungen stark untersucherabhängig [6].

COVID-19 (coronavirus disease 2019) ist das klinische Erscheinungsbild einer Infektion mit dem sich seit Ende 2019 ausbreitenden Virus SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2). COVID-19 mündet bei einem Teil der Betroffenen im akuten respiratorischen Versagen. Dies wurde zu Beginn des Auftretens als ARDS beschrieben, mittlerweile mehrten sich jedoch die Hinweise, dass sich ein COVID-19-assoziiertes akutes Lungenversagen von einem klassischen ARDS unterscheidet. Ein mögliches Unterscheidungsmerkmal ist der durchschnittliche Abstand zwischen Infektion und respiratorischer Insuffizienz, der nach aktuellem Wissensstand bei COVID-19-assoziiertem Lungenversagen länger ist als in der Berlin-Definition für ein ARDS festgelegt [7].

### 1.1.3 Pathologie des ARDS

Der pathologische Leitbefund einer Lunge mit ARDS ist das morphologische Bild einer sogenannten diffusen alveolären Schädigung (diffuse alveolar damage) [8].

Das Erscheinungsbild dieser Schädigung ist zeitabhängig und kann in drei Phasen unterteilt werden [8-10]:

1. Die exsudative Phase mit Ödem und Hämorrhagie
2. Die proliferative Phase mit Organisation und Reparatur
3. Die fibrotische Phase mit komplettem Remodelling

Teilweise wird zusätzlich eine Phase der Resolution erwähnt. Die Phasen treten überlappend auf und haben jeweils ihre histologischen und zellulären Besonderheiten.

### **Exsudative Phase**

Diese umfasst ungefähr die ersten sieben Tage nach Beginn des respiratorischen Versagens [8]. Die zuerst zu beobachtenden Veränderungen umfassen eine kapilläre Stauung, interstitielle und alveoläre Ödeme und intraalveoläre Hämorrhagie [8, 9, 11, 12]. Es kommt zur endothelialen Schädigung mit einhergehender Zellnekrose mit Zerstörung und Unterbrechung der Basalmembran [13-15]. Zusätzlich kommt es zu einer massiven Schädigung des alveolären Epithels und zu einer Nekrose der Alveolarzellen Typ 1 und Typ 2. Das alveoläre Epithel löst sich dadurch von der Basalmembran ab [14, 16, 17]. Infolgedessen kommt es zum Verlust der epithelialen Barriere und interstitielle Flüssigkeit kann ungehindert in den Alveolarraum eindringen [14].

Die charakteristische Histologie in dieser Phase sind dichte, hyaline Membranen [10, 11, 18]. Diese Membranen bestehen aus verdichtetem Plasmaprotein, das in den Alveolarraum gelangt und sich dort mit zellulären Zellresten verbindet.

### **Proliferative Phase**

In diesem Zeitraum organisiert sich das zuvor angesammelte intraalveoläre und interstitielle Exsudat [19]. Die Alveolarzellen Typ 2 beginnen schon drei Tage nach klinischem Beginn des ARDS zu proliferieren, eine Fibrose ist ungefähr ab dem zehnten Tag festzustellen [8, 18]. Es kommt also zu einer bemerkenswert schnellen Modifikation der Lunge in ein sogenanntes „Endstadiumsorgan“ mit stark reduzierter Compliance, welche das Überleben limitiert [20]. Durch Mitose bilden Alveolarzellen Typ 2 neue Alveolarzellen Typ 1. Der fibrotische Umbau

geschieht führend durch Fibroblasten. Diese konvertieren das Exsudat in zelluläres Granulationsgewebe und anschließend durch Kollagenablagerung in dichtes, zellarmes fibrotisches Gewebe [15, 21-23].

### **Fibrotische Phase**

Bei beatmeten Patienten findet nach 3-4 Wochen ein komplettes Remodelling statt, das Lungenparenchym wird durch spärlich zellularisiertes Bindegewebe ersetzt. Histologisch bestehen die Alveolarsepten und Bronchialwände aus verdicktem, kollagenhaltigem Bindegewebe, wobei eine erhöhte Kollagenkonzentration gemessen werden kann [24]. Dementsprechend ist diese Phase klinisch durch eine verminderte pulmonale Compliance gekennzeichnet [19, 25]. Auch die pulmonalen Gefäße unterliegen einem Umbau. Oft bildet sich als Folge des erhöhten Gefäßwiderstandes eine pulmonale Hypertonie aus [24, 26].

Schon früh kommt es zu einer reversiblen Erhöhung des pulmonalarteriellen Drucks durch pulmonale Vasokonstriktion, Thrombembolien und interstitielle Ödeme [26]. Später kommt es überdies zu permanenten Veränderungen: So ist zum Beispiel eine Intimaproliferation zu beobachten und hypoxische Zustände triggern eine Hypertrophie der glatten Gefäßmuskulatur [27-30].

#### **1.1.4 Therapie des ARDS**

Die Therapie des ARDS erfolgt hauptsächlich supportiv. Ein wichtiger Bestandteil der Therapie ist eine Beatmungsunterstützung. Je nach Schweregrad und klinischem Zustand des Patienten stehen hier verschiedene Beatmungsformen zur Verfügung. Mittlerweile wird eine lungenprotektive Beatmung mit niedrigen Atemzugsvolumina (4-6 ml/kg idealem Körpergewicht) und begrenzten Spitzendrücken empfohlen, wobei auch erhöhte endtidale CO<sub>2</sub>-Werte im Sinne einer permissiven Hyperkapnie toleriert werden [31].

Die Volumentherapie beim ARDS erfolgt situationsabhängig: Während bei Mono-Organversagen ein restriktives Flüssigkeitsmanagement empfehlenswert ist, ist bei einem ARDS im Rahmen eines septischen Geschehens eher eine Volumenzufuhr nötig.

Als Besonderheit der ARDS-Therapie ist die intermittierende Bauchlagerung (prone positioning oder auch „proning“) zu nennen. Ziel ist es, basale, atelektatische bzw. ödematöse Bereiche zu rekrutieren und damit die Oxygenierungssituation zu verbessern. Praktisch bedeutet dies eine Umlagerung des Patienten alle 16 Stunden [32].

Als letzte Eskalationsstufe steht in ARDS-Behandlungszentren die veno-venöse extrakorporale Membranoxygenierung zur Verfügung. Das Blut wird extrakorporal über spezielle Membranen decarboxyliert und oxygeniert und anschließend in den Körper zurückgeführt. Die Studienlage zum Einsatz dieses Verfahrens ist allerdings noch unklar [33].

Medikamentös kann eine Therapie mit inhalativen Vasodilatoren wie Stickstoffmonoxid oder aerosolisiertem Prostazyklin durchgeführt werden. Durch die inhalative Gabe erreichen die Wirkstoffe nur die Gefäße der gut ventilierten Bereiche, sorgen für eine selektive pulmonale Vasodilatation und vermindern so den Shunteinfluss der minderbelüfteten Areale.

Auch schwere Störungen des Surfactant-Systems wurden im ARDS beschrieben. Der Nutzen einer Surfactant-Applikation wurde in tierexperimentellen Studien gezeigt, in klinischen Studien gelang es bisher jedoch nicht, einen klaren Vorteil bei erwachsenen Patienten mit ARDS nachzuweisen [34].

## **1.2 Pathophysiologie des ARDS**

Eine wichtige Grundlage der pathophysiologischen Vorgänge des ARDS ist die Tatsache, dass eine dysregulierte Immunantwort in einer inadäquaten Aktivierung und Akkumulation von Leukozyten und Thrombozyten mündet. Dies verhält sich sehr ähnlich zum Krankheitsbild der Sepsis und bei beiden Krankheitsbildern kommt es dementsprechend schlussendlich zu vielen Sterbefällen, die auf ein Multiorganversagen zurückzuführen sind [3].

Ein wichtiger Teilaspekt sind Veränderungen bzw. Schädigungen der alveolären epithelialen und endothelialen Barriere [3, 35, 36]. Die Integrität dieser wird durch eine Vielzahl an Faktoren bestimmt und beeinflusst. Ein wichtiger Bestandteil für

die Integrität der endothelialen Barriere ist beispielsweise das VE-Cadherin [37]. Über die epitheliale Barriere ist noch nicht so viel bekannt wie über die endotheliale, jedoch spielt auch diese sowohl bei der Ödembildung als auch bei der Leukozytenakkumulation eine wichtige Rolle [38-40].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass multifaktorielle Mechanismen eine erhöhte Permeabilität der mikrovaskulären Barriere bewirken. Diese Permeabilitätserhöhung führt zu extravaskulären Ansammlungen von proteinreichen Ödemen [3, 36]. Einerseits zieht dies eine Konzentrationserhöhung von Leukozyten und Erythrozyten im alveolären Raum nach sich, andererseits aber auch eine Konzentrationserhöhung an proinflammatorischen Zytokinen [14, 41].

In der bronchoalveolären Lavage (BAL) von ARDS-Patienten wurden auch erhöhte Konzentrationen von Polymorphkernigen Neutrophilen Granulozyten (PMNs) und anderen Leukozyten festgestellt [42]. Von PMNs ausgeschüttete Oxidantien und Proteasen können die alveolar-kapilläre Membran schädigen [43].

Schon Ashbaugh et al. beschrieben die interstitiellen und intraalveolären Ödeme und Hämorrhagien in ihrer Erstbeschreibung des Krankheitsbildes [1].

Die erhöhte Permeabilität der Gefäße mit nachfolgender Anreicherung von proteinreichen Ödemen wird allgemein als Kennzeichen des ARDS gesehen. Sie wurde erstmal 1974 in Großtiermodellen beschrieben und festgestellt [44-46].

Eine weitere Ursache der ausgeprägten Ödembildung liegt neben der gestörten Barrierefunktion in einer verminderten Resorption. Die Resorption der Ödeme wird als *alveolar fluid clearance* bezeichnet. Ist sie vermindert, resultiert dies in einer erhöhten Letalität. Auch hier ist die epitheliale Barriere von elementarer Bedeutung [47, 48].

Des Weiteren beeinflussen mechanische Faktoren und der Beatmungsmodus die Inflammation und können zusätzlich selbst zu einer Verstärkung der Schädigung beitragen [3, 35, 49-52]. Ein ungeeignetes Beatmungsregime kann somit die

Schädigung der Lunge noch vergrößern und muss als iatrogene Komponente berücksichtigt werden [3, 31, 35]. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass auch zu hohe Sauerstoff-Konzentrationen zur Schädigung der alveolären Membran beitragen können [53]. In Tierversuchen verstärkte eine Hyperoxie die pulmonale Retention von PMNs und induzierte die Dysregulation anderer Mechanismen der angeborenen Immunabwehr [53, 54].

### 1.2.1 Aktivierung durch PAMPs und DAMPs

Ein wichtiger Schritt der Immunabwehr ist die Konfrontation von Zellen der angeborenen Abwehr (Makrophagen, Dendritische Zellen, Neutrophile Granulozyten) mit sogenannten pathogen-associated molecular pattern (PAMPs) oder damage-associated molecular pattern (DAMPs). PAMPs sind Moleküle, die mit pathogenen Keimen assoziiert sind, beispielsweise Lipopolysaccharide (LPS), DAMPs solche, die mit einem Gewebeschaden assoziiert sind [55].

Die PAMPs und DAMPs werden von pattern recognition receptors (PRRs) erkannt. Hier sind vor allem die Transmembranproteine der Familie der toll-like-receptors (TLRs) zu nennen [56].

Nach Erkennen von PAMPs/DAMPs durch die PRRs wird die Transkription von Genen proinflammatorischer Proteine hochreguliert und diese anschließend sezerniert. Dazu zählen unter anderem Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  sind die Zytokine, die schon sehr früh die Hochregulation von Adhäsionsmolekülen vermitteln [57].

Interleukine werden vor allem von Lungenmakrophagen produziert, aber auch von alveolären Epithelzellen, Fibroblasten und Mastzellen [57].

Chemokine der Interleukin-8-Familie (IL-8) wirken chemotaktisch für Leukozyten und induzieren Kollagensynthese, Zellproliferation und Angiogenese. Interessanterweise ist eine exzessive IL-8-Produktion mit Ausbildung eines ARDS assoziiert [58].

Andererseits gibt es auch antiinflammatorisch wirkende Zytokine. So unterdrücken Interleukin-5, Interleukin-10 und Interleukin-13 die Wirkung von TNF- $\alpha$  und verhindern so die Hochregulation des Adhäsionsmoleküls intercellular

adhesion molecule-1 (ICAM-1) [59]. Zusammen mit der Ausschüttung inflammatorischer Komponenten wie Thrombin, Leukotriene, Oxidantien oder auch Histamin kommt es zur endothelialen Aktivierung.

### 1.2.2 Endotheliale Aktivierung

Wichtig für das Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge des ARDS ist der Begriff der endothelialen Aktivierung. Diese wird teilweise als prinzipieller Mechanismus für die pathophysiologische Ausbildung eines ARDS angesehen [42, 60]. Endotheliale Aktivierung ist als eine „Veränderung im Phänotyp oder Funktion als Antwort auf einen Umweltreiz“ zu betrachten [61]. Mögliche Stimuli sind PAMPs, DAMPs oder weitere Faktoren wie Thrombin, Histamin, Leukotriene, hämodynamische Störungen, Oxidantien und Strahlung [62, 63].

Beispielsweise wird in diesem Zusammenhang die Translokation von P-Selektin (CD62P) von seinem Speicherort, den Weibel-Palade-Körperchen, zur Plasmamembran induziert und durch Thrombin die Synthese von platelet activating factor (PAF) bewirkt. Die aktivierten Zellen präsentieren nun CD62P und PAF, was zu Bindung und Kommunikation mit PMNs führt. Beides spielt sich innerhalb von Minuten ab, folglich kann angenommen werden, dass P-Selektin auf jeden Fall auch in der sehr frühen Phase der Leukozytenauswanderung beteiligt ist [61, 64].

Eine direkte Aktivierung von PRRs durch PAMPs/DAMPs mit sofortiger Exprimierung von P-Selektin und Synthese von E-Selektin (CD62E) ist ebenfalls möglich [65, 66]. Darüber hinaus reagieren die Endothelzellen mit der Expression von E-Selektin und IL-8. Die Expression von E-Selektin und IL-8 erfolgt über Transkription und de novo Synthese, weshalb dieser Vorgang einige Zeit in Anspruch nimmt [67-69].

Die Stimulation der Endothelzellen bewirkt eine Veränderung der Oberfläche und der Zellform, was wiederum die PMN-Rekrutierung fördert [65, 70, 71]. Ausschließlich aktiviertes Endothel nimmt an der inflammatorischen Antwort teil und auch nur dort können Leukozyten adhären und migrieren [57].

Nach Zimmermann et al. kann die die endotheliale Zellaktivierung entweder ein „regulierbares Ereignis als Teil einer physiologischen Antwort“ sein oder ein „un-/dysreguliertes Ereignis als Teil einer pathologischen Antwort“. Diese un- bzw. dysregulierte endotheliale Aktivierung könnte das ARDS von anderen Pathologien wie Pneumonien unterscheiden, in denen diese Veränderungen nur kurz auftreten und sich dann wieder normalisieren [61].

Das Lungenendothel spielt insgesamt eine sehr dynamische Rolle in der Lungeninflammation [67]. So kann beispielsweise die Aktivierung des Endothels eine Induktion von prokoagulatorischen (z.B. tissue factor) oder auch antikoagulatorischen Faktoren (tissue plasminogen activator, Thrombomodulin) bewirken.

### 1.2.3 Leukozytenauswanderung

Die Migration von Leukozyten in geschädigtes bzw. entzündetes Gewebe ist wichtig für die Entzündungsantwort, muss aber gut reguliert sein, da die Migration in gesundes Gewebe oder auch eine überschießende Antwort eine schädigende Wirkung haben kann [72]. Außer den bereits erwähnten PMNs sind weitere Leukozytenpopulationen beteiligt, hierzu zählen unter anderem Lungenmakrophagen und Subpopulationen von Monozyten [42, 73-75].

Für die Extravasation wird eine sogenannte „multistep cascade“ formuliert, die das Zusammenspiel von Leukozyten und Endothel im Detail beschreibt [76, 77].

Kurz zusammengefasst läuft die Extravasation nach folgendem Muster ab:

Endotheliale Selektine binden an Leukozyten, was eine Verringerung der Leukozytengeschwindigkeit zur Folge hat. Die Leukozyten rollen nun an der Gefäßwand entlang. Diese initiale Bindung ist jedoch nur sehr schwach. Während dieses Rollens sind die Leukozyten in der Lage, durch das Endothel ausgestoßene, stimulierende Signale wahrzunehmen [78, 79]. Eine stabilere Bindung erfolgt durch Chemokine und Integrine und der Leukozyt kann schließlich aus dem Gefäß ins Gewebe auswandern [66].

Schematisch laufen folgende Schritte nacheinander ab: Langsames Rollen, Verstärkung der Adhäsion, intraluminales Crawling und Transmigration.

## **Langsames Rollen**

Im vorherigen Absatz wurde die endotheliale Aktivierung beschrieben, die in der Expressierung von Selektinen an der Endothelzelloberfläche mündet. Durch diese Selektine wird der erste Schritt der eigentlichen Leukozytenauswanderung vermittelt: das langsame Rollen. Selektine sind Calcium-abhängige Typ-I-Transmembranproteine [80]. Für die Leukozytenauswanderung von Bedeutung sind E-Selektin, P-Selektin und L-Selektin.

L-Selektin (CD62L) ist auf fast allen neutrophilen Granulozyten, Monozyten und auf der Mehrheit der T- und B- Zellen im Knochenmark und auf Unterformen der natürlichen Killerzellen exprimiert [81]. E-Selektin hingegen ist nur auf Endothel exprimiert und auch nur dann, wenn das Endothel zuvor durch IL-1 $\beta$ , TNF- $\beta$  oder bakterielles LPS stimuliert wurde [82].

P-Selektin wird sowohl auf Endothel als auch auf (aktivierten) Thrombozyten exprimiert [83]. In Endothelzellen wird P-Selektin in den Weibel-Palade-Körperchen gespeichert, in den Thrombozyten in den  $\alpha$ -Granula. Interessanterweise findet sich jeweils in diesen beiden Organellen auch das Protein von-Willebrand-Faktor (vWF) [84-87].

Alle drei Selektine interagieren mit P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL1), das auf Endothelzellen [88], PMNs [89] und Thrombozyten [90] exprimiert wird.

Obwohl ihre Hauptaufgabe eher im Aufbau einer stabilen Adhäsion liegt, findet wohl auch durch Integrine vermitteltes Rollen von PMNs statt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die  $\beta$ 2-Integrine lymphocyte function associated antigen-1 (LFA-1,  $\alpha$ <sub>L</sub> $\beta$ <sub>2</sub>, CD11a/CD18) und macrophage-1 antigen (Mac-1,  $\alpha$ <sub>M</sub> $\beta$ <sub>2</sub>, CD11b/CD18) das selektinvermittelte Rollen unterstützen [91-94].

## **Adhäsion und Crawling („Kriechen“)**

Durch das langsame, selektinvermittelte Rollen kommen die PMNs in engen Kontakt mit dem Endothel, wodurch sie in der Lage sind, durch Endothelzellen ausgestoßene Signale wahrzunehmen und stimuliert zu werden [78, 79]. Dies

geschieht durch proinflammatorische Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), Chemokine oder durch Kontakt mit aktivierten Endothelzellen [55, 95].

Die stabile Adhäsion zwischen PMNs und Endothel ist maßgeblich von  $\beta$ 2-Integrinen abhängig. Diese  $\beta$ 2-Integrine bestehen aus einer  $\beta$ 2-Untereinheit und jeweils einer von vier verschiedenen  $\alpha$ -Untereinheiten [96]. Für die stabile Adhäsion von PMNs an das Endothel sind hauptsächlich die  $\beta$ 2-Integrine LFA-1 und Mac-1 notwendig.

Chemokine gehören zu den stärksten Aktivatoren der Integrin-vermittelten Adhäsion. Sie aktivieren die Integrine durch G-Protein-gekoppelte Chemokin-Rezeptor-Bindungen (GPCRs). Dieser Vorgang wird als „inside-out signalling“ bezeichnet. Durch die Aktivierung der PMNs über GPCRs kommt es zu einer Konformationsänderung der an der Oberfläche exprimierten Integrine, die dadurch eine verstärkte Affinität zu ihren jeweiligen Liganden aufweisen und in einen aktiven Zustand übergehen [97]. Zusätzlich wird durch chemische Lockstoffe („chemoattractants“) eine Translokation von Mac-1 aus intrazellulären Speichern an die PMN-Oberfläche bewirkt [98]. Die jetzt in ihrer Affinität verstärkten bzw. exprimierten Integrine können nun an Proteine der Immunoglobulin-Superfamilie der Endothelzellen binden. Hierzu gehören die auf Endothelzellen exprimierten Proteine ICAM-1 und ICAM-2 ebenso wie das vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) [99, 100].

Mac-1 und LFA-1 binden beide sowohl an ICAM-1 [101, 102] als auch ICAM-2 [103, 104]. Mac-1 bindet zusätzlich auch an Fibrinogen [105]. Diese Bindung mündet in einer stabilen Anheftung der PMNs an die Endothelzelle.

### **Transmigration**

Nach der aufgebauten stabilen Adhäsion kann der Leukozyt nun beginnen, die Gefäßwand zu durchwandern. Bei der Auswanderung aus dem Gefäß sind drei Barrieren zu überwinden: die Endothelzellschicht, die Basalmembran und die Perizytenummantelung (diese umkleidet die Venolen, den Ort der Migration bei dem Großteil der verschiedenen Gewebearten). Für das Passieren der

Endothelzellschicht benötigen die PMNs 2-5 Minuten, für das Passieren der Basalmembran dann jedoch deutlich länger, zwischen 5-15 Minuten [65]. Die Passage durch die Endothelzellschicht findet überwiegend parazellulär, jedoch auch transzellulär statt [106, 107].

Die Bindung von PMNs an das Endothel führt zu einer Lockerung der interendothelialen Verbindungen, wodurch die parazelluläre Migration erleichtert wird. Die Bindung kann durch unterschiedliche Faktoren wie zum Beispiel durch TNF- $\alpha$ , Thrombin, vascular endothelial growth factor und Thrombozyten-Signale beeinflusst werden [37].

Die aktivierten Endothelzellen reorganisieren Moleküle, um die Migration zu erleichtern [108]. Liganden für PMNs werden an der luminalen Oberfläche exprimiert und auf diese Art und Weise werden die Leukozyten an den Verbindungsstellen konzentriert [109]. Die beschriebenen Vorgänge zeigen, dass es präferierte Orte der Transmigration gibt. An den Orten der Auswanderung werden durch das Endothel Vorwölbungen in das Lumen, sogenannte „transmigratory cups“, gebildet, in welchen ICAM-1 und VCAM stark exprimiert sind [106]. Durch Bindung von LFA-1 und very late antigen-4 (VLA-4,  $\alpha 4\beta 1$ ) an ICAM-1 und VCAM wird anschließend die PMN-Durchwanderung reguliert [106].

Einige weitere an der Transmigration beteiligte Rezeptoren und Moleküle sind das platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1), CD31, CD99 und Mitglieder der Familie der junctional adhesion molecules (JAMs) [109-111] sowie das endothelial cell-selective adhesion molecule (ESAM). Durch Erhöhung der Expression von PECAM-1 an Orten der gewünschten Transmigration wird die Migration ebenfalls reguliert [112]. Für die Proteine der JAM-Familie konnte, im Besonderen für JAM-A, gezeigt werden, dass es mit LFA-1 eine Bindung eingehen kann, und diese Bindung sowohl die feste Adhäsion als auch die Transmigration vermittelt [113].

### **1.3 Rolle der Thrombozyten im ARDS**

Seit längerem ist bekannt, dass Thrombozyten bei Entzündungsreaktionen eine bedeutende Rolle spielen. Sie können Bindungen mit verschiedenen Zellen eingehen, die Entzündungsreaktion abschwächen oder auch verstärken, PMNs anlocken, deren Aktivität beeinflussen und sind auch bei der Leukozytenauswanderung beteiligt [114].

#### **1.3.1 Interaktion zwischen Thrombozyten und PMN**

Thrombozyten wirken bei der Anlockung (Chemotaxis) von PMNs zum Ort der Schädigung und deren Aktivierung mit. Das Chemokin  $\beta$ -thromboglobulin (CXCL7) und platelet factor 4 (PF4 bzw. CXCL4) sind in den Thrombozyten gespeichert und werden sofort nach Aktivierung sezerniert [115]. CXCL7 ist ein sehr potenter Aktivator der PMN-Chemotaxis und wirkt über den CXCR2-Rezeptor [116]. Auch in einem murinen LPS-Schädigungsmodell war die PMN-Aktivierung und die PMN-Rekrutierung abhängig von durch Thrombozyten ausgestoßenes CCL5 (RANTES) und CXCL4 (PF4) [117]. Aktivierte Thrombozyten induzieren über IL-1 $\beta$  zudem auch die Sekretion von CXCL8 (IL-8) und CXCL1 aus endothelialen Zellen, worüber wiederum PMNs aktiviert werden können [118-121].

Die Phagozytose und der oxidative Burst von PMNs wird durch die von Thrombozyten sezernierten Mediatoren verstärkt [122, 123]. Bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen wird diese verstärkte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies durch PMNs durch Blockade von P-Selektin vermindert [124].

Thrombozyten exprimieren toll-like-receptors 1, 2, 4 und 9 (TLR) und können hierdurch verschiedene PAMPs/DAMPs erkennen [125, 126]. Eine Aktivierung der Thrombozyten nach Erkennung von PAMPs bewirkt eine Bindung an PMNs und führt zur Ausbildung von Neutrophil Extracellular Traps (NETs) [127, 128]. Außerdem sezernieren Thrombozyten transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) und

verhindern dadurch die Apoptose von PMNs und verlängern somit ihre Lebensdauer [129].

### 1.3.2 Plättchen-Neutrophilen-Komplexe

Schon früh wurde ein sogenannter „platelet satellitism“ um PMNs bei Patienten mit verschiedenen Erkrankungen beobachtet [130]. In gesunden Probanden sind 25% der zirkulierenden Neutrophilen an Plättchen gebunden [131]. Mittlerweile wurden sogenannte platelet-neutrophil-complexes (PNCs), also Komplexe aus Thrombozyten und PMN beschrieben.

Ein vermehrtes Auftreten von PNCs wurde für sehr viele „klassisch“ entzündliche Erkrankungen wie rheumatoide Arthritis, chronisch entzündliche Darmerkrankungen, sowie bakterielle Infektionen und Sepsis beschrieben [132-134]. Des Weiteren gibt es auch für kardiovaskuläre Erkrankungen wie Myokardischämie oder explizit die Lunge betreffende Krankheitsbilder wie die chronisch-obstruktive Lungenerkrankung ähnliche Erkenntnisse [135-137]. Die Feststellung der erhöhten Anzahl an PNCs in Lungenerkrankungen passt wiederum zu den sehr frühen Untersuchungen, bei denen in akut geschädigtem Lungengewebe Thrombozyten vorgefunden wurden [14, 138, 139].

Peters et al. beschrieben eine erhöhte Aktivität/Expression von Mac-1 und eine Erhöhung des PNC-Anteils nach Stimulation durch Adenosindiphosphat (ADP), wodurch gezeigt wurde, dass die Aktivierung von Thrombozyten in der Bildung von PNCs mündet [131].

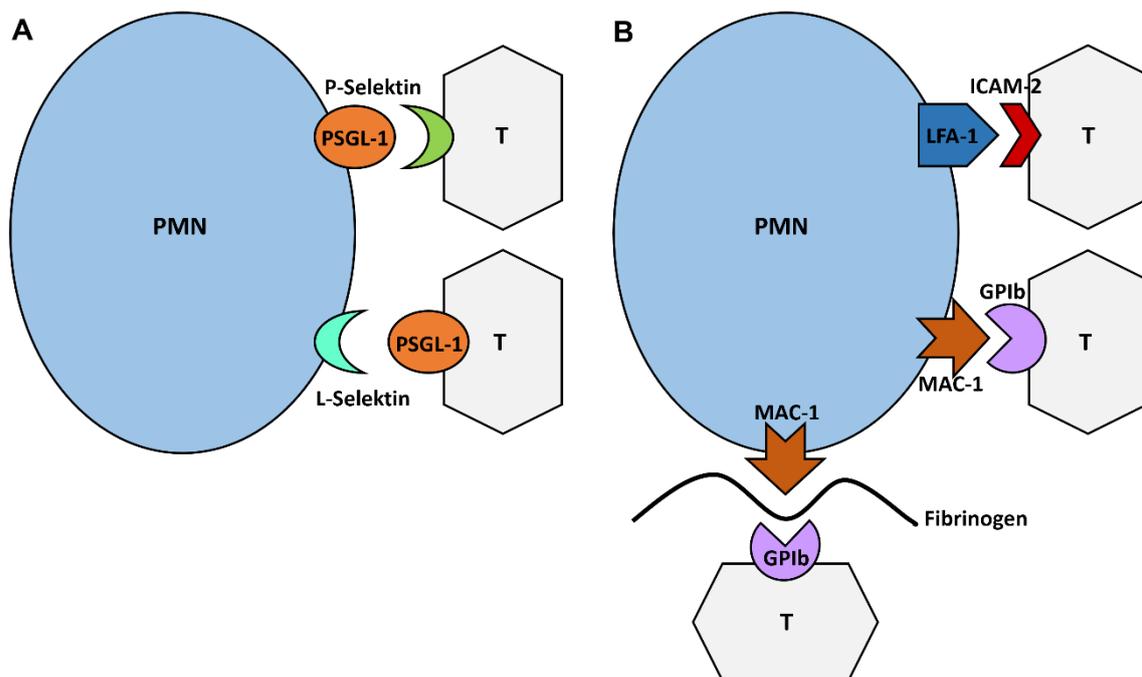
Thrombozyten können über verschiedene Bindungen Komplexe mit PMNs bilden. Zusätzlich können sie jedoch auch Bindungen mit dem Endothel eingehen, entweder um dieses zu aktivieren oder um als Brücke zwischen Endothel und PMNs zu fungieren [140-142].

Aktivierte Thrombozyten setzen aus  $\alpha$ -Granula P-Selektin frei und exprimieren es auf der Oberfläche. P-Selektin bindet an PSGL-1 auf PMNs und vermittelt so

die Bindung zwischen Thrombozyten und PMNs [143-146]. Außerdem können Thrombozyten durch Aktivierung der Endothelzellen die Verlagerung von P-Selektin aus den Weibel-Palade-Körperchen an die Oberfläche bewirken, an welches die PMNs ebenfalls dann über PSGL-1 binden können. Initial kommt es zur selektinvermittelten Annäherung zwischen PMNs und Thrombozyten.

Durch diese Annäherung kommt es zur Aktivierung der PMNs, der Induktion der Expression von LFA-1 und Mac-1 und hierüber dann zur festen Bindung zwischen PMNs und Thrombozyten [147-150].

Beide Mechanismen sind in **Abbildung 1** dargestellt.

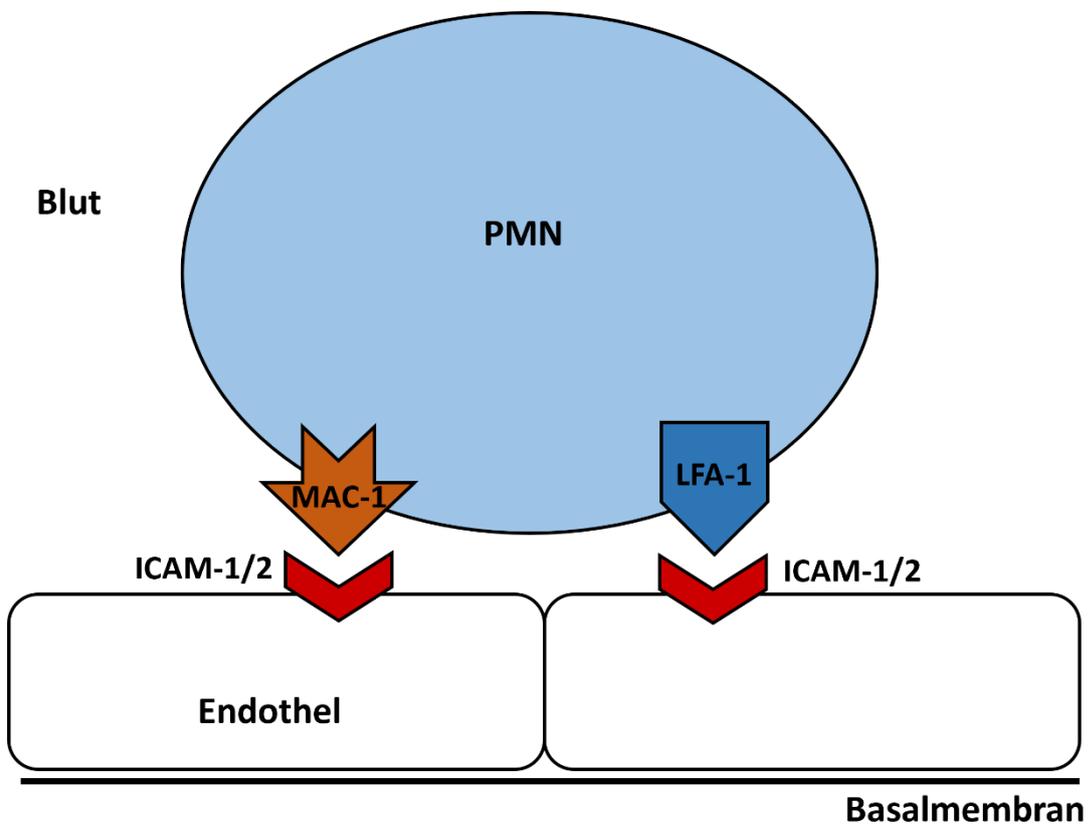


**Abbildung 1:** (A) Selektinvermittelte Annäherung (B) Feste Bindung durch Integrine

Die vorherrschende Art der Bindung hängt von den auf die Zellen einwirkenden Scherkräften ab. Bei starken Scherkräften ist bevorzugt die P-Selektin/PSGL-1 Achse für die PNC-Bildung wichtig, bei schwachen die Integrin-Aktivierung.

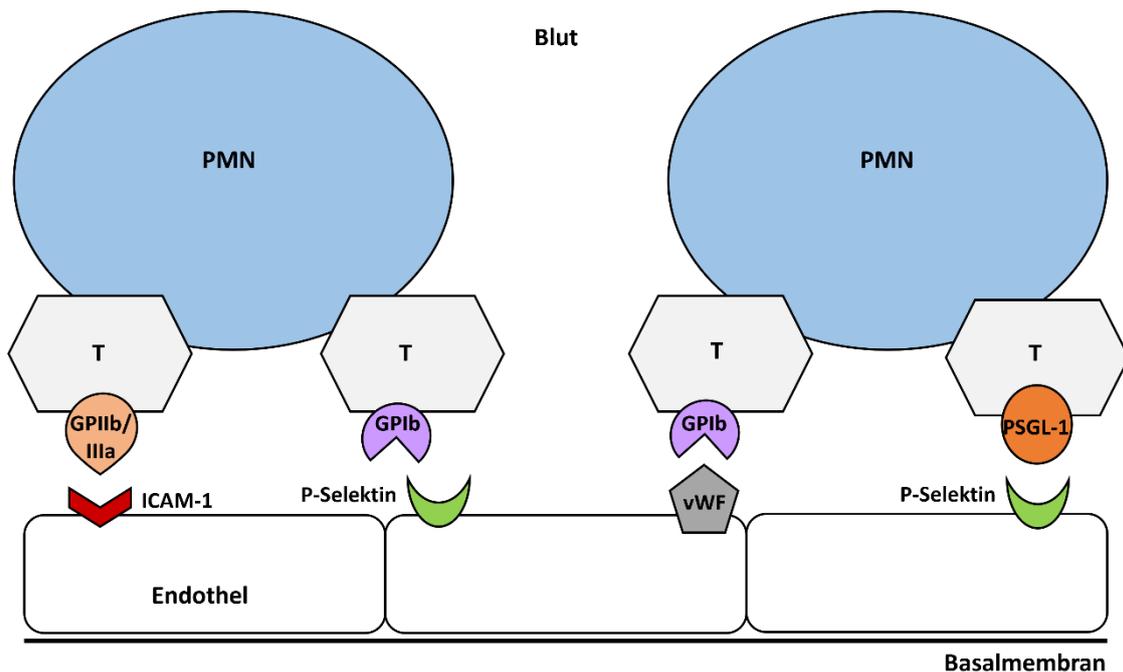
In ähnlicher Weise ist für die Plättchen-Adhäsion am Endothel bei moderaten Scherkräften das Integrin Glykoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) ausreichend, ansonsten wird zusätzlich die Bindung zwischen Glykoprotein Ib/IX/V (GPIb/IX/V) mit vWF benötigt [151, 152].

Die Expression der Integrine auf den PMNs bewirkt schließlich eine verstärkte Bindung zwischen PMN und Endothel, diese Bindungen sind in **Abbildung 2** dargestellt.



**Abbildung 2:** Bindungen zwischen Endothel und PMN

Thrombozyten können ebenfalls als Brücke für die Bindung von PMNs und Endothel fungieren. Hierbei sind Bindungen über GPIb (Thrombozyten) zu P-Selektin oder vWF auf Endothel oder über GPIIb/IIIa (Thrombozyten) zu ICAM-1 (Endothel) möglich [90, 141, 142, 153] (**Abbildung 3**).



**Abbildung 3:** Thrombozyten als Brücke zwischen Endothel und PMN

Auch GPIIb $\alpha$  (Thrombozyten) kann mit Mac-1 (PMN) interagieren [154-156]. Durch eine Brückenbindung mit Fibrinogen (Bindung einerseits an GPIIb auf Thrombozyten, andererseits an Mac-1 auf PMN) kann ebenfalls eine stabile Bindung zwischen Thrombozyten und PMN erreicht werden [157].

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die PMNs, getriggert durch Thrombozyten und die PNC-Bildung, aus dem Gefäßsystem in die Alveolen gelangen und dort, beispielweise über NETs, die Schädigung verursachen. Die Schädigung wird somit maßgeblich durch die PNCs vermittelt.

### 1.3.3 Untersuchungen zu Thrombozyten im akuten Lungenschaden

Zarbock et al. demonstrierten 2006 in einem murinen Modell sehr deutlich, dass eine Thrombozyten-Depletion vor pulmonaler Salzsäure-Applikation den Proteingehalt in der BAL und die histopathologischen Veränderungen verringert. Sie konnten weiterhin zeigen, dass nach Salzsäure-Applikation über P-Selektin-Bindungen PNCs gebildet werden. Nach Blockade des P-Selektins durch einen

Antikörper verbesserte sich die Oxygenierung, die PMN-Migration wurde vermindert, der Proteingehalt verringerte sich und die histopathologischen Veränderungen wurden minimiert. Durch den Einsatz von chimären Mäusen konnte gezeigt werden, dass diese Effekte nicht durch das endotheliale, sondern durch das thrombozytäre P-Selektin vermittelt wurden [152].

Ein weiterer auf Thrombozyten exprimierter Rezeptor ist das Glykoprotein VI (GPVI) [158], ein wichtiger Kollagenrezeptor [159]. Mittlerweile wurden weitere Liganden beschrieben, unter anderem Vitronectin. Über dieses Protein bindet GPVI an aktiviertes Endothel, durch die resultierende Thrombozyten-Endothel-Interaktion wird der Reperfusionsschaden in einem murinen Herzinfarkt-Modell verstärkt [160]. Ein weiterer Bindungspartner ist EMMPRIN, hierüber wird beispielweise eine Monozytenadhäsion an Thrombozyten vermittelt [161].

Claushuis et. al zeigten in einem pneumogenen Sepsis-Modell mit inhalativ verabreichten *Klebsiella pneumonia* bei GPVI-defizienten Tieren eine reduzierte PNC-Bildung [162]. In vitro zeigten sie zusätzlich die vermehrte Bildung von PNCs nach Stimulation von GPVI [162].

Über den GPVI-Rezeptor kann auch eine Aktivierung von Thrombozyten durch *Staphylococcus aureus* [163] oder *Helicobacter pylori* [164] erfolgen. GPVI vermittelt des Weiteren die Anlockung von Thrombozyten ins Gewebe bei einer Immunkomplex-Glomerulonephritis und induziert so auch die Anlockung von PMNs [165].

## **1.4 Ziel der Arbeit**

Wie dargelegt ist das ARDS ein relevantes Krankheitsbild, das von einer sehr hohen Letalität gekennzeichnet ist. Ein zentraler Punkt des ARDS ist die Ödembildung durch PMN-Auswanderung, neben der PNC-initiierten pulmonalen Schädigung. Der Pathomechanismus dieser Vorgänge ist noch nicht hinreichend verstanden. Zur Verbesserung der Therapiemöglichkeiten ist es jedoch unverzichtbar, diesen Pathomechanismus genauer zu untersuchen.

In dieser Arbeit wurden mit dem LPS-Inhalationsmodell und dem ventilator-induced lung injury (VILI)-Modell zwei verschiedene Modelle eingesetzt. Ziel war es, die unterschiedliche Genese eines ARDS abzubilden. Die beiden häufigsten Ursachen für ein ARDS sind Pneumonie und Sepsis. Die Darstellung eines infektiösen Lungenschadens erfolgte mit dem LPS-Inhalationsmodell. Im Gegensatz hierzu konnte durch im VILI-Modell durch eine beatmungsinduzierte Lungenschädigung eine „sterile Inflammation“ induziert und abgebildet werden.

Untersucht wurden Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Pathomechanismen und Funktionen verschiedener zellulärer Bestandteile wie Thrombozyten und Thrombozyten-PMN-Komplexe (PNCs) sowie die Bedeutung von für diese interzelluläre Kommunikation wichtiger Proteine.

Wir vermuten, dass Thrombozyten einen großen Einfluss auf die Ausbildung der Lungenschädigung haben. Dies wollen wir mit dem Einsatz der verschiedenen gendefizienten Linien objektivieren und die Relevanz der einzelnen Proteine für die PMN-Auswanderung sowie der Lungenschädigung untersuchen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialliste

#### 2.1.1 Allgemeine Gerätschaften

**Tabelle 3:** Allgemeine Gerätschaften

<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Produktnummer</b>	<b>Hersteller</b>
Pipette Eppendorf Reference® 2		
10 µl gelb	4925000057	Eppendorf AG,
100 µl gelb	4925000103	Hamburg
1000 µl blau	4925000154	
Pipette Eppendorf research plus		
0,5-10 µl	3120000020	Eppendorf AG,
10-100 µl	3120000046	Hamburg
100-1000 µl	3120000062	
Pipettierhilfe	155 019	Integra Biosciences
PIPETBOY acu 2		AG, Zizers, Schweiz
Magnetrührer IKAMAG RCT	0003810000	Janke u. Kunkel
		GmbH, Staufen i.Br.
Magnetrührer KMO2 basic	Z645079	Janke u. Kunkel
		GmbH, Staufen i.Br.
Waage Kern ALS		Kern u. Sohn GmbH,
		Balingen
Vortexer Genie 2	G560E	Scientific Industries,
		INC, Bohemia, USA

## 2.1.2 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 4:** Allgemeine Verbrauchsmaterialien

<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Produktnummer</b>	<b>Hersteller</b>
Falcon Advantage Serological Pipet		Coming incorporated- Life Sciences, Durham, USA
5 ml	356543	
10 ml	356551	
25 ml	356525	
Pipettenspitzen 10 µl	720011	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Pipettenspitzen 20 µl	2500170	Ratiolab, Dreieich
Pipettenspitzen 1000 µl	686290	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen 200 µl	70.760.002	Sarstedt AG, Nümbrecht
Pipettenspitzen 200 µl	0030000.870	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen (lang) 200 µl	28480	BioScience inc, Salt Lake City, USA
Reaktionsgefäß 2 ml	623201	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Reaktionsgefäß 1,5 ml	616201	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Eppendorf Tubes 5.0 ml	0030119460	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Safe Lock Tubes		Eppendorf AG, Hamburg
2 ml	0030120094	
1,5 ml	0030120086	
Falcon™ konische Zentrifugenröhrchen		BD Falcon, Heidelberg
15 ml	352096	
50 ml	352070	

### 2.1.3 Chemikalien

**Tabelle 5:** Chemikalien

<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Produktnummer</b>	<b>Hersteller</b>
Ethanol	4Y016431	AppliChem GmbH, Darmstadt
Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline (PBS)	D8537	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Isotone Kochsalzlösung 0,9%		Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
ABTS	A1888-2G	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Wasserstoffperoxid	1.08597.1000	Merck Millipore, Darmstadt
Natriumcitrat	3580.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Citronensäure	8.18707.1000	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol	20847.307	VWR International GmbH, Darmstadt
Formaldehyd Lösung 37%	7398.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
PBS <sup>-</sup> Tabletten	18912014	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Tween20	9005-64-5	AppliChem GmbH, Darmstadt

#### 2.1.4 Tiermodelle

**Tabelle 6:** Material Tiermodelle

<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Produktnummer</b>	<b>Hersteller</b>
Stereomikroskop Olympus SZX12		Olympus, Japan
Kaltlichtquelle KL1500 LCD	SCHOTTKL1500 LCD	Leica Camera AG, Wetzlar
OP-Tisch mit Heizplatte und Steuergerät	08321	Klaus Effenberger, Med.-Techn. Gerätebau, Pfaffing
Chirurgiegerät ICC50	192885347472	ERBE, Tübingen
Bipolare Pinzette abgewinkelt, 10,5 cm, Spitze 0,5 mm, fein	20195-021	ERBE, Tübingen
Servo Ventilator 900C		Siemens Elema, Schweden
Sauerstoff UN1072		Westfalen AG, Münster
Luft verdichtet UN1002		Westfalen AG, Münster
EKG- Monitor	78354A	Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA
Inhalationsgerät Pocket Nebuliser MicroAIR U22	B000UGYD48	Omron Healthcare Europe, Hoofddorp, Niederlande
Wasserstrahlpumpe „Plastibrand“	1596 00	Brand GmbH Co KG, Wertheim
Narcoren ®	798-594	Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim am Rhein
Paraffinöl dickflüssig, 1 Liter	8904.1	CARL Roth GmbH, Karlsruhe
Lipopolysaccharides from E. coli 026:B6	L8274, 10mg	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Roti Histofix ECP Plus	8907.2	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Einmalspritze BD Plastipak 1ml	303172	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
25 G Microlance 3-Kanüle	300400	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
27 G Microlance 3- Kanüle	302200	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Intravaskulärer Katheter BD Insyte	381223	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Citrat-S- Monovetten, 10 ml 9NC	02.1067.001	Sarstedt AG, Nümbrecht
Universaleinbettkassetten Gelb	09-0202	R. Langenbrick, Labor- u. Medizintechnik, Emmendingen
Hellblau	09-0203	
Einmalspritze, 2-teilig 5 ml	4606051V	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
10 ml	4606018V	
CryoTube™ Vials	368632	Thermo Scientific, Roskilde, Denmark

### 2.1.5 Zellzahlmessung

**Tabelle 7:** Material Zellzahlmessung

<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Produktnummer</b>	<b>Hersteller</b>
Mikroskop Eclipse Ci-L		Nikon Coporation, Tokyo, Japan
Hirschmann Dosiergerät ceramus®	9342000	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
CASY cell counter and analyzer TT	TT-LA-2226	Roche Diagnostics Ltd., Burgess Hill, UK
CASYcups	5651794	OMNI Life Sciene GmbH und Co.KG, Bremen
CASYclean	5651787	OMNI Life Sciene GmbH und Co.KG, Bremen
CASY® ton	5651808	OMNI Life Sciene GmbH und Co.KG, Bremen
Trypan Blue Solution	T8154, 100ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
C-Chip Neubauer Improved DHC-N01	NE63508-01	NanoEnTek, INC., Waltham, MA, USA

## 2.1.6 ELISA

**Tabelle 8:** Material ELISA

<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Produktnummer</b>	<b>Hersteller</b>
Tecan- Reader infinite M200 PRO	30050303	Tecan Austria GmbH, Grödig, Österreich
Mikroplattenwascher HydroFlex™	INSTHF-02	Tecan Austria GmbH, Grödig, Österreich
Mini Zentrifuge	T464.1	CARL Roth GmbH, Karlsruhe
Eppendorf® Research® plus pipette, 30-300 µl, 8-Kanal	Z683957	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen epT.I.P.S. Standard, 2-200 µl	Z640093	Eppendorf AG, Hamburg
Mikrotitrierplatte ELISA Nunc MaxiSorp	442404	Thermo Scientific, Roskilde, Denmark
Mouse TNF-alpha DuoSet ELISA	DY410	RD Systems, Minneapolis, MN, USA
Mouse IL-6 DuoSet ELISA	DY406	RD Systems, Minneapolis, MN, USA
Mouse IL-1β DuoSet ELISA	DY401-05	RD Systems, Minneapolis, MN, USA
ReagentDiluent	DY995	RD Systems, Minneapolis, MN, USA
Streptavidin-HRP	893975	RD Systems, Minneapolis, MN, USA
Color Reagent B	895001	RD Systems, Minneapolis, MN, USA
Color Reagent A	895000	RD Systems, Minneapolis, MN, USA

### 2.1.7 Messung Protein und Myeloperoxidase

**Tabelle 9:** Material Messung Protein und Myeloperoxidase

<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Produktnummer</b>	<b>Hersteller</b>
Wärmeschrank HERAEUS Oven	50042293	Thermo Scientific Thermo Electron LED GmbH
Multipipette M4 Eppendorf	4982000012	Eppendorf AG, Hamburg
Microplate, 96 Well	655101	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pierce BCA Protein Assay Kit	23525	Thermo Scientific, Roskilde, Denmark
Albumin Standard	23209	Thermo Scientific, Roskilde, Denmark

### 2.1.8 Histologie

**Tabelle 10:** Material Histologie

<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Produktnummer</b>	<b>Hersteller</b>
Gewebeinfiltrationsautomat Leica TP1020	14042230535	Leica Biosystems, Nussloch
Beheizte Paraffinausgießstation LEICA EG 1150 H	14038837689	Leica Biosystems, Nussloch
Kühlplatte LEICA EG 1150 C	14038838037	Leica Biosystems, Nussloch
Rotationsmikrotom LEICA RM2235	050038602	Leica Biosystems, Nussloch
Paraffinstrecktisch LEICA HI 1220	14042321474	Leica Biosystems, Nussloch
Paraffinstreckbad LEICA HI 1210	041521466	Leica, Microsystems Nussloch

SuperFrost Plus Objektträger	03 00600	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen
PARAPLAST PLUS	39502004	Leica Biosystems Richmond, IL, USA

### 2.1.9 Immunhistochemie

**Tabelle 11:** Material Immunhistochemie

<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Produktnummer</b>	<b>Hersteller</b>
Mikrowelle	MM817ASM	Robert-Bosch GmbH, Gerlingen
Antigen Unmasking Solution	H- 3300	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Avidin/ Biotin Blocking Kit	SP- 2001	Vector Laboratories, Burlingame, USA
FSGO Gelatin from cold water fish skin 40-50% in H <sub>2</sub> O	G7765	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Vectastain-ABC Kit-HRP	PK-4000	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Anti-Ly6g + Ly6c antibody	ab25377	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Anti-CD41 antibody	63983-100	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Normal-IgG-Rat	SC-2026	Santa Cruz Biotechnology Inv. Dallas, USA
Normal-IgG-Rabbit	SC-2027	Santa Cruz Biotechnology Inv. Dallas, USA
Normal Rabbit-Serum	S-5000-20	Vector Laboratories, Burlingame, USA

Normal Goat-Serum	S-1000-20	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Rabbit Anti-Rat IgG Antibody	BA-4000-1.5	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Goat Anti-Rabbit IgG Antibody	BA-1000	Vector Laboratories, Burlingame, USA
DAB Substrate Kit	SK-4100	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Histoprime	E109	LINARIS Biologische Produkte GmbH, Dossenheim
Fast Nuclear Red	H-3403	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Eukitt®	03989	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Pap Pen Immunostaining Pen - Spitzendicke 2 mm	MKP-1	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt

## 2.2 Versuchstiere

In unseren Tierversuchen verwendeten wir zwei verschiedene Maus-Modelle zur Induktion eines akuten Lungenschadens.

Es wurden Wildtypmäuse (WT; C57BL/6J) sowie gentechnisch veränderte Linien eingesetzt. Es wurden sowohl Weibchen als auch Männchen bis zu einem Alter von 20 Wochen verwendet. Die Genehmigung aller Tierversuche erfolgte durch die Tierversuchskommission des Regierungspräsidiums Tübingen unter der Tierantragsnummer A2/18.

Die Tiere wurden von Prof. Nieswandt vom Rudolf-Virchow-Zentrum für Experimentelle Biomedizin in Würzburg zur Verfügung gestellt.

In den gendefizienten Linien wurden die Proteine, deren codierende Gene verändert wurden, nicht exprimiert oder waren nicht funktionell. Die offiziellen

Bezeichnungen sowie die in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen sind in folgender Tabelle dargestellt:

**Tabelle 12:** Offizielle Linienbezeichnungen und verwendete Abkürzungen

<b>Internationale Bezeichnung</b>	<b>Abkürzung</b>
C57Bl6J.VWF	vWF <sup>-/-</sup>
C57Bl/6J.TgH(Tm_GPIb-IL4R)Jwa	GPIb-IL-4tg
C57Bl6J.GP6	GPVI <sup>-/-</sup>
C57Bl/6J-C62Ptm1	CD62P <sup>-/-</sup>
129B6.Cd41tm2(TGra)	CD41-YFP

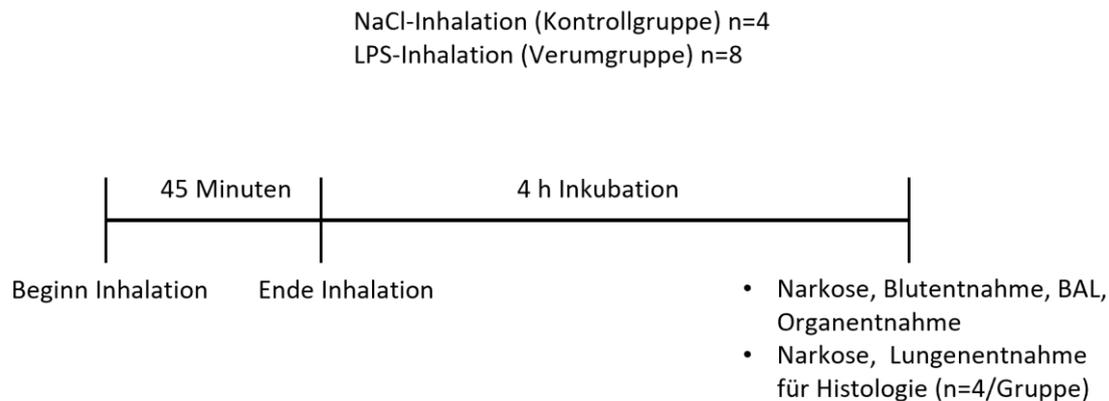
## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Lipopolysaccharid-Inhalations-Modell

Beim LPS-Inhalations-Modell wurde durch Inhalation von Lipopolysacchariden, charakteristischen Bestandteilen der Wand gramnegativer Bakterien, eine Entzündung der Lunge induziert.

Für die Durchführung wurde zuerst eine Inhalations-Lösung hergestellt. Dazu wurden für die Schädigungsgruppe 10 mg pulverisiertes LPS in 20 ml 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung (NaCl) aufgelöst, was einer resultierenden Konzentration von 0,5 mg/ml gleichkommt. In der Kontrollgruppe wurde reine 0,9%ige NaCl-Lösung verwendet.

Maximal sechs Mäuse wurden anschließend zusammen in eine zylinderförmige Kammer gesetzt. Um die Inhalationslösung fein zu zerstäuben, wurde auf der Eingangsseite der Kammer ein Vernebler angeschlossen. Auf der Ausgangsseite wurde über einen Plastikschlauch eine Wasserstrahlpumpe installiert, wodurch ein ständiger leichter Sog in der Kammer hervorgerufen wurde, um eine gleichbleibend gesättigte Konzentration aufrecht zu erhalten. Diese Prozedur wurde über einen Zeitraum von 45 Minuten durchgeführt. Anschließend folgte eine vierstündige Inkubationszeit, um die initiierte Entzündungsreaktion fortschreiten zu lassen (**Abbildung 4**).



**Abbildung 4:** Versuchsablauf LPS-Modell

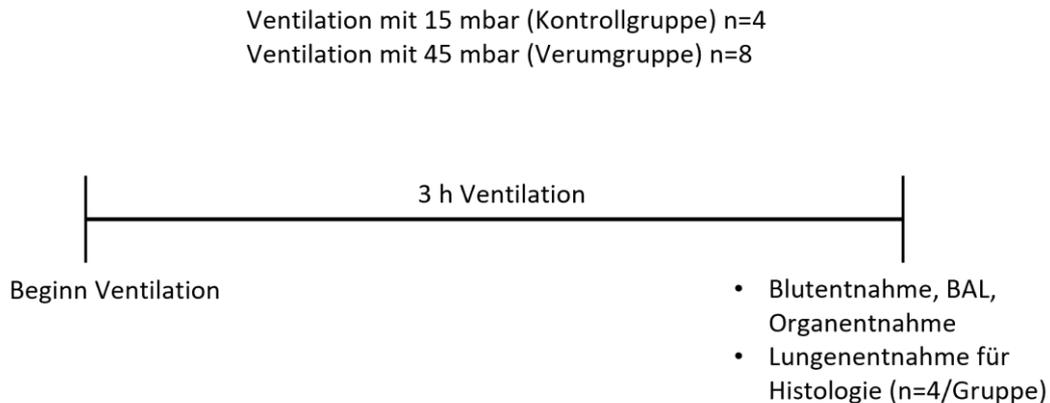
### 2.3.2 Modell des beatmungsinduzierten Lungenschadens

Beim Modell des beatmungsinduzierten Lungenschadens wird der Lungenschaden durch eine invasive Beatmung verursacht. Dieses Modell wird im Nachfolgenden als ventilator-induced lung injury (VILI) Modell bezeichnet.

Die Mäuse wurden an ein Beatmungsgerät angeschlossen und über drei Stunden kontinuierlich beatmet. Das Ziel war es, durch diese invasive Beatmung mit einem sehr hohen inspiratorischen Druck einen nicht-infektiösen Lungenschaden zu generieren. Hierfür wurden die Mäuse mit einer gewichtsadaptierten, intraperitoneal verabreichten Pentobarbitalgabe betäubt und auf einem Präparationstisch fixiert. Das Fell wurde am späteren Schnittbereich mit Paraffinöl befeuchtet, um ein Ablösen von Haaren und somit eine mögliche Probenverunreinigung zu vermeiden. Um die Trachea freizulegen, wurde am Hals ein kurzer Längsschnitt durchgeführt, die Muskulatur und die Speicheldrüsen mobilisiert und nach lateral verschoben. Anschließend wurde über eine kleine Inzision am kranialen Ende der Trachea ein Tubus eingeführt und mit zwei Fäden fixiert. An diesen Tubus wurde über ein Verbindungsstück der Beatmungsschlauch angeschlossen.

Die Beatmung erfolgte über einen Zeitraum von drei Stunden. Für die Verumgruppen wurde ein inspiratorischer Spitzendruck von 45 mbar bei einer Frequenz von 75 Atemhüben/Minute eingestellt, für die Kontrollgruppen 20 mbar

inspiratorischer Spitzendruck bei 105 Atemhüben/Minute. Die Beatmung erfolgte mit 100% Sauerstoff (**Abbildung 5**).



**Abbildung 5:** Versuchsablauf VILI-Modell

### 2.3.3 Probenentnahme

Beim LPS-Inhalationsmodell wurden die Mäuse nach vier Stunden Inkubationszeit mit Pentobarbital intraperitoneal betäubt und fixiert, die Trachea freigelegt, ein Tubus eingesetzt und mit zwei Fäden befestigt. Beim Ventilationsmodell wurde der Beatmungsschlauch nach drei Stunden Beatmung diskonnektiert und der Tubus in der Trachea belassen. Die Probenentnahme erfolgte in beiden Modellen auf gleiche Art und Weise.

Zu Beginn wurde die Blutentnahme durchgeführt, wofür mit Schere und Pinzette zunächst über einen Längsschnitt das Abdomen eröffnet wurde. Die Blutentnahme von 300 µl Blut erfolgte mit einer 27-Gauge-Kanüle aus der Vena cava inferior in eine mit 30 µl Citrat gefüllte Spritze. Anschließend wurde über den zuvor eingeführten endotrachealen Tubus das bronchoalveoläre System dreimal mit je 600 µl Phosphate Buffered Saline<sup>-</sup> (PBS<sup>-</sup>) gespült und so die Bronchoalveoläre Lavage (BAL) gewonnen. Aus der BAL wurde im weiteren Verlauf die Zellzahl bestimmt, sowie die Konzentrationen von Myeloperoxidase (MPO), Protein, IL-6, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  ermittelt. Zudem wurde ein Teil des rechten Leberlappens, das Herz sowie die Lunge entnommen. Alle Proben wurden in Flüssigstickstoff schockgefroren und anschließend im Gefrierschrank (-80 °C) aufbewahrt.

Bei vier Tieren pro Gruppe wurde keine BAL durchgeführt, sondern die gesamte Lunge für die histologische Aufarbeitung entnommen. Die Lunge wurde über den eingebrachten Tubus mit einer Fixierlösung (3,9%ige Formalinlösung) befüllt, die Trachea mit einem Faden verschlossen, die Lunge explantiert und für ca. 24 Stunden bei Raumtemperatur in Fixierlösung gelagert.

#### 2.3.4 Zellzahl in der BAL

In der BAL wurde per automatischer und manueller Zellzählung die Anzahl an Zellen (hauptsächlich PMNs) bestimmt. Für das automatische Auszählen wurden 10 µl BAL in 10 ml CASY-TON-Flüssigkeit gegeben, durch den CASY cell counter and analyzer TT, mit voreingestelltem Verdünnungsfaktor, die Zellanzahl ermittelt. Dabei wurden jeweils 5 Werte gemessen und der Mittelwert berechnet. Bei der manuellen Auszählung wurden 10 µl BAL 1:100 mit Trypanblaulösung verdünnt. Von dieser verdünnten Lösung wurden dann 10 µl auf einen Neubauer-Zählchip gegeben, ausgezählt und anschließend die Zellzahl ausgerechnet.

#### 2.3.5 Zytokinkonzentrationen in der BAL

Zur Ermittlung der Konzentration von TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-1 $\beta$  in der BAL wurden ELISA-Tests durchgeführt (enzyme-linked immunosorbent assay).

Dazu wurde eine 96-Well-Mikrotiterplatte mit einem Capture-Antikörper beschichtet. Je nach zu ermittelndem Zytokin wurde eine bestimmte Menge an Capture-Antikörper in 11 ml PBS<sup>-</sup> (speziell für ELISA filtriert) gelöst:

**Tabelle 13:** Menge an Capture-Antikörper

<b>Zytokin</b>	<b>Menge Capture-Antikörper in 11 ml PBS<sup>-</sup></b>
Tumornekrosefaktor- $\alpha$	88 µl
Interleukin-6	92 µl
Interleukin-1 $\beta$	92 µl

Von dieser Lösung wurden jeweils 100 µl in jedes Well der Mikrotiterplatte gegeben. Nach der Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur wurde die Platte gewaschen (300 µl 0,5%ige Tween-PBS<sup>-</sup>-Lösung), sodass nur die gebundenen

Antikörper in den Wells verblieben. Auch zwischen allen folgenden Schritten wurde die Mikrotiterplatte jeweils drei Mal gewaschen.

Zuerst wurden eine Blocklösung durch Mischen von Reagent Diluent im Verhältnis 1:10 mit Aqua destillata erstellt. Durch Zugabe von 150 µl blockierender Lösung pro Well wurden bei einer Inkubationszeit von 60 Minuten unspezifische Bindungen abgesättigt. Diese Lösung diente im weiteren Verlauf auch zum Auflösen des Detektion-Antikörpers, des Streptavidins und zur Herstellung der Standardreihe. Die Proben wurden vor der Eingabe für zehn Minuten bei 1300 Umdrehungen bei 4 °C zentrifugiert. Parallel dazu wurde nach Herstellerangaben in der Blocklösung eine Standardreihe für jedes Zytokin erstellt.

Nach der Zentrifugation wurden je 100 µl der Probe oder der jeweiligen Standardlösung in die einzelnen Wells gegeben. Die Inkubationszeit erfolgte über zwei Stunden mit anschließendem Waschen.

Anschließend wurde der biotinylierte Detektion-Antikörper hinzugegeben. Auch hier wurde je nach zu ermittelndem Zytokin eine spezifische Menge auf 11 ml Blocklösung gelöst:

**Tabelle 14:** Menge an Detektion-Antikörper

<b>Zytokin</b>	<b>Menge Detektion-Antikörper in 11 ml Blocklösung</b>
Tumornekrosefaktor-α	183 µl
Interleukin-6	184 µl
Interleukin-1β	184 µl

Von den erhaltenen Lösungen wurden jeweils 100 µl / Well hinzugegeben. Es folgte, wie nach Zugabe der Probe bzw. der Standardlösung, eine zweistündige Inkubationszeit mit anschließendem Waschschrift.

Anschließend wurden pro Well 100 µl mit horseradish peroxidase (HRP) konjugiertes Streptavidin zugegeben, welches an das Biotin des Detektion-Antikörpers bindet. Das Streptavidin wurde im Verhältnis 1:40 mit der

Blocklösung verdünnt. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten im Dunkeln wurden Wasserstoffperoxid (Color Reagent A) und Tetramethylbenzidine (Color Reagent B) im Verhältnis 1:1 gemischt und jeweils 100 µl pro Well zugegeben. Die HRP-Peroxidase reagierte mit den Substraten zu einem durch blaue Farbe gekennzeichneten Endprodukt. Das Abstoppen der Farbreaktion erfolgte durch 50 µl Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) pro Well. Zum Schluss wurde die Endproduktkonzentration photometrisch mit dem Tecan- Reader infinite M200 PRO gemessen.

Die Auswertung erfolgte wie bei den nachfolgend beschriebenen Messungen der Protein- und MPO-Konzentrationen mit dem Programm Magellan™.

### **2.3.6 Proteinkonzentration in der BAL**

Nach Erstellung einer Albumin-Standardreihe wurden die Wells der Pipettierplatte mit je 25 µl Albumin-Standardlösung oder Probe befüllt. Durch Mischung von Reagent A und Reagent B im Verhältnis von 50:1 wurde die Bicinchoninsäuren (BCA)-Reagenz hergestellt. Anschließend wurden pro Well 200 µl BCA-Reagenz hinzugegeben und für 30 Minuten bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert.

Durch die Verbindung von Protein und Cu<sup>2+</sup> wurde Cu<sup>2+</sup> zu Cu<sup>1+</sup> reduziert, welches zusammen mit Bicinchoninsäure einen rosa Farbkomplex bildete, welcher sofort photometrisch vermessen wurde.

### **2.3.7 Myeloperoxidase-Konzentration in der BAL**

Je 50 µl der Probe wurden auf eine Pipettierplatte gegeben und anschließend jeweils 100 µl einer ABTS-Lösung hinzugegeben. Zur Herstellung dieser Lösung wurden 1,25 ml Citratpuffer, 11,25 ml Aqua destillata, 7 mg ABTS-Pulver und 12,5 µl Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) gemischt.

Nach Zugabe der Lösung wurde die Pipettierplatte für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde eine photometrische Messung durchgeführt.

### 2.3.8 Histologie

Die in 3,9%iger-Formalinlösung fixierten Organe wurden nach 24 Stunden in einem Gewebeeinfiltrationsautomaten schrittweise entwässert und mit Paraffin infiltriert. Anschließend wurden die Organe im Gewebeeinbettautomaten in Paraffin eingebettet und anschließend auf der Kälteplatte abgekühlt.

Diese Paraffinblöcke wurden dann am Rotationsmikrotom in 3 µm dicke Schnitte geschnitten. Zur Entfaltung wurden die Schnitte zunächst in ein Eisbad und anschließend in ein Paraffinstreckbad gegeben. Jeweils drei Schnitte pro Kondition wurden auf einen Objektträger aufgebracht. Die Objektträger wurden über Nacht auf einer Wärmeplatte getrocknet.

### 2.3.9 Immunhistochemische Färbung

Ziel der immunhistochemischen Färbung war die Darstellung der PMNs, der Thrombozyten und ihrer Komplexe, also der PNCs, im Lungengewebe. Die Thrombozyten wurde mit einem thrombozytenspezifischen Antikörper gegen GPIIb (CD41) und die PMNs mit einem spezifischen Antikörper gegen Lymphocyte antigen 6 complex locus G6D (Ly6G) markiert. Durch den unten beschriebenen Einsatz von Zweitantikörpern wird die farbliche Identifizierung der verschiedenen Zelltypen ermöglicht und PNCs im Gewebe können erkannt und quantitativ ausgewertet werden.

Zu Beginn wurden die fixierten Gewebeschnitte mit Xylol entparaffiniert und über eine absteigende Alkoholreihe rehydratisiert. Um unspezifische Reaktionen durch die endogene Peroxidase zu verhindern, wurden diese durch Methanol und Wasserstoffperoxid blockiert. Zur Antigendemaskierung wurden parallel chemische und thermische Verfahren eingesetzt und die Gewebeschnitte über sieben Minuten mit einer Antigen Unmasking Lösung bei 700 W in einer Mikrowelle erhitzt. Anschließend wurde mit einem PAP-Pen jedes Präparat isoliert, um die einzelnen Schnitte separat mit den nachfolgenden Färbe- und Waschschrinen behandeln zu können.

Zunächst wurde vor der Zugabe der Erstantikörper eine Avidin-Block-Lösung aufgetragen, um das Auftreten unspezifischer Reaktionen zu vermindern. Danach wurde jeweils ein thrombozytenspezifischer oder ein PMN-spezifischer Erstantikörper auf die Schnitte gegeben. Parallel dazu wurden Schnitte mit Normal-Immunglobulin G (IgG) oder PBS<sup>-</sup> behandelt, um Positiv- und Negativkontrollen anzufertigen. Nach Zugabe der Erstantikörper folgte eine Inkubation über Nacht bei 4 °C.

Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe eines biotinylierten Zweitantikörpers und anschließend eine Behandlung mit einer zuvor hergestellten ABC-Lösung.

Hierfür wurde das Vectastain-ABC Kit-HRP (Vector Laboratories) verwendet und Lösung A und Lösung B zu gleichen Teilen in PBS<sup>-</sup> gelöst.

Zur optischen Darstellung des ersten Zweitantikörper wurde nach Zugabe der ABC-Solution eine DAB-Chromogen-Lösung verwendet.

Beim zweiten Zweitantikörper wurde ein HistoGreen-Substrat-Kit eingesetzt. Hierfür wurde HistoGreen-Mischung aus Pufferlösung, Chromogen und Wasserstoffperoxid angefertigt und auf die Schnitte gegeben.

Eine strukturelle Gegenfärbung erfolgte mit Nuclear Fast Red. Abschließend wurden die Objektträger mit EUKITT® eingedeckelt.

## **2.4 Datenauswertung und Statistische Tests**

Die Daten wurden mit Hilfe der Software „GraphPad Prism Version 8.4.3 für Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)“ ausgewertet und dargestellt. Es wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (One-way analysis of variance (ANOVA)) durchgeführt. Es wurde der „Dunnett's multiple comparison test“ verwendet, wobei alle Gruppen mit der vom Auswertenden definierten wichtigsten Gruppe verglichen wurden.

Ein Wert für  $p \leq 0,05$  wurde als signifikant definiert. Die verschiedenen Signifikanzniveaus wurden in den Graphen mit Sternen gekennzeichnet: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

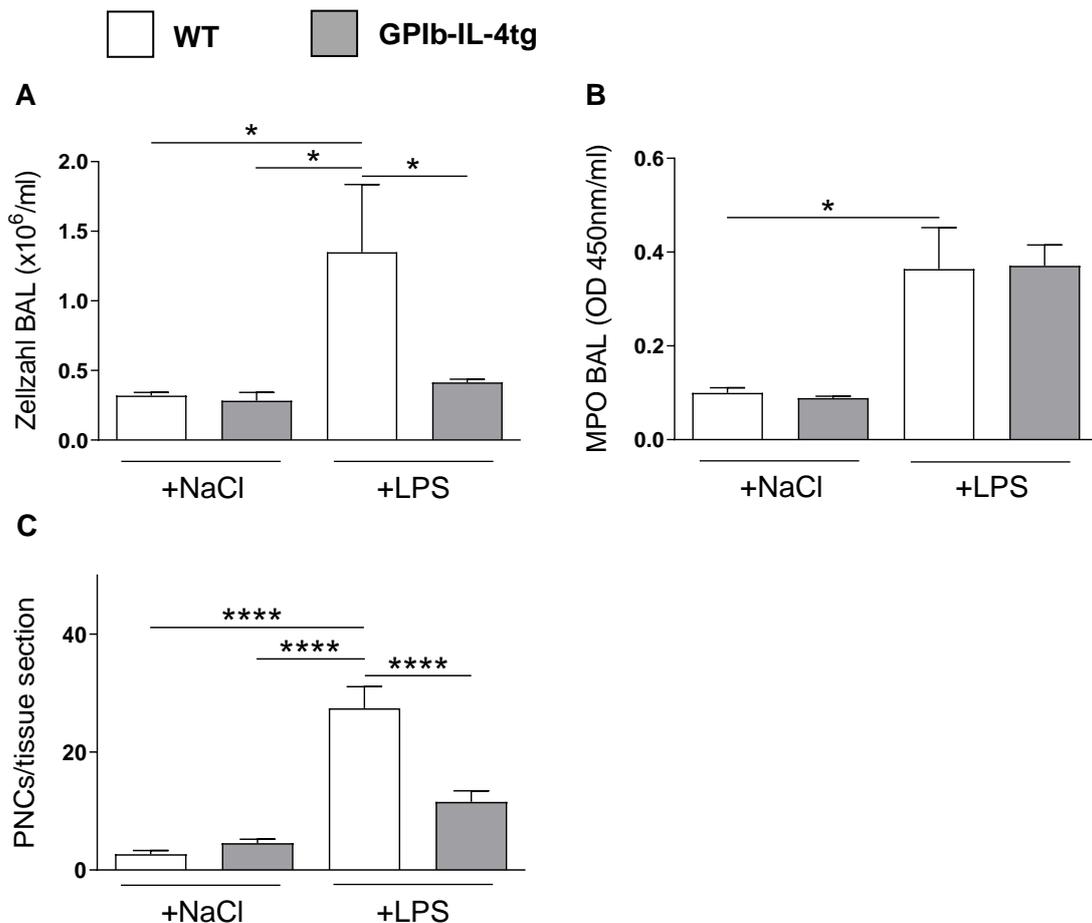
In den Abbildungen dargestellt sind die Mittelwerte und der Standardfehler (SEM).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Einfluss von GPIb

##### 3.1.1 LPS-Inhalations-Modell

Die Ergebnisse der Zellzahlmessung, die MPO-Konzentrationen in den BALs und die jeweiligen PNC-Anzahlen der ausgezählten immunhistochemischen Aufarbeitungen sind in folgender Grafik (**Abbildung 6**) dargestellt:



**Abbildung 6:** Zellzahl in BAL (A), MPO-Konzentration in BAL (B) und PNC-Anzahl in immunhistochemischen Schnitten (C) nach NaCl- bzw. LPS-Inhalation in WT- und GPIb-IL-4tg-Tieren; dargestellt sind Mittelwerte und SEM; \*p<0,05 \*\*\*\*p<0,0001

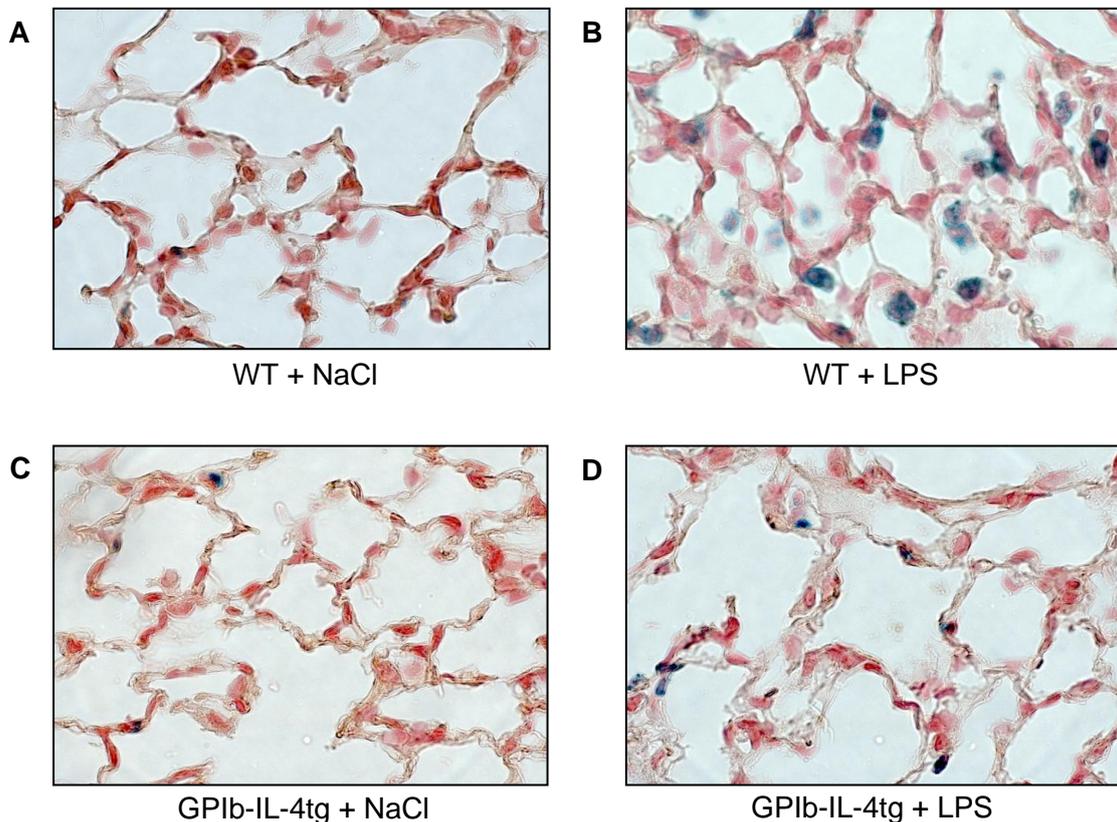
#### Zellzahl in der BAL

Die Zellzahl in der BAL von Wildtyp-Tieren (WT) die LPS inhalierten (WT + LPS:  $1,349 \pm 0,488 \times 10^6/\text{ml}$ ), war signifikant höher als in der BAL der NaCl-inhalierenden Kontrollgruppen (WT + NaCl:  $0,3185 \pm 0,02411 \times 10^6/\text{ml}$ ,  $p=0,0258$ ; GPIb-IL-4tg:  $0,283 \pm 0,05956 \times 10^6/\text{ml}$ ,  $p=0,0461$ ).

Bei den GPIb-IL-4tg-Tieren war dieser Anstieg nach LPS-Inhalation nicht zu beobachten, die Zellzahl befand sich auf Niveau der NaCl-Kontrollen ( $0,4147 \pm 0,02275 \times 10^6/\text{ml}$ ). Der Unterschied zwischen WT + LPS und GPIb-IL-4tg + LPS war mit einem p-Wert von 0,0462 signifikant (**Abbildung 6**).

### Myeloperoxidase-Konzentration in der BAL

Die Myeloperoxidase-Konzentration bei den NaCl-inhalierenden Kontrollen lag in beiden Gruppen auf gleichem Niveau (WT + NaCl:  $0,09954 \pm 0,01118$ ; GPIb-IL-4tg + NaCl:  $0,08895 \pm 0,003656$ ). Bei WT + LPS stieg die Konzentration stark an auf  $0,3635 \pm 0,0885$ , ebenso bei GPIb-IL-4tg + LPS auf  $0,3708 \pm 0,04431$  (**Abbildung 7**).



**Abbildung 7:** Immunhistochemische Färbung von Lungenschnitten nach NaCl- bzw. LPS-Inhalation in WT- und GPIb-IL-4tg-Tieren. Markierung der PMNs mit einem Ly6G-Antikörper und der Thrombozyten mit einem CD41-Antikörper; (A) WT + NaCl (B) WT + LPS (C) GPIb-IL-4tg + NaCl (D) GPIb-IL-4tg + LPS

### **PNC-Anzahl in immunhistochemischen Schnitten**

Zur Bestimmung der PNC-Anzahl wurden immunhistochemische Färbungen angefertigt. Von drei Tieren pro Gruppe wurden je drei Schnitte angefertigt und in diesen die Anzahl an PNCs in den immunhistochemisch gefärbten Lungenschnitten ausgezählt. Die Auswertung dieser Auszählung wird in **Abbildung 6** dargestellt. Eine exemplarische Färbung pro Kondition wird in **Abbildung 7** dargestellt.

In Relation zur gemessenen Zellzahl in der BAL zeigten sich ähnliche Ergebnisse.

Die Anzahl an PNCs bei den NaCl-inhalierenden Kontrollen befand sich auf gleichem, niedrigem Niveau (WT + NaCl:  $2,667 \pm 0,6455$  PNCs/tissue section; GPIb-IL-4tg + NaCl:  $4,556 \pm 0,669$  PNCs/tissue section).

Bei den Wildtyptieren, die LPS inhalierten, stieg die PNC-Anzahl stark und signifikant auf  $27,44 \pm 3,64$  PNCs/tissue section ( $p < 0,0001$ ) an, bei GPIb-IL-4tg + LPS war der Anstieg geringerer ( $11,56 \pm 1,864$  PNCs/tissue section). Der Unterschied zwischen WT + LPS und GPIb-IL-4tg + LPS war signifikant ( $p < 0,0001$ ).

### **Zytokinkonzentrationen in der BAL**

Die beiden Zytokine IL-6 und TNF- $\alpha$  verhielten sich bei den jeweiligen Gruppen sehr ähnlich.

Bei den NaCl-inhalierenden Tieren lagen die Konzentrationen der Zytokine deutlich niedriger als bei den LPS inhalierenden Tieren. Jedoch waren sowohl bei IL-6 als auch bei TNF- $\alpha$  die Konzentrationen bei GPIb-IL-4tg + NaCl (IL-6:  $86,38 \pm 50,92$  pg/ml; TNF- $\alpha$ :  $82,61 \pm 46,72$  pg/ml) etwas höher als bei WT + NaCl (IL-6:  $14,69 \pm 3,206$  pg/ml; TNF- $\alpha$   $6,894 \pm 1,642$  pg/ml) Tieren. Bei den LPS-inhalierenden Tieren lagen die Werte deutlich höher, jedoch ohne Unterschied zwischen WT + LPS (IL-6:  $282,1 \pm 28,65$  pg/ml; TNF- $\alpha$ :  $183,5 \pm 32,76$  pg/ml) und GPIb-IL-4tg + LPS (IL-6:  $289,8 \pm 15,44$  pg/ml; TNF- $\alpha$ :  $173,9 \pm 21,62$  pg/ml) (**Abbildung 8**).

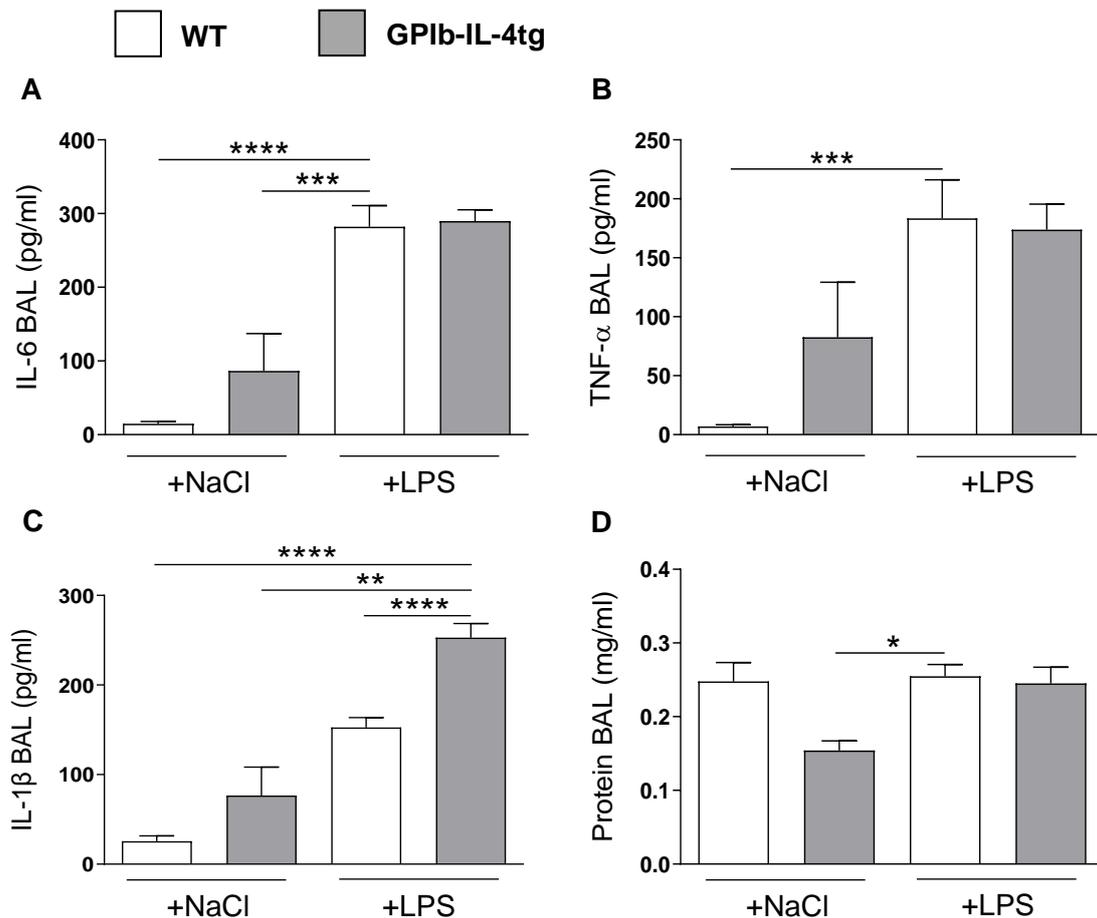
Bei IL-1 $\beta$  verhielten sich die Zytokinkonzentrationen ähnlich wie bei IL-6 und TNF- $\alpha$ , mit Ausnahme der Konzentration bei GPIb-IL-4tg + LPS, die mit  $252,9 \pm$

15,76 pg/ml signifikant höher lag als bei WT + LPS (152,6 ± 11,01 pg/ml;  $p < 0,0001$ ).

Bei den NaCl-Kontrollen war wiederum die Konzentration bei den GPIb-IL-4tg-Tieren (76,71 ± 31,77 pg/ml) im Vergleich zu den WT-Tieren (25,59 ± 6,029 pg/ml) leicht erhöht, aber insgesamt auf niedrigem Niveau (**Abbildung 8**).

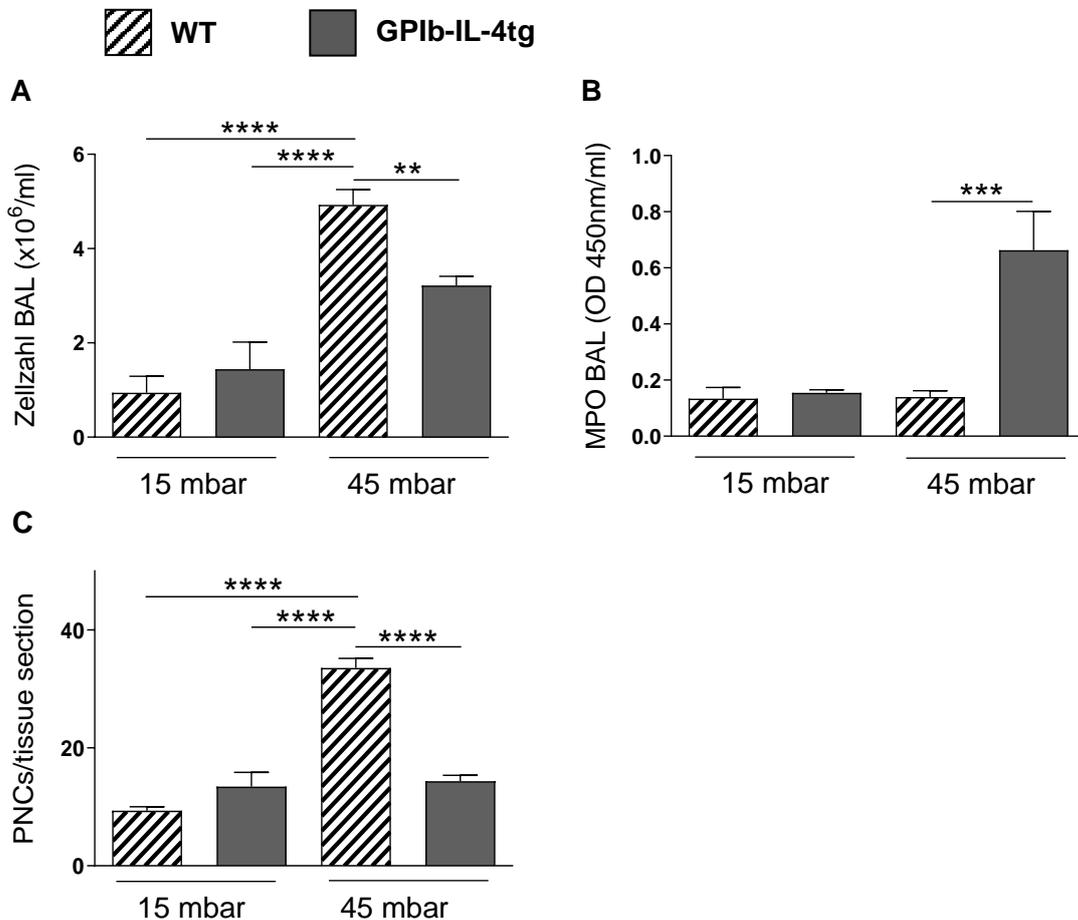
### Proteinkonzentration in der BAL

Die Proteinkonzentrationen lagen für WT + NaCl (0,248 ± 0,02549 mg/ml), WT + LPS (0,2548 ± 0,01593 mg/ml) und GPIb-IL-4tg + LPS (0,2452 ± 0,022 mg/ml) auf ähnlichem Niveau, lediglich bei GPIb-IL-4tg + NaCl war mit 0,1542 ± 0,01284 mg/ml eine leicht erniedrigte Konzentration zu messen (**Abbildung 8**).



**Abbildung 8:** Konzentration von IL-6 (A), TNF-α (B), IL-1β (C) und Protein (D) in der BAL nach NaCl- bzw. LPS-Inhalation in WT- und GPIb-IL-4tg-Tieren; dargestellt sind Mittelwerte und SEM; \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  \*\*\*\* $p < 0,0001$

### 3.1.2 VILI-Modell



**Abbildung 9:** Zellzahl in BAL (A), MPO-Konzentration in BAL (B) und PNC-Anzahl in immunhistochemischen Schnitten (C) nach Ventilation mit 15 bzw. 45 mbar in WT- und GPIb-IL-4tg-Tieren; dargestellt sind Mittelwerte und SEM; \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

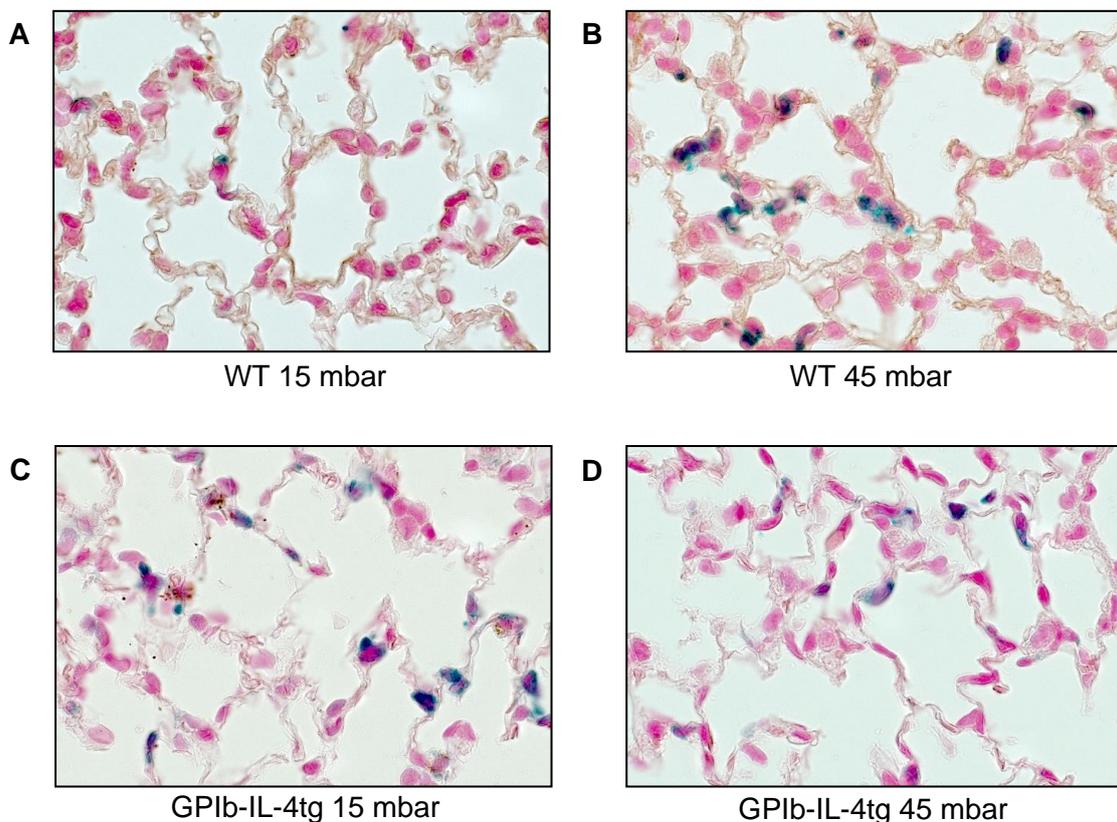
#### Zellzahl in der BAL

Die Zellzahl zeigte im VILI-Modell ein ähnliches Bild wie im LPS-Inhalations-Modell. Es war ein signifikanter Anstieg der Zellzahl bei WT mit 15 mbar ( $0,9436 \pm 0,3507 \times 10^6/\text{ml}$ ) und GPIb-IL-4tg mit 15 mbar ( $1,44 \pm 0,5774 \times 10^6/\text{ml}$ ) zu WT-Mäusen mit 45 mbar Beatmungsdruck zu beobachten ( $4,925 \pm 0,3282 \times 10^6/\text{ml}$ ;  $p < 0,0001$ ).

Bei den gendefizienten Tieren, die mit 45 mbar ventiliert wurden, fiel der Anstieg deutlich geringer aus ( $3,216 \pm 0,1953 \times 10^6/\text{ml}$ ). Verglichen mit den Wildtyptieren war der Unterschied signifikant ( $p = 0,0054$ ) (**Abbildung 9**).

### Myeloperoxidase-Konzentration in der BAL

Es zeigten sich keine Unterschiede bei den MPO-Konzentrationen von WT mit 15 mbar ( $0,1334 \pm 0,0403$ ), GPIb-IL-4tg mit 15 mbar ( $0,1549 \pm 0,01074$ ) und WT mit 45 mbar ( $0,1394 \pm 0,02281$ ) Beatmungsdruck. In der Gruppe der gendefizienten GPIb-IL-4tg Tiere, die mit 45 mbar beatmet wurden, war die MPO-Konzentration jedoch signifikant erhöht ( $0,6632 \pm 0,1381$ ;  $p=0,0004$ ) (**Abbildung 9**).



**Abbildung 10:** Immunhistochemische Färbung von Lungenschnitten nach Ventilation mit 15 bzw. 45 mbar in WT- und GPIb-IL-4tg-Tieren. Markierung der PMNs mit einem Ly6G-Antikörper und der Thrombozyten mit einem CD41-Antikörper; (A) WT mit 15 mbar (B) WT mit 45 mbar (C) GPIb-IL-4tg mit 15mbar (D) GPIb-IL-4tg mit 45mbar

### PNC-Anzahl in immunhistochemischen Schnitten

In **Abbildung 10** ist je ein Beispiel der immunhistochemischen Färbungen pro Gruppe dargestellt.

Die Anzahl der ausgezählten PNCs (**Abbildung 9**) verhielt sich äquivalent zu den Werten der Zellzahlermittlung in der BAL: Ein niedriges Niveau bei den

normoventilierten Tieren (WT mit 15 mbar:  $9,333 \pm 0,6667$  PNCs/tissue section; GPIb-IL-4tg mit 15 mbar:  $13,44 \pm 2,422$  PNCs/tissue section) und ein stark signifikanter Anstieg ( $p < 0,0001$ ) bei den WT mit 45 mbar Beatmungsdruck ( $33,56 \pm 1,642$  PNCs/tissue section). Bei den GPIb-IL-4tg mit 45 mbar ( $14,33 \pm 1,014$  PNCs/tissue section) war hingegen kein Anstieg zu sehen. Der Unterschied zu den mit 45 mbar beatmeten WT-Tieren war deutlich signifikant ( $p < 0,0001$ ).

### **Zytokinkonzentrationen in der BAL**

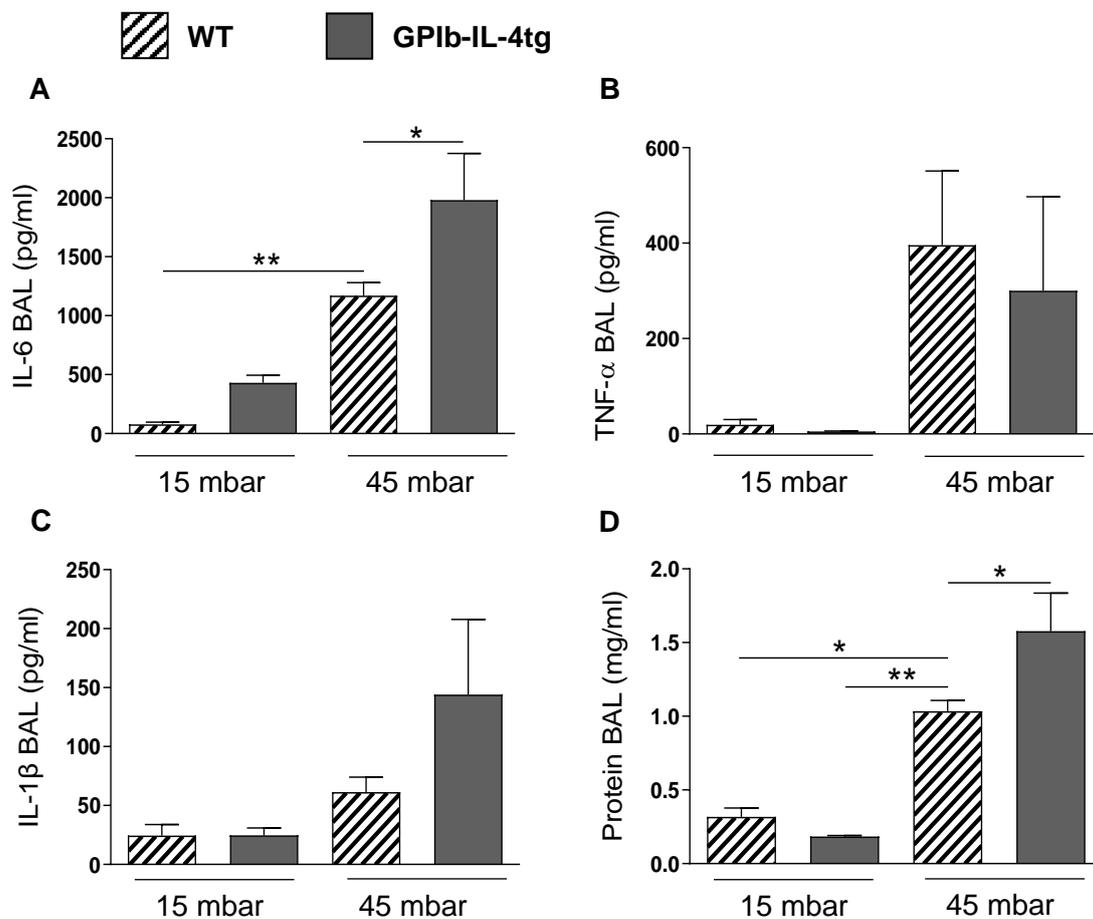
In Bezug auf die IL-6 Konzentrationen zeigte sich ein Anstieg bei den Schädigungsgruppen (Ventilation mit 45 mbar) im Vergleich zu den Kontrollgruppen (Ventilation mit 15 mbar). Bei den gendefizienten Tieren war sowohl bei den normoventilierten (GPIb-IL-4tg mit 15 mbar:  $430 \pm 64,08$  pg/ml) als auch bei den mit 45 mbar ventilierten Tieren ( $1981 \pm 394,1$  pg/ml) eine höhere Konzentration im Gegensatz zu den jeweiligen WT-Tieren zu beobachten (WT mit 15 mbar:  $78,71 \pm 17,71$  pg/ml; WT mit 45 mbar:  $1169 \pm 111,8$  pg/ml). Der Unterschied zwischen GPIb-IL-4tg mit 45 mbar zu WT mit 45 mbar Beatmungsdruck war auch hier signifikant ( $p = 0,025$ ) (**Abbildung 11**).

Bei den gemessenen TNF- $\alpha$ -Konzentrationen wurde ein Anstieg in beiden Schädigungsgruppen (WT mit 45 mbar:  $395,7 \pm 155,8$  pg/ml; GPIb-IL-4tg mit 45 mbar:  $300,1 \pm 197,1$  pg/ml) gegenüber den Kontrollgruppen (WT mit 15 mbar:  $19,18 \pm 11,06$  pg/ml; GPIb-IL-4tg mit 15 mbar:  $5,158 \pm 0,8562$  pg/ml) ermittelt. Keinen signifikanten Unterschied gab es zwischen gendefizienten und genkompetenten Tieren (**Abbildung 11**).

Für die IL-1 $\beta$ -Konzentration hingegen konnte nur ein geringer Anstieg in der Gruppe der WT mit 45 mbar beatmeten Tieren ( $61,41 \pm 12,62$  pg/ml) im Vergleich zu den normoventilierten Kontrollen (WT mit 15 mbar:  $24,52 \pm 9,375$  pg/ml; GPIb-IL4-tg mit 15 mbar:  $24,65 \pm 6,205$  pg/ml) festgestellt werden. Ein deutlich erhöhter Wert zeigte sich jedoch in der mit 45 mbar beatmeten GPIb-IL-4tg-Gruppe ( $144,1 \pm 63,8$  pg/ml). Der Unterschied zu den WT-Tieren mit 45 mbar Beatmungsdruck war jedoch nicht signifikant ( $p = 0,3545$ ) (**Abbildung 11**).

## Proteinkonzentration in der BAL

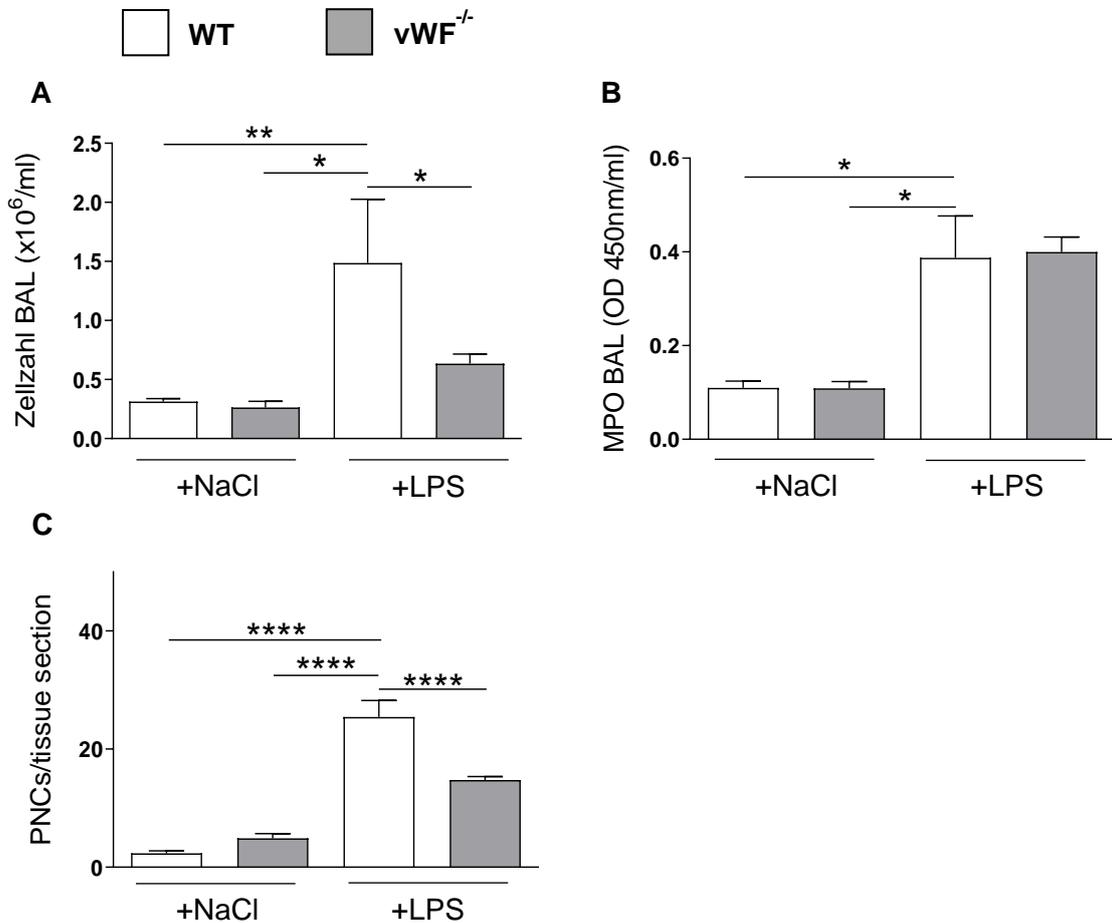
Die beiden mit 45 mbar ventilerten Gruppen zeigten im Vergleich zu den normoventilierten Gruppen (WT mit 15 mbar:  $0,3172 \pm 0,06012$  pg/ml; GPIb-IL-4tg mit 15 mbar  $0,1836 \pm 0,007707$  pg/ml) erhöhte Werte. Der Anstieg der Werte bei den GPIb-IL-4tg Tieren mit 45 mbar Ventilation ( $1,577 \pm 0,2583$  pg/ml) war jedoch im Vergleich zu den WT-Tieren, die mit 45 mbar beatmet wurden ( $1,034 \pm 0,0743$  pg/ml), signifikant höher ( $p=0,0435$ ) (**Abbildung 11**).



**Abbildung 11:** Konzentration von IL-6 (A), TNF-α (B), IL-1β (C) und Protein (D) in der BAL nach Ventilation mit 15 bzw. 45 mbar in WT- und GPIb-IL-4tg-Tieren; dargestellt sind Mittelwerte und SEM; \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$

## 3.2 Einfluss des von-Willebrand-Faktor

### 3.2.1 LPS-Inhalations-Modell



**Abbildung 12:** Zellzahl in BAL (A), MPO-Konzentration in BAL (B) und PNC-Anzahl in immunhistochemischen Schnitten (C) nach NaCl- bzw. LPS-Inhalation in WT- und vWF<sup>-/-</sup>-Tieren; dargestellt sind Mittelwerte und SEM; \*p<0,05 \*\*p<0,01 \*\*\*\*p<0,0001

#### Zellzahl in der BAL

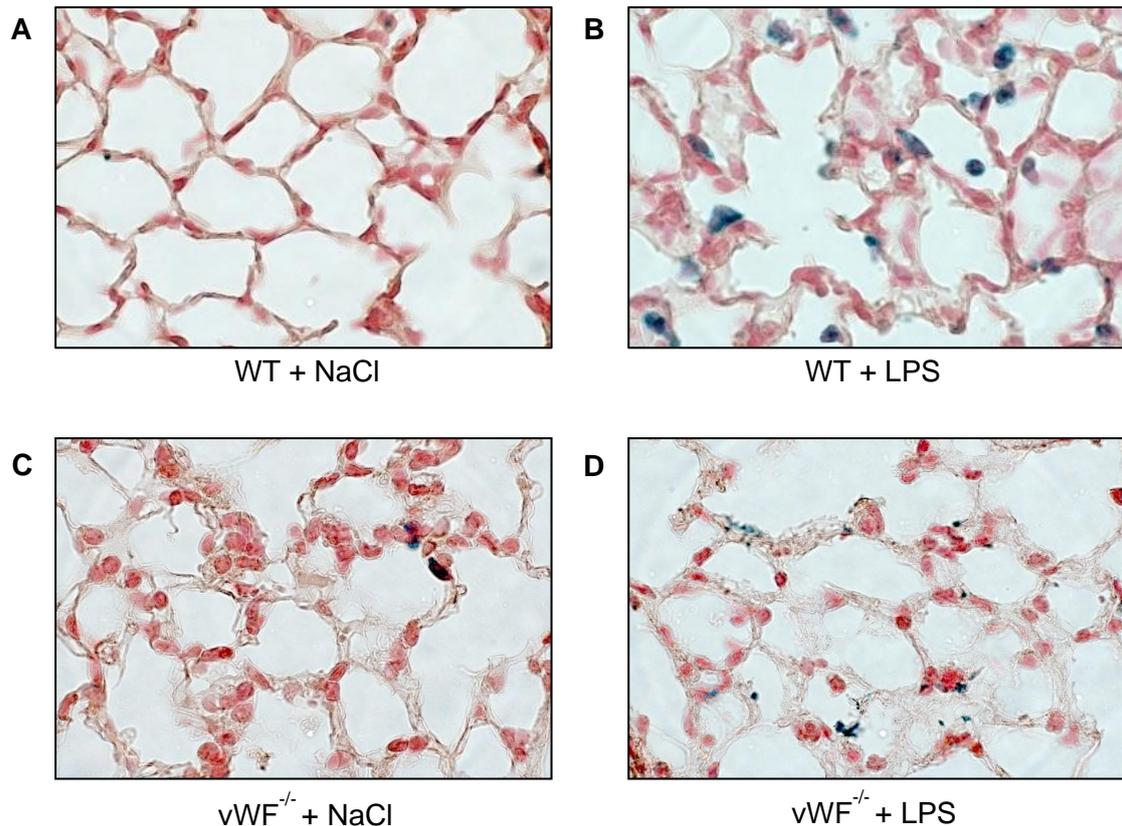
WT-Tiere und vWF-defiziente Tiere (vWF<sup>-/-</sup>) inhalierten NaCl oder LPS. Anschließend wurde die Zellzahl in der BAL ermittelt (**Abbildung 12**). Hier zeigte sich bei den WT-Tieren nach LPS-Inhalation mit  $1,486 \pm 0,5411 \times 10^6$  Zellen/ml ein signifikanter Anstieg der Zellzahl im Vergleich zu den Kontrollgruppen (WT + NaCl:  $0,3137 \pm 0,02422 \times 10^6$  Zellen/ml,  $p=0,0082$ ; vWF<sup>-/-</sup> + NaCl:  $0,263 \pm 0,05274 \times 10^6$  Zellen/ml,  $p=0,0103$ ). Bei den vWF-defizienten Tieren, die LPS inhalierten, stieg die Zellzahl im Vergleich zu den NaCl-Kontrollen in deutlich geringerem Ausmaß auf  $0,6342 \pm 0,08212 \times 10^6$  Zellen/ml an. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen WT + LPS und vWF<sup>-/-</sup> + LPS ( $p=0,0494$ ).

### **Myeloperoxidase-Konzentration in der BAL**

Bei der Konzentrationsmessung der Myeloperoxidase zeigte sich eine Erhöhung der Konzentration bei den LPS-Tieren (WT + LPS:  $0,387 \pm 0,08986$ ; vWF<sup>-/-</sup> + LPS:  $0,3997 \pm 0,03199$ ) im Vergleich zu den NaCl-Tieren (WT + NaCl:  $0,11 \pm 0,01442$ ; vWF<sup>-/-</sup> + NaCl:  $0,1088 \pm 0,01457$ ). Es zeigten sich jedoch keine Konzentrationsunterschiede zwischen WT und vWF<sup>-/-</sup> (**Abbildung 12**).

### **PNC-Anzahl in immunhistochemischen Schnitten**

Entsprechend der Zellzahl in der BAL verhielt sich auch die Anzahl an PNCs (**Abbildung 12**). Jeweils ein immunhistochemischer Schnitt pro Untersuchungsgruppe ist in **Abbildung 13** dargestellt. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg bei den WT-Tieren + LPS ( $25,44 \pm 2,774$  PNCs/tissue section) im Vergleich zu den NaCl-Kontrollen (WT + NaCl:  $2,333 \pm 0,441$  PNCs/tissue section,  $p < 0,0001$ ; vWF<sup>-/-</sup> + NaCl:  $4,889 \pm 0,807$  PNCs/tissue section,  $p < 0,0001$ ), jedoch nur ein geringer Anstieg bei vWF<sup>-/-</sup> + LPS ( $14,78 \pm 0,572$  PNCs/tissue section). Der Unterschied zwischen WT + LPS und vWF<sup>-/-</sup> + LPS war signifikant ( $p < 0,0001$ ).



**Abbildung 13:** Immunhistochemische Färbung von Lungenschnitten nach NaCl- bzw. LPS-Inhalation in WT und  $vWF^{-/-}$ -Tieren. Markierung der PMNs mit einem Ly6G-Antikörper und der Thrombozyten mit einem CD41-Antikörper; (A) WT + NaCl (B) WT + LPS (C)  $vWF^{-/-}$  + NaCl (D)  $vWF^{-/-}$  + LPS

### Zytokinkonzentrationen in der BAL

Auch bei den Zytokinen zeigte sich verglichen mit den Kontrollgruppen (NaCl-Inhalation) eine Konzentrationserhöhung bei Tieren, die LPS inhalierten (**Abbildung 14**). Im Detail zeigte sich bei den Zytokinen IL-6, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  in den LPS-Gruppen eine Erhöhung. Auffälligerweise zeigte sich für alle drei Zytokine, dass in der Gruppe  $vWF^{-/-}$  + LPS der Anstieg signifikant höher ausfiel als bei WT + LPS.

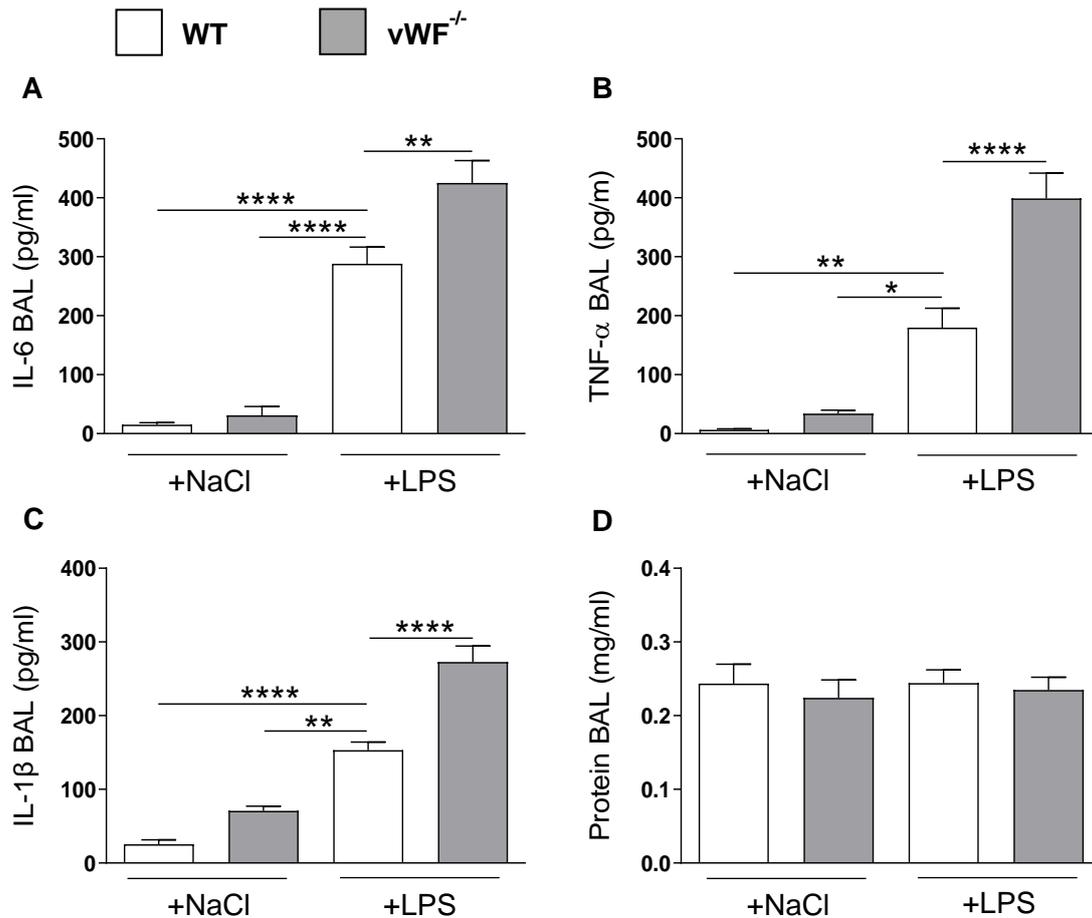
Quantitativ bedeutet dies einen signifikanten Anstieg der gemessenen Konzentration von IL-6 von  $15,23 \pm 3,502$  pg/ml (WT + NaCl) bzw.  $31,02 \pm 15,18$  pg/ml ( $vWF^{-/-}$  + NaCl) auf  $288,1 \pm 28,55$  pg/ml in den Gruppen WT + LPS und bei  $vWF^{-/-}$  + LPS sogar auf  $425,4 \pm 37,8$  pg/ml. Der Unterschied zwischen WT + LPS und  $vWF^{-/-}$  + LPS war signifikant ( $p=0,0027$ ). In Bezug auf die Konzentrationen von TNF- $\alpha$  war ein signifikanter Anstieg bei WT + LPS auf  $180 \pm 32,71$  im

Vergleich zu WT + NaCl  $6,377 \pm 1,591$  pg/ml ( $p=0,0017$ ) und vWF<sup>-/-</sup> + NaCl  $33,9 \pm 5,874$  pg/ml ( $p=0,0184$ ) zu beobachten. Der Unterschied zwischen vWF<sup>-/-</sup> + LPS ( $398,8 \pm 42,99$  pg/ml) und WT + LPS war signifikant unterschiedlich ( $p<0,0001$ ).

Ähnlich hierzu verhielten sich die Werte bei der Konzentrationsmessung von IL-1 $\beta$ . Es gab einen signifikanten Anstieg von IL-1 $\beta$  bei den Kontrollen WT + NaCl ( $25,58 \pm 6,031$  pg/ml;  $p<0,0001$ ) und vWF<sup>-/-</sup> + NaCl ( $70,77 \pm 6,251$  pg/ml;  $p=0,0037$ ) verglichen mit WT + LPS ( $153,3 \pm 11$  pg/ml). Bei den vWF-defizienten Tieren stieg die Konzentration im Vergleich zu den genkompetenten Tieren, die LPS inhalierten, signifikant ( $p<0,0001$ ) auf  $272,9 \pm 21,57$  pg/ml an.

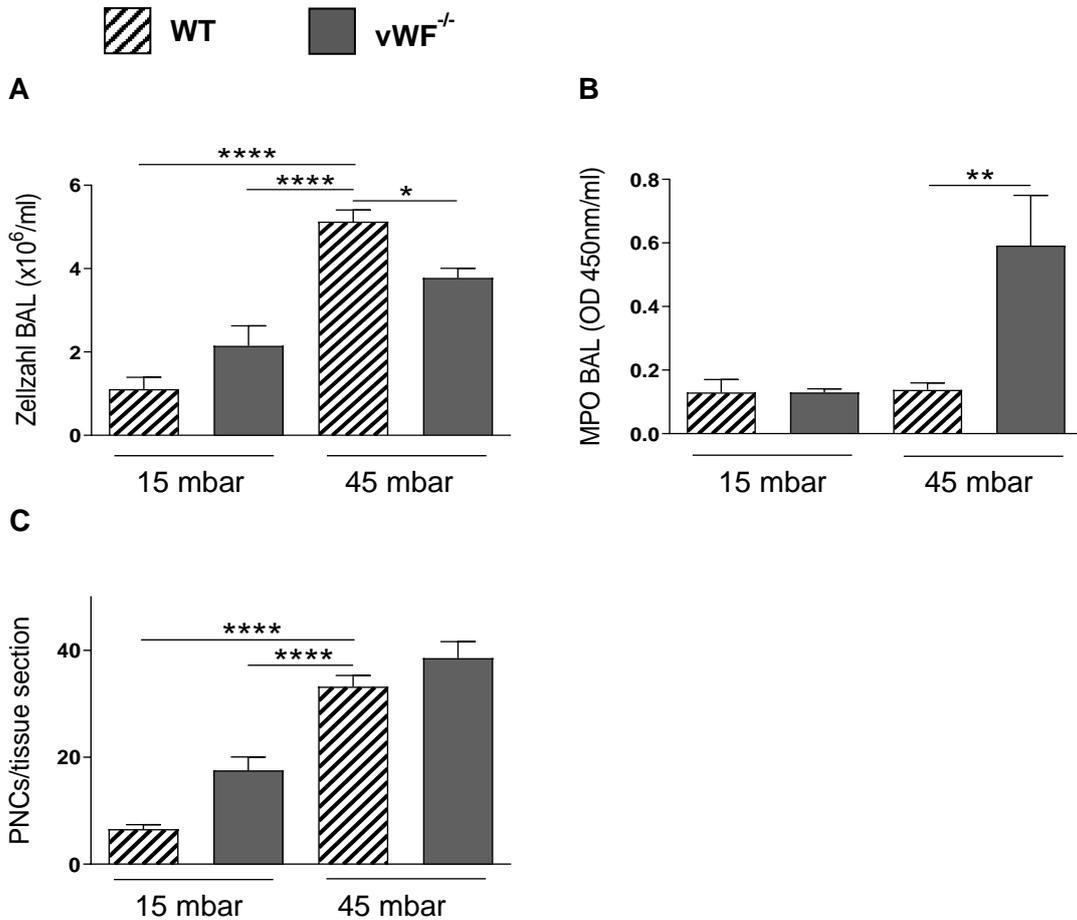
## Proteinkonzentration in der BAL

Der Proteingehalt der BAL aller vier Gruppen unterschied sich nur minimal (WT + NaCl:  $0,2435 \pm 0,02651$  mg/ml;  $vWF^{-/-}$  + NaCl:  $0,2241 \pm 0,02454$  mg/ml; WT + LPS  $0,2441 \pm 0,01816$  mg/ml;  $vWF^{-/-}$  + LPS:  $0,2348 \pm 0,01747$  mg/ml) (Abbildung 14).



**Abbildung 14:** Konzentration von IL-6 (A), TNF- $\alpha$  (B), IL-1 $\beta$  (C) und Protein (D) in der BAL nach NaCl- bzw. LPS-Inhalation in WT- und  $vWF^{-/-}$ -Tieren; dargestellt sind Mittelwerte und SEM; \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\*\* $p < 0,0001$

### 3.2.2 VILI-Modell



**Abbildung 15:** Zellzahl in BAL (A), MPO-Konzentration in BAL (B) und PNC-Anzahl in immunhistochemischen Schnitten (C) nach Ventilation mit 15 bzw. 45 mbar in WT- und vWF<sup>-/-</sup>-Tieren; dargestellt sind Mittelwerte und SEM; \*p<0,05 \*\*p<0,01 \*\*\*\*p<0,0001.

#### Zellzahl in der BAL

Bei der Zellzahl der BAL zeigte sich erneut ein signifikanter Anstieg ( $p < 0,0001$ ) bei den WT mit 45 mbar ( $5,125 \pm 0,2832 \times 10^6$  Zellen/ml) im Vergleich zu den normoventilierten Tieren (WT mit 15 mbar:  $1,105 \pm 0,2876 \times 10^6$  Zellen/ml, vWF<sup>-/-</sup> mit 15 mbar:  $2,146 \pm 0,484 \times 10^6$  Zellen/ml).

Der Anstieg bei vWF<sup>-/-</sup> mit 45 mbar ( $3,775 \pm 0,2308 \times 10^6$  Zellen/ml) im Vergleich zu den normoventilierten Tieren fiel nur gering aus. Der Unterschied zwischen den WT-Tieren mit 45 mbar und den vWF<sup>-/-</sup>-Tieren mit 45 mbar war signifikant ( $p = 0,0356$ ) (**Abbildung 15**).

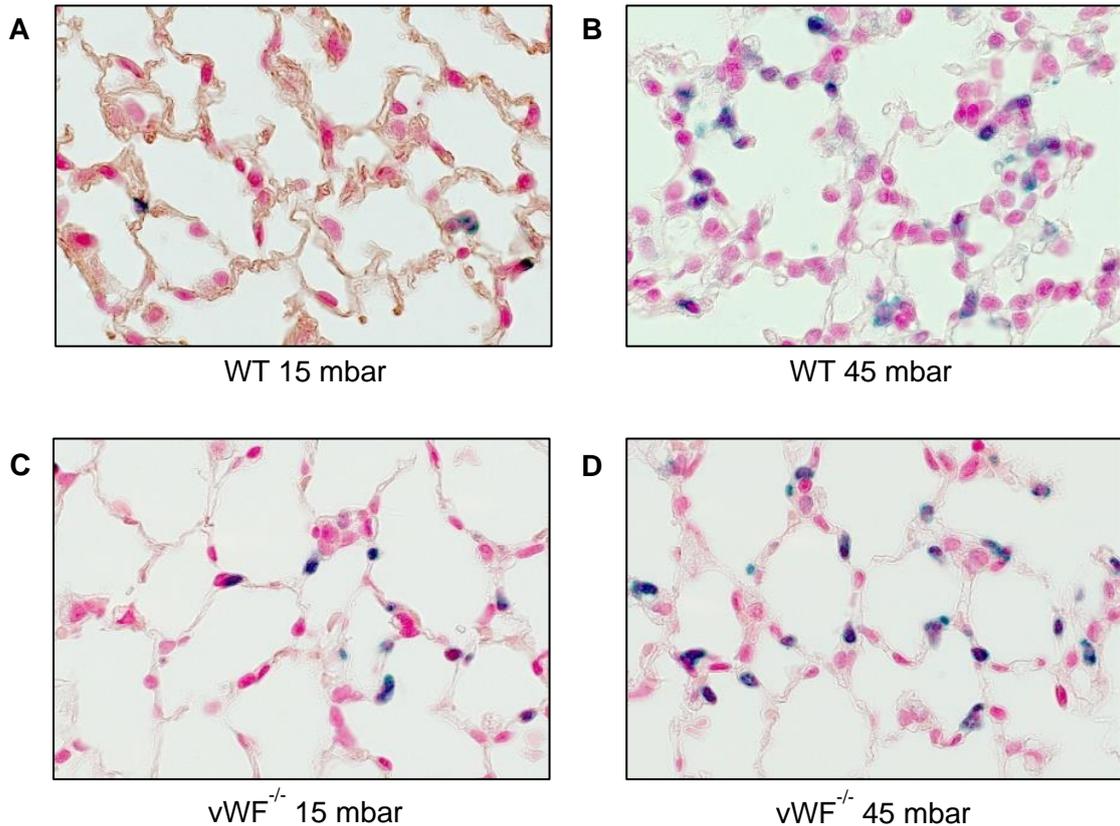
### **Myeloperoxidase-Konzentration in der BAL**

Bei der Konzentration der Myeloperoxidase in der BAL zeigte sich kein Anstieg bei den WT-Tieren mit 45 mbar ( $0,1374 \pm 0,02211$ ) im Vergleich zu den normoventilierten Tieren (WT mit 15 mbar:  $0,1296 \pm 0,04089$ ; vWF<sup>-/-</sup> mit 15 mbar:  $0,1295 \pm 0,01172$ ). Jedoch konnte bei den vWF<sup>-/-</sup> mit 45 mbar ( $0,5914 \pm 0,158$ ) ein signifikanter Anstieg ( $p=0,0049$ ) im Vergleich zur WT mit 45 mbar-Gruppe gemessen werden (**Abbildung 15**).

### **PNC-Anzahl in immunhistochemischen Schnitten**

Jeweils ein immunhistochemischer Schnitt pro Untersuchungsgruppe ist in **Abbildung 16** dargestellt. Die ermittelte Anzahl an PNCs in den immunhistochemischen Schnitten (3 Tiere/Gruppe und 3 Schnitte pro Tier) ist graphisch in **Abbildung 15** dargestellt.

Es zeigte sich ein Anstieg der PNC-Anzahl bei den mit 45 mbar ventilierten Tieren (WT mit 45 mbar:  $33,22 \pm 2,08$  PNCs/tissue section; vWF<sup>-/-</sup> mit 45 mbar:  $38,56 \pm 3,083$  PNCs/tissue section) im Vergleich zu den normoventilierten Tieren (WT mit 15 mbar:  $6,556 \pm 0,8352$  PNCs/tissue section; vWF<sup>-/-</sup> mit 15 mbar  $17,56 \pm 2,489$  PNCs/tissue section). Der Unterschied zwischen vWF<sup>-/-</sup> mit 45 mbar und WT mit 45 mbar war nur gering.



**Abbildung 16:** Immunhistochemische Färbung von Lungenschnitten nach Ventilation mit 15 bzw. 45 mbar in WT- und vWF<sup>-/-</sup>-Tieren. Markierung der PMNs mit einem Ly6G-Antikörper und der Thrombozyten mit einem CD41-Antikörper; (A) WT mit 15 mbar (B) WT mit 45 mbar (C) vWF<sup>-/-</sup> mit 15 mbar (D) vWF<sup>-/-</sup> mit 45 mbar

### Zytokinkonzentrationen in der BAL

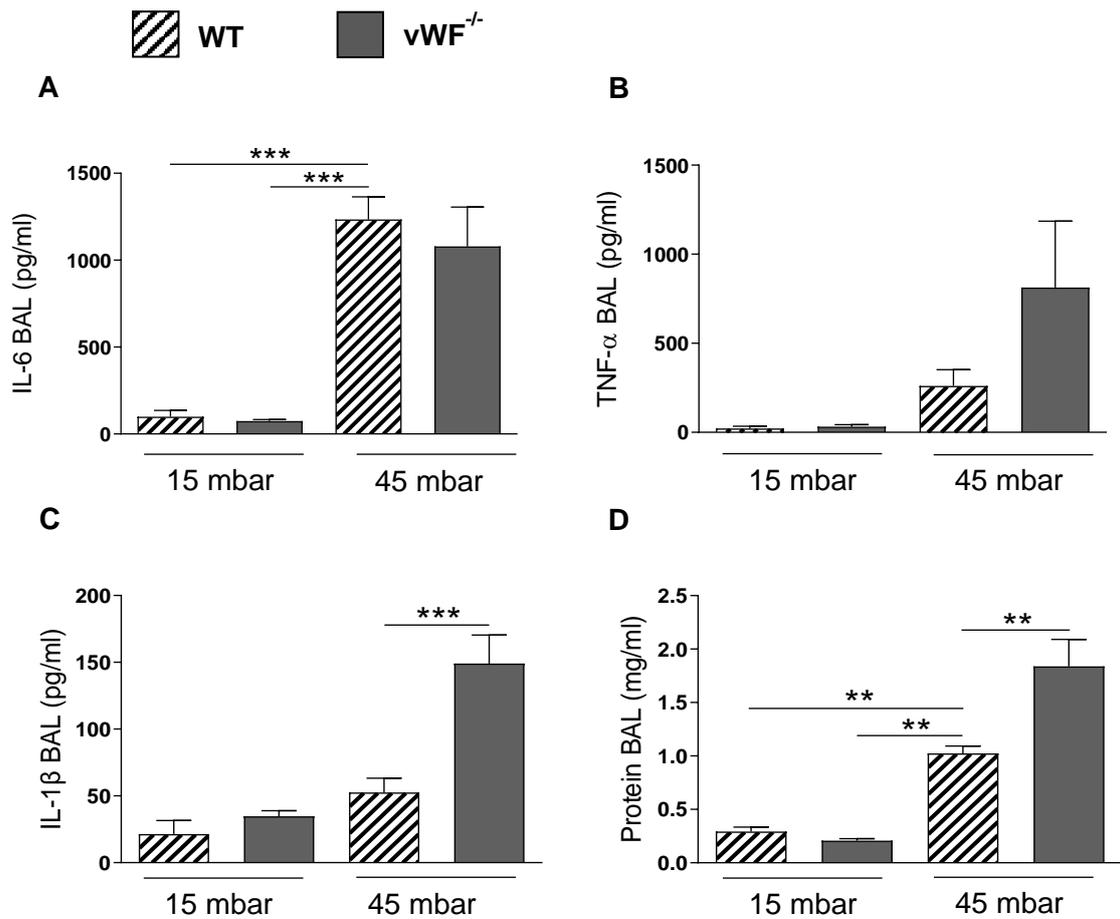
Bei der Konzentration von IL-6 (**Abbildung 17**) zeigte sich eine Erhöhung bei den Schädigungsgruppen (WT mit 45 mbar:  $1234 \pm 129,9$  pg/ml; vWF<sup>-/-</sup> mit 45 mbar:  $1079 \pm 226,2$  pg/ml) gegenüber den Kontrollgruppen (WT mit 15 mbar:  $99,55 \pm 36,52$  pg/ml; vWF<sup>-/-</sup> mit 15 mbar:  $74,58 \pm 8,867$  pg/ml), innerhalb der Schädigungsgruppe war jedoch kein Unterschied zwischen WT und vWF<sup>-/-</sup> zu beobachten.

Bei TNF- $\alpha$  zeigte sich bei WT mit 45 mbar ( $260,4 \pm 90,84$  pg/ml) ein Anstieg im Vergleich zu den normoventilierten Tieren (WT mit 15 mbar:  $21,57 \pm 13,39$  pg/ml; vWF<sup>-/-</sup> + 15 mbar:  $32,02 \pm 11,55$  pg/ml). Bei vWF<sup>-/-</sup> mit 45 mbar ( $813,3 \pm 372,9$  pg/ml) zeigte sich ein stärkerer Anstieg, dieser war jedoch nicht signifikant im Vergleich zu WT mit 45 mbar ( $p=0,2342$ ) (**Abbildung 17**).

In Bezug auf IL-1 $\beta$  waren bei den Kontrollgruppen (WT mit 15 mbar: 21,37  $\pm$  10,23 pg/ml; vWF<sup>-/-</sup> mit 15 mbar: 34,71  $\pm$  4,151 pg/ml) und WT mit 45 mbar (52,54  $\pm$  10,71 pg/ml) nur moderate Unterschiede zu erkennen. Bei vWF<sup>-/-</sup> mit 45 mbar (149  $\pm$  21,37 pg/ml) war hingegen ein starker Anstieg von IL-1 $\beta$  messbar, der im Vergleich zu WT mit 45 mbar auch signifikant war (p=0,0003) (**Abbildung 17**).

### **Proteinkonzentration in der BAL**

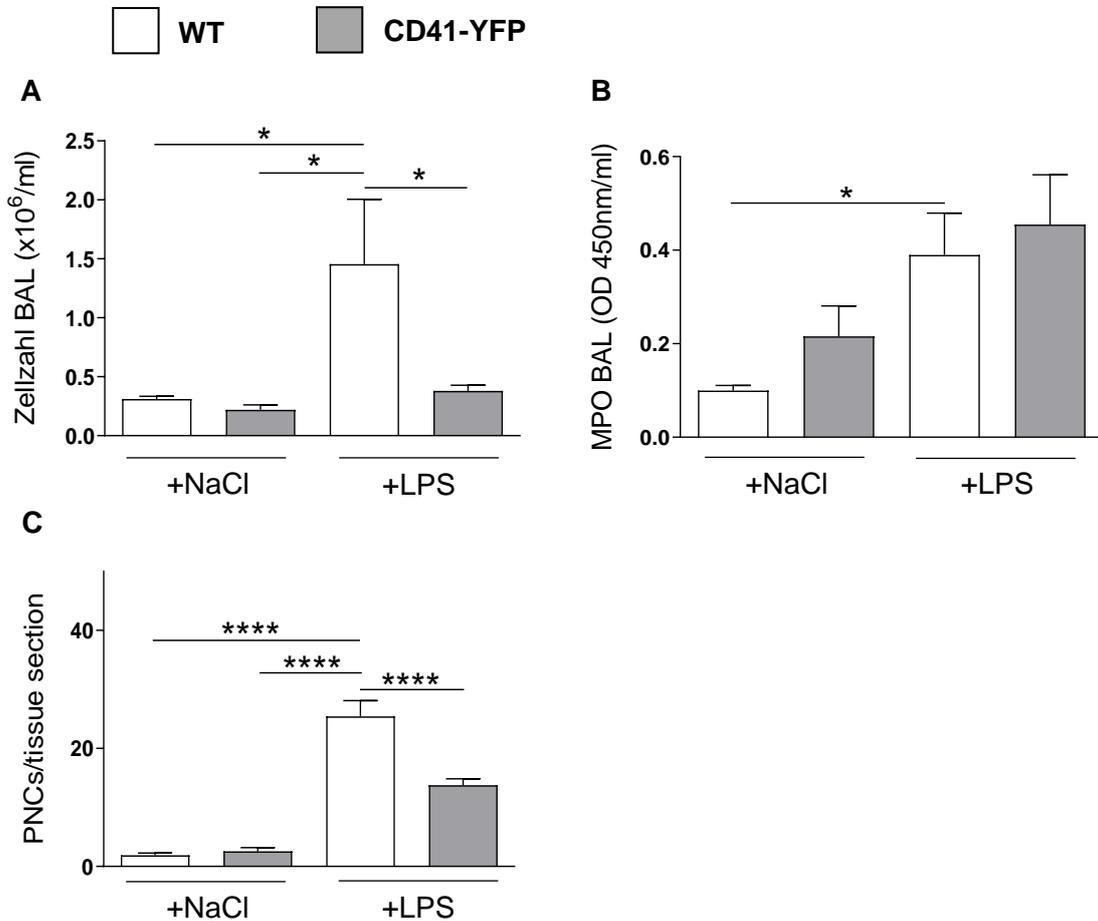
Hier war ein signifikanter Anstieg bei WT mit 45 mbar (1,023  $\pm$  0,06941 mg/ml) im Vergleich zu den normoventilierten Kontrollgruppen zu messen (WT mit 15 mbar 0,2932  $\pm$  0,04087 mg/ml, p=0,0077; vWF<sup>-/-</sup> mit 15 mbar: 0,2082  $\pm$  0,01772 mg/ml; p=0,003). Bei den vWF-defizienten Tieren, die mit 45 mbar ventiliert wurden, fiel der Anstieg der Proteinkonzentration auf 1,839  $\pm$  0,2524 mg/ml im Vergleich zu den gleichbehandelten Wildtyp-Tieren signifikant höher aus (p=0,0012) (**Abbildung 17**).



**Abbildung 17:** Konzentration von IL-6 (A), TNF- $\alpha$  (B), IL-1 $\beta$  (C) und Protein (D) in der BAL nach Ventilation mit 15 bzw. 45 mbar in WT- und vWF<sup>-/-</sup>-Tieren; dargestellt sind Mittelwerte und SEM; \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$

### 3.3 Einfluss von GPIIb/IIIa

#### 3.3.1 LPS-Inhalations-Modell



**Abbildung 18:** Zellzahl in BAL (A), MPO-Konzentration in BAL (B) und PNC-Anzahl in immunohistochemischen Schnitten (C) nach NaCl- bzw. LPS-Inhalation in WT- und CD41-YFP-Tieren; dargestellt sind Mittelwerte und SEM; \* $p < 0,05$  \*\*\*\* $p < 0,0001$

#### Zellzahl in der BAL

Die gemessene Zellzahl (dargestellt in **Abbildung 18**) stieg bei den Wildtyp-Tieren, die LPS inhalierten (WT + LPS:  $1,455 \pm 0,5506 \times 10^6/\text{ml}$ ), im Vergleich zu den NaCl-Kontrollen signifikant an (WT + NaCl:  $0,3104 \pm 0,0236 \times 10^6/\text{ml}$ ;  $p = 0,0229$ ; CD41-YFP+NaCl:  $0,2198 \pm 0,04118 \times 10^6/\text{ml}$ ,  $p = 0,0454$ ). Bei den gendefizienten Tieren, die LPS inhalierten, war kein Anstieg zu beobachten (CD41-YFP + LPS:  $0,3804 \pm 0,04829 \times 10^6/\text{ml}$ ), der Unterschied zu den Wildtyp-Tieren war auch hier signifikant ( $p = 0,0406$ ).

### **Myeloperoxidase-Konzentration in der BAL**

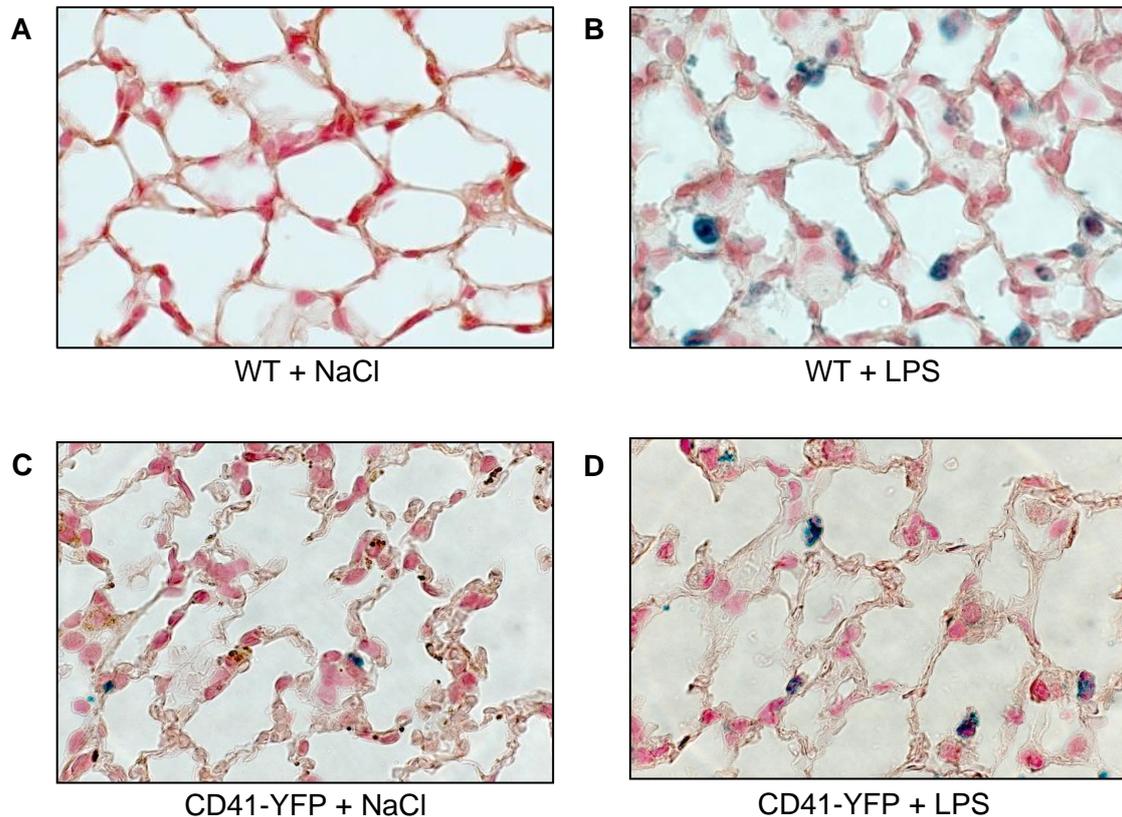
Die gemessenen Konzentrationen der Myeloperoxidase lagen bei WT + NaCl bei  $0,09954 \pm 0,01118$ , bei den CD41-YFP + NaCl etwas höher bei  $0,216 \pm 0,06491$ . Bei den WT-Tieren zeigte die LPS-Gruppe ( $0,3898 \pm 0,08955$ ) signifikant höhere Werte als die NaCl-Gruppe ( $p=0,0393$ ). Bei den CD41-YFP-Mäusen, die LPS inhalierten, stieg die Konzentration sogar noch etwas höher auf  $0,4547 \pm 0,1066$  (**Abbildung 18**).

### **PNC-Anzahl in immunhistochemischen Schnitten**

Hinsichtlich der PNC-Anzahl zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei der gemessenen Zellzahl:  $1,889 \pm 0,3889$  PNCs/tissue section bei WT + NaCl bzw.  $2,556 \pm 0,6261$  PNCs/tissue section bei den CD41-YFP-Mäusen, die NaCl inhalierten.

Bei den WT-Tieren, die LPS inhalierten, zeigte sich im Vergleich zu den NaCl-Kontrollen ein signifikanter Anstieg ( $p<0,0001$ ) auf  $25,44 \pm 2,641$  PNCs/tissue section. Bei den gendefizienten Tieren war ebenfalls ein Anstieg auf  $13,78 \pm 1,09$  PNCs/tissue section messbar, dieser fiel jedoch signifikant geringer aus als bei der entsprechenden Wildtyp-Kontrolle ( $p<0,0001$ ) (**Abbildung 18**).

Jeweils ein Beispiel der immunhistochemischen Färbung pro Untersuchungsgruppe ist in **Abbildung 19** dargestellt.



**Abbildung 19:** Immunhistochemische Färbung von Lungenschnitten nach NaCl- bzw. LPS-Inhalation in WT- und CD41-YFP-Tieren. Markierung der PMNs mit einem Ly6G-Antikörper und der Thrombozyten mit einem CD41-Antikörper; (A) WT + NaCl (B) WT + LPS (C) CD41-YFP + NaCl (D) CD41-YFP + LPS

### Zytokinkonzentrationen in der BAL

Hier präsentierten sich die Konzentrationen vergleichbar mit den Ergebnissen bei den  $vWF^{-/-}$ -Tieren. Für IL-6 wurde ein signifikanter Unterschied von  $15,56 \pm 3,618$  pg/ml bei WT + NaCl gegenüber  $280,5 \pm 28,44$  pg/ml bei WT + LPS gemessen ( $p=0,0081$ ). Bei den CD41-YFP-Mäusen, die NaCl inhalierten, wurde ein ähnlicher Wert wie bei den Wildtyp-Tieren gemessen ( $31,58 \pm 6,677$  pg/ml). CD41-YFP-Tiere, die LPS inhalierten, zeigten jedoch eine im Vergleich zu der entsprechenden Wildtypkontrolle signifikant erhöhte Konzentration an IL-6 ( $606,6 \pm 124,2$  pg/ml,  $p=0,0011$ ) (**Abbildung 20**).

Beim  $TNF-\alpha$  Konzentrationsvergleich bot sich ein ähnliches Bild: Von  $5,86 \pm 1,295$  pg/ml (WT + NaCl) stieg die Konzentration signifikant auf  $179,6 \pm 32,68$  pg/ml (WT+LPS) an ( $p=0,0092$ ). Die gendefizienten Tiere boten mit  $40,64 \pm 17,7$

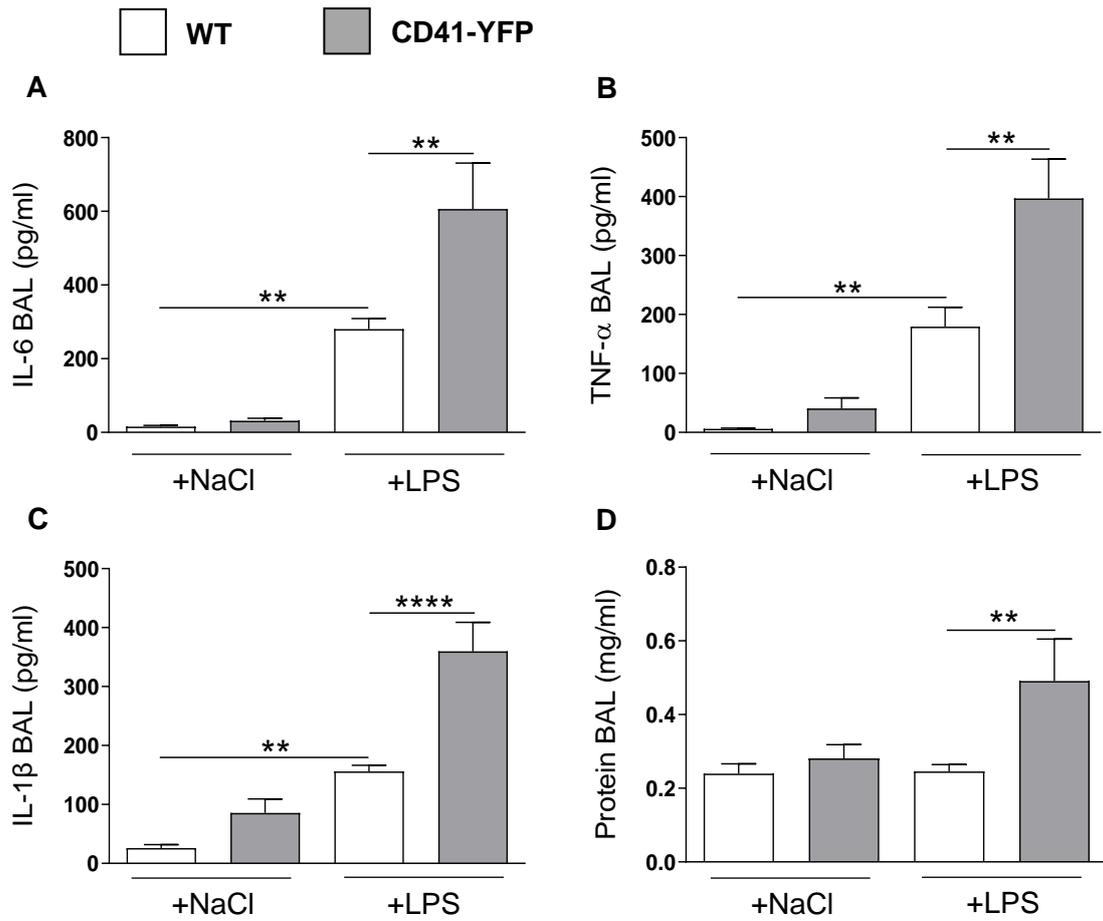
pg/ml nach NaCl-Inhalation einen vergleichbaren Wert wie die korrespondierenden Wildtypen.

Wie bei den anderen Zytokinen zeigte sich bei den CD41-YFP im Vergleich zu den Wildtypkontrollen ein noch stärkerer signifikanter Anstieg nach LPS-Inhalation auf  $396,7 \pm 66,79$  pg/ml ( $p=0,0011$ ) (**Abbildung 20**).

Dasselbe Muster konnte bei der Konzentrationsmessung von IL-1 $\beta$  beobachtet werden. Bei WT- und CD41-YFP-Tieren stieg die Konzentration nach LPS-Inhalation im Vergleich zu den NaCl-Gruppen signifikant an (WT + LPS:  $155,9 \pm 10,53$  pg/ml; CD41-YFP+LPS:  $360 \pm 48,98$  pg/ml). Bei CD41-YFP stieg die Konzentration jedoch deutlich höher an als bei WT + LPS; dieser Unterschied war signifikant ( $p<0,0001$ ) (**Abbildung 20**).

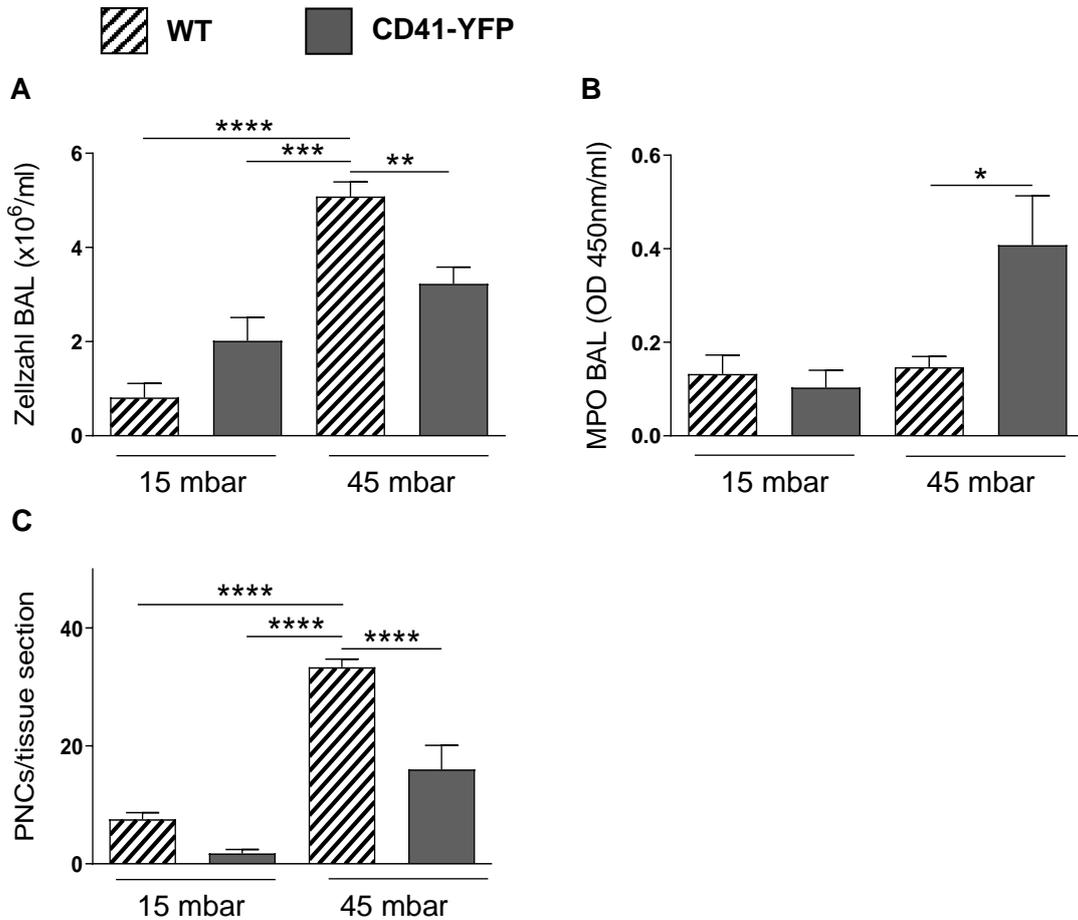
#### **Proteinkonzentration in der BAL**

Bei der Proteinmessung zeigten sich WT + NaCl ( $0,2398 \pm 0,02661$  mg/ml), CD41-YFP + NaCl ( $0,2812 \pm 0,03684$  mg/ml) und WT + LPS ( $0,246 \pm 0,01832$  mg/ml) auf gleichem Niveau, während bei CD41-YFP + LPS mit  $0,4908 \pm 0,1142$  mg/ml eine im Vergleich zu WT + LPS signifikante Erhöhung festzustellen war ( $p=0,0029$ ) (**Abbildung 20**).



**Abbildung 20:** Konzentrationen von IL-6 (A), TNF- $\alpha$  (B), IL-1 $\beta$  (C) und Protein (D) in der BAL nach NaCl- bzw. LPS-Inhalation in WT- und CD41-YFP-Tieren; dargestellt sind Mittelwerte und SEM; \*\*p<0,01 \*\*\*\*p<0,0001

### 3.3.2 VILI-Modell



**Abbildung 21:** Zellzahl in BAL (A), MPO-Konzentration in BAL (B) und PNC-Anzahl in immunhistochemischen Schnitten (C) nach Ventilation mit 15 bzw. 45 mbar in WT- und CD41-YFP-Tieren; dargestellt sind Mittelwerte und SEM; \*p<0,05 \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001 \*\*\*\*p<0,0001

#### Zellzahl in der BAL

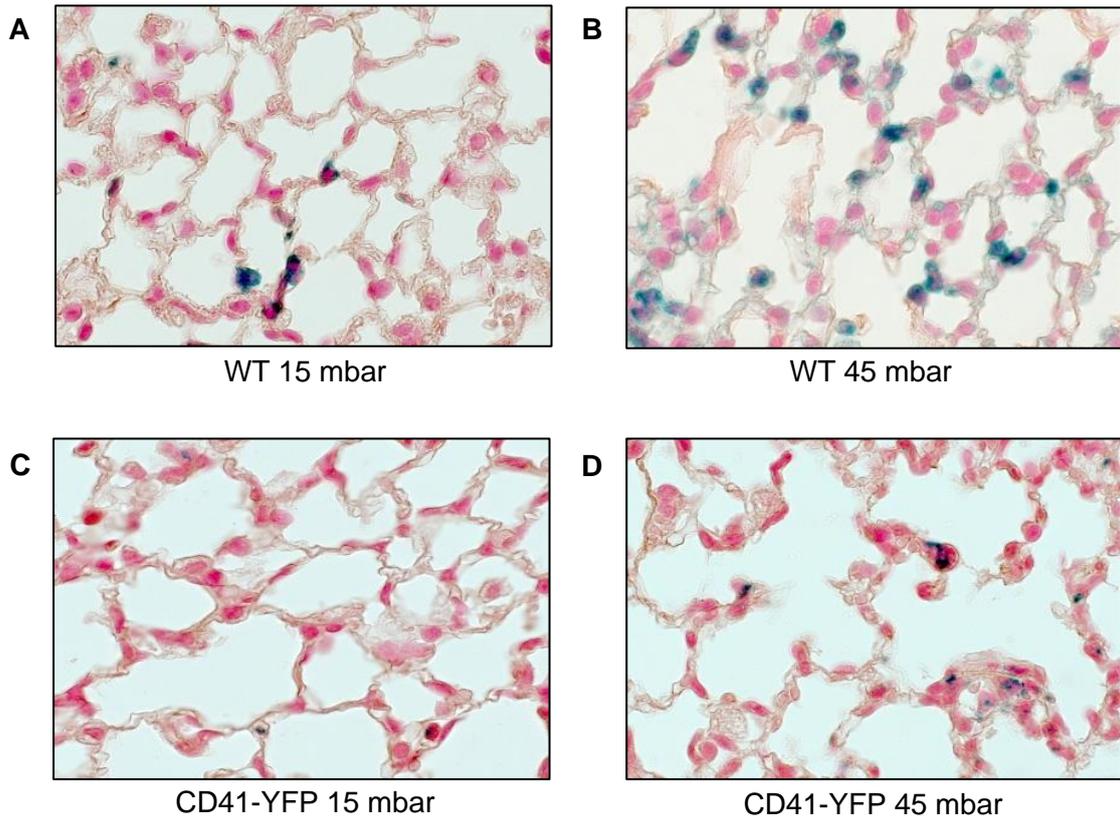
Vergleichbar mit den Ergebnissen des LPS-Inhalation-Modells gab es hier eine signifikante Erhöhung der gemessenen Zellen in der BAL bei WT mit 45 mbar ( $5,08 \pm 0,3112 \times 10^6/\text{ml}$ ) gegenüber den 15 mbar-Kontrollen (WT mit 15 mbar:  $0,8123 \pm 0,3026 \times 10^6/\text{ml}$ ,  $p<0,0001$ ; CD41-YFP mit 15 mbar:  $2,019 \pm 0,4915 \times 10^6/\text{ml}$ ,  $p=0,0003$ ) zu messen. Bei den CD41-YFP-Mäusen wurde nach 45 mbar-Ventilation eine signifikant geringere Anzahl ( $p=0,005$ ) an Zellen gemessen als bei den Wildtypen (CD41-YFP mit 45 mbar:  $3,228 \pm 0,3533 \times 10^6/\text{ml}$ ) (**Abbildung 21**).

### **Myeloperoxidase-Konzentration in der BAL**

Bei den Messungen der MPO-Konzentration konnte für die normoventilierten Gruppen (WT mit 15 mbar:  $0,1324 \pm 0,0405$ ; CD41-YFP mit 15 mbar:  $0,1032 \pm 0,03681$ ) und die überdruckbeatmeten Wildtypen (WT mit 45 mbar:  $0,1466 \pm 0,02339$ ) eine ähnliche Konzentration gemessen werden, während sie bei den gendefizienten Tieren nach Schädigungsventilation signifikant anstieg ( $0,4079 \pm 0,1053$ ,  $p=0,024$ ) (**Abbildung 21**).

### **PNC-Anzahl in immunhistochemischen Schnitten**

Beispiel-Färbungen sind in **Abbildung 22** dargestellt. Die Ergebnisse der Auszählung spiegelten hier erneut die Tendenzen der Zellzahlmessung wider. Während bei den Wildtypen, die mit 45 mbar ventiliert wurden, mit  $33,33 \pm 1,404$  PNCs/tissue section signifikant mehr PNCs gezählt wurden als bei den mit 15 mbar ventilierten Kontrollen (WT mit 15 mbar:  $7,556 \pm 1,119$  PNCs/tissue section,  $p<0,0001$ ; CD41-YFP mit 15 mbar:  $1,778 \pm 0,662$  PNCs/tissue section,  $p<0,0001$ ), konnten bei CD41-YFP mit 45 mbar mit nur  $16 \pm 4,099$  PNCs/tissue section signifikant weniger PNCs ermittelt werden als bei den entsprechenden Wildtyp-Kontrollen ( $p<0,0001$ ) (**Abbildung 21**).



**Abbildung 22:** Immunhistochemische Färbung von Lungenschnitten nach Ventilation mit 15 bzw. 45 mbar in WT- und CD41-YFP-Tieren. Markierung der PMNs mit einem Ly6G-Antikörper und der Thrombozyten mit einem CD41-Antikörper; (A) WT mit 15 mbar (B) WT mit 45 mbar (C) CD41-YFP mit 15 mbar (D) CD41-YFP mit 45 mbar

### Zytokinkonzentrationen in der BAL

Es war eine signifikante Erhöhung der IL-6-Konzentration (**Abbildung 23**) nach 45 mbar-Ventilation bei den Wildtypen auf  $1196 \pm 124,9$  pg/ml im Gegensatz zur Normoventilation (WT mit 15 mbar:  $114,6 \pm 36,26$  pg/ml,  $p < 0,0001$ ; CD41-YFP mit 15 mbar:  $96,69 \pm 46,69$  pg/ml,  $p < 0,0001$ ) zu messen. Bei den gendefizienten Tieren fiel die Erhöhung nach 45 mbar Ventilation ( $522,5 \pm 144,9$  pg/ml) signifikant ( $p = 0,0008$ ) geringer aus als bei den Wildtyp-Tieren.

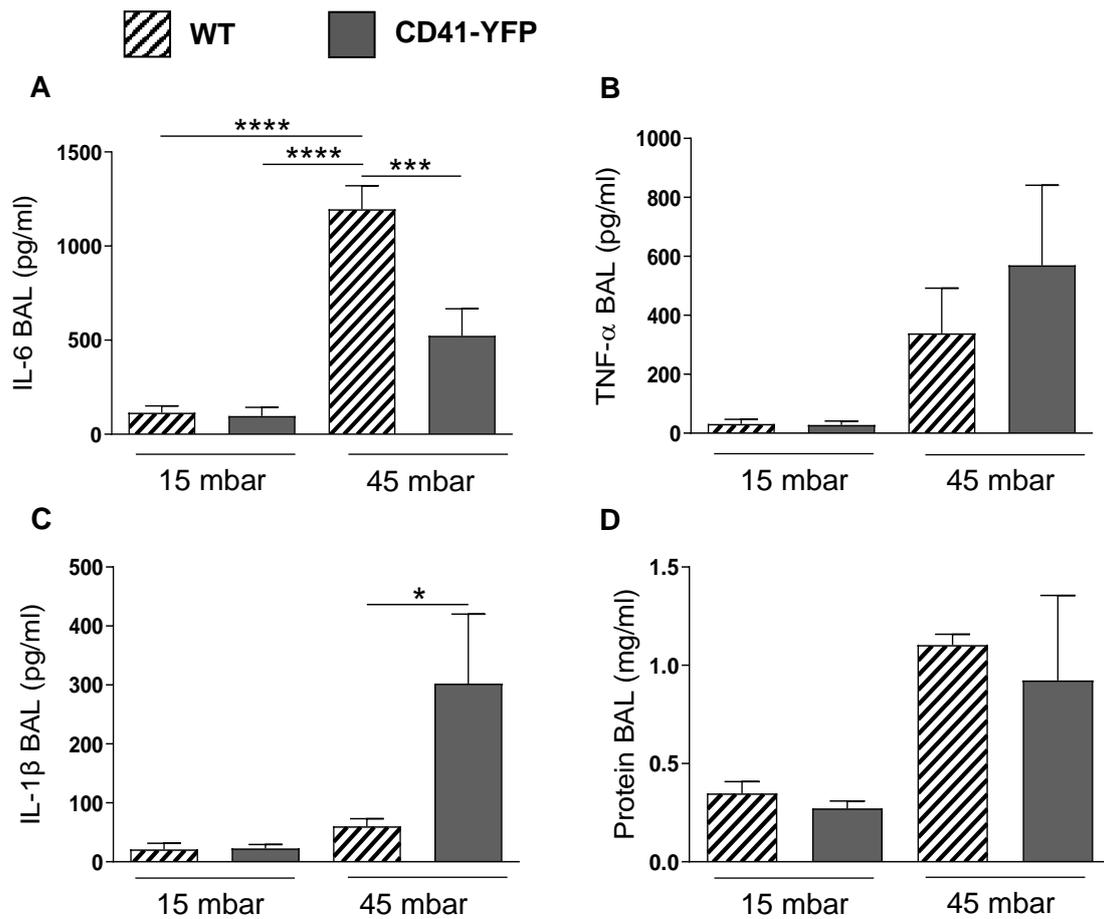
Die gemessenen TNF- $\alpha$ -Konzentrationen stiegen (**Abbildung 23**) bei den Wildtyp-Tieren nach Überdruckbeatmung moderat an auf  $339,1 \pm 152,6$  pg/ml von  $31,19 \pm 15,72$  pg/ml (WT mit 15 mbar) bzw.  $27,9 \pm 13,62$  pg/ml (CD41-YFP mit 15 mbar). Bei den gendefizienten Tieren war dieser Anstieg zwar deutlich

stärker ausgeprägt ( $569,3 \pm 272$  pg/ml), diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

Wie bei TNF- $\alpha$  zeigte sich auch bei IL-1 $\beta$  bei den WT-Tieren eine mäßige Erhöhung der Konzentration in der BAL nach Überdruckbeatmung (WT mit 15 mbar:  $21,06 \pm 10,22$  pg/ml; CD41-YFP mit 15 mbar:  $22,67 \pm 6,705$  pg/ml; WT mit 45 mbar:  $60,23 \pm 12,84$  pg/ml). Eine starke, signifikante Erhöhung zeigte sich hingegen bei den CD41-YFP-Tieren nach Überdruckbeatmung ( $302,4 \pm 117,8$  pg/ml;  $p=0,0184$ ) (**Abbildung 23**).

### **Proteinkonzentration in der BAL**

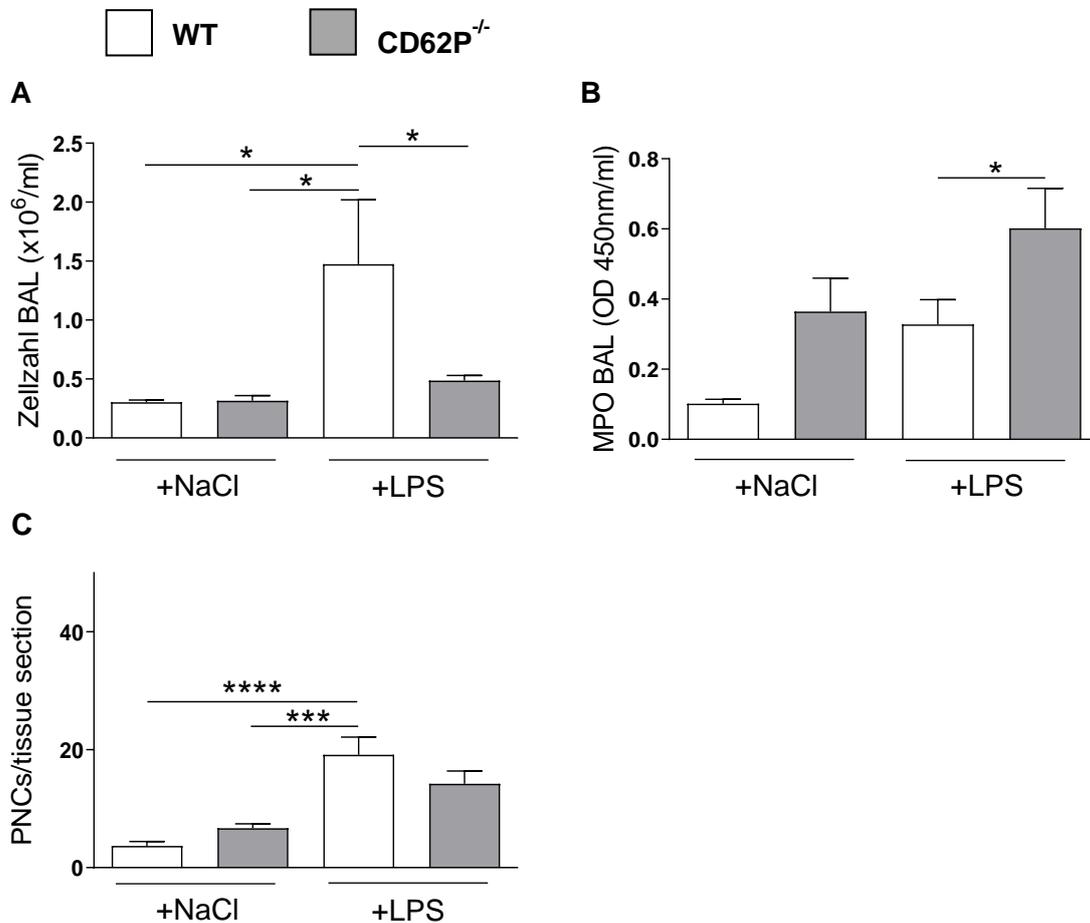
Die Proteinkonzentration stieg nach Überdruckbeatmung im Gegensatz zur Normoventilation in beiden Mauslinien an, wobei die Unterschiede nicht signifikant waren (WT mit 15 mbar:  $0,3484 \pm 0,0597$  mg/ml; CD41-YFP mit 15 mbar:  $0,2725 \pm 0,03664$  mg/ml; WT mit 45 mbar:  $1,103 \pm 0,05491$  mg/ml; CD41-YFP mit 45 mbar:  $0,9227 \pm 0,4334$  mg/ml) (**Abbildung 23**).



**Abbildung 23:** Konzentration von IL-6 (A), TNF- $\alpha$  (B), IL-1 $\beta$  (C) und Protein (D) in der BAL nach Ventilation mit 15 bzw. 45 mbar in WT- und CD41-YFP-Tieren; dargestellt sind Mittelwerte und SEM; \*p<0,05 \*\*\*p<0,001 \*\*\*\*p<0,0001

### 3.4 Einfluss von P-Selektin

#### 3.4.1 LPS-Inhalations-Modell



**Abbildung 24:** Zellzahl in BAL (A), MPO-Konzentration in BAL (B) und PNC-Anzahl in immunohistochemischen Schnitten (C) nach NaCl- bzw. LPS-Inhalation in WT- und CD62P<sup>-/-</sup>-Tieren; dargestellt sind Mittelwerte und SEM; \*p<0,05 \*\*\*p<0,001 \*\*\*\*p<0,0001

#### Zellzahl in der BAL

In Bezug auf die Zellzahl zeigte sich bei WT + NaCl ( $0,303 \pm 0,01967 \times 10^6/\text{ml}$ ) bzw. CD62P<sup>-/-</sup> + NaCl ( $0,3163 \pm 0,0425 \times 10^6/\text{ml}$ ) eine signifikant geringere Zellzahl ( $p=0,0126$  bzw.  $0,0309$ ) im Vergleich zu WT + LPS ( $1,475 \pm 0,5444 \times 10^6/\text{ml}$ ) (**Abbildung 24**).

Bei den gendefizienten Tieren ließ sich jedoch trotz LPS-Inhalation kein Anstieg der Zellzahl beobachten ( $0,4874 \pm 0,04353 \times 10^6/\text{ml}$ ), der Unterschied zu den Wildtyp-Kontrollen war auch hier signifikant ( $p=0,0383$ ).

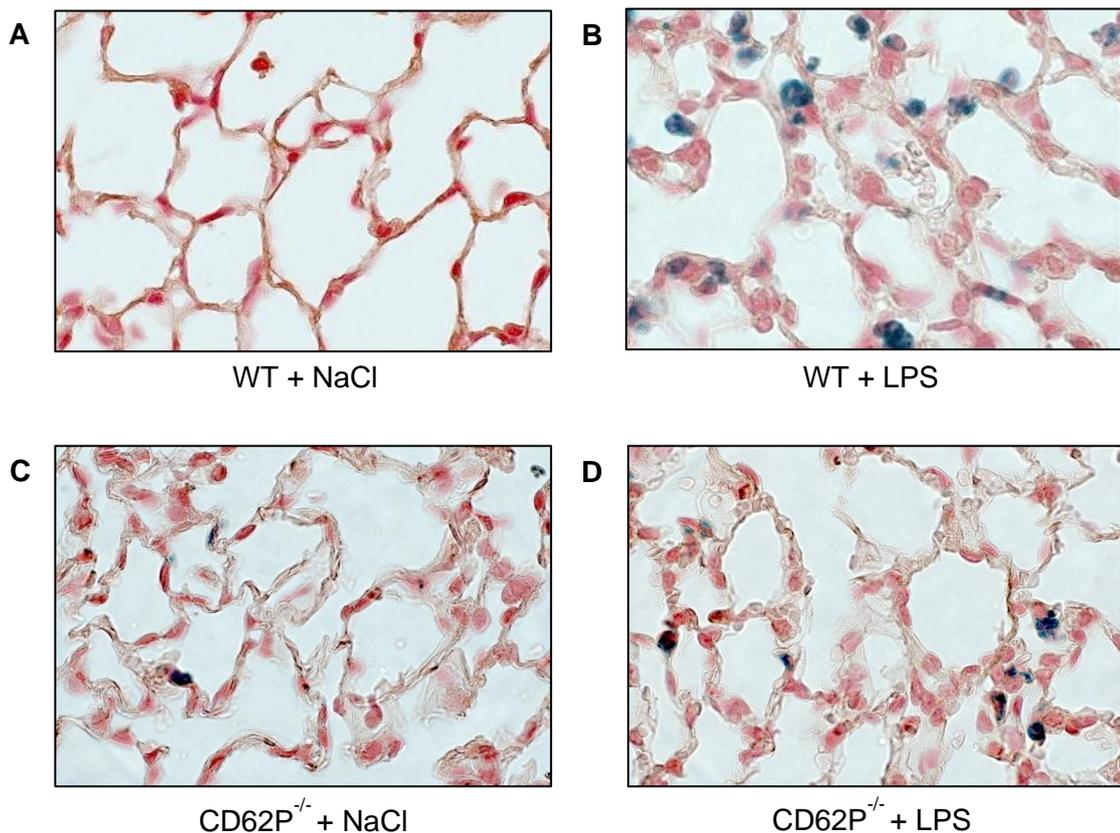
#### Myeloperoxidase-Konzentration in der BAL

Bei der MPO-Konzentration zeigte sich bei WT + NaCl mit  $0,1017 \pm 0,01284$  der niedrigste Wert, während bei CD62P<sup>-/-</sup> + NaCl ( $0,3643 \pm 0,09563$ ) und WT + LPS

( $0,3277 \pm 0,07083$ ) etwas höhere Werte gemessen wurden. Die absolute Konzentration lag bei  $CD62P^{-/-}$  + LPS mit  $0,6016 \pm 0,1139$  am höchsten, dieser Unterschied zur Wildtyp-Kontrolle war mit einem p-Wert von  $0,0426$  auch leicht signifikant (**Abbildung 24**).

### PNC-Anzahl in immunhistochemischen Schnitten

Wie in **Abbildung 24** dargestellt, konnte bei der Auszählung der PNCs eine vermehrte Anzahl bei WT + LPS ( $19,13 \pm 3,02$  PNCs/tissue section) im Vergleich zu WT + NaCl ( $3,667 \pm 0,7817$  PNCs/tissue section,  $p < 0,0001$ ) und  $CD62P^{-/-}$  + NaCl ( $6,667 \pm 0,7638$  PNCs/tissue section,  $p = 0,0002$ ) erhoben werden. Bei  $CD62P^{-/-}$  + LPS ( $14,22 \pm 2,159$  PNCs/tissue section) war die Erhöhung geringer ausgeprägt (Darstellung der Beispielfärbungen in **Abbildung 25**).



**Abbildung 25:** Immunhistochemische Färbung von Lungenschnitten nach NaCl- bzw. LPS-Inhalation in WT- und  $CD62P^{-/-}$ -Tieren. Markierung der PMNs mit einem Ly6G-Antikörper und der Thrombozyten mit einem CD41-Antikörper; (A) WT + NaCl (B) WT + LPS (C)  $CD62P^{-/-}$  + NaCl (D)  $CD62P^{-/-}$  + LPS

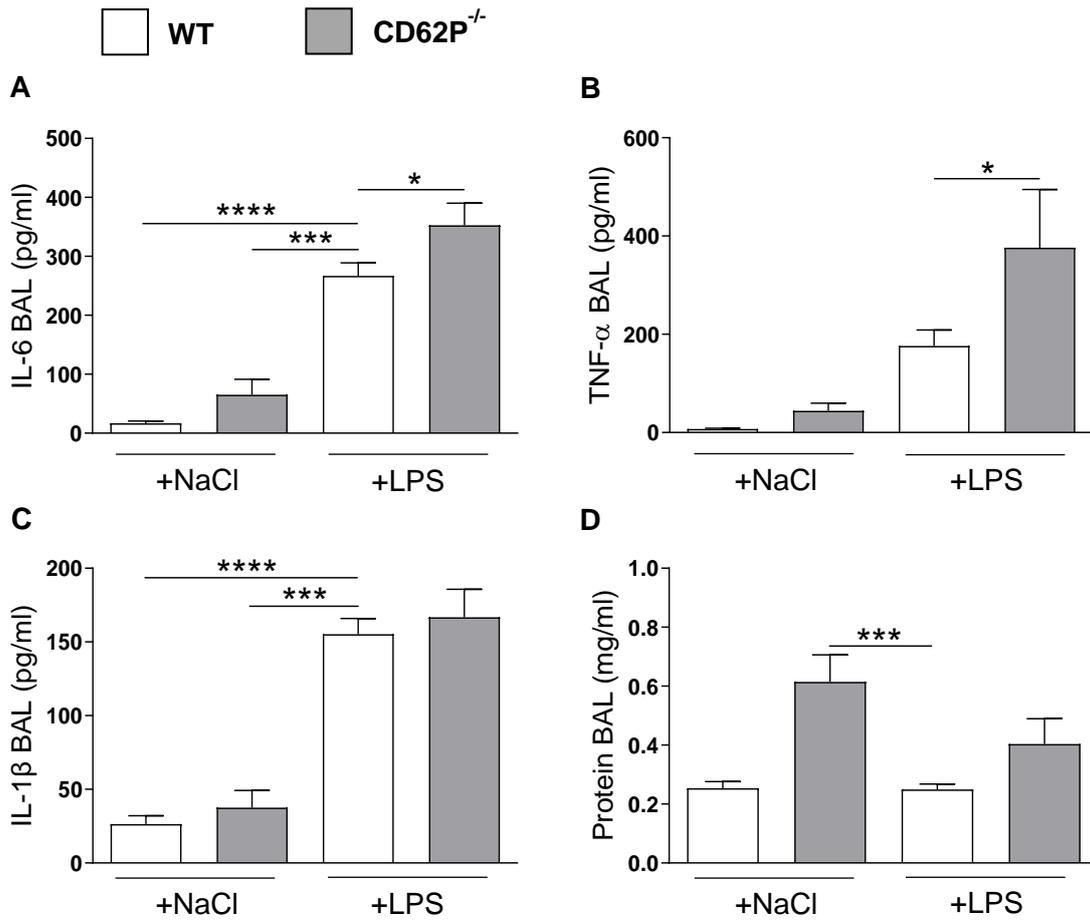
In **Abbildung 26** ist deutlich zu sehen, dass die Konzentration von IL-6 bei den Wildtyp-Tieren nach LPS-Inhalation mit  $267,1 \pm 21,7$  pg/ml gegenüber den NaCl-Kontrollen signifikant erhöht ist (WT + NaCl:  $16,72 \pm 3,716$  pg/ml,  $p < 0,0001$ ; CD62P<sup>-/-</sup> + NaCl:  $65,35 \pm 26,24$  pg/ml,  $p = 0,0001$ ). Bei den CD62P-defizienten Mäusen zeigte sich nach LPS-Inhalation eine noch höhere Konzentration von  $352,5 \pm 37,84$  pg/ml, der Unterschied zu WT + LPS stellte sich allerdings nicht signifikant dar.

Auch bei der Messung der TNF- $\alpha$ -Konzentration (**Abbildung 26**) konnte ein Anstieg von  $7,262 \pm 1,548$  pg/ml (WT + NaCl) bzw.  $44,05 \pm 15,55$  pg/ml (CD62P<sup>-/-</sup> + NaCl) auf  $176,4 \pm 32,21$  pg/ml (WT + LPS) und sogar auf  $376,4 \pm 118,3$  pg/ml bei CD62P<sup>-/-</sup> + LPS ermittelt werden, dieser Unterschied war im Vergleich zur WT-Kontrolle signifikant ( $p = 0,0411$ ).

Die gemessene Konzentration von IL-1 $\beta$  fiel bei WT + LPS mit  $155,2 \pm 10,72$  pg/ml signifikant höher aus als bei den NaCl-inhalierenden Kontrollen (WT + NaCl:  $26,39 \pm 5,776$  pg/ml,  $p < 0,0001$ ; CD62P<sup>-/-</sup> + NaCl:  $37,54 \pm 11,67$  pg/ml,  $p = 0,0001$ ). Zwischen WT + LPS und CD62P<sup>-/-</sup> + LPS ( $166,7 \pm 19,04$ ) zeigten sich keine nennenswerten Unterschiede (**Abbildung 26**).

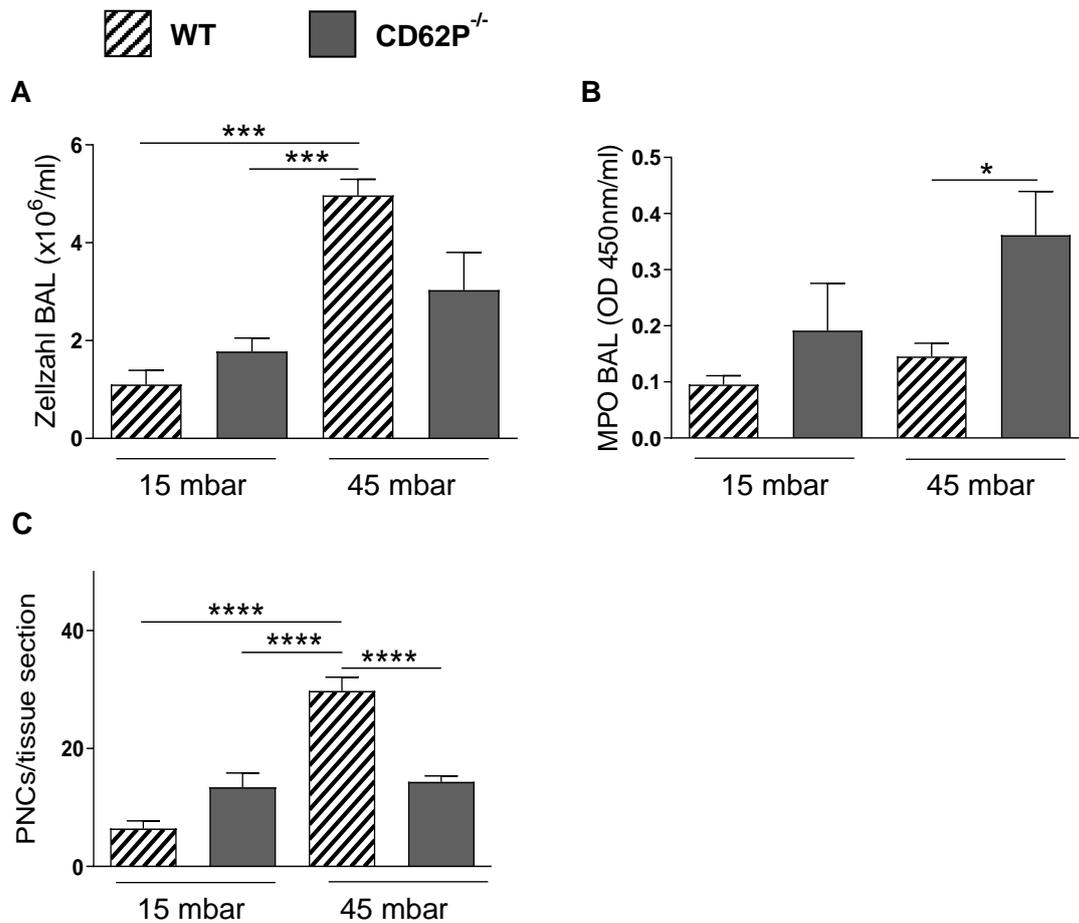
### **Proteinkonzentration in der BAL**

Die Messung der Proteinkonzentrationen (**Abbildung 26**) ergab einen erhöhten Wert bei CD62P<sup>-/-</sup> + NaCl mit  $0,6149 \pm 0,09099$  mg/ml, dieser war signifikant höher als bei WT + LPS ( $0,2498 \pm 0,01796$  mg/ml,  $p = 0,0004$ ). In der Wildtyp-Gruppe, die NaCl inhalierte, konnte mit  $0,2534 \pm 0,02279$  mg/ml ein der LPS-Gruppe ähnlicher Wert ermittelt werden. Bei den gendefizienten Tiere, die LPS inhalierten, konnte mit  $0,4041 \pm 0,08521$  mg/ml ein gegenüber den Wildtypen ebenfalls leicht höherer Wert festgestellt werden, jedoch ohne statistische Signifikanz.



**Abbildung 26:** Konzentration von IL-6 (A), TNF- $\alpha$  (B), IL-1 $\beta$  (C) und Protein (D) in der BAL nach NaCl- bzw. LPS-Inhalation in WT- und CD62P<sup>-/-</sup>-Tieren; dargestellt sind Mittelwerte und SEM; \*p<0,05 \*\*\*p<0,001 \*\*\*\*p<0,0001

### 3.4.2 VILI-Modell



**Abbildung 27:** Zellzahl in BAL (A), MPO-Konzentration in BAL (B) und PNC-Anzahl in immunhistochemischen Schnitten (C) nach Ventilation mit 15 bzw. 45 mbar in WT- und CD62P<sup>-/-</sup>-Tieren; dargestellt sind Mittelwerte und SEM; \*p<0,05; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001

#### Zellzahl in der BAL

Bei den Wildtyp-Tieren waren nach Überdruckbeatmung, wie in **Abbildung 27** dargestellt, signifikant erhöhte Zellzahlen in der BAL messbar (WT mit 15 mbar:  $1,101 \pm 0,2919 \times 10^6/\text{ml}$ ,  $p = 0,0004$ ; CD62P<sup>-/-</sup> mit 15 mbar:  $1,775 \pm 0,2782 \times 10^6/\text{ml}$ ,  $p = 0,0009$ ; WT mit 45 mbar:  $4,965 \pm 0,3343 \times 10^6/\text{ml}$ ). Auch bei den CD62P<sup>-/-</sup>-Tieren ( $3,033 \pm 0,7668 \times 10^6/\text{ml}$ ) war nach Überdruckbeatmung eine höhere Zellzahl als nach Normoventilation zu messen, diese war jedoch signifikant niedriger als die Zellzahl bei Wildtyp-Tieren ( $p = 0,0367$ ).

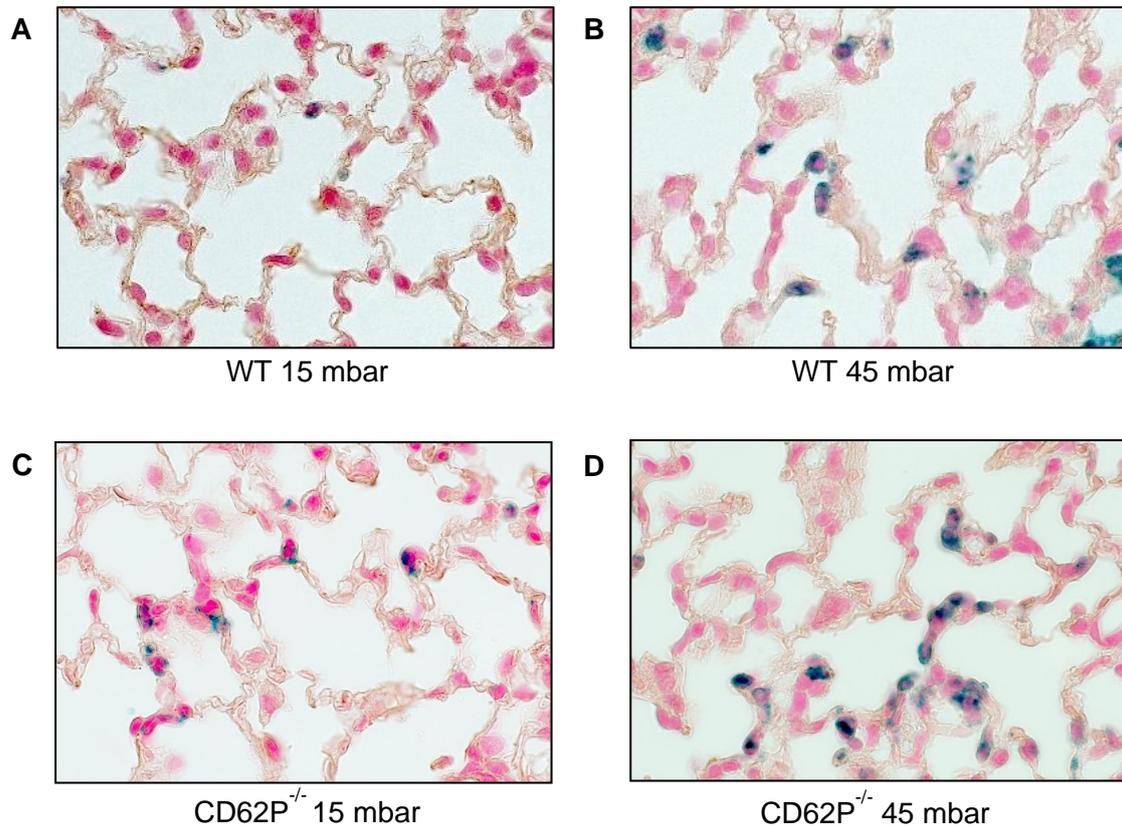
### **Myeloperoxidase-Konzentration in der BAL**

Ebenfalls in **Abbildung 27** sind die Konzentrationen der MPO in der BAL der jeweiligen Gruppe zu sehen. Hier lagen die Konzentrationen der Überdruck- und normoventilierten Wildtyp-Tiere sowie der normoventilierten CD62P<sup>-/-</sup> auf etwa dem gleichen Niveau (WT mit 15 mbar:  $0,0951 \pm 0,01615$ ; CD62P<sup>-/-</sup> mit 15 mbar:  $0,1913 \pm 0,08446$ ; WT mit 45 mbar:  $0,1454 \pm 0,02348$ ). Nach Überdruckbeatmung war bei den gendefizienten Tieren jedoch eine im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle signifikante Erhöhung der MPO-Konzentration zu messen (CD62P<sup>-/-</sup> mit 45 mbar:  $0,3613 \pm 0,07804$ ,  $p=0,0479$ ).

### **PNC-Anzahl in immunhistochemischen Schnitten**

Bei Tieren dieser Gruppen wurden ebenfalls Lungen zur immunhistochemischen Aufarbeitung gewonnen, stellvertretende Beispielfärbungen sind in **Abbildung 28** zu sehen. Äquivalent zur Zellzahlmessung in der BAL konnte ein signifikanter Anstieg der PNC-Anzahl in der Immunhistochemie bei Wildtyp-Mäusen nach Überdruckbeatmung gemessen werden (WT mit 45 mbar:  $29,78 \pm 2,326$  PNCs/tissue section; WT mit 15 mbar:  $6,444 \pm 1,281$  PNCs/tissue section,  $p<0,0001$ ; CD62P<sup>-/-</sup> mit 15 mbar:  $13,44 \pm 2,422$  PNCs/tissue section,  $p<0,0001$ ) (**Abbildung 27**).

Bei den gendefizienten Tieren blieb jedoch nach der Überdruckbeatmung die ermittelte Anzahl an PNCs in der Immunhistochemie mit  $14,33 \pm 1,014$  PNCs/tissue section auf dem gleichen Niveau wie bei den normoventilierten Kontrollgruppen und hiermit signifikant niedriger als bei der korrespondierenden Wildtyp-Kontrolle ( $p<0,0001$ ).



**Abbildung 28:** Immunhistochemische Färbung von Lungenschnitten nach Ventilation mit 15 bzw. 45 mbar in WT- und CD62P<sup>-/-</sup>-Tieren. Markierung der PMNs mit einem Ly6G-Antikörper und der Thrombozyten mit einem CD41-Antikörper; (A) WT mit 15 mbar (B) WT mit 45 mbar (C) CD62P<sup>-/-</sup> mit 15 mbar (D) CD62P<sup>-/-</sup> mit 45 mbar

### Zytokinkonzentrationen in der BAL

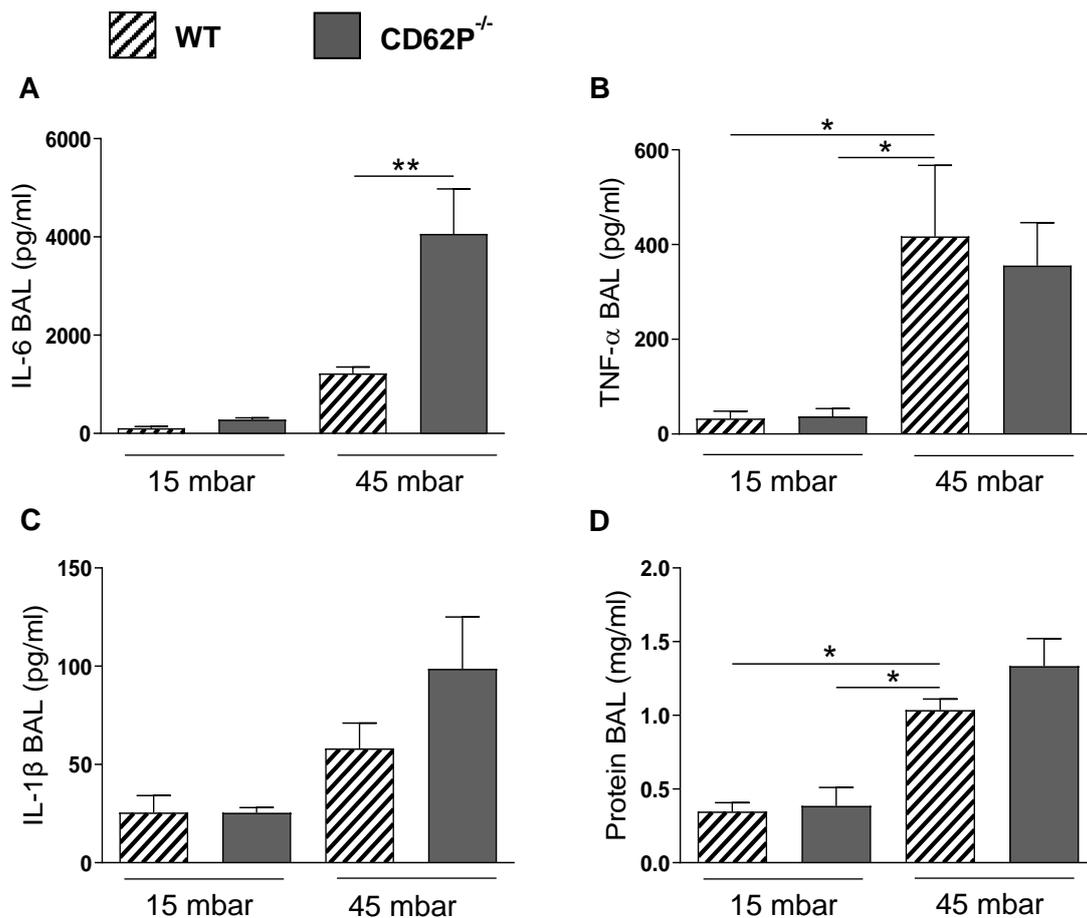
Die IL-6-Konzentration (**Abbildung 29**) war bei Wildtyp-Tieren nach Überdruckbeatmung ( $1220 \pm 129,8$  pg/ml) im Vergleich zu normoventilierten Tieren stark erhöht (WT mit 15 mbar:  $107 \pm 37,46$  pg/ml; CD62P<sup>-/-</sup> mit 15 mbar:  $281,4 \pm 36,39$  pg/ml). Noch höher war die Konzentration jedoch bei den gendefizienten Tieren nach Überdruckbeatmung ( $4064 \pm 914,8$  pg/ml,  $p=0,0039$ ).

Bei den Wildtyp-Tieren zeigte sich eine signifikant höhere TNF- $\alpha$ -Konzentration nach Überdruckbeatmung ( $417,4 \pm 149,9$  pg/ml) im Vergleich zu den Kontrollen (WT mit 15 mbar:  $32,95 \pm 15,22$  pg/ml,  $p=0,0484$ ; CD62P<sup>-/-</sup> mit 15 mbar:  $37,21 \pm 16,4$  pg/ml,  $p=0,0406$ ). Die gendefizienten Tiere unterschieden sich nicht von den Wildtyp-Tieren (CD62P<sup>-/-</sup> mit 45 mbar:  $355,6 \pm 90,76$  pg/ml) (**Abbildung 29**).

Die gemessene IL-1 $\beta$ -Konzentrationen stiegen zwar nach Überdruckbeatmung bei Wildtyp-Mäusen ( $58,23 \pm 12,88$  pg/ml) und sogar stärker bei den gendefizienten Mäusen ( $98,73 \pm 26,31$  pg/ml) an, diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (**Abbildung 29**).

### Proteinkonzentration in der BAL

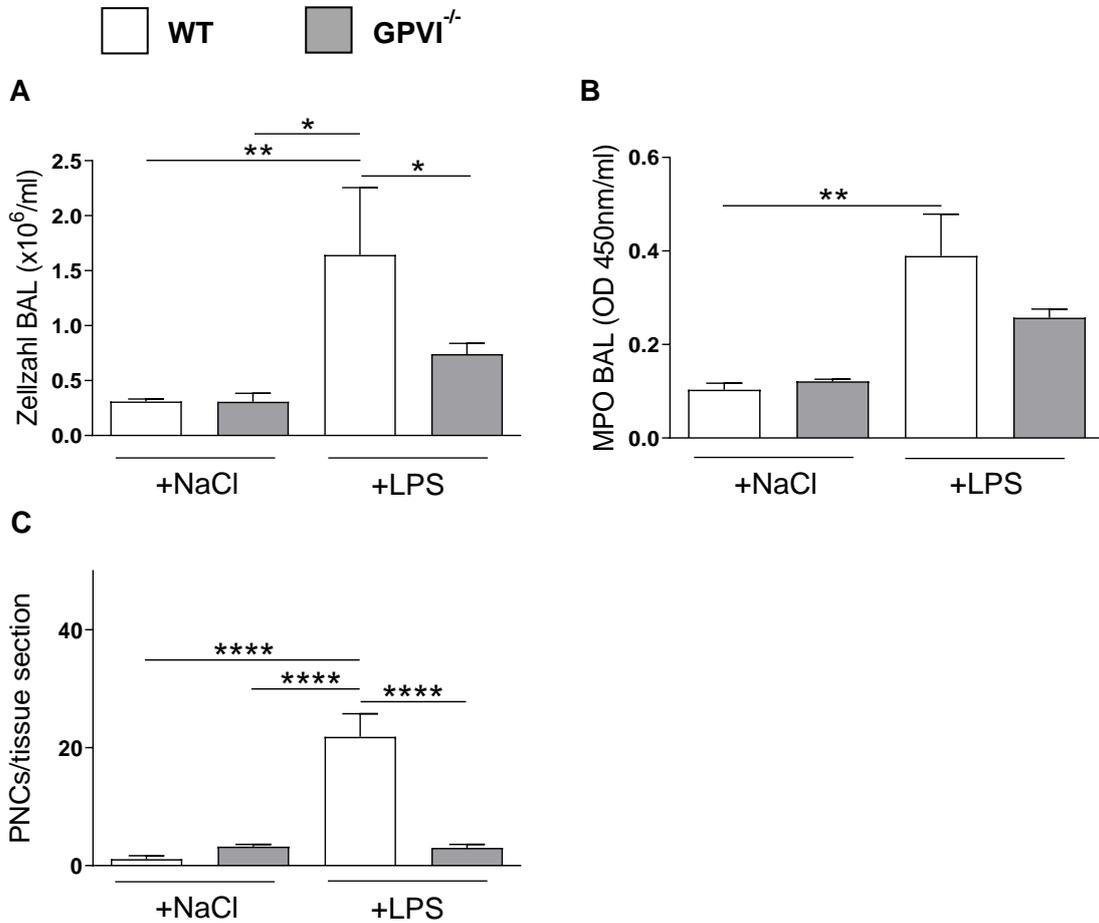
Die Proteinkonzentration in der BAL (**Abbildung 29**) war bei genkompetenten und gendefizienten Tieren nach Normoventilation (WT mit 15 mbar:  $0,3469 \pm 0,06028$  mg/ml; CD62P<sup>-/-</sup> mit 15 mbar:  $0,3855 \pm 0,1257$  mg/ml) ähnlich. Nach Überdruckbeatmung stieg die gemessene Konzentration sowohl bei Wildtyptieren ( $1,036 \pm 0,07483$  mg/ml) als auch, etwas stärker, bei CD62P-defizienten Tieren ( $1,333 \pm 0,1881$  mg/ml) an.



**Abbildung 29:** Konzentration von IL-6 (A), TNF- $\alpha$  (B), IL-1 $\beta$  (C) und Protein (D) in der BAL nach Ventilation mit 15 bzw. 45 mbar in WT- und CD62P<sup>-/-</sup>-Tieren; dargestellt sind Mittelwerte und SEM; \*p<0,05 \*\*p<0,01

### 3.5 Einfluss von GPVI

#### 3.5.1 LPS-Inhalations-Modell



**Abbildung 30:** Zellzahl in BAL (A), MPO-Konzentration in BAL (B) und PNC-Anzahl in immunhistochemischen Schnitten (C) nach NaCl- bzw. LPS-Inhalation in WT- und GPVI<sup>-/-</sup>-Tieren; dargestellt sind Mittelwerte und SEM; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*\*p<0,0001

#### Zellzahl in der BAL

Die ermittelte Zellzahl in der BAL nach NaCl- bzw. LPS-Inhalation ist in Abbildung 30 dargestellt. Ein Anstieg von  $0,3098 \pm 0,0234 \times 10^6/\text{ml}$  (WT + NaCl) bzw.  $0,3077 \pm 0,07744 \times 10^6/\text{ml}$  (GPVI<sup>-/-</sup> + NaCl) auf  $1,642 \pm 0,6129 \times 10^6/\text{ml}$  war bei den LPS-inhalierenden Wildtyp-Tieren zu messen ( $p=0,0049$  bzw.  $p=0,0188$ ).

Auch bei den gendefizienten Tieren stieg die Zellzahl nach LPS-Inhalation an auf  $0,741 \pm 0,09849 \times 10^6/\text{ml}$ . Dieser Anstieg war jedoch signifikant geringer als bei den Wildtyp-Tieren ( $p=0,0473$ ).

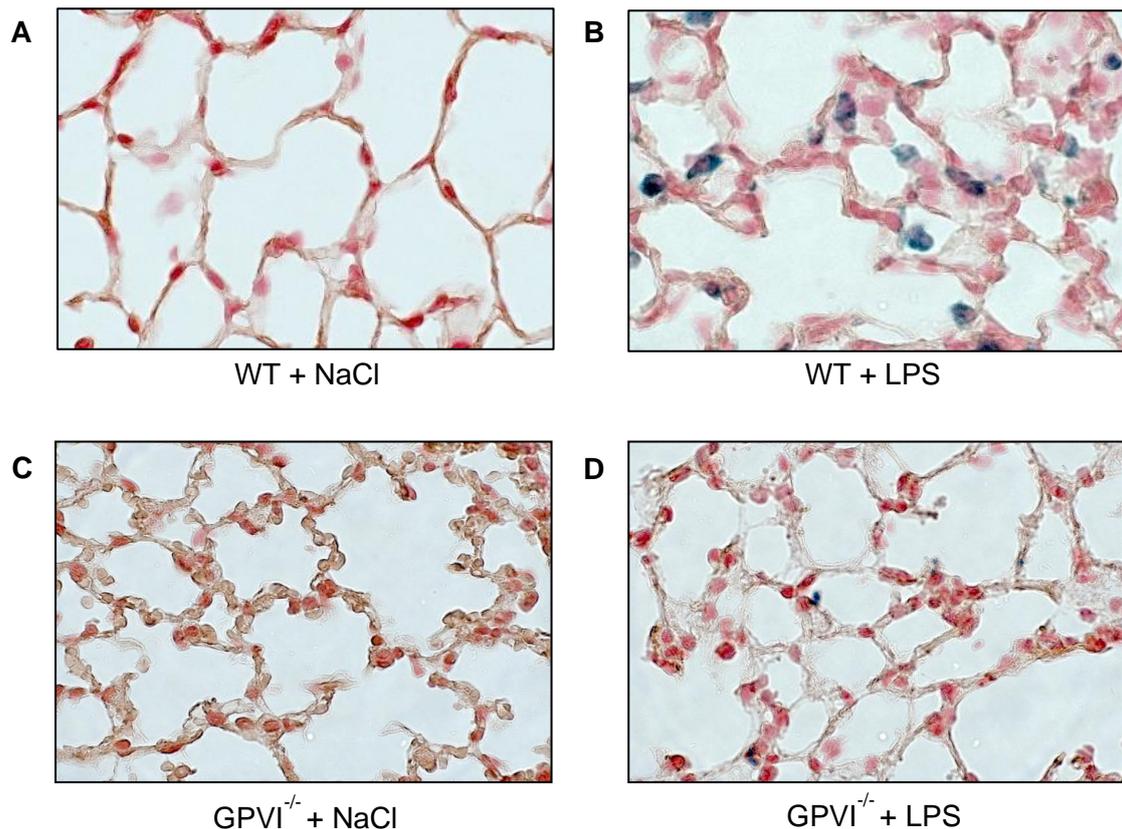
### **Myeloperoxidase-Konzentration in der BAL**

Die gemessenen Konzentrationen an MPO, ebenfalls graphisch in **Abbildung 30** wiedergegeben, lagen auch hier analog zur gemessenen Zellzahl: Niedrige Konzentrationen bei den NaCl-Kontrollen (WT + NaCl:  $0,1035 \pm 0,01371$ ; GPVI<sup>-/-</sup> + NaCl:  $0,1214 \pm 0,004638$ ) sowie der gendefizienten LPS-Gruppe (GPVI<sup>-/-</sup> + LPS:  $0,257 \pm 0,01854$ ) und eine erhöhte Konzentration bei den WT + LPS mit  $0,3892 \pm 0,08963$ .

### **PNC-Anzahl in immunhistochemischen Schnitten**

Auch bei der Anzahl der PNCs in der Immunhistochemie (**Abbildung 30**) zeigte das Ergebnis ähnliche Tendenzen wie die in der BAL gemessene Zellzahl.

Die Anzahl der PNCs war bei der WT + LPS-Gruppe ( $21,86 \pm 3,894$  PNCs/tissue section) jeweils signifikant höher als bei den NaCl-Kontrollen (WT + NaCl:  $1,111 \pm 0,5879$  PNCs/tissue section,  $p < 0,0001$ ; GPVI<sup>-/-</sup> + NaCl:  $3,222 \pm 0,4006$  PNCs/tissue section,  $p < 0,0001$ ) und den LPS-inhalierenden GPVI<sup>-/-</sup>-Mäusen ( $3 \pm 0,6009$  PNCs/tissue section,  $p < 0,0001$ ). Beispiele der zugrunde liegenden Färbungen sind in **Abbildung 31** präsentiert.



**Abbildung 31:** Immunhistochemische Färbung von Lungenschnitten nach NaCl- bzw. LPS-Inhalation in WT- und GPVI<sup>-/-</sup>-Tieren. Markierung der PMNs mit einem Ly6G-Antikörper und der Thrombozyten mit einem CD41-Antikörper; (A) WT + NaCl (B) WT + LPS (C) GPVI<sup>-/-</sup> + NaCl (D) GPVI<sup>-/-</sup> + LPS

### Zytokinkonzentrationen in der BAL

Die ermittelten Konzentrationen der Zytokine sowie von Protein in der BAL in den Kontroll- bzw. Schädigungsgruppen werden in **Abbildung 32** gezeigt. Bei der Messung der Konzentrationen von IL-6 war bei den LPS-Gruppen eine starke Erhöhung von  $18,01 \pm 3,246$  pg/ml (WT + NaCl) bzw.  $3,421 \pm 1,166$  pg/ml (GPVI<sup>-/-</sup> + NaCl) auf  $285,7 \pm 28,76$  pg/ml bei den Wildtyp-Tieren ( $p < 0,0001$  gegenüber den NaCl-Kontrollen) und  $341,8 \pm 28,33$  pg/ml bei den gendefizienten Mäusen messbar. Zwischen den beiden LPS-Gruppen war kein signifikanter Unterschied zu erkennen ( $p = 0,2779$ ).

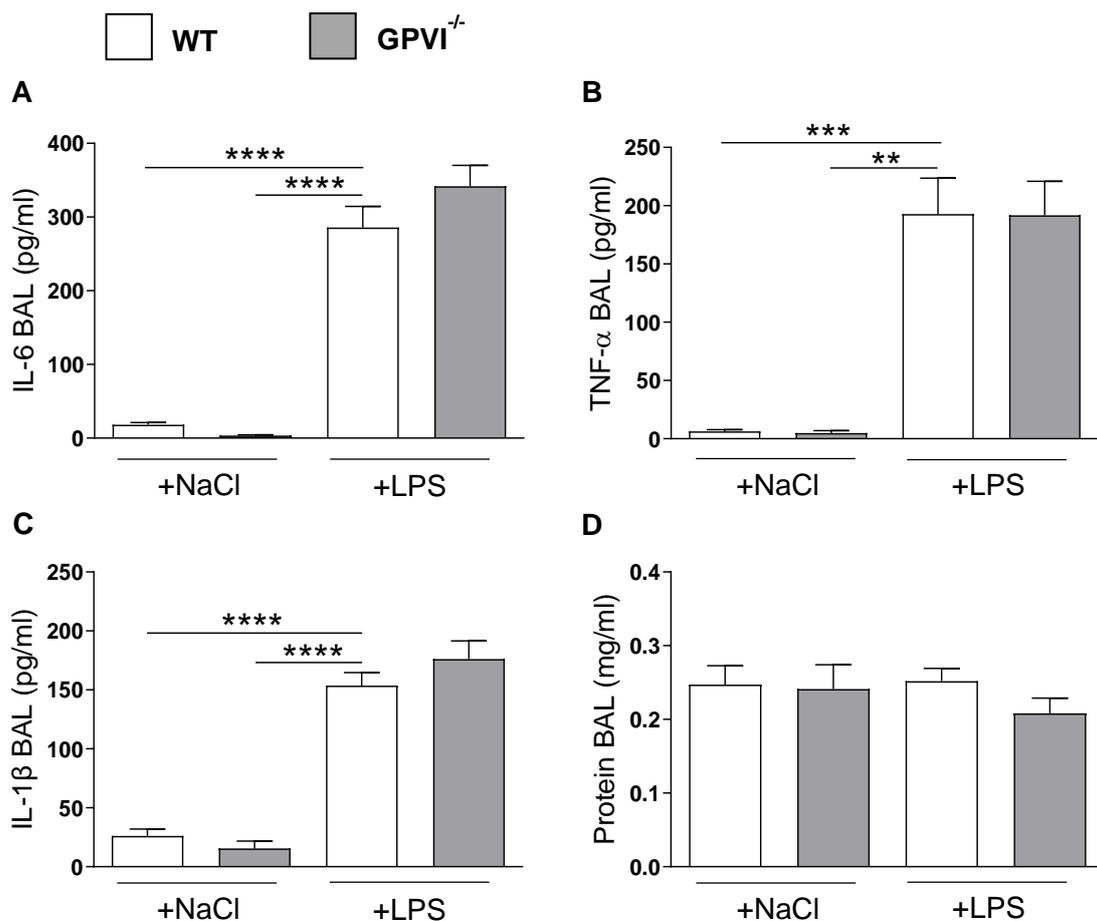
Die gemessenen Konzentrationsverhältnisse von TNF- $\alpha$  waren denen von IL-6 sehr ähnlich. Weder zwischen NaCl-Kontrollen (WT + NaCl:  $6,29 \pm 1,56$  pg/ml; GPVI<sup>-/-</sup>+NaCl:  $4,978 \pm 2,053$  pg/ml), noch zwischen den LPS-Gruppen (WT +

LPS:  $192,8 \pm 30,73$  pg/ml; GPVI<sup>-/-</sup> + LPS:  $191,8 \pm 29,18$  pg/ml) konnte ein Unterschied gemessen werden.

Auch die Konzentrationen von IL-1 $\beta$  waren bei gendefizienten und genkompetenten-NaCl-Kontrollen (WT + NaCl:  $26,16 \pm 5,865$  pg/ml; GPVI<sup>-/-</sup> + NaCl:  $15,44 \pm 6,23$  pg/ml) gleich. Ein kleiner, jedoch nicht signifikanter Unterschied von  $153,7 \pm 10,97$  pg/ml (WT + LPS) zu  $176,2 \pm 15,25$  pg/ml (GPVI<sup>-/-</sup> + LPS) zeigte sich in den LPS-Gruppen.

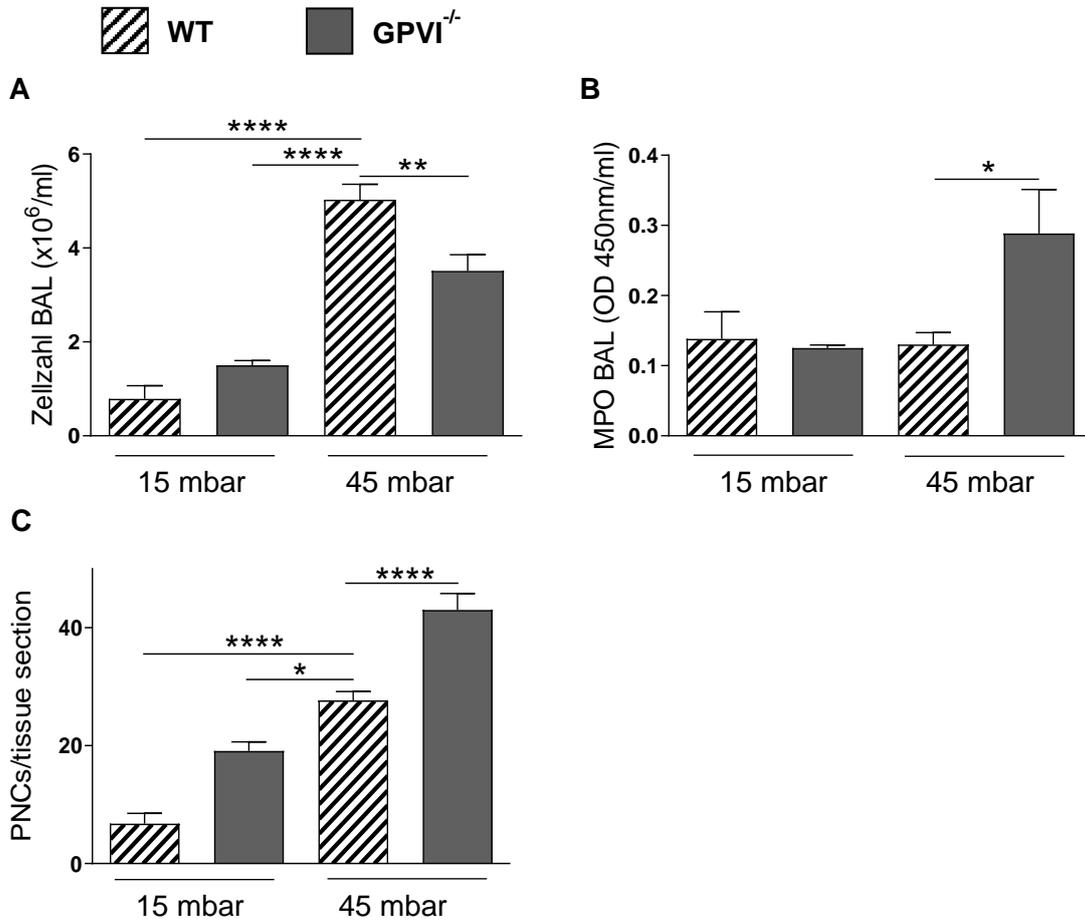
### Proteinkonzentration in der BAL

Die Proteinkonzentrationen waren bei den einzelnen Gruppen ähnlich (WT + NaCl:  $0,2473 \pm 0,02573$  mg/ml; GPVI<sup>-/-</sup> + NaCl:  $0,2412 \pm 0,03304$  mg/ml; WT + LPS:  $0,252 \pm 0,01731$  mg/ml; GPVI<sup>-/-</sup> + LPS:  $0,2082 \pm 0,02069$  mg/ml).



**Abbildung 32:** Konzentration von IL-6 (A), TNF- $\alpha$  (B), IL-1 $\beta$  (C) und Protein (D) in der BAL nach NaCl- bzw. LPS-Inhalation in WT- und GPVI<sup>-/-</sup>-Tieren; dargestellt sind Mittelwerte und SEM; \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001 \*\*\*\*p<0,0001

### 3.5.2 VILI-Modell



**Abbildung 33:** Zellzahl in BAL (A), MPO-Konzentration in BAL (B) und PNC-Anzahl in immunohistochemischen Schnitten (C) nach Ventilation mit 15 bzw. 45 mbar in WT- und GPVI<sup>-/-</sup>-Tieren; dargestellt sind Mittelwerte und SEM; \*p<0,05 \*\*p<0,01 \*\*\*\*p<0,0001

#### Zellzahl in der BAL

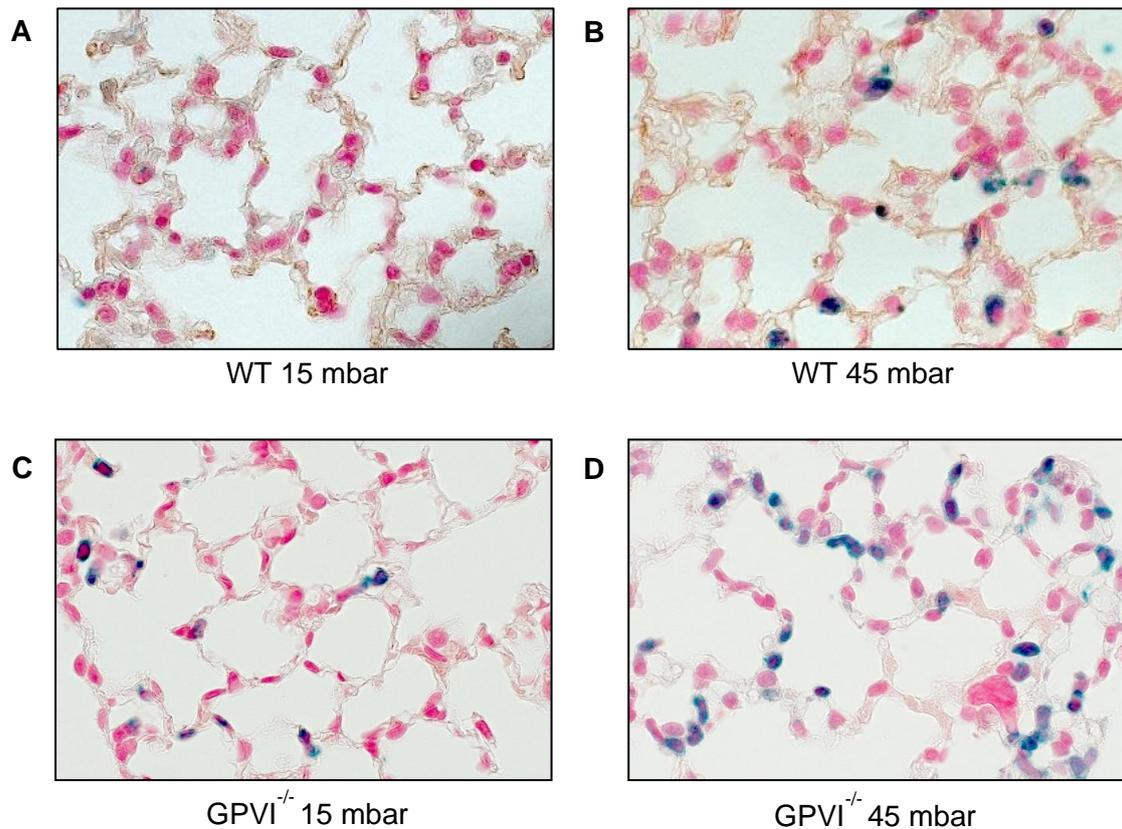
Die Zellzahl (**Abbildung 33**) bei den normoventilierten Gruppen unterschied sich nicht (WT mit 15 mbar:  $0,7873 \pm 0,2812 \times 10^6/\text{ml}$ ; GPVI<sup>-/-</sup> mit 15 mbar:  $1,5 \pm 0,1036 \times 10^6/\text{ml}$ ). Bei den Wildtyp-Mäusen stieg diese nach Überdruckbeatmung jedoch signifikant an auf  $5,03 \pm 0,329 \times 10^6/\text{ml}$  ( $p < 0,0001$ ). Auch bei den gendefizienten Tieren wurde nach Überdruckbeatmung mit  $3,513 \pm 0,3448 \times 10^6/\text{ml}$  eine höhere Zellkonzentration als bei den Normoventilations-Kontrollen gemessen, diese war jedoch signifikant niedriger als bei den entsprechenden Wildtyp-Tieren ( $p = 0,0063$ ).

### **Myeloperoxidase-Konzentration in der BAL**

Bei WT mit 15 mbar ( $0,1382 \pm 0,03881$ ), GPVI<sup>-/-</sup> mit 15 mbar  $0,1251 \pm 0,004471$ ) und WT mit 45 mbar ( $0,1301 \pm 0,01709$ ) waren ähnliche Werte der MPO zu messen. Nach Überdruckbeatmung war die Konzentration bei den GPVI-defizienten Tieren mit  $0,2885 \pm 0,06278$  signifikant höher als bei der äquivalenten Wildtyp-Gruppe ( $p=0,0479$ ) (**Abbildung 33**).

### **PNC-Anzahl in immunhistochemischen Schnitten**

Repräsentative Beispiele der immunhistochemischen Färbungen sind in **Abbildung 34** zu sehen. Die ausgewertete Anzahl an PNCs wird graphisch in **Abbildung 33** dargestellt. Bei WT mit 15 mbar konnten  $6,778 \pm 1,746$  PNCs/tissue section ausgezählt werden, bei GPVI<sup>-/-</sup> mit 15 mbar  $19,11 \pm 1,532$  PNCs/tissue section. Nach Überdruckbeatmung stieg die Anzahl signifikant ( $p<0,0001$ ;  $p=0,0118$ ) auf  $27,67 \pm 1,509$  PNCs/tissue section bei den Wildtyp-Tieren an. Bei GPVI-defizienten Tieren stieg die PNC-Anzahl jedoch signifikant höher auf  $43 \pm 2,799$  PNCs/tissue section ( $p<0,0001$ ) an.



**Abbildung 34:** Immunhistochemische Färbung von Lungenschnitten nach Ventilation mit 15 bzw. 45 mbar in WT- und GPVI<sup>-/-</sup>-Tieren. Markierung der PMNs mit einem Ly6G-Antikörper und der Thrombozyten mit einem CD41-Antikörper; (A) WT mit 15 mbar (B) WT mit 45 mbar (C) GPVI<sup>-/-</sup> mit 15 mbar (D) GPVI<sup>-/-</sup> mit 45 mbar

### Zytokinkonzentrationen in der BAL

Auch hier werden die Konzentrationen der Zytokine sowie von Protein zusammen in **Abbildung 35** dargestellt. Für WT mit 15 mbar konnte eine IL-6-Konzentration von  $111,8 \pm 36,97$  pg/ml ermittelt werden, für GPVI<sup>-/-</sup> mit 15 mbar  $119,4 \pm 41,43$  pg/ml. Nach Überdruckbeatmung stieg die Konzentration bei Wildtyp-Tieren signifikant auf  $1244 \pm 128,8$  pg/ml ( $p < 0,0001$ ;  $p = 0,0004$ ) an. Auch bei den gendefizienten Tieren wurde ein Anstieg auf  $975,4 \pm 213,2$  pg/ml gemessen.

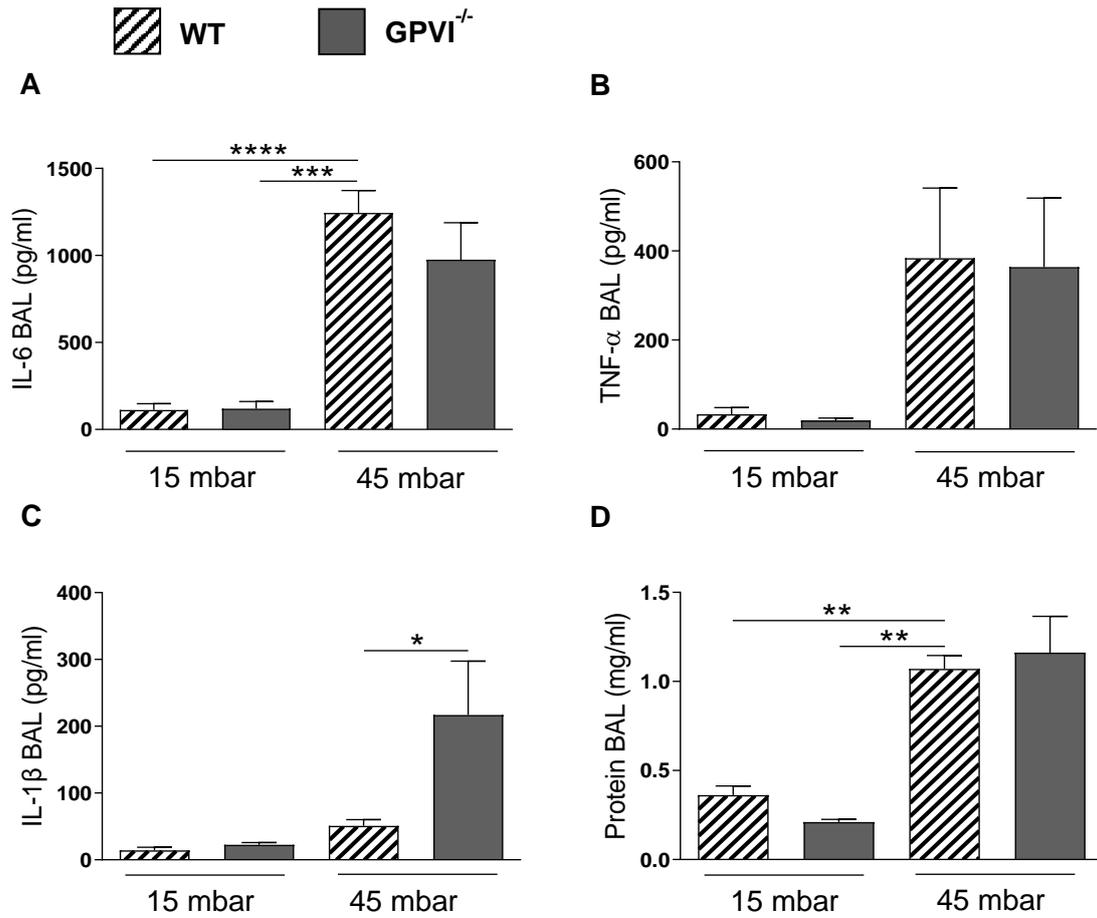
In der Gruppe der normoventilierten Tiere zeigte sich ein ähnliches Konzentrationsniveau an TNF- $\alpha$  (WT mit 15 mbar:  $33,3 \pm 15,08$  pg/ml; GPVI<sup>-/-</sup> mit 15 mbar:  $19,28 \pm 5,539$  pg/ml). Nach Überdruckbeatmung stieg die Konzentration an, ohne dass Unterschiede zwischen gendefizienten und genkompetenten

Tieren bestanden (WT mit 45 mbar:  $384 \pm 157,3$  pg/ml; GPVI<sup>-/-</sup> mit 45 mbar:  $363,8 \pm 154,9$  pg/ml).

IL-1 $\beta$  stieg nach Überdruckbeatmung mit 45 mbar bei Wildtyp-Tieren im Vergleich zu normoventilierten Mäusen nur leicht an (WT mit 15 mbar:  $14,23 \pm 4,499$  pg/ml; GPVI<sup>-/-</sup> mit 15 mbar:  $22,45 \pm 3,432$  pg/ml; WT mit 45 mbar:  $50,88 \pm 9,194$  pg/ml). Bei den GPVI-defizienten Tieren war hingegen eine signifikante Konzentrationserhöhung auf  $216,8 \pm 80,79$  pg/ml zu messen ( $p=0,0492$ ).

### **Proteinkonzentration in der BAL**

Für Wildtyp-Mäuse, die mit 15 mbar ventiliert wurden, konnte eine Konzentration von  $0,3622 \pm 0,05113$  mg/ml ermittelt werden, bei GPVI-gendefizienten Tieren lag die Konzentration bei  $0,2103 \pm 0,01579$  mg/ml. Die Proteinkonzentration stieg nach Überdruckbeatmung bei Wildtyp-Tieren auf  $1,07 \pm 0,07559$  mg/ml an ( $p=0,0066$ ). Auch für die GPVI<sup>-/-</sup>-Tiere, die mit Überdruck beatmet wurden, konnte ein Anstieg auf  $1,162 \pm 0,2038$  mg/ml gemessen werden.



**Abbildung 35:** Konzentration von IL-6 (A), TNF- $\alpha$  (B), IL-1 $\beta$  (C) und Protein (D) in der BAL nach Ventilation mit 15 bzw. 45 mbar in WT- und GPVI<sup>-/-</sup>-Tieren; dargestellt sind Mittelwerte und SEM; \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\*\* $p < 0,0001$

## **4 Diskussion**

### **4.1 Diskussion der Methoden**

Das LPS-Inhalations-Modell, das zur Simulierung der infektiösen Genese eines akuten Lungenschadens eingesetzt wird, ist eine anerkannte und in der Universitätsklinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin Tübingen gut etablierte Methode [166-169]. Dieses Modell ist für die Forschung unverzichtbar, da ein Großteil der ARDS-Erkrankungen durch eine Pneumonie oder Sepsis ausgelöst wird. Das LPS-Inhalations-Modell überzeugte auch in den experimentellen Teilen dieser Versuchsreihe. Nach Inhalation von LPS stiegen die Schädigungsparameter wie Zellzahl in der BAL, MPO-Konzentration und die Zytokinkonzentrationen in der BAL im Gegensatz zur Inhalation von NaCl zuverlässig und signifikant an. Das Modell erwies sich somit als gut geeignet und äußerst reliabel.

Die Wahl der Inhalationsdauer sowie der Inkubationszeit wurde auf der Grundlage der Erkenntnisse aus Vor- bzw. Etablierungsversuchen und anderer Publikationen getroffen [166, 170]. Die gewählten Zeitpunkte sind charakteristisch für das jeweilige Modell und Auftreten der stärksten Schädigung und bieten damit auch die größte Möglichkeit zur Aufdeckung eines Unterschiedes.

Das Modell der ventilator-induced lung injury, also einem durch invasive Beatmung hervorgerufenen Lungenschaden, wurde 2008 von Eckle et al. beschrieben und wiederholt erfolgreich eingesetzt [170, 171]. Bei dieser Methode wird eine sterile Inflammation induziert, wie sie beispielsweise als Lungenschädigung durch eine lang andauernde oder schlecht eingestellte Beatmungstherapie verursacht werden kann.

Auch für dieses Modell konnte mit der zuverlässigen Auslösung einer messbaren Lungenschädigung nach Ventilation mit 45 mbar inspiratorischem Spitzendruck eine hohe Reliabilität gezeigt werden.

Die gewählten Parameter orientierten sich auch hier an in der Literatur vorbeschriebenen Versuchen und zusätzlicher im Labor vorhandener Fachkenntnis: Durch Eckle et al. sowie Koeppen et al. wurden die Protein- sowie die MPO-Konzentration als Parameter gewählt, Koeppen et al. bestimmten zusätzlich die Konzentration der Entzündungszellen in der BAL [170, 171]. Beide Publikationen beschreiben zusätzlich die stärksten sichtbaren Effekte bei einer Ventilation mit einem inspiratorischen Spitzendruck von 45 mbar. Diesen Spitzendruck wendeten auch wir in unseren Versuchen an.

Wie Högl et al. zeigen konnten, ist sogar eine Kombination der beiden Modelle mit einer sich potenzierenden Schädigung möglich, um die oft auch multifaktorielle Genese eines ARDS besser widerzuspiegeln [172]. Dies kann in Zukunft für ergänzende Versuche oder Subgruppenversuche in Betracht gezogen werden.

Zarbock et al. bestimmten die Anzahl an PMNs sowie die Proteinkonzentration in der BAL. Der Schädigungsgrad der Lunge wurde mithilfe von Hämatoxylin-Eosin-Färbungen beurteilt [152]. Wir legten in der Histologie jedoch mehr Wert auf die PNC-Anzahl und weniger auf die pathologischen Aspekte und entschlossen uns aus diesem Grund für die Anfertigung von immunhistochemischen Darstellungen. Als weitere Methode zur Quantifizierung der klinischen Beeinträchtigung wäre die Durchführung einer Blutgasanalyse möglich gewesen, vor allem zur Bestimmung des arteriellen Sauerstoffpartialdrucks und zur Berechnung des Oxygenierungsindex, der wie oben beschrieben auch in der klinischen Einteilung eines ARDS nach Berlin-Definition eine elementare Rolle spielt. Xu et al. zeigten jedoch in einem murinen Modell mit viral induziertem Lungenschaden einen engen Zusammenhang zwischen vermindertem Sauerstoffpartialdruck in der Blutgasanalyse sowie erhöhter Zellzahl in der BAL, sodass diese Untersuchung nicht unbedingt einen weiteren Erkenntnisgewinn erbracht hätte [173]. Die gemessene Zellzahl in der BAL ist als einer der wichtigsten Parameter für den klinischen Zustand der Versuchstiere zu deuten und dementsprechend hoch zu bewerten und kann durch die schnelle Messung quasi als Surrogatparameter eingesetzt werden kann.

Zur Untersuchung der Effekte der jeweiligen Proteine verwendeten wir gendefiziente Mäuse. Diese Linien beinhalteten jedoch keine thrombozytenspezifischen Knockouts. Einige der untersuchten Proteine kommen nicht nur auf Thrombozyten vor, sondern auch auf anderen Körperzellen. Bei der gendefizienten Linie für P-Selektin bedeutet dies beispielsweise, dass P-Selektin weder in den  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten noch in den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen gespeichert ist. Eine exklusive Zuschreibung der beobachteten Effekte zum thrombozytären Einfluss dieser Proteine kann also in diesen Fällen nicht erfolgen. Eine genauere Differenzierung wäre mithilfe des Einsatzes von chimären Linien möglich, ein solches Vorgehen wird von Zarbock et al. beschrieben [152].

Eine weitere Möglichkeit ist die Gabe von Antikörpern gegen die einzelnen Proteine. Hier würde die anspruchsvolle Zucht und Haltung der gendefizienten Tiere entfallen. Die eigentliche Versuchsdurchführung gestaltet sich jedoch sowohl technisch als auch organisatorisch schwieriger und aufwendiger, da sich die ohnehin schon langen Versuchszeiten erneut um die Zeit der Antikörpergabe sowie der benötigten Inkubationszeit verlängern. Der große Vorteil eines Modells mit Antikörpergabe ist aber sicherlich das gleichzeitige Austesten einer in der Humanmedizin realisierbaren therapeutischen Option. Nach den vielversprechenden Untersuchungen mit gendefizienten Mäusen, die in dieser Arbeit beschrieben werden, werden weitere Versuche mit Antikörpern in unserer Arbeitsgruppe bereits durchgeführt.

Die Übertragung der Modelle und der Ergebnisse auf die klinische Humanmedizin ist selbstverständlich nicht ohne Einschränkungen möglich.

Einerseits kann ein Tiermodell niemals die humanen Bedingungen genau abbilden. Als Unterschied soll beispielhaft benannt werden, dass im murinen Endothel TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  die P-Selektin-Produktion stimulieren, in humanen Endothelzellen diese Stimulatoren hingegen vor allem auf das E-Selektin wirken [174]. Andererseits wird in unseren beiden Modellen jeweils nur der Beginn der akuten Phase der Schädigung abgebildet. Nach drei (VILI-Modell) bzw. vier

Stunden (LPS-Modell) sind im klinischen Alltag in der Regel die Patienten nicht diagnostiziert, sie sind gegebenenfalls bereits symptomatisch, jedoch wird eine Diagnose oder gar eine spezifische Therapie zu diesem Zeitpunkt nur in sehr wenigen Fällen erfolgen. Unterschiede in der Dynamik des murinen und des humanen Stoffwechsels dürfen bei dieser Überlegung jedoch nicht vernachlässigt werden. Es ist möglich, dass die Proteine in den anderen Phasen des ARDS differierende Funktionen bzw. Auswirkungen haben. Eine Untersuchung mehrerer Zeitpunkte nach Schädigung wäre vor diesem Hintergrund selbstverständlich wünschenswert. Da alle Versuche jedoch als Terminalversuch durchgeführt werden, würde dies mit einem hohen Verlust an Versuchstieren einhergehen und wäre somit nur bei klarer Indikation ethisch vertretbar. Beim VILI-Modell ist eine längere Durchführung zusätzlich nur mit deutlich erhöhtem Aufwand (Ernährung, lange Narkose, Personal) möglich.

## **4.2 Diskussion der Ergebnisse**

Die Rolle von Thrombozyten in der Immunantwort ist äußerst komplex. Zudem zeigen die bisherigen Studien auf diesem Gebiet ein sehr inkonsistentes Bild und offenbar unterscheidet sich die Funktion der Proteine je nach untersuchtem Organ oder Gewebe [66]. Dies erschwert den Vergleich zu anderen Untersuchungen sowie die Erstellung eines Gesamtbildes. Auch der Ort der PMN-Migration unterscheidet sich je nach Organ, in der Lunge findet sie sowohl in den Venolen als auch in den Kapillaren statt [66].

Im Folgenden sollen die Ergebnisse der Arbeit für jeden der untersuchten Rezeptoren diskutiert und zu anderen veröffentlichten Studien sowie zum bisherigen Wissensstand in Kontext gesetzt werden.

### **4.2.1 Einfluss von GPIb**

GPIb ist, wie in der Einleitung dargelegt, ein Protein, das multiple Verbindungen eingehen kann und auf diese Art und Weise Bindungen zwischen Endothel und PMN sowie zwischen Thrombozyten und Endothel vermitteln kann.

Die Interpretation der Ergebnisse dieses Proteins ist schwierig, da keine Aussage über die Relevanz der einzelnen Bindung getroffen werden kann. Hier müssen also auch die Ergebnisse der anderen Rezeptoren miteinbezogen werden, die mit GPIb in Interaktion treten.

In unserer Studie stiegen bei den WT-Tieren nach LPS-Inhalation die Zellzahl in der BAL, die PNC-Anzahl im Gewebe sowie die Zytokinkonzentrationen in der BAL an. Dies zeigt, dass eine Entzündungsreaktion stattgefunden hat und somit mit diesem Modell ein ARDS abgebildet werden kann. Außerdem konnten wir nachweisen, dass nach Stimulation durch LPS PNCs gebildet werden, die anschließend in das Gewebe migrieren und dort immunhistochemisch dargestellt werden können. Bei GPIb-defizienten Tieren (GPIb-IL-4tg) ist kein funktioneller GPIb-Rezeptor an der Oberfläche der Thrombozyten exprimiert. Bei diesen Tieren war die gemessene Zellzahl in der BAL nach LPS-Inhalation sowie die Anzahl an PNCs im Vergleich zu den Wildtypen signifikant reduziert. Dies weist

darauf hin, dass GPIb sowohl für die PNC-Bildung als auch die PNC-Auswanderung notwendig ist.

Im VILI-Modell als Darstellung einer sterilen Inflammation ist die Anzahl an PMNs in der BAL bei GPIb-gendefizienten Tieren ebenfalls signifikant reduziert, ebenso die PNC-Anzahl. Trotz signifikantem Abfall der Zellzahl ist dagegen ein signifikanter Anstieg der MPO-Konzentration zu messen. Dies verwundert vor dem Hintergrund, dass MPO eigentlich einen Marker für ausgewanderte PMNs darstellt und MPO-Konzentration und Zellzahl sich meist konvergent verhalten. Möglicherweise sind die wenigen PMNs, die noch auswandern, deutlich stärker aktiviert, beispielsweise durch eine fehlende Rückkopplung.

Bisher gibt es keine anderen Untersuchungen über die Auswirkung von GPIb-Gendefizienz bei Mäusen auf eine akute Lungenschädigung. Cognasse et al. beschrieben jedoch in einem murinen TRALI-Modell (transfusion-related acute lung injury), dass die Gabe von Antikörpern gegen GPIb $\alpha$  zu Thrombozyten-Depletion führt. Die nachfolgende Schädigung konnte zwar nicht komplett verhindert werden, war jedoch deutlich abgeschwächt. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass TRALI nicht ausschließlich durch Thrombozyten ausgelöst wird, jedoch im Verlauf durch Thrombozyten beeinflusst wird [175]. In einer weiteren Studie, in der explantierte Schweinelungen mit humanem Blut infundiert wurden, wurde eine Thrombozytenauswanderung und Ausbildung eines Lungenschadens beschrieben. Auch in diesem Modell wurde die Thrombozytenauswanderung und Lungenschädigung durch die Applikation eines Antikörpers gegen GPIb vermindert [176].

In einem weiteren Maus-Modell mit LPS-induzierter Hirnschädigung konnte demonstriert werden, dass Thrombozyten dort elementar für die PMN-Auswanderung sind. Durch die Gabe eines Anti-GPIb-Antikörpers wurde die Auswanderung von PMNs deutlich vermindert [177]. In einem ähnlichen Hirninfarktmodell wurde das Ausmaß der Schädigung durch einen Anti-GPIb Antikörper vermindert, wie Kleinschnitz et al. aufzeigen konnten [178].

Unsere Modelle unterscheiden sich durch die Verwendung von Knockout-Tieren und der Wahl der Schädigungsform von anderen Antikörper-basierten Studien. Die beiden Publikationen unter Verwendung der TRALI-Modelle bilden auch die Lunge ab, die Publikationen von Giles et al. und Kleinschnitz et al. sind aber Hirnschädigungsmodelle [175-178]. Wie bereits beschrieben gibt es Unterschiede zwischen den Organen bezüglich der Relevanz der einzelnen Proteine, sodass hier nur eine eingeschränkte Vergleichbarkeit mit unserer Studie vorliegt. Jedoch lassen sich diese Daten gut mit den Ergebnissen unserer beiden Modelle in Einklang bringen. Durch Abwesenheit oder Blockade von GPIb wird die PMN-Auswanderung im Vergleich zur LPS-konfrontierten Wildtypgruppe bzw. zur normoventilierten Gruppe stark reduziert. Neu demonstriert ist die Rolle von GPIb für die Bildung von PNCs nach Stimulation mit LPS mit Überdruckventilation sowie deren Darstellung in der Immunhistochemie. Die neu gewonnenen Ergebnisse bestätigen größtenteils die bisherigen Theorien erstmals auch in einem Knockout-Modell.

#### 4.2.2 Einfluss von vWF

Der vWF bindet an GPIb und hilft so beim Aufbau einer Bindung zwischen Endothel und Thrombozyten. Die Konzentrationen der Zytokine stiegen bei vWF<sup>-/-</sup> in unseren beiden Modellen zumeist an. Die Zellzahl in der BAL war jedoch bei beiden Modellen im Vergleich zu WT trotz der erhöhten Zytokine stark reduziert. Trotz ablaufender Entzündungsreaktion und starker Ausschüttung von Zytokinen kommt es bei verschiedenen Schädigungsformen bei Abwesenheit von vWF zur stark verminderten Auswanderung von PMNs.

Ware et al. maßen die Konzentrationen von vWF im Plasma von Patienten mit ARDS und stellten fest, dass höhere Spiegel mit einem schlechteren Verlauf im Sinne einer erhöhten Letalität sowie Organversagen korrelierten. Die vWF-Konzentration wurde hier als Maß für die endotheliale Aktivierung gesehen, schlussfolgernd besteht also ein Zusammenhang zwischen endothelialer Aktivierung und schweren Verläufen. Hohe Werte hingen auch mit einem erhöhten Risiko für ein schweres ARDS zusammen [179].

Bei den vWF-defizienten Tieren in der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine signifikant verminderte Zellzahl und eine damit anzunehmende verbesserte Klinik. Diese Ergebnisse stehen also im Einklang mit den Ergebnissen von Ware et al. Zudem wiesen 60% der dort eingeschlossenen Patienten eine infektiöse Genese des ARDS auf, was besonders einen Vergleich zu unserem LPS-Modell nahelegt.

Petri et al. setzten in einem abakteriellen Peritonitis-Modell Antikörper gegen vWF ein und konnten anschließend eine verminderte PMN-Auswanderung demonstrieren. Nach Ergänzung der Versuche durch chimäre Linien konnte der endotheliale und nicht der Thrombozyten-assoziierte vWF als verantwortlich identifiziert werden [180]. Der endotheliale vWF vermittelt die PMN-Auswanderung über eine Bindung an GPIIb, wie in dieser Studie durch Gabe von Anti-GPIIb-Antikörper demonstriert werden konnte.

Der Vergleich von GPIIb-IL-4tg und vWF<sup>-/-</sup> unseres LPS-Modells zeigt ähnliche Ergebnisse, was eine hohe Relevanz der Bindung zwischen vWF und GPIIb für die Leukozyten- und PNC-Auswanderung nahelegt. GPIIb bindet zusätzlich jedoch an Mac-1 und P-Selektin, hierdurch lassen sich kleinere Unterschiede beider Gruppen erklären.

Unsere Daten fügen sich hier sehr gut in die bisher angenommene Rolle des vWF ein. Bei der Interpretation der Ergebnisse ist zudem zu beachten, dass bei vWF-defizienten Mäusen gleichzeitig ein ausgeprägter Defekt in der CD62P-Expression auftritt [180]. Daraus leitet sich auch für unsere Studie eine fehlende Differenzierung zwischen dem Einfluss von thrombozytärem und endothelalem vWF sowie P-Selektin ab und damit eine Einschränkung der Aussagekraft.

#### 4.2.3 Einfluss von GPIIb/IIIa

Durch Einsatz von CD41-YFP-Tieren mit nicht-funktionellem CD41 (GPIIb) sollten Aufschlüsse über die Relevanz des GPIIb/IIIa-Rezeptors gewonnen werden. Dieser ist ein elementarer Thrombozytenrezeptor für die Thrombozytenaktivierung, vermittelt jedoch über ICAM-1 auch eine Bindung zwischen Thrombozyten und Endothel und ist damit über Bridging an der Bindung

zwischen PMN und Endothel beteiligt. Bisher wurden hierzu keine Studien mit gendefizienten Tieren publiziert.

In unseren Experimenten konnte in beiden Modellen eine verminderte Zellzahl in der BAL sowie eine verminderte Anzahl an PNCs in den immunhistochemischen Schnitten beobachtet werden. Im Gegensatz hierzu zeigte sich in einer Studie von Grommes et al. in einem murinen LPS-Lungenschädigungsmodell (Inhalation von *Salmonella enteritidis* für 30 Minuten, Analyse vier Stunden später) kein Einfluss durch einen Anti-GPIIb/IIIa-Antikörper auf die Neutrophilen-Extravasation [117].

In der Literatur finden sich zudem zwei Arbeiten mit TRALI-Modellen und dem Einsatz von GPIIb/IIIa-neutralisierenden Antikörpern. In der bereits erwähnten Arbeit von Cognasse et al., in der explantierte Schweinelungen mit humanem Blut infundiert wurden, wurden zusätzlich zum Anti-GPIb-Antikörper auch Anti-GPIIb/IIIa-Antikörper verabreicht. Nach Gabe des Anti-GPIb-Antikörpers zeigte sich eine stark verminderte Thrombozyten-Auswanderung, dieser Effekt konnte durch Blockade von GPIIb/IIIa verstärkt werden [176]. In einem weiteren ähnlichen Modell wirkte die Blockade von GPIIb/IIIa protektiv gegenüber einer Erhöhung des pulmonalen vaskulären Widerstands. Zudem zeigte sich eine Verminderung der extravasalen Flüssigkeitsverschiebung und Thrombozytenauswanderung [181]. In diesen beiden Untersuchungen wurde also für die akute Lungenschädigung im Rahmen eines TRALI ein deutlicher Einfluss von GPIIb/IIIa-Bindungen auf die Thrombozytenauswanderung und damit einhergehendem Lungenschädigung demonstriert.

Kongruent hierzu verhalten sich auch unsere Ergebnisse. GPIIb/IIIa scheint eine übergeordnete Rolle bei der Thrombozytenaktivierung, PNC-Bildung und Auswanderung zu spielen. Da dies in beiden Modellen zu beobachten ist, scheint die Genese der Schädigung keine Rolle zu spielen.

#### 4.2.4 Einfluss von P-Selektin

P-Selektin beeinflusst zunächst die selektinvermittelte Annäherung von PMN an Thrombozyten und später auch die Bindung zwischen Thrombozyten und Endothel. Bei den P-Selektin-defizienten Tieren konnte in beiden Modellen eine im Vergleich zu WT verminderte Zellzahl sowie eine verminderte Anzahl an PNCs im Gewebe gemessen werden.

P-Selektin ist unter den in dieser Studie untersuchten Proteinen dasjenige, zu dem die meisten experimentellen Studien vorliegen. Meist wurden entweder P-Selektin-defiziente Mäuse oder Antikörper in murinen Modellen eingesetzt. Die Resultate der bisherigen Studien sind widersprüchlich.

Mizgerd et al. setzten ein murines Lungenschädigungsmodell ein, es erfolgte die intratracheale Instillation von *Streptococcus pneumoniae*. In E- oder P-Selektin-defizienten Mäusen wurde nach Auslösung der Entzündung eine erhöhte Anzahl an Leukozyten in den Alveolen gefunden. Die Zugabe von Antikörpern gegen L- und P-Selektin in Wildtyp-Tieren beeinflusste die Leukozytenauswanderung dagegen nicht [182]. Zudem konnte durch Kornerup et al. demonstriert werden, dass LPS-induziertes pulmonales Neutrophilenrekrutment abhängig von PSGL-1 und L-Selektin, jedoch unabhängig von P-Selektin stattfindet [183].

Grommes et al. setzten ein unserem LPS-Modell ähnliches Modell ein [117]: Es erfolgte die Inhalation von LPS (*Salmonella enteritidis* gegenüber *E. coli* in unserem Modell) über 30 Minuten (gegenüber 45 Minuten in unserem Modell), eine Analyse erfolgte vier Stunden später (identisch zu unserem Modell).

Es zeigte sich überraschenderweise lediglich die MPO-Konzentration in der BAL nach Gabe eines Anti-P-Selektin-Antikörpers vermindert, ansonsten konnte kein Einfluss auf die Neutrophilen-Extravasation gemessen werden. Weitaus relevanter waren in dieser Studie die durch Thrombozyten sezernierten Chemokine, wobei die Bildung eines Heteromers zwischen CCL5 und CXCL4 wohl eine übergeordnete Rolle spielt. Durch Blockade der Chemokine konnte die Leukozytenauswanderung vermindert werden.

In Relation zu diesen beiden Publikationen widersprechen unsere Daten (sowohl des LPS- als auch des VILI-Modells) den oben beschriebenen Ergebnissen in großen Teilen.

Cleary et al. beobachteten per Intravitalmikroskopie die PMN- und Thrombozytenrekrutierung nach intranasaler LPS-Inhalation bei Mäusen. Zusätzlich wurden Antikörper gegen PSGL-1 oder P-Selektin verabreicht. Die PMN-Rekrutierung wurde durch die Antikörper vermindert, die Thrombozytenrekrutierung blieb dagegen unbeeinflusst [184].

Diese Ergebnisse spiegeln sich in unserem LPS-Modell wider. Hier zeigte sich ebenfalls eine verminderte Zellzahl in der BAL, jedoch ähnlich viele PNCs in der Immunhistochemie. Auch im VILI-Modell konnte eine verminderte Zellzahl gemessen werden, jedoch war auch die Anzahl der PNCs in der Immunhistochemie reduziert. Die Messungen bei Cleary et al. erfolgten allerdings anders als in unserem Modell erst nach 48 Stunden, hier werden demzufolge unterschiedliche Phasen der Inflammation verglichen. Wie bereits zuvor dargelegt scheint es große Unterschiede in der Relevanz und der pro- bzw. anti-inflammatorischen Wirkung der einzelnen Proteine in den verschiedenen Phasen zu geben.

Zarbock et al. konnten in einem murinen Modell der Lungenschädigung, ausgelöst durch Säure-bedingte Aspiration, zeigen, dass die Defizienz für P-Selektin eine bessere Oxygenierung und weniger pathologische Lungenveränderungen zur Folge hat. Es konnte ferner nachgewiesen werden, dass diese Effekte ausschließlich durch das thrombozytäre P-Selektin verursacht werden [152]. Die Ergebnisse bei den  $CD62P^{-/-}$  lassen sich mit unseren Erkenntnissen in Einklang bringen.

Zusammenfassend zeigt sich weiter ein uneinheitliches Bild bezüglich der Rolle von P-Selektin für die Ausbildung einer akuten Lungenschädigung, wobei die Forschung durch die schwierige Unterscheidung zwischen den verschiedenen P-Selektin-Quellen (Thrombozyten und Endothelzellen) erschwert wird. Die

Anwendung von chimären Linien wird in diesem Bereich zum weiteren Erkenntnisgewinn sinnvoll sein.

Auch in der klinischen Forschung werden bereits Studien durchgeführt, die den Einfluss von P-Selektin auf die akute Lungenschädigung untersuchen. Ergebnisse zur Wirkung des Anti-P-Selektin-Antikörpers Crizanlizumab bei ARDS-Patienten sind jedoch noch ausstehend [185].

#### 4.2.5 Einfluss von GPVI

GPVI vermittelt über Vitronectin eine Bindung von Thrombozyten (und damit PNCs) an das Endothel, zusätzlich wird gemeinsam über einen GPVI/ GPIIb/IIIa-abhängigen Signalweg die PMN-Anlockung gefördert [165].

In unserem LPS-Modell zeigten sich Zellzahl und PNCs bei GPVI-defizienten Tieren nach LPS-Inhalation signifikant reduziert, während kein Unterschied in der Konzentration der Zytokine gemessen werden konnte. Im VILI-Modell zeigte sich die Zellzahl zwar signifikant vermindert, die PNCs jedoch überraschenderweise signifikant erhöht.

Hu et al. konnten demonstrieren, dass GPVI die Aktivierung von Thrombozyten durch verschiedene Bakterien wie *Staphylococcus aureus* oder *Helicobacter pylori* vermittelt [163, 164]. Während einer Infektion findet über GPVI also eindeutig eine Aktivierung von Thrombozyten statt.

Zudem konnte gezeigt werden, dass GPVI bei Immunkomplex- Glomerulonephritis über einen GPVI/GPIIb/IIIa-abhängigen Signalweg die Thrombozyten-Mobilisation ins Gewebe vermittelt und so auch die PMN-Rekrutierung erhöht [165].

Eine interessante Arbeit veröffentlichten Claushuis et al. 2018 [162]. Sie untersuchte den Einfluss von GPVI in einem pneumogenen Sepsis-Modell. Viele Parameter des experimentellen Aufbaus und der Auswertung ähneln hierbei unserer Arbeit: Am Mausmodell wurde als Pathogen *Klebsiella pneumoniae*

eingesetzt, dessen Zellmembran als gramnegatives Bakterium ebenso LPS enthält. Vergleichbar mit unseren Experimenten wurden Zellzahl sowie Zytokinkonzentrationen in der BAL evaluiert. Sie zeigten überzeugend, dass in GPVI-defizienten Tieren weniger Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate gebildet wurden. Aus einer Anti-GPVI-Antikörpergabe resultierten weniger Thrombozyten-Neutrophilen-Komplexe und eine verminderte Thrombozytenaktivierung. In vitro konnte zudem eine vermehrte Bildung von Thrombozyten-Leukozyten-Komplexen nach Stimulation von GPVI gemessen werden [162]. GPVI ist demnach definitiv bei Bildung der PNCs und der Thrombozytenaktivierung beteiligt.

Für GPVI<sup>-/-</sup> beschrieben Claushuis et al. eine vermehrte bakterielle Konzentration in der Lunge sowie anderen Organen, nach Anti-GPVI-Antikörpergabe ausschließlich in der Lunge. In diesem Kontext scheint die Anwesenheit von GPVI und PNC-Bildung also protektiv zu wirken. Jedoch müssen hier Unterschiede in Bezug auf den Messzeitpunkt erwähnt werden: Wir führten die Probenentnahmen vier Stunden nach Induktion der Inflammation durch, Claushuis et al. erst nach 12 bzw. 36 bzw. 42 Stunden. Hier werden also andere Phasen der Lungenschädigung abgebildet.

Die Ergebnisse von Claushuis et al. zeigen die Relevanz einer ausgeglichenen Immunantwort und Entzündungsreaktion. Thrombozyten-Neutrophilen-Komplexe sind nicht per se schädlich, sondern wirken hier, wenn auch erst im späteren Verlauf, auch antibakteriell, die komplette Ausschaltung dieses Abwehrprozesses kann demzufolge auch schädlich sein.

Die Daten von Claushuis et al. lassen sich teilweise mit unseren Ergebnissen in Einklang bringen: Auch wir beobachteten in unserem LPS-Modell in den GPVI<sup>-/-</sup> weniger PNCs im Gewebe sowie einen leichten Anstieg der gemessenen Zytokine. Dies bestätigt die durch Claushuis et al. demonstrierte Rolle (in-vivo und in-vitro) der GPIV-vermittelten PNC-Bildung. In unseren Versuchen nahm die Zahl an PMN in der BAL jedoch signifikant ab, dies gilt für das LPS- sowie das VILI-Modell. Zusätzlich wanderten beim VILI-Modell überraschenderweise mehr

PNCs in das Gewebe aus, was den Daten von Claushuis et al. sowie den Messungen im LPS-Modell widerspricht. Für diesen Mechanismus scheint also interessanterweise die Art der Schädigung die Relevanz des Rezeptors in stark gegensätzlicher Ausprägung zu bestimmen.

#### 4.2.6 Diskussion der Zytokinkonzentrationen

In einem CLP-Modell (cecal ligation and puncture: durch Darmperforation induzierte Peritonitis mit folgender Sepsis) konnten Corken et al. ebenfalls eine signifikante Erhöhung der proinflammatorischen Zytokine MIP-1 $\beta$ , MCP-1, KC und IL-6 in GPIb-defizienten-Tieren (eingesetzte Linie: hIL-4R/Ib $\alpha$ ) messen [186].

Xiang et al. zeigten sehr überzeugend und ausführlich, dass in einem murinen Sepsis-Modell bei thrombopenen Tieren (Thrombopenie durch Anti-GPIb-Antikörper) die Plasmakonzentrationen von TNF- $\alpha$  and IL-6 erhöht waren, nach Thrombozytentransfusion wiederum war ein Absinken derselben zu beobachten. Des Weiteren konnte demonstriert werden, dass Thrombozyten über einen Cyclooxygenase1-Prostaglandin-Signalweg die Makrophagen-induzierte Entzündung vermindern und so die Zytokinlevel beeinflussen [187].

Die Zytokinkonzentrationen verhielten sich von Modell zu Modell und von Protein zu Protein sehr unterschiedlich. Am auffälligsten stellten sich die Konzentrationen von IL-1 $\beta$  dar, diese waren bei den gendefizienten Tieren nach Schädigung im Vergleich zu WT in fast jeder Subgruppe stark bzw. sogar signifikant erhöht. Eine Ausnahme bildeten die Werte des LPS-Modells für GPVI $^{-/-}$  und CD62P $^{-/-}$ , hier war kein Unterschied zu beobachten.

Diverser verteilten sich die Werte für IL-6, hier war kein Muster hinsichtlich der angewandten Modelle zu erkennen.

In Bezug auf TNF- $\alpha$  zeigten sich die Werte bei GPIb-IL-4tg sowie GPVI $^{-/-}$  (beide Modelle) gleich, bei vWF $^{-/-}$  und CD41-YFP jeweils stark (VILI) bzw. signifikant (LPS) erhöht. Bei CD62P $^{-/-}$  bei LPS erhöht, bei VILI gleich.

Die teilweise signifikanten Erhöhungen lassen sich mit den oben beschriebenen Mechanismen erklären, wenngleich bisher für IL-1 $\beta$  der Zusammenhang nicht in der Literatur beschrieben wurde.

Die erhöhten Zytokinwerte können als Hinweis auf eine verstärkt ablaufende Entzündungsreaktion gewertet werden. Jedoch muss auch die Möglichkeit einer fehlenden PNC- und PMN-Anlockung und eine damit einhergehende Verstärkung der Zytokinausschüttung durch fehlende negative Rückkopplung in Betracht gezogen werden.

Signifikante Verminderungen der Zytokine in Zusammenhang mit verminderten ausgewanderten PMNs und PNCs könnten wiederum doch eher auf einen anti-inflammatorischen Effekt von PNCs hindeuten.

Es wird deutlich, dass Thrombozyten anscheinend sowohl schädigenden als auch protektiven Einfluss nehmen können. Die Tatsache, dass Thrombozyten durch Beeinflussung von Makrophagen eine verminderte Entzündungsreaktion bewirken, zeigt die Relevanz bei der Auflösung einer Inflammation.

Es sind also eine differenzierende Betrachtung und weitere Studien notwendig. Eine genaue Erklärung, welches Protein welchen Einfluss auf welches Zytokin mit welcher schlussendlichen Konsequenz hat, ist mit den vorliegenden Daten nicht möglich.

#### **4.2.7 Diskussion der Protein-Konzentrationen**

Bei den Proteinkonzentrationen waren keine großen Unterschiede zwischen WT und gendefizienten Tieren zu messen. Die einzigen signifikanten Erhöhungen gegenüber WT fanden sich bei vWF<sup>-/-</sup> + 45 mbar sowie CD41-YFP + LPS.

Ansonsten waren lediglich gleiche bzw. leicht erhöhte Konzentrationen zu messen. Da aber auch kein durchgehender Unterschied zwischen Kontroll- und Schädigungsgruppen zu messen war, ist die Proteinkonzentration wahrscheinlich ein Parameter mit nur geringer Aussagekraft.

### **4.3 Schlussfolgerung der Diskussion**

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass beide Modelle sehr gut funktionieren und geeignet sind, um Unterschiede zwischen WT und gendefizienten Tieren darzustellen. Nach Schädigung der Lunge (durch bakterielle Bestandteile wie LPS oder Überdruckbeatmung) werden PNCs gebildet, die immunhistochemisch darstellbar sind. Die (funktionelle) Ausschaltung der meisten der untersuchten thrombozytären Proteine bewirkte nach Schädigung eine verminderte Zellzahl in der BAL sowie eine verminderte Zahl an PNCs im Lungengewebe, folglich ist eine verbesserte Oxygenierung mit gebessertem klinischem Zustand anzunehmen.

Die IL-1 $\beta$ -Zytokinkonzentrationen präsentierten sich bei den gendefizienten Tieren größtenteils signifikant erhöht, was eine protektive Wirkung der thrombozytären Proteine vermuten ließe. Da die Endpunkte wie Zellzahl und PNCs in Lungengewebe jedoch erniedrigt waren, ist kein eindeutiger Schluss zu ziehen.

Die Konzentrationen von IL-6 sowie TNF- $\alpha$  zeigten sich nicht kohärent erhöht oder erniedrigt. Die untersuchten Zytokine scheinen also in Bezug auf ihre inflammatorische Wirkung unterschiedlichen Einfluss zu haben. Unklar bleibt, weshalb signifikant veränderte Zytokinkonzentrationen nicht immer einen entsprechenden Einfluss auf das Maß der Schädigung nehmen. Möglicherweise ist eine fehlende negative Rückkopplung oder die Veränderung weiterer Signalwege durch die Gendefizienz hierfür verantwortlich.

Antikörper als direkte therapeutische Option werden nach den dargelegten, vielversprechenden Ergebnissen in unserem Institut bereits in mehreren murinen Modellen getestet. Zur weiteren Forschung ist eine Kombination beider Modelle zur besseren Darstellung der multifaktoriellen Genese eines ARDS sinnvoll, zusätzlich wäre der Einsatz von chimären Mauslinien möglich.

## 5 Zusammenfassung

Das ARDS ist ein häufiges Krankheitsbild mit hoher Letalität, zu dem bisher keine kausale Therapiemöglichkeit existiert.

Der Einfluss von Thrombozyten ist sehr wichtig für die Immunantwort, die PMN-Auswanderung und die inflammatorische Schädigung. Komplexe aus Thrombozyten und PMNs (PNCs) werden über multiple Bindungen aufgebaut als Reaktion auf eine Inflammation und vermitteln anschließend die inflammatorische Schädigung.

Mit dem Lipopolysaccharid-Inhalationsmodell sowie dem ventilator-induced lung injury-Modell und dem Einsatz genmodifizierter Mäuse wurde die Rolle der jeweiligen Rezeptoren und der Thrombozyten entsprechend der Genese eines akuten Lungenschadens untersucht. Je nach Mauslinie wurden unterschiedliche Proteine funktionell ausgeschaltet. Es wurden jeweils Zellzahl, Zytokine (IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ), Protein- und Myeloperoxidase-Gehalt bestimmt sowie immunhistochemische Färbungen der Lungen zum Nachweis von Plättchen-Neutrophilen-Komplexen durchgeführt.

In beiden Modellen zeigten sich bei den gendefizienten Tieren überwiegend verminderte Zellzahlen in der BAL sowie verminderte PNC-Anzahlen im Lungengewebe. Dies ist nach aktuellem Wissensstand mit einem verbesserten klinischen Zustand assoziiert, die untersuchten Proteine stellen sich schlussfolgernd als vermutlich schädigend dar. In Bezug auf die Zytokine zeigte sich die Konzentration des IL-1 $\beta$  bei vielen der gendefizienten Linien nach Schädigung signifikant erhöht, für IL-6 sowie TNF- $\alpha$  konnten je nach Linie signifikant erhöhte, aber teilweise auch signifikant verminderte Konzentrationen gemessen werden. Die geprüften Proteine haben demzufolge einen großen Einfluss auf Zytokinproduktion und -freisetzung.

Die bisherig publizierten Studien zeichnen ein sehr inkonsistentes Bild der Rolle von Thrombozyten in der Immunantwort. Aus diesem Grund sind unsere Ergebnisse mit einigen Studien kongruent, zu anderen jedoch konträr.

Nach den Ergebnissen dieser Arbeit spielen Thrombozyten zusammenfassend bei der Ausbildung einer Lungenschädigung eine zentrale Rolle. Die Blockade spezieller thrombozytärer Proteine könnte eine vielversprechende Therapieoption darstellen und die Lungenschädigung vermindern. Für weitere Studien empfiehlt sich eine Kombination beider Modelle, um die multifaktorielle Genese des ARDS besser abzubilden. Die Ergebnisse dieser Studie bilden die Grundlage für weitere Untersuchungen mit dem Einsatz von Antikörpern, um die Erforschung einer gezielten ARDS-Therapie weiter voranzutreiben.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Ashbaugh, D.G., et al., *Acute respiratory distress in adults*. Lancet, 1967. **2**(7511): p. 319-23.
2. Ranieri, V.M., et al., *Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition*. Jama, 2012. **307**(23): p. 2526-33.
3. Ware, L.B. and M.A. Matthay, *The acute respiratory distress syndrome*. N Engl J Med, 2000. **342**(18): p. 1334-49.
4. Sigurdsson, M.I., et al., *Acute respiratory distress syndrome: nationwide changes in incidence, treatment and mortality over 23 years*. Acta Anaesthesiol Scand, 2013. **57**(1): p. 37-45.
5. Manzano, F., et al., *Incidence of acute respiratory distress syndrome and its relation to age*. J Crit Care, 2005. **20**(3): p. 274-80.
6. Pham, T. and G.D. Rubenfeld, *Fifty Years of Research in ARDS. The Epidemiology of Acute Respiratory Distress Syndrome. A 50th Birthday Review*. Am J Respir Crit Care Med, 2017. **195**(7): p. 860-870.
7. Li, X. and X. Ma, *Acute respiratory failure in COVID-19: is it "typical" ARDS?* Crit Care, 2020. **24**(1): p. 198.
8. Katzenstein, A.L., C.M. Bloor, and A.A. Leibow, *Diffuse alveolar damage--the role of oxygen, shock, and related factors. A review*. Am J Pathol, 1976. **85**(1): p. 209-28.
9. Nash, G., J.B. Blennerhassett, and H. Pontoppidan, *Pulmonary lesions associated with oxygen therapy and artificial ventilation*. N Engl J Med, 1967. **276**(7): p. 368-74.
10. Pratt, P.C., et al., *Pulmonary morphology in a multihospital collaborative extracorporeal membrane oxygenation project. I. Light microscopy*. Am J Pathol, 1979. **95**(1): p. 191-214.
11. Orell, S.R., *Lung pathology in respiratory distress following shock in the adult*. Acta Pathol Microbiol Scand A, 1971. **79**(1): p. 65-76.
12. Teplitz, C., *The core pathobiology and integrated medical science of adult acute respiratory insufficiency*. Surg Clin North Am, 1976. **56**(5): p. 1091-1133.
13. Albertine, K.H., *Ultrastructural abnormalities in increased-permeability pulmonary edema*. Clin Chest Med, 1985. **6**(3): p. 345-69.
14. Bachofen, M. and E.R. Weibel, *Alterations of the gas exchange apparatus in adult respiratory insufficiency*

- associated with septicemia. *Am Rev Respir Dis*, 1977. **116**(4): p. 589-615.
15. Riede, U.N., et al., *The pulmonary air-blood barrier of human shock lungs (a clinical, ultrastructural and morphometric study)*. *Pathol Res Pract*, 1978. **162**(1): p. 41-72.
  16. Greene, R., et al., *Early bedside detection of pulmonary vascular occlusion during acute respiratory failure*. *Am Rev Respir Dis*, 1981. **124**(5): p. 593-601.
  17. Nash, G., F.D. Foley, and P.C. Langlinais, *Pulmonary interstitial edema and hyaline membranes in adult burn patients. Electron microscopic observations*. *Hum Pathol*, 1974. **5**(2): p. 149-60.
  18. Thurlbeck, W.M., *The lung: structure, function and disease. Miscellany*. *Monogr Pathol*, 1978. **19**: p. 287-315.
  19. Tomashefski, J.F., Jr., *Pulmonary pathology of the adult respiratory distress syndrome*. *Clin Chest Med*, 1990. **11**(4): p. 593-619.
  20. Hill, J.D., et al., *Pulmonary pathology in acute respiratory insufficiency: lung biopsy as a diagnostic tool*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1976. **71**(1): p. 64-71.
  21. Matsubara, O., et al., *Alveolar basement membrane breaks down in diffuse alveolar damage: an immunohistochemical study*. *Pathol Int*, 1995. **45**(7): p. 473-82.
  22. Pache, J.C., et al., *Myofibroblasts in diffuse alveolar damage of the lung*. *Mod Pathol*, 1998. **11**(11): p. 1064-70.
  23. Fukuda, Y., et al., *The role of intraalveolar fibrosis in the process of pulmonary structural remodeling in patients with diffuse alveolar damage*. *Am J Pathol*, 1987. **126**(1): p. 171-82.
  24. Zapol, W.M., et al., *Pulmonary fibrosis in severe acute respiratory failure*. *Am Rev Respir Dis*, 1979. **119**(4): p. 547-54.
  25. Bellingan, G.J., *The pulmonary physician in critical care \* 6: The pathogenesis of ALI/ARDS*. *Thorax*, 2002. **57**(6): p. 540-6.
  26. Jones, R., et al., *Pulmonary vascular pathology: human and experimental studies*. *Lung biology in health and disease*, 1985. **24**: p. 23-160.
  27. Tomashefski, J.F., Jr., et al., *The pulmonary vascular lesions of the adult respiratory distress syndrome*. *Am J Pathol*, 1983. **112**(1): p. 112-26.

28. Hislop, A. and L. Reid, *New findings in pulmonary arteries of rats with hypoxia-induced pulmonary hypertension*. Br J Exp Pathol, 1976. **57**(5): p. 542-54.
29. Meyrick, B. and L. Reid, *The effect of continued hypoxia on rat pulmonary arterial circulation. An ultrastructural study*. Lab Invest, 1978. **38**(2): p. 188-200.
30. Naeye, R.L., *Hypoxemia and pulmonary hypertension. A study of the pulmonary vasculature*. Arch Pathol, 1961. **71**: p. 447-52.
31. Brower, R.G., et al., *Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome*. N Engl J Med, 2000. **342**(18): p. 1301-8.
32. Guerin, C., et al., *Prone positioning in severe acute respiratory distress syndrome*. N Engl J Med, 2013. **368**(23): p. 2159-68.
33. Munshi, L., et al., *Extracorporeal life support for acute respiratory failure. A systematic review and metaanalysis*. Ann Am Thorac Soc, 2014. **11**(5): p. 802-10.
34. Raghavendran, K., D. Willson, and R.H. Notter, *Surfactant therapy for acute lung injury and acute respiratory distress syndrome*. Crit Care Clin, 2011. **27**(3): p. 525-59.
35. Matthay, M.A., et al., *Future research directions in acute lung injury: summary of a National Heart, Lung, and Blood Institute working group*. Am J Respir Crit Care Med, 2003. **167**(7): p. 1027-35.
36. Matthay, M.A. and G.A. Zimmerman, *Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: four decades of inquiry into pathogenesis and rational management*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005. **33**(4): p. 319-27.
37. Vestweber, D., et al., *Cell adhesion dynamics at endothelial junctions: VE-cadherin as a major player*. Trends Cell Biol, 2009. **19**(1): p. 8-15.
38. Wiener-Kronish, J.P., K.H. Albertine, and M.A. Matthay, *Differential responses of the endothelial and epithelial barriers of the lung in sheep to Escherichia coli endotoxin*. J Clin Invest, 1991. **88**(3): p. 864-75.
39. Ware, L.B. and M.A. Matthay, *Clinical practice. Acute pulmonary edema*. N Engl J Med, 2005. **353**(26): p. 2788-96.
40. Zemans, R.L., S.P. Colgan, and G.P. Downey, *Transepithelial migration of neutrophils: mechanisms and implications for*

- acute lung injury*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2009. **40**(5): p. 519-35.
41. Dolinay, T., et al., *Inflammasome-regulated cytokines are critical mediators of acute lung injury*. Am J Respir Crit Care Med, 2012. **185**(11): p. 1225-34.
  42. Pittet, J.F., et al., *Biological markers of acute lung injury: prognostic and pathogenetic significance*. Am J Respir Crit Care Med, 1997. **155**(4): p. 1187-205.
  43. Brigham, K.L., *Mechanisms of lung injury*. Clin Chest Med, 1982. **3**(1): p. 9-24.
  44. Brigham, K.L., R. Bowers, and J. Haynes, *Increased sheep lung vascular permeability caused by Escherichia coli endotoxin*. Circ Res, 1979. **45**(2): p. 292-7.
  45. Brigham, K.L., et al., *Increased sheep lung vascular permeability caused by pseudomonas bacteremia*. J Clin Invest, 1974. **54**(4): p. 792-804.
  46. Ohkuda, K., et al., *Lung fluid exchange after uneven pulmonary artery obstruction in sheep*. Circ Res, 1978. **43**(2): p. 152-61.
  47. Matthay, M.A. and J.P. Wiener-Kronish, *Intact epithelial barrier function is critical for the resolution of alveolar edema in humans*. Am Rev Respir Dis, 1990. **142**(6 Pt 1): p. 1250-7.
  48. Ware, L.B. and M.A. Matthay, *Alveolar fluid clearance is impaired in the majority of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **163**(6): p. 1376-83.
  49. Kuebler, W.M., et al., *Pressure is proinflammatory in lung venular capillaries*. J Clin Invest, 1999. **104**(4): p. 495-502.
  50. Frank, J.A., et al., *Low tidal volume reduces epithelial and endothelial injury in acid-injured rat lungs*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. **165**(2): p. 242-9.
  51. Ranieri, V.M., et al., *Effect of mechanical ventilation on inflammatory mediators in patients with acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial*. Jama, 1999. **282**(1): p. 54-61.
  52. Uhlig, S., M. Ranieri, and A.S. Slutsky, *Biotrauma hypothesis of ventilator-induced lung injury*. Am J Respir Crit Care Med, 2004. **169**(2): p. 314-5; author reply 315.
  53. Rinaldo, J.E. and R.M. Rogers, *Adult respiratory-distress syndrome: changing concepts of lung injury and repair*. N Engl J Med, 1982. **306**(15): p. 900-9.

54. Baleeiro, C.E., et al., *Sublethal hyperoxia impairs pulmonary innate immunity*. J Immunol, 2003. **171**(2): p. 955-63.
55. Williams, M.R., et al., *Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium*. Trends Immunol, 2011. **32**(10): p. 461-9.
56. Takeuchi, O. and S. Akira, *Pattern recognition receptors and inflammation*. Cell, 2010. **140**(6): p. 805-20.
57. Ward, P.A. and G.W. Hunninghake, *Lung inflammation and fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. **157**(4 Pt 2): p. S123-9.
58. Donnelly, S.C., et al., *Interleukin-8 and development of adult respiratory distress syndrome in at-risk patient groups*. Lancet, 1993. **341**(8846): p. 643-7.
59. Moore, K.W., et al., *Interleukin-10*. Annu Rev Immunol, 1993. **11**: p. 165-90.
60. Ward, P.A. and J.C. Fantone, *Adhesion molecules and the lung*. Lung biology in health and disease. 1996, New York: M. Dekker. xvi, 404 p.
61. Zimmerman, G.A., et al., *Endothelial activation in ARDS*. Chest, 1999. **116**(1 Suppl): p. 18S-24S.
62. Cines, D.B., et al., *Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders*. Blood, 1998. **91**(10): p. 3527-61.
63. Fishman, A.P., et al., *Mechanisms of proliferative and obliterative vascular diseases. Insights from the pulmonary and systemic circulations. NHLBI Workshop summary*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. **158**(2): p. 670-4.
64. Yao, L., et al., *Interleukin 4 or oncostatin M induces a prolonged increase in P-selectin mRNA and protein in human endothelial cells*. J Exp Med, 1996. **184**(1): p. 81-92.
65. Ley, K., et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(9): p. 678-89.
66. Petri, B., M. Phillipson, and P. Kubes, *The physiology of leukocyte recruitment: an in vivo perspective*. J Immunol, 2008. **180**(10): p. 6439-46.
67. Zimmerman, G.A., S.M. Prescott, and T.M. McIntyre, *Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules*. Immunol Today, 1992. **13**(3): p. 93-100.

68. Granger, D.N. and P. Kubes, *The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion*. J Leukoc Biol, 1994. **55**(5): p. 662-75.
69. Zimmerman, G.A., T.M. McIntyre, and S.M. Prescott, *Adhesion and signaling in vascular cell-cell interactions*. J Clin Invest, 1996. **98**(8): p. 1699-702.
70. Phillipson, M. and P. Kubes, *The neutrophil in vascular inflammation*. Nat Med, 2011. **17**(11): p. 1381-90.
71. Sadik, C.D., N.D. Kim, and A.D. Luster, *Neutrophils cascading their way to inflammation*. Trends Immunol, 2011. **32**(10): p. 452-60.
72. Petri, B. and M.G. Bixel, *Molecular events during leukocyte diapedesis*. Febs j, 2006. **273**(19): p. 4399-407.
73. Tate, R.M. and J.E. Repine, *Neutrophils and the adult respiratory distress syndrome*. Am Rev Respir Dis, 1983. **128**(3): p. 552-9.
74. Thickett, D.R., et al., *Vascular endothelial growth factor may contribute to increased vascular permeability in acute respiratory distress syndrome*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(9): p. 1601-5.
75. Rosseau, S., et al., *Phenotypic characterization of alveolar monocyte recruitment in acute respiratory distress syndrome*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. **279**(1): p. L25-35.
76. Springer, T.A., *Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm*. Cell, 1994. **76**(2): p. 301-14.
77. Butcher, E.C., *Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity*. Cell, 1991. **67**(6): p. 1033-6.
78. Vestweber, D. and J.E. Blanks, *Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands*. Physiol Rev, 1999. **79**(1): p. 181-213.
79. Johnston, B. and E.C. Butcher, *Chemokines in rapid leukocyte adhesion triggering and migration*. Semin Immunol, 2002. **14**(2): p. 83-92.
80. Kansas, G.S., *Selectins and their ligands: current concepts and controversies*. Blood, 1996. **88**(9): p. 3259-87.
81. Kansas, G.S., et al., *Functional characterization of human T lymphocyte subsets distinguished by monoclonal anti-leu-8*. J Immunol, 1985. **134**(5): p. 2995-3002.

82. Bevilacqua, M.P., et al., *Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins*. *Science*, 1989. **243**(4895): p. 1160-5.
83. Moore, K.L., et al., *Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells*. *J Cell Biol*, 1992. **118**(2): p. 445-56.
84. Bonfanti, R., et al., *PADGEM (GMP140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells*. *Blood*, 1989. **73**(5): p. 1109-12.
85. McEver, R.P., et al., *GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies*. *J Clin Invest*, 1989. **84**(1): p. 92-9.
86. Wagner, D.D., J.B. Olmsted, and V.J. Marder, *Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells*. *J Cell Biol*, 1982. **95**(1): p. 355-60.
87. Weibel, E.R. and G.E. Palade, *NEW CYTOPLASMIC COMPONENTS IN ARTERIAL ENDOTHELIA*. *J Cell Biol*, 1964. **23**: p. 101-12.
88. da Costa Martins, P., et al., *P-selectin glycoprotein ligand-1 is expressed on endothelial cells and mediates monocyte adhesion to activated endothelium*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(5): p. 1023-9.
89. Evangelista, V., et al., *Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction: P-selectin triggers protein-tyrosine phosphorylation-dependent CD11b/CD18 adhesion: role of PSGL-1 as a signaling molecule*. *Blood*, 1999. **93**(3): p. 876-85.
90. Frenette, P.S., et al., *P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo*. *J Exp Med*, 2000. **191**(8): p. 1413-22.
91. Salas, A., et al., *Rolling adhesion through an extended conformation of integrin alphaLbeta2 and relation to alpha I and beta I-like domain interaction*. *Immunity*, 2004. **20**(4): p. 393-406.
92. Chesnutt, B.C., et al., *Induction of LFA-1-dependent neutrophil rolling on ICAM-1 by engagement of E-selectin*. *Microcirculation*, 2006. **13**(2): p. 99-109.

93. Jung, U., et al., *Transit time of leukocytes rolling through venules controls cytokine-induced inflammatory cell recruitment in vivo*. J Clin Invest, 1998. **102**(8): p. 1526-33.
94. Dunne, J.L., et al., *Control of leukocyte rolling velocity in TNF- $\alpha$ -induced inflammation by LFA-1 and Mac-1*. Blood, 2002. **99**(1): p. 336-41.
95. Summers, C., et al., *Neutrophil kinetics in health and disease*. Trends Immunol, 2010. **31**(8): p. 318-24.
96. Luo, B.H., C.V. Carman, and T.A. Springer, *Structural basis of integrin regulation and signaling*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 619-47.
97. Phillipson, M., et al., *Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade*. J Exp Med, 2006. **203**(12): p. 2569-75.
98. Jones, D.H., et al., *Quantitation of intracellular Mac-1 (CD11b/CD18) pools in human neutrophils*. J Leukoc Biol, 1988. **44**(6): p. 535-44.
99. Campbell, J.J., et al., *Biology of chemokine and classical chemoattractant receptors: differential requirements for adhesion-triggering versus chemotactic responses in lymphoid cells*. J Cell Biol, 1996. **134**(1): p. 255-66.
100. Campbell, J.J., et al., *Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions*. Science, 1998. **279**(5349): p. 381-4.
101. Staunton, D.E., et al., *The arrangement of the immunoglobulin-like domains of ICAM-1 and the binding sites for LFA-1 and rhinovirus*. Cell, 1990. **61**(2): p. 243-54.
102. Diamond, M.S., et al., *Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation*. Cell, 1991. **65**(6): p. 961-71.
103. Staunton, D.E., M.L. Dustin, and T.A. Springer, *Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1*. Nature, 1989. **339**(6219): p. 61-4.
104. Xie, J., et al., *Intercellular adhesion molecule-2 (CD102) binds to the leukocyte integrin CD11b/CD18 through the A domain*. J Immunol, 1995. **155**(7): p. 3619-28.
105. Altieri, D.C., et al., *Oligospecificity of the cellular adhesion receptor Mac-1 encompasses an inducible recognition*

- specificity for fibrinogen.* J Cell Biol, 1988. **107**(5): p. 1893-900.
106. Carman, C.V. and T.A. Springer, *A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them.* J Cell Biol, 2004. **167**(2): p. 377-88.
  107. Engelhardt, B. and H. Wolburg, *Mini-review: Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house?* Eur J Immunol, 2004. **34**(11): p. 2955-63.
  108. Shaw, S.K., et al., *Real-time imaging of vascular endothelial-cadherin during leukocyte transmigration across endothelium.* J Immunol, 2001. **167**(4): p. 2323-30.
  109. Muller, W.A., *Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response.* Trends Immunol, 2003. **24**(6): p. 327-34.
  110. Fabbri, M., et al., *Regulation of lymphocyte traffic by adhesion molecules.* Inflamm Res, 1999. **48**(5): p. 239-46.
  111. Vestweber, D., *Lymphocyte trafficking through blood and lymphatic vessels: more than just selectins, chemokines and integrins.* Eur J Immunol, 2003. **33**(5): p. 1361-4.
  112. Mamdouh, Z., et al., *Targeted recycling of PECAM from endothelial surface-connected compartments during diapedesis.* Nature, 2003. **421**(6924): p. 748-53.
  113. Ostermann, G., et al., *JAM-1 is a ligand of the beta(2) integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes.* Nat Immunol, 2002. **3**(2): p. 151-8.
  114. Wagner, D.D. and P.C. Burger, *Platelets in inflammation and thrombosis.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(12): p. 2131-7.
  115. Brandt, E., et al., *The beta-thromboglobulins and platelet factor 4: blood platelet-derived CXC chemokines with divergent roles in early neutrophil regulation.* J Leukoc Biol, 2000. **67**(4): p. 471-8.
  116. Walz, A., et al., *Effects of the neutrophil-activating peptide NAP-2, platelet basic protein, connective tissue-activating peptide III and platelet factor 4 on human neutrophils.* J Exp Med, 1989. **170**(5): p. 1745-50.
  117. Grommes, J., et al., *Disruption of Platelet-derived Chemokine Heteromers Prevents Neutrophil Extravasation in Acute Lung Injury.* American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2012. **185**(6): p. 628-636.

118. Mine, S., et al., *Activated platelets and endothelial cell interaction with neutrophils under flow conditions*. Intern Med, 2001. **40**(11): p. 1085-92.
119. Kaplanski, G., et al., *Activated platelets induce endothelial secretion of interleukin-8 in vitro via an interleukin-1-mediated event*. Blood, 1993. **81**(10): p. 2492-5.
120. Petersen, F., et al., *Platelet factor 4-induced neutrophil-endothelial cell interaction: involvement of mechanisms and functional consequences different from those elicited by interleukin-8*. Blood, 1999. **94**(12): p. 4020-8.
121. Thornton, P., et al., *Platelet interleukin-1alpha drives cerebrovascular inflammation*. Blood, 2010. **115**(17): p. 3632-9.
122. Zalavary, S., et al., *Platelets enhance Fc(gamma) receptor-mediated phagocytosis and respiratory burst in neutrophils: the role of purinergic modulation and actin polymerization*. J Leukoc Biol, 1996. **60**(1): p. 58-68.
123. Wu, B., et al., *Effects of platelet release products on neutrophilic activity in human whole blood*. Inflamm Res, 2009. **58**(6): p. 321-8.
124. Suzuki, K., et al., *Activated platelets in ulcerative colitis enhance the production of reactive oxygen species by polymorphonuclear leukocytes*. Scand J Gastroenterol, 2001. **36**(12): p. 1301-6.
125. Shiraki, R., et al., *Expression of Toll-like receptors on human platelets*. Thromb Res, 2004. **113**(6): p. 379-85.
126. Cognasse, F., et al., *Evidence of Toll-like receptor molecules on human platelets*. Immunol Cell Biol, 2005. **83**(2): p. 196-8.
127. Clark, S.R., et al., *Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood*. Nat Med, 2007. **13**(4): p. 463-9.
128. Caudrillier, A., et al., *Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury*. J Clin Invest, 2012. **122**(7): p. 2661-71.
129. Andonegui, G., et al., *Inhibition of human neutrophil apoptosis by platelets*. J Immunol, 1997. **158**(7): p. 3372-7.
130. Bauer, H.M., *In-vitro platelet-neutrophil adherence*. Am J Clin Pathol, 1975. **63**(6): p. 824-7.
131. Peters, M.J., et al., *Investigation of platelet-neutrophil interactions in whole blood by flow cytometry*. J Immunol Methods, 1997. **209**(2): p. 125-35.

132. Bunescu, A., et al., *Enhanced Fcγ receptor I, αMβ2 integrin receptor expression by monocytes and neutrophils in rheumatoid arthritis: interaction with platelets*. J Rheumatol, 2004. **31**(12): p. 2347-55.
133. Irving, P.M., et al., *Platelet-leucocyte aggregates form in the mesenteric vasculature in patients with ulcerative colitis*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2008. **20**(4): p. 283-9.
134. Gawaz, M., et al., *Platelet activation and interaction with leucocytes in patients with sepsis or multiple organ failure*. Eur J Clin Invest, 1995. **25**(11): p. 843-51.
135. Köhler, D., et al., *Phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein contributes to myocardial ischemic preconditioning*. Basic Res Cardiol, 2018. **113**(2): p. 11.
136. Kohler, D., et al., *Phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein prevents platelet-neutrophil complex formation and dampens myocardial ischemia-reperfusion injury*. Circulation, 2011. **123**(22): p. 2579-90.
137. Ferroni, P., et al., *Soluble P-selectin as a marker of platelet hyperactivity in patients with chronic obstructive pulmonary disease*. J Investig Med, 2000. **48**(1): p. 21-7.
138. Bachofen, M. and E.R. Weibel, *Structural alterations of lung parenchyma in the adult respiratory distress syndrome*. Clin Chest Med, 1982. **3**(1): p. 35-56.
139. Bone, R.C., P.B. Francis, and A.K. Pierce, *Intravascular coagulation associated with the adult respiratory distress syndrome*. Am J Med, 1976. **61**(5): p. 585-9.
140. Kirton, C.M. and G.B. Nash, *Activated platelets adherent to an intact endothelial cell monolayer bind flowing neutrophils and enable them to transfer to the endothelial surface*. J Lab Clin Med, 2000. **136**(4): p. 303-13.
141. Dole, V.S., et al., *PSGL-1 regulates platelet P-selectin-mediated endothelial activation and shedding of P-selectin from activated platelets*. Thromb Haemost, 2007. **98**(4): p. 806-12.
142. Dole, V.S., et al., *Activated platelets induce Weibel-Palade-body secretion and leukocyte rolling in vivo: role of P-selectin*. Blood, 2005. **106**(7): p. 2334-9.
143. Moore, K.L., A. Varki, and R.P. McEver, *GMP-140 binds to a glycoprotein receptor on human neutrophils: evidence for a lectin-like interaction*. J Cell Biol, 1991. **112**(3): p. 491-9.

144. Larsen, E., et al., *PADGEM-dependent adhesion of platelets to monocytes and neutrophils is mediated by a lineage-specific carbohydrate, LNF III (CD15)*. Cell, 1990. **63**(3): p. 467-74.
145. Hamburger, S.A. and R.P. McEver, *GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils*. Blood, 1990. **75**(3): p. 550-4.
146. Moore, K.L., et al., *P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin*. J Cell Biol, 1995. **128**(4): p. 661-71.
147. Konstantopoulos, K., et al., *Venous levels of shear support neutrophil-platelet adhesion and neutrophil aggregation in blood via P-selectin and beta2-integrin*. Circulation, 1998. **98**(9): p. 873-82.
148. Evangelista, V., et al., *Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction in dynamic conditions: evidence of adhesion cascade and cross talk between P-selectin and the beta 2 integrin CD11b/CD18*. Blood, 1996. **88**(11): p. 4183-94.
149. Blanks, J.E., et al., *Stimulation of P-selectin glycoprotein ligand-1 on mouse neutrophils activates beta 2-integrin mediated cell attachment to ICAM-1*. Eur J Immunol, 1998. **28**(2): p. 433-43.
150. Yeo, E.L., J.A. Sheppard, and I.A. Feuerstein, *Role of P-selectin and leukocyte activation in polymorphonuclear cell adhesion to surface adherent activated platelets under physiologic shear conditions (an injury vessel wall model)*. Blood, 1994. **83**(9): p. 2498-507.
151. Ruggeri, Z.M., J.A. Dent, and E. Saldívar, *Contribution of distinct adhesive interactions to platelet aggregation in flowing blood*. Blood, 1999. **94**(1): p. 172-8.
152. Zarbock, A., K. Singbartl, and K. Ley, *Complete reversal of acid-induced acute lung injury by blocking of platelet-neutrophil aggregation*. The Journal of Clinical Investigation. **116**(12): p. 3211-3219.
153. Frenette, P.S., et al., *Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(16): p. 7450-4.
154. Wang, Y., et al., *Leukocyte integrin Mac-1 regulates thrombosis via interaction with platelet GPIIb/IIIa*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 15559.

155. Simon, D.I., et al., *Platelet glycoprotein Ibalpha is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18)*. J Exp Med, 2000. **192**(2): p. 193-204.
156. Wang, Y., et al., *Leukocyte engagement of platelet glycoprotein Ibalpha via the integrin Mac-1 is critical for the biological response to vascular injury*. Circulation, 2005. **112**(19): p. 2993-3000.
157. Lo, S.C., et al., *Involvement of platelet glycoprotein Ib in platelet microparticle mediated neutrophil activation*. J Biomed Sci, 2006. **13**(6): p. 787-96.
158. Clemetson, K.J., et al., *Characterization of the platelet membrane glycoprotein abnormalities in Bernard-Soulier syndrome and comparison with normal by surface-labeling techniques and high-resolution two-dimensional gel electrophoresis*. J Clin Invest, 1982. **70**(2): p. 304-11.
159. Nieswandt, B. and S.P. Watson, *Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor?* Blood, 2003. **102**(2): p. 449-61.
160. Schönberger, T., et al., *The dimeric platelet collagen receptor GPVI-Fc reduces platelet adhesion to activated endothelium and preserves myocardial function after transient ischemia in mice*. Am J Physiol Cell Physiol, 2012. **303**(7): p. C757-66.
161. Schulz, C., et al., *EMMPRIN (CD147/basigin) mediates platelet-monocyte interactions in vivo and augments monocyte recruitment to the vascular wall*. J Thromb Haemost, 2011. **9**(5): p. 1007-19.
162. Claushuis, T.A.M., et al., *Platelet glycoprotein VI aids in local immunity during pneumonia-derived sepsis caused by gram-negative bacteria*. Blood, 2018. **131**(8): p. 864-876.
163. Hu, H., et al., *GPVI and GPIIb $\alpha$  mediate staphylococcal superantigen-like protein 5 (SSL5) induced platelet activation and direct toward glycans as potential inhibitors*. PLoS One, 2011. **6**(4): p. e19190.
164. Scopel-Guerra, A., et al., *The Impact of Helicobacter pylori Urease upon Platelets and Consequent Contributions to Inflammation*. Front Microbiol, 2017. **8**: p. 2447.
165. Devi, S., et al., *Platelet recruitment to the inflamed glomerulus occurs via an alphaIIb $\beta$ 3/GPVI-dependent pathway*. Am J Pathol, 2010. **177**(3): p. 1131-42.
166. Granja, T., et al., *Crucial role of Plexin C1 for pulmonary inflammation and survival during lung injury*. Mucosal Immunol, 2014. **7**(4): p. 879-91.

167. Mirakaj, V., et al., *Netrin-1 dampens pulmonary inflammation during acute lung injury*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010. **181**(8): p. 815-24.
168. Morote-Garcia, J.C., et al., *Repression of the equilibrative nucleoside transporters dampens inflammatory lung injury*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013. **49**(2): p. 296-305.
169. Roth, J.M., et al., *Semaphorin 7A Aggravates Pulmonary Inflammation during Lung Injury*. *PLoS One*, 2016. **11**(1): p. e0146930.
170. Eckle, T., et al., *Usefulness of pressure-controlled ventilation at high inspiratory pressures to induce acute lung injury in mice*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008. **295**(4): p. L718-24.
171. Koeppen, M., T. Eckle, and H.K. Eltzschig, *Pressure controlled ventilation to induce acute lung injury in mice*. *J Vis Exp*, 2011(51).
172. Hoegl, S., et al., *Capturing the multifactorial nature of ARDS - "Two-hit" approach to model murine acute lung injury*. *Physiol Rep*, 2018. **6**(6): p. e13648.
173. Xu, T., et al., *Acute respiratory distress syndrome induced by avian influenza A (H5N1) virus in mice*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006. **174**(9): p. 1011-7.
174. Pan, J., L. Xia, and R.P. McEver, *Comparison of promoters for the murine and human P-selectin genes suggests species-specific and conserved mechanisms for transcriptional regulation in endothelial cells*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(16): p. 10058-67.
175. Cognasse, F., et al., *Platelet depletion limits the severity but does not prevent the occurrence of experimental transfusion-related acute lung injury*. *Transfusion*, 2020. **60**(4): p. 713-723.
176. Burdorf, L., et al., *Platelet sequestration and activation during GalTKO.hCD46 pig lung perfusion by human blood is primarily mediated by GPIb, GPIIb/IIIa, and von Willebrand Factor*. *Xenotransplantation*, 2016. **23**(3): p. 222-236.
177. Giles, J.A., et al., *Neutrophil infiltration to the brain is platelet-dependent, and is reversed by blockade of platelet GPIIb/IIIa*. *Immunology*, 2018. **154**(2): p. 322-328.
178. Kleinschnitz, C., et al., *Targeting platelets in acute experimental stroke: impact of glycoprotein Ib, VI, and IIb/IIIa blockade on infarct size, functional outcome, and intracranial bleeding*. *Circulation*, 2007. **115**(17): p. 2323-30.

179. Ware, L.B., E.R. Conner, and M.A. Matthay, *von Willebrand factor antigen is an independent marker of poor outcome in patients with early acute lung injury*. Crit Care Med, 2001. **29**(12): p. 2325-31.
180. Petri, B., et al., *von Willebrand factor promotes leukocyte extravasation*. Blood, 2010. **116**(22): p. 4712-9.
181. Pfeiffer, S., et al., *Hyperacute lung rejection in the pig-to-human model. III. Platelet receptor inhibitors synergistically modulate complement activation and lung injury*. Transplantation, 2003. **75**(7): p. 953-9.
182. Mizgerd, J.P., et al., *Selectins and neutrophil traffic: margination and Streptococcus pneumoniae-induced emigration in murine lungs*. J Exp Med, 1996. **184**(2): p. 639-45.
183. Kornerup, K.N., et al., *Circulating platelet-neutrophil complexes are important for subsequent neutrophil activation and migration*. J Appl Physiol (1985), 2010. **109**(3): p. 758-67.
184. Cleary, S.J., et al., *LPS-induced Lung Platelet Recruitment Occurs Independently from Neutrophils, PSGL-1, and P-Selectin*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2019. **61**(2): p. 232-243.
185. Neri, T., D. Nieri, and A. Celi, *P-selectin blockade in COVID-19-related ARDS*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2020. **318**(6): p. L1237-l1238.
186. Corken, A., et al., *Platelet glycoprotein Ib-IX as a regulator of systemic inflammation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014. **34**(5): p. 996-1001.
187. Xiang, B., et al., *Platelets protect from septic shock by inhibiting macrophage-dependent inflammation via the cyclooxygenase 1 signalling pathway*. Nature Communications, 2013. **4**: p. 2657.

## **7 Erklärung zum Eigenanteil**

Die Arbeit wurde in der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin unter Betreuung von Prof. Dr. med. Peter Rosenberger durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. med. Peter Rosenberger und Dr. rer. nat. David Köhler (Arbeitsgruppenleiter).

Die Tierversuche wurden von Dr. rer. nat. David Köhler und mir gemeinsam durchgeführt. Die immunhistochemische Aufarbeitung erfolgte durch Michaela Hoch-Gutbrod und mich.

Sämtliche weiteren Untersuchungen wurden nach Einarbeitung durch Dr. rer. nat. David Köhler, Dr. rer. nat. Claudia Eggstein und Dr. rer. med. Tiago Granja von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Beratung und Anleitung durch das Institut für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie sowie Dr. rer. nat. David Köhler eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Stuttgart, den 06.03.2022

## 8 Veröffentlichungen

Diese Doktorarbeit wurde im Rahmen des Trans-Regio-Sonderforschungsbereiches TR240 der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) durchgeführt.

Posterpräsentation auf dem Jahreskongress 2018 der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI) in Leipzig, Deutschland

*Glykoprotein Ib, von Willebrand Faktor und P-Selektin beeinflussen die Ausbildung eines akuten Lungenschadens*

**P. Dignus**, D. Köhler, L. Pulvermüller, P. Burkhardt, B. Nieswandt, P. Rosenberger

Posterpräsentation 1st CRC/TR240 Retreat Meeting, Mai 05-07, 2019, Neckarsulm, Deutschland

*Glycoprotein Ib, IIb/IIIa and von Willebrand Factor influence the progression of ARDS*

Köhler D., **P. Dignus**, P. Burkard, T. Granja, S. Beck, T. Steiner, B. Nieswandt und P. Rosenberger