

Aus der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität

Experimentelle Untersuchungen an einem *in vitro* Sepsismodell mit der
Rotationsthrombelastographie

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Stefanie Paniczek

2021

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöckner

Erstgutachter: PD Dr. med. Christoph Sucker

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Ulrich Germing

„We've come a long, long way together.“

Fatboy Slim

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Sucker, C., Paniczek, S., Scharf, R.E., Litmathe, J., et al. (2013) Rotation thromboelastography for the detection and characterization of lipoteichoic acid-induced activation of haemostasis in an in vitro sepsis model. *Perfusion*. [Online] 28 (2), 146–151. Available from: doi:10.1177/0267659112464712.

Zusammenfassung (deutsch)

Die Sepsis ist ein schweres, akut verlaufendes Krankheitsbild mit hoher Morbidität und Letalität. Sie wird durch die fehlregulierte Antwort eines Organismus auf Infektionen oder Schädigungen hervorgerufen. In ihrem Verlauf führt sie zu unkontrollierter Aktivierung von systemischen Entzündungen und Gerinnung. Zellwandbestandteile von gramnegativen (Lipopolysaccharid, LPS) und grampositiven (Lipoteichonsäure, LTA) Bakterien sind häufig Auslöser einer Sepsis. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von LTA und LPS auf den Gerinnungsprozess in einem *in vitro*-Modell, basierend auf der Rotationsthrombelastographie (ROTEM®) untersucht.

Es wurden Citrat-Vollblutproben von 29 gesunden Probanden mittels NATEM (Recalcifizierung) des ROTEM® untersucht. Es wurden konzentrations- und zeitabhängige Versuchsreihen mit LTA, LPS und beiden Toxinen („Costimulation“) gegen Kontrolle (NaCl) getestet. Untersucht wurden die Parameter CT (*Clotting Time*), CFT (*Clot Formation Time*), MCF (*Maximum Clot Firmness*) und Alpha-Winkel.

Die durch Zugabe von Toxinen hervorgerufenen Gerinnungsveränderungen können gut mit ROTEM® abgebildet werden. Es kommt im Sinne einer Gerinnungsaktivierung reproduzierbar zu einer sowohl dosis- als auch zeitabhängigen signifikanten Verkürzung der CT in allen Ansätzen (LTA, LPS und Costimulation). Der Effekt setzt ab 2 Stunden nach Beginn einer Inkubation bei 37° des entnommenen Blutes mit dem Toxin ein. Auffallend war, dass die CT sich in dem LPS-Ansatz deutlicher und früher verkürzte als in dem LTA-Ansatz. Eine Costimulation führte nicht zu einer weiteren Abnahme der CT. Der Effekt auf die CT kann bei der LTA-Probe bis zu einer Inkubationsdauer von 24 Stunden nachgewiesen werden. Veränderungen von CFT, MCF und Alpha-Winkel waren optisch darstellbar, jedoch nicht durchgängig signifikant abgrenzbar von der Kontrollprobe. Die durch die Toxine hervorgerufene Verkürzung der CT konnte durch Gabe von Cycloheximid, einem Proteinsyntheseinhibitor, teilweise aufgehoben werden. Ebenso führte eine erhöhte Inkubationstemperatur (Hitze stress) zu einem Ausbleiben des Effektes.

Die Arbeit bestätigt vorangegangene Untersuchungen, dass LTA und LPS eine Gerinnungsaktivierung auslösen können. Dies erfordert eine Proteinsynthese und wird durch Hitze stress gehemmt. Die durch LTA ausgelösten Veränderungen sind denen durch LPS qualitativ vergleichbar, nehmen unter LTA aber ein geringeres Ausmaß gegenüber LPS ein. Die ROTEM® ist geeignet, die gerinnungsphysiologischen Veränderungen reproduzierbar nachzustellen. Auch aufgrund der hier verwendeten Toxinkonzentrationen, die deutlich über den *in vivo* beobachteten liegen, kann nicht auf die klinische Verwendbarkeit geschlossen werden. Diese Untersuchungen erlauben aber den Einblick in zeitlich früh ablaufende Gerinnungsvorgänge einer Sepsis. Sie können dazu dienen, Hypothesen zur Beeinflussung dieser Gerinnungsvorgänge zu generieren und sie in diesem *in vitro*-Modell zu testen.

Zusammenfassung (englisch)

Sepsis is a clinical condition that leads to significant morbidity and mortality. Cell damage or invasion of pathogens results in uncontrolled activation of inflammation and coagulation. Toxins of gramnegative (lipopolysaccharid, LPS) and grampositive (lipoteichoic acid, LTA) bacteria are the starting point of the immunological and coagulation cascades. This paper takes a closer look at the effects of LTA and LPS on coagulation in an *in vitro*-sepsis model using Rotational Thrombelastography (ROTEM®).

Blood was drawn from 29 healthy volunteers and examined using the NATEM method of ROTEM®. Time and dose-depending tests with LTA, LPS and a combination of both (here: „costimulation“) as well as vehicle showed alterations of CT (*Clotting Time*), CFT (*Clot Formation Time*), MCF (*Maximum Clot Firmness*) and alpha-angle.

Toxin induced alterations of coagulation are detectable with ROTEM®. Reliably there is a shortening of CT in all tests (using LTA, LPS or costimulation). This effect first occurs 2 hours after the beginning of incubation with mentioned toxins at 37°C. Interestingly, CT-shortening was faster and more significant in LPS than in LTA. Costimulation did not lead to faster shortening of CT. Shortening of CT can be detected using LTA until 24 hours after beginning of incubation. Alterations of CFT, MCF or alpha angle were visually detectable, but not always significant in contrast to vehicle. Shortening of CT could be reversed by adding cycloheximide, an inhibitor of protein synthesis. Raising the incubation temperature to 40°C failed to show a shortening of CT.

This paper is in line with former findings, that toxins LTA and LPS are able to activate coagulation. The effect requires protein synthesis and can be inhibited under conditions of cellular heat stress. LTA-induced changes in coagulation are qualitatively comparable to those resulting from LPS. Nevertheless, LTA leads to a weaker, and in costimulation with LPS enhanceable effect. ROTEM® is capable to describe the activating effects of LPS and LTA on coagulation in an *in vitro*-sepsis model reproducibly. Due to the toxin concentrations used that are above those seen *in vivo*, this method is not directly applicable to clinical settings. These experiments give insights in early processes of sepsis induced activation of coagulation. They may support to develop and test hypothesis how to modify sepsis induced alterations of coagulation.

Abkürzungsverzeichnis

°	Grad	LRR	<i>Leucin-rich repeat</i>
°C	Grad Celsius	LTA	<i>Lipoteichoic acid</i> (Lipoteichonsäure)
µg/ml	Mikrogramm pro Milliliter	M	Molar
ACCP	<i>American College of Clinical Pharmacy</i>	MA	Maximalamplitude
Alpha	Alpha-Winkel	MAP	<i>mean arterial pressure</i> (mittlerer arterieller Blutdruck)
aPPT	partielle Thromboplastinzeit	MAP-Kinasen	<i>Mitogen-activated- protein-Kinase</i>
BD	Becton, Dickinson and Company	MCF	<i>Maximum Clot Firmness</i>
CaCl₂	Calciumchlorid	MDL	MDL Information Systems GmbH
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>	mg	Milligramm
CD14	<i>Cluster of Differentiation 14</i>	mg/ml	Milligramm pro Milliliter
CFT	<i>Clot Formation Time</i>	ml/die	Milliliter pro Tag
CRP	C-reaktives Protein	mm	Millimeter
CT	<i>Clotting Time</i>	mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
DIC	<i>disseminated intravascular coagulation</i> (Disseminierte intravasale Gerinnung)	MODS	<i>multiple organ dysfunction syndrome</i>
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>	mol/l	Mol pro Liter
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response 88</i>
FFP	<i>Fresh Frozen Plasma</i>	n	Probandenanzahl
Gal	Galactose	NaCl	Natriumchlorid
GCS	<i>Glasgow Coma Scale</i>	NF-κB	Nekrosefaktor Kappa B
Glc	Glucose	ng/ml	Nanogramm pro Milliliter
GroP	Glycerolphosphat	NGc	N-Acetyl-Glucosamin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1- piperazinyl)- ethansulfonsäure	NH	Stickstoffgruppe
IL	Interleukin	P	Phosphatgruppe
LED	<i>Light emitting diode</i>	PAMPs	<i>pathogenassociated molecular patterns</i>
LPS	Lipopolysaccharid		

paO²/FiO²	Oxygenierungsindex, Horowitz-Index
PG	Peptidoglycan
pH	potential hydrogenii
PRRs	<i>Pattern recognition receptors</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROTEM®	Rotations- thrombelastographie
s	Sekunden
SCCM	<i>Society of Critical Care Medicine</i>
SIRS	<i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i>
SOFA	<i>Sequential Organ Failure Assessment</i>
TEG	Thrombelastographie
TEM	Temogramm
TF	<i>Tissue factor</i>
TIR	Toll/Interleukin 1-Rezeptor- Homologe
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Medizinhistorie der Sepsis	3
1.2	Diagnostik der Sepsis	4
1.3	Pathogenese der Sepsis	6
1.4	Einflüsse der Sepsis auf die Blutgerinnung	10
1.5	Rotationsthrombelastographie	12
1.6	Zielsetzung	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Methoden	15
2.1.1	Probanden	15
2.1.2	Blutentnahme	15
2.1.3	Rotationsthrombelastographie	16
2.1.4	Durchführung der Analyse	21
2.1.5	Verdünnungsreihen	22
2.1.6	Versuchsreihen	22
2.1.7	Statistische Verfahren	29
2.1.8	Prüfung auf Normalverteilung	29
2.2	Materialien	31
3	Ergebnisse	32
3.1	Methodische Aspekte	33
3.2	Beeinflussung der ROTEM®-Parameter durch unterschiedliche LTA-Konzentrationen	38
3.3	Beeinflussung der ROTEM®-Parameter durch unterschiedliche LPS-Konzentrationen	47
3.4	Zeitabhängigkeiten der ROTEM®-Parameter in der Langzeitinkubation mit LTA ...	58
3.5	Beeinflussung der ROTEM®-Parameter durch Costimulation mit LTA und LPS	65
3.6	Einfluss von Cycloheximid auf die Effekte von LPS und LTA im ROTEM®	74
3.7	Einfluss hoher Temperatur auf die Effekte von LPS und LTA im ROTEM®	78
4	Diskussion	87
4.1	Methodische Aspekte der Rotationsthrombelastographie	88
4.2	Rotationsthrombelastographie als Sepsis-Modell	90
4.3	Gerinnungsaktivierung im Modell der Rotationsthrombelastographie	91
4.4	Ähnlichkeit der Effekte von LTA und LPS in der Rotationsthrombelastographie	92
4.5	Vergleichbarkeit der Reaktion auf LTA, LPS oder bei Costimulation	94
4.6	Zeitliche Dynamik der Gerinnungsaktivierung unter LTA oder LPS	96

4.7	Proteinsyntheschemmer Cycloheximid schwächt Wirkung der Toxine ab.....	97
4.8	Hitzestress (40°C) inhibiert die Effekte von LTA und LPS	99
4.9	Rotationsthrombelastographie bei Sepsis	101
4.10	Epikritische Überlegungen.....	104
5	Literatur und Quellenverzeichnis	105
6	Anhang	113

1 Einleitung

Bei der Sepsis handelt es sich um ein schweres, akut verlaufendes Krankheitsbild mit hoher Morbidität und Letalität, vor allem im Rahmen von Multiorganversagen. Sie wird vor allem durch die fehlregulierte Antwort eines Organismus auf eine Infektion hervorgerufen.

Auch in heutiger Zeit ist die Inzidenz der Sepsis steigend und diese wird als eine der häufigsten Todesursachen angesehen (Rhodes *et al.*, 2017; Purcarea & Sovaila, 2020).

Eine sehr häufige Komplikation der Sepsis ist die disseminierte intravasale Gerinnung (*disseminated intravascular coagulation*, DIC) (Boral, Williams & Boral, 2016). Durch eine Aktivierung der Blutgerinnung und eine Inhibition der Fibrinolyse kommt es zunächst zu einer adäquaten, im Verlauf zu einer inadäquat gesteigerten Gerinnung mit Bildung von Mikrothromben in kleinsten Gefäßen wie Kapillaren, Arteriolen und Venolen. Zudem entsteht durch einen die Synthesekapazitäten von Gerinnungskomponenten übersteigenden Verbrauch, der nicht kompensiert werden kann, eine Blutungsneigung (Verbrauchskoagulopathie). Beide Komponenten dieser Gerinnungsstörung gelten als mitverantwortlich für den teils fatalen Verlauf des Multiorganversagens (Levi & van der Poll, 2017).

Die Prognose der Sepsis hängt entscheidend von der frühen Diagnosestellung und Einleitung einer Therapie ab (Bone *et al.*, 1992; Rhodes *et al.*, 2017). Gerade die frühen Veränderungen der Gerinnung entziehen sich jedoch in der Regel den üblichen Labortestverfahren, welche nur hämostaseologische Teilfunktionen abprüfen (Gando, Levi & Toh, 2016). Dem gegenüber gilt die Thrombelastographie, welche erstmals 1948 von H. Hartert beschrieben wurde und im Verlauf als Rotationsthrombelastographie weiterentwickelt wurde, als ein Verfahren, welches den intravasalen, nicht nur plasmatischen Gerinnungsvorgang aus Vollblut abbildet und quantifizierbar macht (Hartert, 1948).

Seitdem ist diese Untersuchungsmethode weiterentwickelt worden und hat einen breiten klinischen Einsatz erfahren. Aufgrund des Aufbaus des Gerätes aus einer Messeinheit und einem Laptop (vergl. Abb. 6) benötigt sie nicht viel Platz, ist wenig stör anfällig und wird intraoperativ von geschultem Personal angewandt, um Gerinnungsstörungen aufzuzeigen (Whiting & DiNardo, 2014).

Verschiedene Arbeitsgruppen, unter anderem am ehemaligen Institut für Hämostaseologie, Hämotherapie und Transfusionsmedizin (PD Dr. Sucker und Prof. Hartmann), konnten in vorangegangenen Studien Problemstellungen an Sepsismodellen erarbeiten. Speziell wurden bereits *in vitro*-Untersuchungen zu Gerinnungsabläufen im Rahmen des Modells einer gramnegativen Sepsis durchgeführt (Sucker & Hartmann, 2006; Sucker *et al.*, 2007).

Die vorliegende Arbeit nimmt diese Thematik auf, erweitert sie um Untersuchungen an einem Modell der grampositiven Sepsis und stellt vergleichende Untersuchungen zu den gerinnungsphysiologischen Modellen dar.

1.1 Medizinhistorie der Sepsis

Bereits unter Hippokrates (ca. 460-370 v. Chr.) wurde der Begriff „Sepsis“ (altgriechisch „σηψις“) geprägt. Damals verstand man unter dem Begriff das Krankheitsbild der Wundfäulnis (heute „Nekrose“) (Geroulanos & Douka, 2006).

Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723) entdeckte als passionierter Mikroskopbauer erstmals 1675 Bakterien (Lane, 2015). Erst im 19. Jahrhundert jedoch, vor allem auch durch die Entdeckungen von Robert Koch (1843-1910), wurden weitere Zusammenhänge von Mikroorganismen als Auslöser von Infektionen, Phlegmonen und Abszessen bekannt (Koch, 1882). Der Begriff „Sepsis“ wurde nun zu einem Synonym für fulminante invasive Infektionen. Erst später erkannte man, dass die klinischen Symptome der Sepsis nicht durch die Infektion ausgelöst werden, sondern durch die hervorgerufene Immunantwort des Organismus (Thomas, 1972).

Klinisch gesehen hat die Sepsis einen hohen Stellenwert (Celes, Prado & Rossi, 2013). Septischer Schock und sepsis-induziertes Multiorganversagen sind die häufigsten Todesursachen auf Intensivstationen (Rhodes *et al.*, 2017). Deshalb sind das frühzeitige und sichere Erkennen einer beginnenden Sepsis und die schnelle und effiziente Behandlung zwei wichtige prognostische Faktoren.

1.2 Diagnostik der Sepsis

Zum frühzeitigen Erkennen erster Anzeichen einer Sepsis wurden 1992 in der ACCP/SCCM Konsensus-Konferenz (ACCP = *American College of Clinical Pharmacy*, SCCM = *Society of Critical Care Medicine*) Richtlinien festgelegt, nach denen mit klinisch messbaren Parametern systemische Entzündungsprozesse erkannt werden können (Bone *et al.*, 1992; Kaukonen *et al.*, 2015).

Dabei wurde der Begriff des SIRS (*systemic inflammatory response syndrome*) geprägt, welches als eine systemische Entzündungsreaktion eines Organismus als Antwort auf eine lokale Entzündungsreaktion zu sehen ist und aufgrund verschiedenster Krankheitsbilder auftreten kann. Wenn ein SIRS aufgrund einer Infektion auftritt, lautet die klinische Diagnose Sepsis. (Bone *et al.*, 1992).

Falls mindestens eine Organdysfunktion nachweisbar ist, wird die Sepsis als „schwer“ eingestuft. Bei Vorliegen eines Kreislaufversagens mit Hypotension spricht man von einem septischen Schock. Der schwerste Fall einer Sepsis wird als MODS (*multiple organ dysfunction syndrome*) bezeichnet (Bone *et al.*, 1992).

Die Diagnostik eines SIRS wird anhand von vier Kriterien abgefragt (Körpertemperatur, Herzfrequenz, Leukozytenzahl und Atemfrequenz), kann also sicher nicht spezifisch sein (Bone *et al.*, 1992). Daher wurden die SIRS-Kriterien in der Konsensus-Leitlinie Sepsis 2016 durch die bereits 1996 von Vincent *et al.* vorgestellten SOFA-Kriterien (*Sequential Organ Failure Assessment*) ersetzt (Rhodes *et al.*, 2017; Vincent *et al.*, 1996).

Der SOFA-Score (Tabelle 1) beruft sich nun auf eine größere Anzahl von Kriterien, es werden Funktionsstörungen verschiedener wichtiger Organsysteme (Herz, Lunge, Leber, Niere und Gerinnungssystem, letzteres über die Thrombozytenzahl) abgefragt. Es wurde beschrieben, dass ein Organversagen nicht nur ein momentaner Zustand sei, sondern ein sich entwickelnder Prozess, so dass auch eine Verlaufsbeobachtung des Gesundheitszustandes eines Patienten anhand dieser Parameter möglich ist (Vincent *et al.*, 1996; Rhodes *et al.*, 2017).

Die Gerinnungssituation allerdings alleine über die Plättchenzahl zu bestimmen, ist im Rahmen einer möglicherweise entstehenden Sepsis-induzierten Gerinnungsstörung nicht ausreichend, da es sich nicht um einen rein zellulären Mechanismus handelt (siehe Einleitung Kapitel 1.3 und 1.4).

	Score 0	1	2	3	4
Respiration paO ² /FiO ² [mmHg]	> 400	< 400	< 300	< 200 mit Atem- unterstützung	< 100 mit Atem- unterstützung
Gerinnung Plättchenanzahl [x10 ³ /μl]	> 150	< 150	< 100	< 50	< 20
Cardiovasculäres System	MAP > 70mmHg	MAP < 70mmHg	-	-	-
GCS [Punkte]	15	13 - 14	10 - 12	6 - 9	< 6
Creatinin [mg/dl]	1,2	1,2 - 1,9	2,0 - 3,4	3,5 - 4,9	< 5,0
Harnausscheidung [ml/die]	-	-	-	< 500	< 200

Tabelle 1: SOFA-Score nach (Vincent *et al.*, 1996), je höher der Score, desto gefährdeter der Patient für ein Multiorganversagen und desto höher die Mortalität. Es werden verschiedene Organsysteme abgefragt (Atmung = Respiration, Gerinnung, Cardiovasculäres System = Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP), Niere (Creatinin und Harnausscheidung) sowie über die Glasgow Coma Scale die Bewusstseinslage.

1.3 Pathogenese der Sepsis

Eine Sepsis kann entstehen, wenn Pathogene (v.a. Bakterien, Viren, Pilze u.a.) in normalerweise sterile Bereiche des Körpers eindringen (Albiger *et al.*, 2007).

Die bestehende physiologische Barriere eines Körpers (z.B. Haut, Schleimhaut) kann durch verschiedene Mechanismen, wie z.B. Traumata, aufgehoben werden. Andererseits sind einzelne Organismen auch in der Lage, bestehende Barrieren wie Endothel und Epithel selbständig zu überwinden, insbesondere bei Immundefiziten (Uhle *et al.*, 2016; Seeley, Matthay & Wolters, 2012).

Eindringende Erreger und Bestandteile der Erreger werden im Rahmen der angeborenen Immunantwort des Organismus durch Monozyten, unspezifische Makrophagen und neutrophile Granulozyten als Pathogene erkannt (Uhle *et al.*, 2016; Seeley, Matthay & Wolters, 2012).

Bestandteile von Erregern, die unter dem Oberbegriff „Pathogen-assoziierte molekulare Muster“ („*pathogenassociated molecular patterns*“, PAMPs) zusammengefasst werden, sind unter anderem Lipopolysaccharide (LPS), Peptidoglykane (PG), Lipoteichonsäuren (LTA), Mannane, Glykane, bakterielle DNA und Doppelstrang-RNA (Mogensen, 2009; Medzhitov & Janeway, 2000a, 2000b).

Die bekanntesten und auch in der Forschung am häufigsten verwendeten PAMPs sind die Toxine Lipopolysaccharid (LPS) und Lipoteichonsäure (LTA), da sie seit langem erforscht, günstig zu erwerben/ herzustellen sind und auch klinisch den höchsten Stellenwert haben. LPS ist ein Bestandteil der Zellwand von gramnegativen Bakterien, LTA kommt äquivalent in der Zellwand von grampositiven Bakterien vor (Mogensen, 2009; Rohde, 2019; Percy & Gründling, 2014; Chandler & Ernst, 2017; Guha & Mackman, 2001).

Diese PAMPs werden nur von den Mikroorganismen, jedoch nicht vom Wirtsorganismus selbst gebildet. LPS einerseits und LTA andererseits unterscheiden sich auch bei verschiedenen Bakterien nur marginal in ihrer molekularen Struktur voneinander. Sie sind daher ideale Angriffspunkte für die immunologische Erkennung einer fremden Struktur (Medzhitov & Janeway, 2000b; Mogensen, 2009).

Lipopolysaccharide sind Endotoxine und bestehen aus einem Lipid- und einem Zuckeranteil (Abb. 1) (Chandler & Ernst, 2017; Guha & Mackman, 2001). Aus einem lebenden Bakterium wie *Escherichia coli* wird nur wenig LPS freigesetzt. Erst nach Untergang desselben wird dieses Endotoxin frei und für den Menschen ein Pathogen.

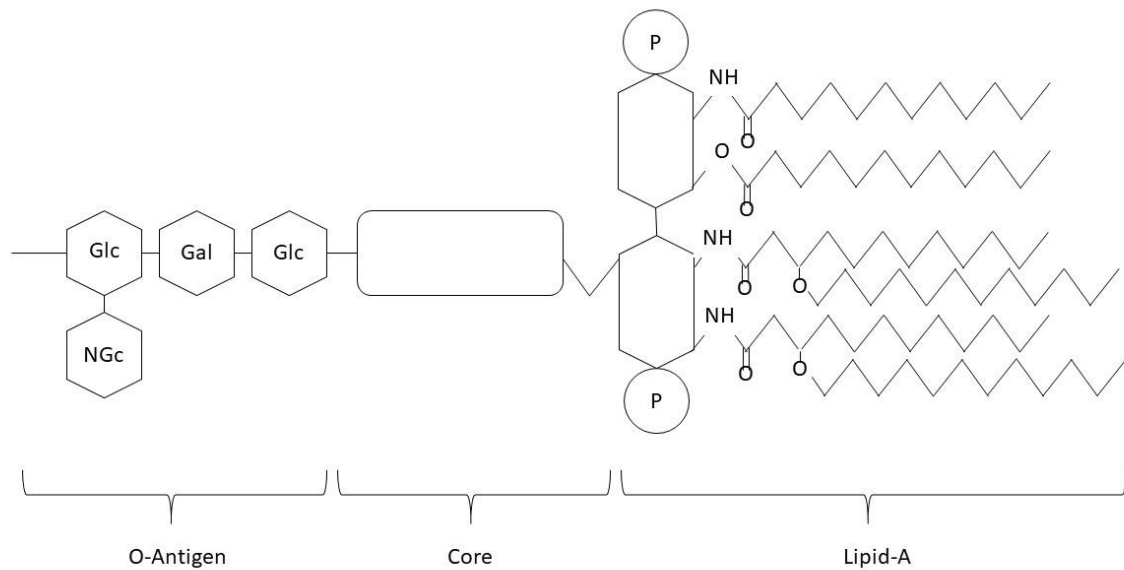


Abb. 1: Molekulare Darstellung eines Lipopolysaccharids (eigene Zeichnung, abgewandelt nach (Chandler & Ernst, 2017)). Glc = Glucose, Gal = Galactose, NGc = N-Acetyl-Glucosamin, P = Phosphat-Gruppe, NH = Stickstoff-Gruppe

Lipoteichonsäure (*Lipoteichoic acid* = LTA) ist Bestandteil der Zellwand von grampositiven Bakterien. Es ist ein wasserlösliches, geladenes Polymer, welches aus 25 Polyglycerol-Phosphaten besteht, die mit einem Glycolipid-Anker verbunden sind (Abb. 2). Dieser Anker dringt als Kette in die Peptidoglykan-Schicht der Zellwand grampositiver Bakterien ein (Wicken & Knox, 1975; Rohde, 2019; Percy & Gründling, 2014; Chandler & Ernst, 2017).

Es ist, zusammen mit z.B. Peptidoglycanen, ein Pathogenitätsfaktor grampositiver Bakterien wie *Staphylokokkus aureus* (Rohde, 2019).

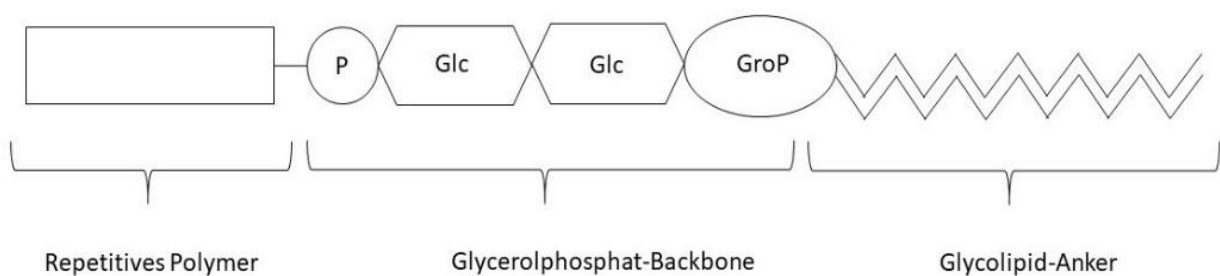


Abb. 2: Molekulare Darstellung einer Lipoteichonsäure (eigene Zeichnung, abgewandelt nach (Chandler & Ernst, 2017)). Glc = Glucose, GroP = Glycerolphosphat, P = Phosphat-Gruppe

Die Erkennung von PAMPs durch das Immunsystem erfolgt durch PRRs (*Pattern recognition receptors*). PRRs können sich in Körperflüssigkeiten befinden, gelöst im Zytoplasma oder an Zelloberflächen gebunden sein (Janeway & Medzhitov, 2002).

Man unterscheidet zwei verschiedene Klassen von PRRs - diejenigen, die die Signalkaskade der angeborenen Immunabwehr auslösen (sog. „*signaling PRRs*“) – und jene, die dies nicht tun (Kaisho & Akira, 2006).

Zur zweiten Gruppe gehören vor allem lösliche Faktoren wie auch das bekannte C-reaktive Protein (CRP) (Kaisho & Akira, 2006). Diese Akut-Phase-Proteine binden an einfallende Mikroorganismen und machen diese so angreifbar für Phagozytose oder aktivieren das Komplementsystem (Kaisho & Akira, 2006; Albiger *et al.*, 2007).

Eine Gruppe der „*signaling PRRs*“ sind die sogenannten *Toll-Like-Rezeptoren* (TLRs), welche erstmals in den 1990er Jahren entdeckt wurden und dem Toll-Rezeptor aus der in der Medizinhistorie wichtigen Taufliegenart „*Drosophila melanogaster*“ glichen (daher der Name „*Toll-like*“) (Medzhitov, Preston-Hurlburt & Janeway, 1997).

TLRs werden von antigenpräsentierenden Zellen exprimiert, unter anderem Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Lymphozyten.

Toll-Like-Rezeptoren sind Typ-I-Transmembranproteine, welche neben der transmembranären Komponente auch eine intra- und eine extrazelluläre Komponente besitzen (Kawasaki & Kawai, 2014; Kaisho & Akira, 2006).

Die extrazelluläre Komponente besteht aus einer sich wiederholenden Leucin-Struktur (LRR = *leucin-rich repeat*), welche für die Erkennung von Liganden wichtig ist. Die intrazelluläre Komponente ist eine sog. Toll/Interleukin-1-Rezeptor-Homologe (TIR) und essentiell für die Signaltransduktion (Albiger *et al.*, 2007; Kaisho & Akira, 2006).

Mittlerweile wurde eine große Anzahl an TLR entdeckt. Sie unterscheiden sich bezüglich der Liganden und der Gene, die sie induzieren können (Janeway & Medzhitov, 2002). Jedoch ist auch die Verteilung in der Zelle unterschiedlich. So gibt es TLR, die sich ausschließlich intrazellulär (in Endosomen und Lysosomen) befinden (Mogensen, 2009).

Grob eingeteilt ist TLR-2 für die Erkennung grampositiver, TLR-4 für die Erkennung gramnegativer Bakterien- und Bakterienbestandteile verantwortlich (Mogensen, 2009; Albiger *et al.*, 2007; Kaisho & Akira, 2006).

Beiden gemein ist ein Signalweg, welcher über ein bei beiden TLR vorkommendes Adaptermolekül (MyD88, sog. MyD88-abhängiger Signalweg, *Myeloid differentiation primary response 88*) eine Aktivierung von NF- κ B (Nekrosefaktor Kappa B) sowie MAP-Kinasen (*Mitogen-activated-protein*) auslöst, welche wiederum proinflammatorische Zytokine induzieren (Albiger *et al.*, 2007; Oliveira-Nascimento, Massari & Wetzler, 2012; Kaisho &

Akira, 2006).

Bei TLR-4 wird zusätzlich ein sogenannter TRIF-Signalweg (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*) ausgelöst, welcher zur Induktion von Typ1-Interferon fähig ist (Lu, Yeh & Ohashi, 2008; Kaisho & Akira, 2006; Mogensen, 2009) (Abb. 3). Innerhalb weniger Minuten wird die Produktion von inflammatorischen Cytokinen vorangetrieben (Kaisho & Akira, 2006; Mogensen, 2009; Lu, Yeh & Ohashi, 2008).

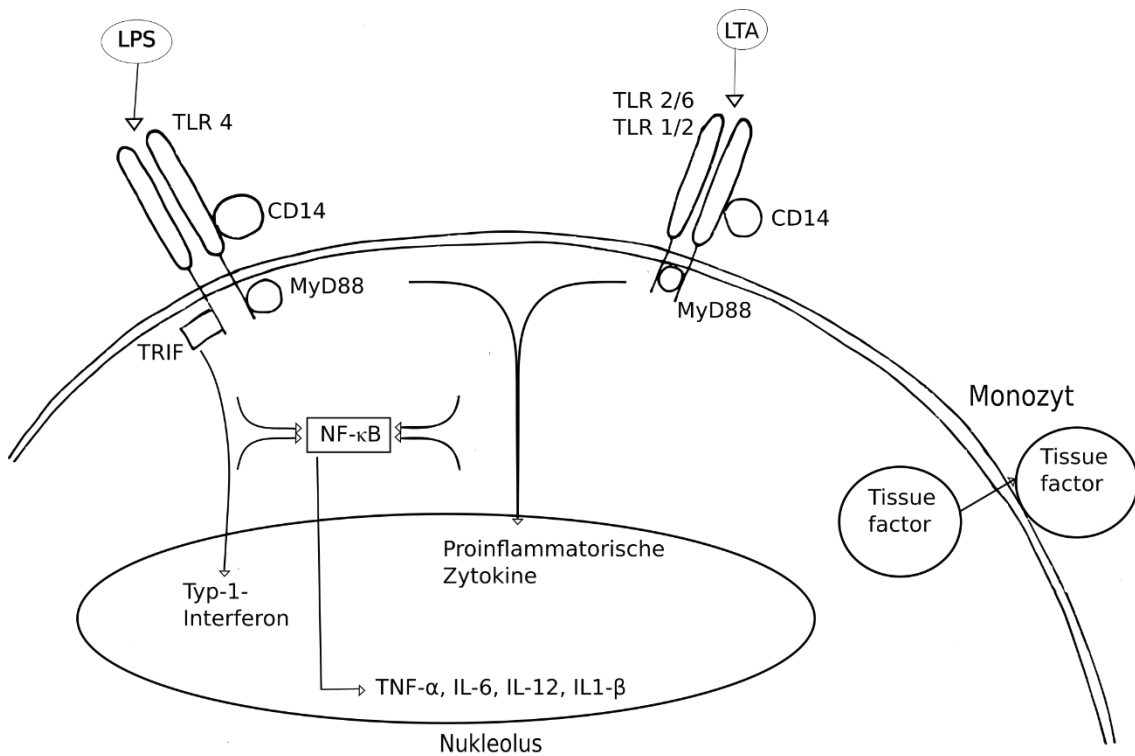


Abb. 3: Signalweg der TLR 4 und 2, eigene Zeichnung, bearbeitet nach (Lu, Yeh & Ohashi, 2008; Foley Jonathan H. & Conway Edward M., 2016; Barton & Medzhitov, 2003). LPS = Lipopolysaccharid, LTA = Lipoteichonsäure, TLR = Toll-like-Rezeptor, MyD88 = Myeloid differentiation primary response 88, TRIF = Toll/Interleukin-Rezeptor-domain-containing adapter-inducing interferon- β , NF- κ B = Nekrosefaktor Kappa B, CD14 = Cluster of differentiation 14, Il = Interleukin, TNF- α = Tumornekrosefaktor-alpha

1.4 Einflüsse der Sepsis auf die Blutgerinnung

Die Hämostase schützt den Körper vor Blutverlusten, die bei Verletzungen entstehen können. Bei fehlender oder falscher Aktivierung der Blutgerinnung oder auch bei überschießender Gerinnungsantwort kann es zu lebensbedrohlichen Situationen für den Organismus kommen.

Die disseminierte intravasale Gerinnung (DIC) ist eine pathophysiologisch gesteigerte Blutgerinnung, die unspezifisch als Komplikation bei einer Reihe von Krankheiten auftreten kann. Darunter ist an oberster Stelle die bakteriell ausgelöste Sepsis zu nennen (Levi & ten Cate, 1999).

Dabei handelt es sich nicht um eine eigenständige Erkrankung, sondern um einen systemischen pathophysiologischen Prozess. Es kommt zu einer überschießenden Gerinnung mit Thrombosen in den kleinen Blutgefäßen. Durch Verbrauch der Gerinnungsfaktoren und Thrombozyten kommt es nachfolgend zu einer Hämorrhagie. Die generalisierte Mikrothrombosierung und Mikroembolisierung von Arteriolen und Kapillaren kann über akute Ischämien eine Organdysfunktion und schließlich ein akutes Multiorganversagen auslösen (Boral, Williams & Boral, 2016).

Bei Sepsis und Trauma wird die Entstehung der DIC durch eine systemische Immunantwort getriggert (Boral, Williams & Boral, 2016). *Tissue factor* (TF) spielt eine entscheidende Rolle in der Verbindung zwischen Inflammation und Gerinnung (Abb. 4). Bei *Tissue factor* (früher als Gewebsthromboplastin bezeichnet) handelt es sich um ein Typ-1-integrales Membranprotein, es gehört zur Familie der Cytokinrezeptoren. Es ist im Subendothel von Gefäßen, ebenso aber auch an Monozyten zu finden. Die TF-Expression wird heraufreguliert als Antwort auf chemische Reize, Traumen oder inflammatorische Zytokine (wie Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) oder Interleukin-1-beta (IL1- β)). Dadurch kommt es zu einer Exposition von TF in das zirkulierende Blut und zu Kontakt mit zirkulierendem Faktor VII. Dieser Komplex aus TF und Faktor VIIa löst weitere Schritte der Gerinnungskaskade aus und führt zur Gerinnungsaktivierung (Østerud & Bjørklid, 2001; Levi & ten Cate, 1999). Der entstehende, zellständige Komplex katalysiert die Aktivierung von Faktor X zu Xa (Thrombokinase). Faktor Xa, Faktor Va (Accelerin), Calcium und Faktor II (Prothrombin) bilden einen Prothrombinase-Komplex, welcher zur Entstehung von Thrombin führt (Hoffman & Monroe, 2001). Thrombin aktiviert Thrombozyten größtenteils über Protease-aktivierende Rezeptoren (PAR), woraufhin die weitere plättchenassoziierte Gerinnung ablaufen kann (Gando, Levi & Toh, 2016).

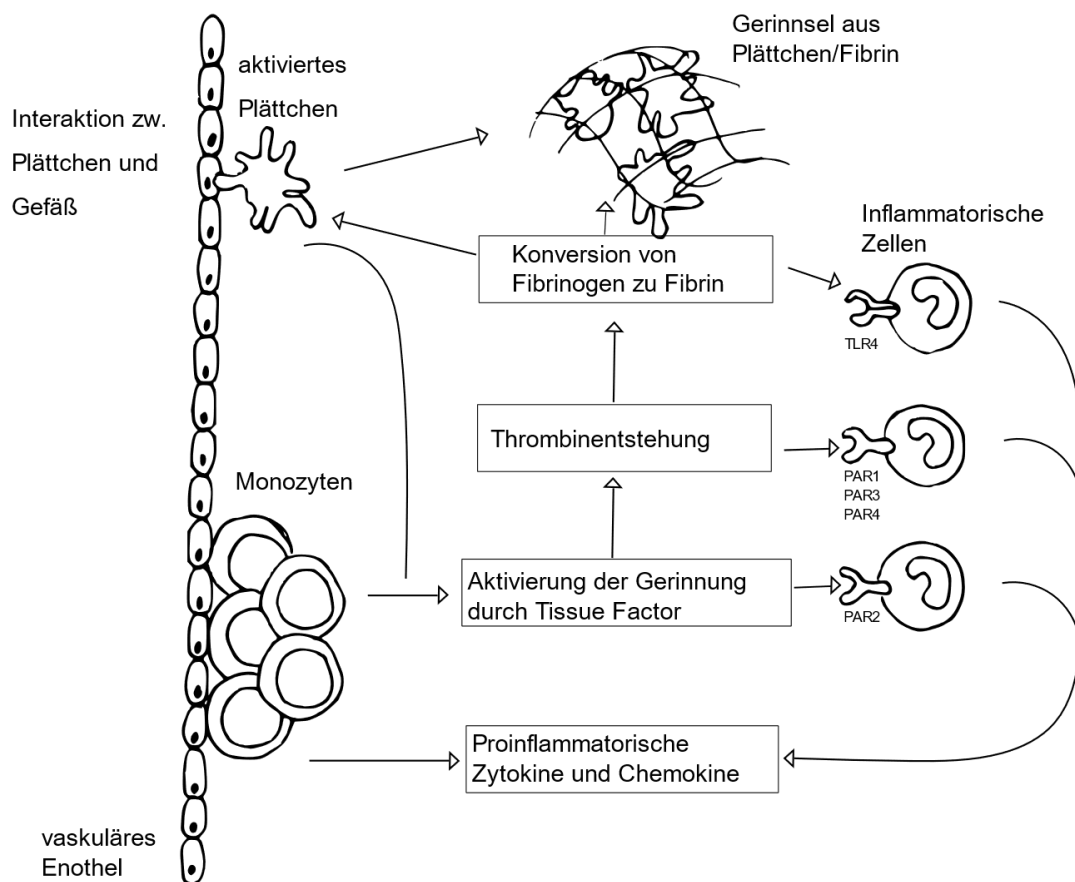


Abb. 4: *Tissue factor* in der korpuskulären Gerinnung, eigene Zeichnung vereinfacht nach (Gando, Levi & Toh, 2016). TLR4 = *Toll-Like-Rezeptor 4*, PAR1-4 = *Protease-aktivierende Rezeptoren*

1.5 Rotationsthrombelastographie

Um hämostaseologische Veränderungen im Rahmen einer Sepsis repräsentativ erfassen zu können, genügt es nicht, nur plasmatische Gerinnungsveränderungen zu beobachten. Daher entwickelte Hellmut Hartert (1918-1993) ein Vollblut-Gerinnungs-Analyseverfahren, welches als Thrombelastographie bezeichnet wurde (Hartert, 1948). Dieses Verfahren misst wie klassische Gerinnungsanalysen die Gerinnungszeit, kann jedoch auch Aussagen über die Festigkeit und die Stabilität eines Blutgerinnsels machen und durch eine einfache Handhabung eine vergleichende Reproduzierbarkeit erlauben (Hartert, 1948).

In Harterts Untersuchung wurde eine Küvette (*Cup*) mit nativem Vollblut gefüllt. In diese Küvette tauchte ein Stempel ein, welcher mit einem Schreiber verbunden war. Der Stempel rotierte innerhalb des langsam zähflüssiger werdenden, da gerinnenden Blutes. Die Bewegung des Stempels wurde auf einen Streifenschreiber (Abb. 5) übertragen (Hartert, 1948).

Solange das Blut im Cup flüssig war, wurde nur ein schwaches Signal als dünne gerade Linie aufgezeichnet. Je mehr sich ein Gerinnsel aus Plättchen und Fibrin bildete und dieses sich mit Küvetten-Innenwand und dem Stempel verband, umso mehr wurde die Bewegung der Küvette an den Stempel übertragen und führte zu einem stärkeren Ausschlag. Eine Amplitude von 20 mm wurde als „Gerinnselbildungszeit“ („g“) definiert. Das Signal erreichte eine Maximalamplitude („MA“) um dann wieder kleiner zu werden, sobald Fibrinolyse einsetzt (Hartert, 1948).

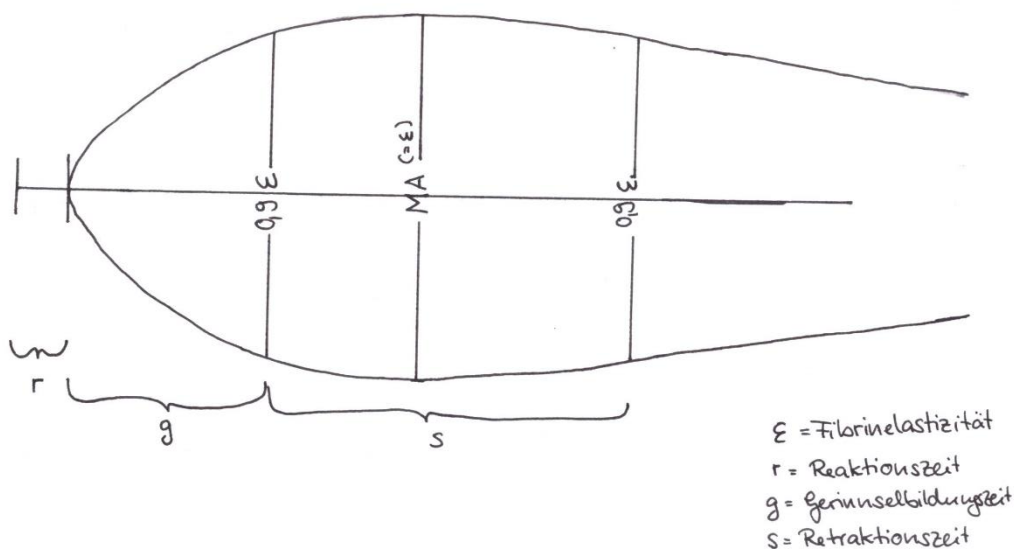


Abb. 5: Thrombelastogramm nach Hartert (Hartert, 1948) Eigene Zeichnung nach Vorlage aus Hartert 1948

Die von Hartert beschriebene Methode wurde im Verlauf weiterentwickelt. Das in dieser Arbeit verwendete Verfahren wurde von Pentapharm zunächst unter dem Namen ROTEG vertrieben, aus patentrechtlichen Gründen jedoch 2003 unter dem Namen Rotationsthromboelastrometrie (ROTEM®) geschützt (Ebinger, 2008). Aktuell wird es von Tem Innovations GmbH vertrieben (Tem Innovations GmbH, 2012).

1.6 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten nun die Gerinnungsabläufe in einer *in vitro*-Sepsis-Umgebung mittels der Rotationsthrombelastographie beurteilt werden. Ausgangspunkt für diese Arbeit waren rotationsthrombelastographische Beobachtungen an Gerinnungsabläufen, die durch Zugabe von bakteriellen Lipopolysacchariden erzeugt wurden (Sucker & Hartmann, 2006; Sucker *et al.*, 2007). Hier werden die gewonnenen Erkenntnisse auf ein grampositives Sepsismodell, insbesondere auf das Toxin LTA ausgeweitet. Unseres Wissens gibt es einige Arbeiten zum Einfluss von LPS auf die Rotationsthrombelastographie *in vivo* und *in vitro*, Daten zu einem Auslöser einer grampositiven Sepsis jedoch keine.

Die Versuche umfassen zum einen die Darstellung der Effekte von LTA auf die Rotationsthrombelastographie und zum anderen zum Vergleich die Darstellung der Effekte von LPS. Zur Untersuchung des zeitlichen Ablaufes des Vorganges wurden Versuche zum Langzeiteffekt durchgeführt. Zusätzlich wurden Versuche vorgenommen, in denen beide Toxine gleichzeitig appliziert wurden, um synergistische Effekte darzustellen („Costimulation“). Wie bei den vorangegangenen Arbeiten wurde auch diesmal die Proteinsynthese inhibiert und ebenso Messungen zu physiologischen und hochphysiologischen Temperaturen („Hitzestress“) durchgeführt (Sucker & Hartmann, 2006; Sucker *et al.*, 2007).

2 Material und Methoden

2.1 Methoden

Für die Fragestellung der Arbeit wurde Vollblut von Probanden entnommen, dieses in Verdünnungsreihen aufbereitet und schließlich der Rotationsthrombelastographie (ROTEM®) zugeführt.

2.1.1 Probanden

Für diese Arbeit wurden insgesamt 29 gesunde Probanden rekrutiert (15 männlich, 14 weiblich), mit einer Altersspanne zwischen 22 und 61 Jahren (Mittelwert 32 Jahre, Median 26 Jahre). Je Versuchsreihe wurden zwischen 6 bis 10 Probanden hinzugezogen. Bei Versuch 4 (Costimulation) und Versuch 6 (Cycloheximid) konnten nur 6 bzw. 7 Probanden rekrutiert werden. Auch bei Versuch 3 (Langzeit) konnten nur 7 Probanden für Untersuchungen rekrutiert werden. Bei Versuch 2 (LPS) mussten zwei Proben und bei Versuch 3 (Langzeit) eine Probe wegen gerätebedingter Störungen verworfen werden.

Die Probanden waren gemäß den Auflagen der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf über die Blutentnahme aufgeklärt und hatten ihr Einverständnis schriftlich gegeben (Ethikvotum Nr. 4417). Des Weiteren mussten sie vor der Blutentnahme einen Fragebogen zur Medikamentenanamnese ausfüllen. Hiermit sollte sichergestellt werden, dass die Probanden in den letzten sieben Tagen vor der Untersuchung keine gerinnungsbeeinflussenden Medikamente eingenommen hatten und keine klinisch relevanten Begleiterkrankungen, insbesondere keine Gerinnungsdefekte, vorlagen. Beide Schriftstücke sind im Anhang (Abb. 61A, B und 62) dargestellt.

2.1.2 Blutentnahme

Den Probanden wurde 17,5 ml Blut (zunächst 4 ml EDTA-Blut als Leerröhrchen, danach 13,5 ml Citrat-Blut mit einer Konzentration von 0,129M (3,8 %) gepuffertes Tri-Natrium-Citrat) nach Desinfektion über eine große, ungestaute Cubitalvene über eine 21G Butterfly-Kanüle entnommen (Dhingra, Safe Injection Global Network, & World Health Organization, 2010).

Die Proben wurden nach Entnahme vorsichtig hin und her geschwenkt; die erste Untersuchung mittels ROTEM® erfolgte 30 bis 60 Minuten nach Blutentnahme, wie empfohlen (Theusinger *et al.*, 2010; Durila, Sevcikova & Vymazal, 2016).

2.1.3 Rotationsthrombelastographie

2.1.3.1. Prinzip

Mit der Thrombelastographie (TEG) entwickelte Hellmut Hartert (1918-1993) 1948 ein Vollblut-Gerinnungs-Analyseverfahren, das auf der Messung der Elastizität des Blutes beruhte (Hartert, 1948). Mit diesem Verfahren kann die Festigkeit eines Gerinnsels nach Einleitung des Gerinnungsprozesses graphisch aufgezeichnet werden und damit standardisierbare Informationen über Gerinnselbildung und Fibrinolyse gewonnen werden. Das ursprüngliche Verfahren wurde im Verlauf weiterentwickelt, das ROTEM[®] wird im Folgenden genauer erläutert.

2.1.3.2. Apparatur und technische Hintergründe

Das ROTEM[®] Vollblut-Gerinnungs-Mess-System (Abb. 6) ist ein patentiertes Analyseverfahren und wird derzeit von der Firma Tem Innovations GmbH, München vertrieben.



Abb. 6: Rotem[®] (ein derzeit nicht mehr im Handel erhältliches Modell, damals noch unter dem Namen ROTEG von der Firma Pentapharm vertrieben. Foto: eigenes Bild)

Das Prinzip der Thrombelastographie beruht auf der Aufzeichnung der viskoelastischen Kräfte zwischen dem gerinnenden Blut und einem sich bewegenden Stempel.

Für die Messung wird ein Einmal-Plastikstempel mit einem Durchmesser von 6 mm fest auf eine vertikale Achse aufgesetzt, die für die Messung permanent in einem $4,75^\circ$ Winkel oszilliert. Der Antrieb dieser Achse erfolgt über einen Motor. Achse und Motor sind über eine elastische Feder miteinander verbunden. Die Bewegung der Achse wird von einer speziellen optischen Detektions-Software aufgezeichnet und graphisch ausgewertet (Abb. 7) (Tem Innovations GmbH, 2012).

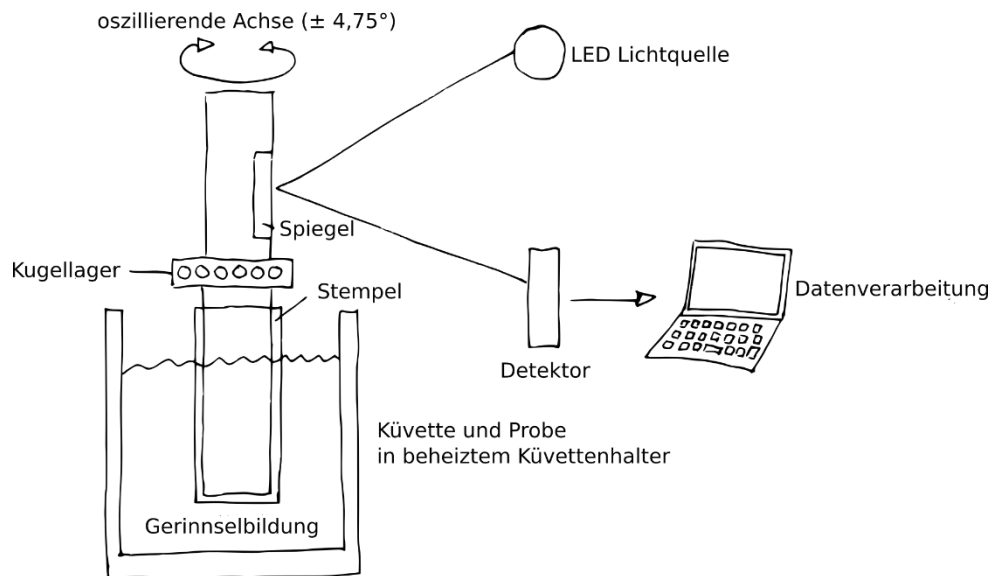


Abb. 7: Die einsetzende Gerinnung führt zu einer geringeren Rotation des in die Blutprobe getauchten Stempels. (eigene Zeichnung nach (Görlinger, Dirkmann & Hanke, 2016)). Genaue Beschreibung des Vorgangs im Text. LED = Light emitting diode

Die Blutprobe wird mittels einer automatischen Pipette in eine zylindrische Einmal-Küvette mit einem Durchmesser von 8 mm pipettiert, die vorher in einem Küvettenhalter platziert wurde. Dieser wird danach auf die Messposition aufgesetzt - somit taucht der Stempel in die Blutprobe (Tem Innovations GmbH, 2012).

Beim Start der Messung wird die Rotation des Stempels in der stationären Küvette in Gang gesetzt. Sie wird optisch über eine Lichtquelle und einen Lichtsensor detektiert. Die Bewegung des Stempels ist unbeeinflusst, solange in der Blutprobe noch keine Gerinnung eingetreten ist. Sobald sich allerdings ein Gerinnsel bildet und die oszillierende Bewegung beeinflusst, wird die Rotationsamplitude der Achse herabgesetzt. Das bedeutet, je fester das Gerinnsel wird, desto geringer wird die Amplitude (Tem Innovations GmbH, 2012).

Das Ergebnis wird über die Standard-Gerätesoftware als Grafik auf dem Bildschirm des angeschlossenen Laptops dargestellt und als „TEM“ oder „TEMogramm“ bezeichnet. Dabei wird die Amplitude der Bewegung des rotierenden Stempels über die Zeit aufgezeichnet (Tem Innovations GmbH, 2012).

Das bedeutet für die Grafik, dass eine freie und ungehinderte Rotation am Anfang des Gerinnungsprozesses in eine Amplitude von 0 mm übersetzt wird, während eine Amplitude von 100 mm gleichzusetzen ist mit einer Blockade mit Stillstand des rotierenden Pins durch das Gerinnsel (Tem Innovations GmbH, 2012).

Durch die automatisch-computergesteuerte elektrische Pipette wird eine Standardisierung des Verfahrens ermöglicht, die eine weitgehend Untersucher-unabhängige ROTEM®-Analytik erlaubt. Das Gerät verfügt über vier Messkanäle, was eine parallele Messung von vier verschiedenen Proben bzw. Ansätzen ermöglicht und für die zeitnahe Analyse der Blutproben bei einer Gerinnungsanalyse von Vorteil ist. Der Küvettenhalter ist beheizt und hält konstant eine voreingestellte Temperatur (hier immer 37°C) zur Simulation der physiologischen Körpertemperatur (Tem Innovations GmbH, 2012).

Während das ursprünglich von Hartert entwickelte Verfahren gänzlich ohne Aktivatoren auskam, erlaubt das ROTEM®-Analyseverfahren durch Zugabe von Reagenzien den Gerinnungsvorgang reproduzierbar zu beeinflussen.

Hier werden von Tem Innovations GmbH, München Reagenzien bereitgestellt, um verschiedene Fragestellungen zu untersuchen. Insbesondere lassen sich sechs unterschiedliche Methoden voneinander abgrenzen.

In der EXTEM-Probe wird die Aktivierung der Gerinnung durch Zugabe von Gewebsthromboplastin (*Tissue factor*) ausgelöst. Es ermöglicht eine Erfassung der Störung der Gerinnselbildung über die Prüfung der Faktoren VII, X, V, II, I, Thrombozyten und Fibrinolyse innerhalb von 10 Minuten (Görlinger, Dirkmann & Hanke, 2016; Tem Innovations GmbH, 2012).

In der INTEM-Probe wird die Gerinnung über die Kontaktphase aktiviert (ähnlich wie in anderen Gerinnungsanalysen wie der aPPT = Partielle Thromboplastinzeit). Es können Störungen v.a. des intrinsischen Gerinnungsweges detektiert werden. Erfasst werden die Faktoren XII, XI, IX, VIII, X, V, II, I, Thrombozyten und die Fibrinolyse (Görlinger, Dirkmann & Hanke, 2016; Tem Innovations GmbH, 2012).

In der FIBTEM-Probe wird die Gerinnung wie in der EXTEM-Probe aktiviert. Unter Zusatz von Cytochalasin D (eine thrombozytenblockierende Substanz) wird die Funktion der Thrombozyten gehemmt. So können Fibrinogenspiegel und Fibrinpolymerisation funktionell beurteilt werden (Görlinger, Dirkmann & Hanke, 2016; Tem Innovations GmbH, 2012).

In der APTEM-Probe wird die Gerinnung ebenfalls wie in der EXTEM-Probe aktiviert. Unter Zusatz von Aprotinin (ein Fibrinolyseinhibitor) wird eine Fibrinolyse *in vitro* gehemmt. Im

Vergleich zur EXTEM-Probe kann eine massive Hyperfibrinolyse nach ca. 10 Minuten erkannt werden (Görlinger, Dirkmann & Hanke, 2016; Tem Innovations GmbH, 2012).

In der HEPTEM-Probe wird die Aktivierung wie in der INTEM-Probe erreicht. Im Gegensatz zur INTEM-Probe wird unter Zusatz von Heparinase (ein Enzym, welches Heparin abbaut) eine Diagnostik an vollheparinisierten Patienten möglich (Görlinger, Dirkmann & Hanke, 2016; Tem Innovations GmbH, 2012).

In dieser Arbeit wurde nicht mit Aktivatoren des intrinsischen und extrinsischen Systems gearbeitet, sondern der Gerinnungsprozess lediglich durch eine Recalcifizierung durch Zugabe von Calciumchlorid (star-tem[®]-Reagenz) eingeleitet. Diese als NATEM-Probe bezeichnete Form der ROTEM[®]-Analyse ist sensitiver als Methoden, die einen Aktivator verwenden, da gerade schwache Alterationen der Blutgerinnung ggf. durch den starken Effekt der Aktivatoren überspielt bzw. maskiert werden und somit der Diagnostik entgehen können (Görlinger, Dirkmann & Hanke, 2016). In der täglichen klinischen Praxis wird diese Methode selten gewählt, da durch eine verlängerte CFT die Untersuchung als unpraktikabel angesehen wird (Whiting & DiNardo, 2014).

2.1.3.3. Gemessene Parameter

Mittels der Rotationsthembelastographie (ROTEM[®]) wurden im Rahmen dieser Arbeit folgende Parameter ermittelt (Abb. 8):

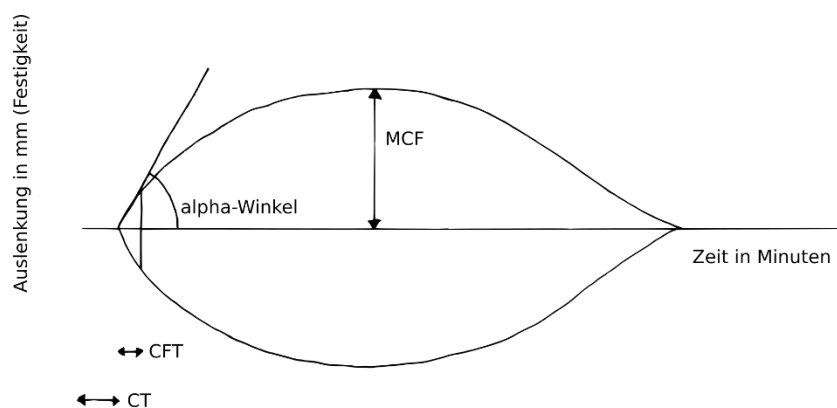


Abb. 8: Die verschiedenen Messgrößen in einem beispielhaften TEMogramm (eigene Zeichnung nach Vorlage von (Görlinger, Dirkmann & Hanke, 2016)). CT = *Clotting Time*, CFT = *Clot Formation Time*, MCF = *Maximum Clot Firmness*

Die *Clotting Time* (CT = Gerinnungszeit), gemessen in Sekunden, beschreibt die Zeit, die vom Start des Tests (Zugabe des Gerinnungsaktivators Calciumchlorid) bis zur Entstehung eines

2 mm Gerinnsels vergeht. Sie wird beeinflusst durch die Aktivitäten der plasmatischen Gerinnungsfaktoren (Lang *et al.*, 2005; Tem Innovations GmbH, 2012).

Die *Clot Formation Time* (CFT = Gerinnselbildungszeit), gemessen in Sekunden, ist als die Zeit definiert, die vergeht, während sich die Amplitude zwischen 2 mm und 20 mm verändert. Sie wird insbesondere beeinflusst von Thrombozytenzahl und Fibrinogenspiegel (Lang *et al.*, 2005; Tem Innovations GmbH, 2012).

Die *Maximum Clot Firmness* (MCF = Maximale Gerinnsel Festigkeit), gemessen in Millimetern (mm), stellt die maximale Amplitude der Gerinnungskurve dar und ist ein Maß für die Festigkeit des Blutgerinnsels. Diese wird erreicht, bevor das Gerinnsel durch die einsetzende Fibrinolyse aufgelöst wird und die Gerinnselfestigkeit wieder sinkt. Sie ist definiert als die Amplitude der halben Kurve des Thrombelastogramms von Punkt 0 bis zur maximalen Höhe. Sie wird durch eine Reihe von Faktoren beeinflusst wie der Plättchenzahl und -funktion, der Fibrinogenkonzentration, der Faktor XIII-Aktivität sowie der Aktivität der Fibrinolyse. Weiterhin nimmt die MCF mit steigendem Hämatokrit ab (Lang *et al.*, 2005; Tem Innovations GmbH, 2012).

Der *Alpha Angle* (α -Winkel), gemessen in Grad, stellt den Winkel der Grundlinie mit einer Tangente an der Gerinnungskurve durch den 2 mm-Punkt dar und beschreibt die Kinetik der Gerinnselbildung. Er wird beeinflusst durch die Geschwindigkeit der Thrombozytenaggregation und die Fibrin-Polymerisation (Lang *et al.*, 2005; Tem Innovations GmbH, 2012).

Weitere durch das ROTEM[®] gemessenen Parameter zur Fibrinolyse wurden in dieser Arbeit nicht betrachtet.

2.1.4 Durchführung der Analyse

In dieser Arbeit wurde die Rotationsthrombelastographie ausschließlich mit dem NATEM-Ansatz durchgeführt.

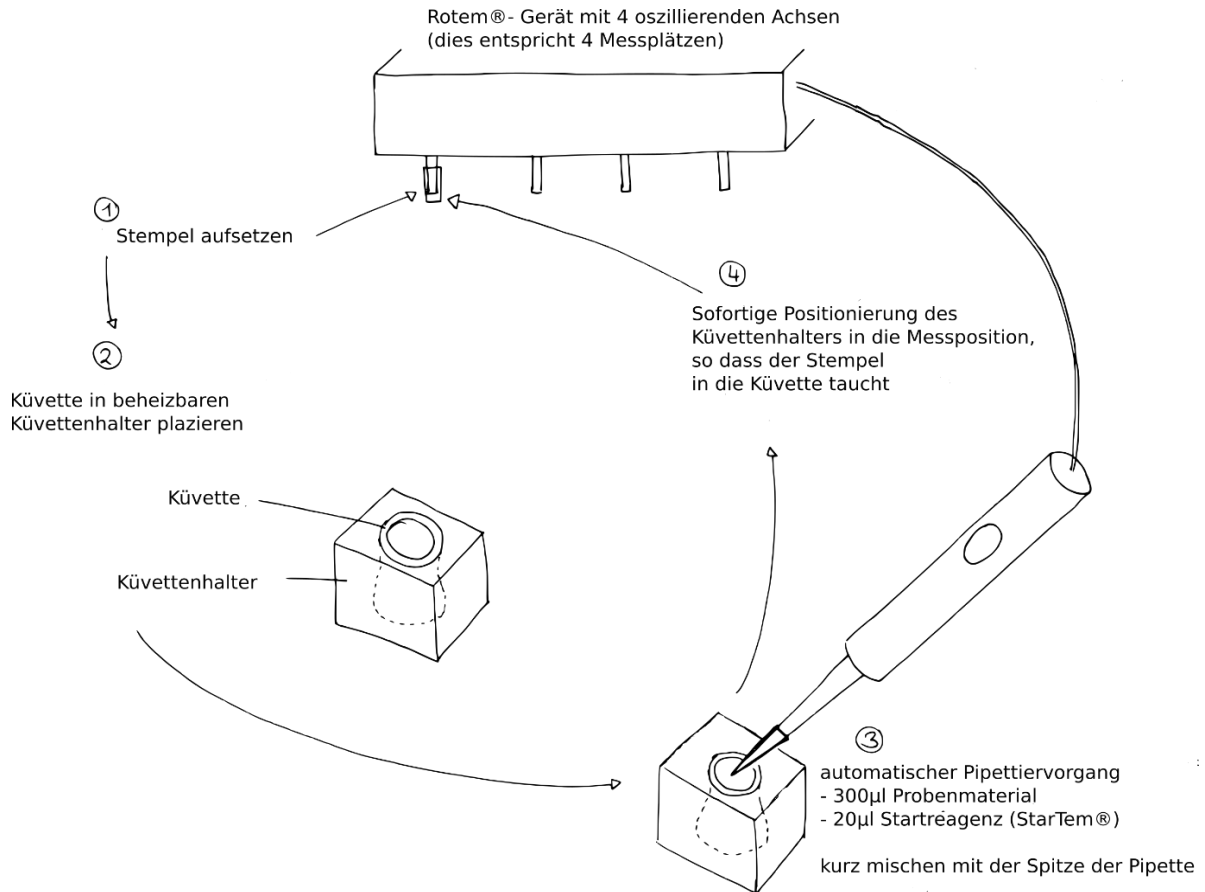


Abb. 9: Schematische Darstellung eines Messvorganges (eigene Zeichnung, auf Erfahrung beruhend)

Zunächst wurde eine Küvette mit zugehörigem Stempel aus der Verpackung entnommen. Der Stempel wurde vorsichtig bis zum Einrasten auf die Achse aufgesetzt, wobei der Stempel nicht berührt werden durfte, um Kontaminationen des Materials zu vermeiden (Abb. 9, Punkt 1). Die dazugehörige Küvette wurde im beheizbaren Küvettenhalter platziert (Abb. 9, Punkt 2). Als nächstes wurden mittels einer zum Gerät gehörenden, computergesteuerten, elektrischen Pipette 300 µl Citrat-Blut in die Küvette pipettiert und die Pipettenspitze gewechselt, um Verunreinigungen zu vermeiden. Daraufhin wurden 20 µl Aktivator-Substanz (Calciumchlorid) zur Recalcifizierung hinzu pipettiert. Das Blut-/Aktivator-Gemisch wurde daraufhin mit der Pipettenspitze wie durch den Hersteller vorgegeben durchmischt (Abb. 9, Punkt 3).

Die Messung startete automatisch durch Zugabe des Aktivators (star-tem® = Calciumchlorid), weshalb eine möglichst unverzügliche Positionierung des Küvettenhalters in die Messposition unerlässlich ist (Abb. 9, Punkt 4). Der Küvettenhalter wird magnetisch in Position gehalten und

nach erfolgter Messung konnten Stempel und Küvette fachgerecht entsorgt werden, da es sich um Einmalartikel handelt.

2.1.5 Verdünnungsreihen

Zur Analyse konzentrationsabhängiger Effekte von Lipopolysacchariden (LPS) und Lipoteichonsäure (LTA) auf den Ablauf der Blutgerinnung wurden Verdünnungsreihen erstellt. Hierzu wurden mittels lyophilisiertem LPS und LTA durch Verdünnung mit 0,9 %iger NaCl-Lösung zunächst jeweils Stammlösungen mit einer Konzentration von 10 mg/ml LPS oder LTA angesetzt.

Durch weitere Verdünnung der Stammlösungen wurden LPS- und LTA-Lösungen mit Konzentrationen von 1 mg/ml, 0,1 mg/ml und 0,01 mg/ml hergestellt.

2.1.6 Versuchsreihen

2.1.6.1. Versuchsreihe zu Lipoteichonsäure

In der ersten Versuchsreihe wurden verschiedene Konzentrationen von LTA gegen eine Kontrolle mit NaCl getestet. Dabei sollte in einem ersten Schritt dargestellt werden, ob es in diesem Versuchsansatz zu signifikanten Veränderungen des Versuchsablaufes unter LTA kommt. Weitere Fragen waren nach Konzentrationsabhängigkeit und einer optimalen Konzentration von LTA für weitergehende Vergleichszwecke.

Bei der ersten Versuchsreihe (Probandenanzahl $n = 10$) wurden je Proband vier verschiedene Reagenzgläser von Citratblut (jeweils 3 ml) bereitgestellt, das den Probanden wie oben beschrieben entnommen wurde. Drei der Reagenzgläser wurden versetzt mit 300 μ l LTA in absteigender Konzentration (1 mg/ml, 0,1 mg/ml und 0,01 mg/ml), wie in den Verdünnungsreihen hergestellt. Die rechnerischen Endkonzentrationen der LTA-Konzentrationen dieser Ansätze betrugen demnach 90,9 μ g/ml, 9,09 μ g/ml sowie 909 ng/ml.

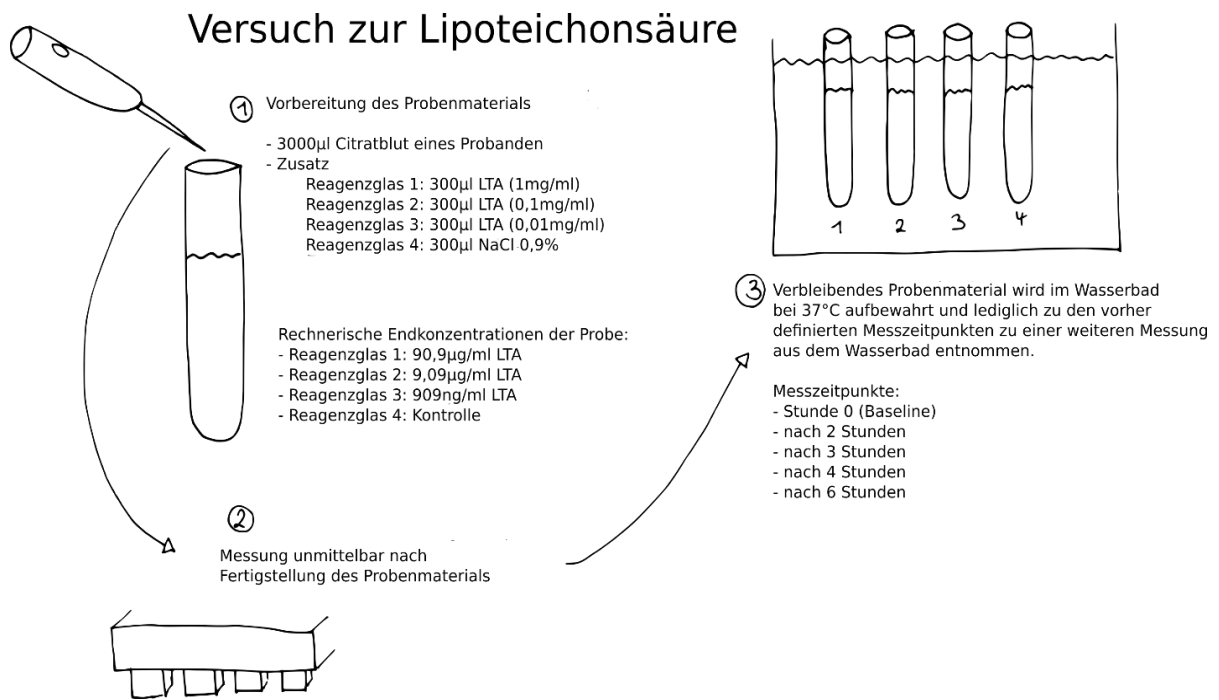


Abb. 10: Vereinfachte Darstellung eines Messvorgangs zum Versuch mit LTA zum besseren Verständnis der Abläufe (eigene Zeichnung, auf Erfahrung beruhend)

Mit jeweils 300 µl des Materials aus diesen Reagenzgläsern wurden mittels der elektrischen Pipette des Gerätes drei der vier vorhandenen Messpositionen des ROTEM® bestückt (Abb. 10). Bei jeder Messung wurde im vierten Steckplatz eine Kontrolle ohne LTA mitgeführt (3ml Citratblut des Probanden mit 300 µl 0,9 % NaCl).

Die Reagenzgläser mit Citratblut und LTA in verschiedenen Konzentrationen sowie das Reagenzglas mit Citratblut und NaCl als Kontrolle wurden sofort nach Entnahme des Materials für die Untersuchung der Ausgangssituation (Stunde „0“) bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach Inkubationszeiten von insgesamt 2, 3, 4 und 6 Stunden wurden jeweils erneut Proben aus den Reagenzgläsern entnommen und mittels ROTEM® untersucht, um neben der Konzentrations- auch die Zeitabhängigkeit des Effektes von LTA auf den Gerinnungsprozess im ROTEM® darzustellen.

2.1.6.2. Versuchsreihe zu Lipopolysaccharid

In der zweiten Versuchsreihe wurden die Versuchsschritte des ersten Versuches mit LPS statt LTA nachgebildet, um Vergleiche der verschiedenen Konzentrationsstufen vornehmen zu können. Bei einer Probandenanzahl von $n = 8$ wurden je Proband vier verschiedene Reagenzgläser von Citratblut (jeweils 3 ml), das den Probanden wie oben beschrieben

entnommen wurde, versetzt mit 300 µl LPS in absteigender Konzentration (1 mg/ml, 0,1 mg/ml und 0,01 mg/ml), wie in den Verdünnungsreihen hergestellt. Die rechnerischen Endkonzentrationen von LPS in den Proben dieser Ansätze betrugen demnach 90,9 µg/ml, 9,09 µg/ml sowie 909 ng/ml.

Mit den drei Ansätzen wurden drei der vier vorhandenen Messpositionen des ROTEM® bestückt (Abb. 11).

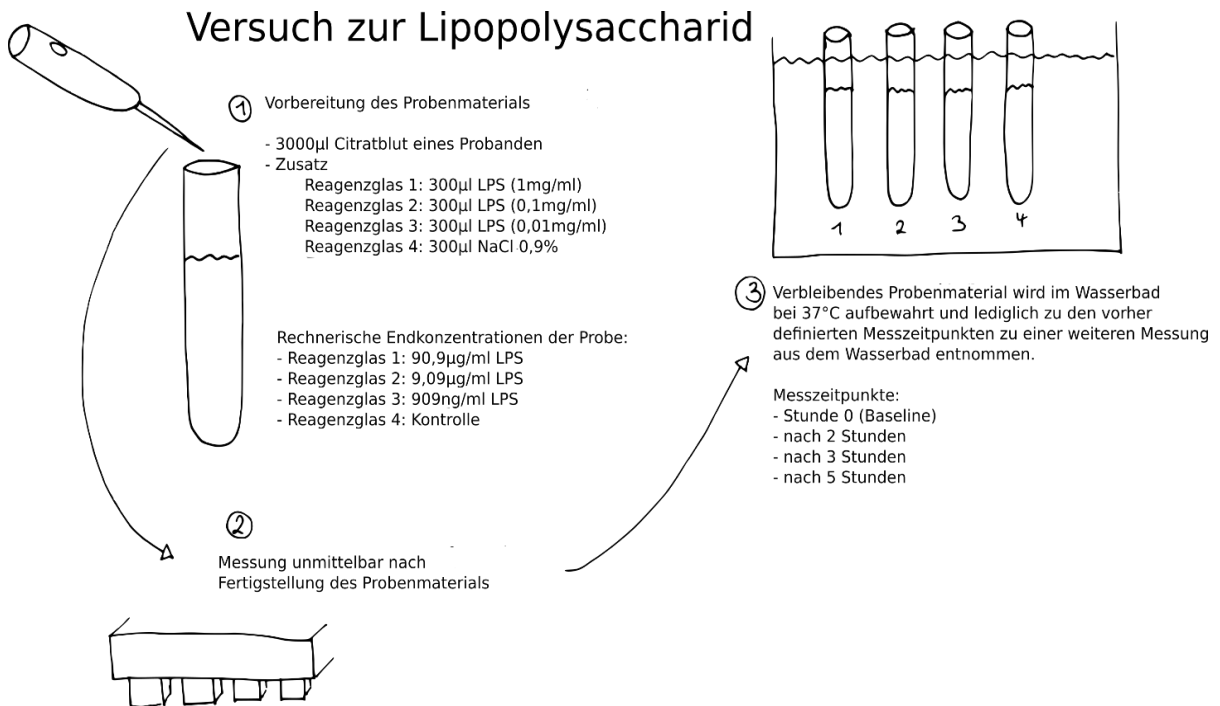


Abb. 11: Vereinfachte Darstellung eines Messvorgangs zum Versuch mit LPS zum besseren Verständnis der Abläufe (eigene Zeichnung, auf Erfahrung beruhend)

Bei jeder Messung wurde im vierten Steckplatz eine Kontrolle ohne LPS mitgeführt (3 ml Citratblut des Probanden mit 300 µl 0,9 % NaCl).

Nachdem die verschiedenen Ansätze für die Ausgangssituation (Stunde „0“) gemessen wurden, wurden die vier Ansätze bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach Inkubationszeiten von insgesamt 2, 3 und 5 Stunden wurden die Proben entnommen und erneut mittels ROTEM® gemessen, um neben der Konzentrations- auch die Zeitabhängigkeit des Effektes von LPS auf den Gerinnungsprozess im ROTEM® zu untersuchen.

2.1.6.3. Versuchsreihe mit verlängerter Inkubationszeit

Bei der dritten Versuchsreihe wurde die Inkubationszeit verlängert, um darzustellen, wie sich die ROTEM®-Parameter über die Zeit verhalten. Dabei wurden pro Proband (Probandenanzahl $n = 9$) zwei verschiedene Reagenzgläser mit Testsubstanzen hergestellt. Dabei handelte es sich um 3 ml Citratblut, das den Probanden wie oben beschrieben entnommen wurde, versetzt mit 300 μ l LTA in einer Konzentration von 1 mg/ml mit einer rechnerischen Endkonzentrationen von 90,9 μ g/ml in der Probe. Damit wurde einer der vier vorhandenen Steckplätze des ROTEM® bestückt (Abb. 12).

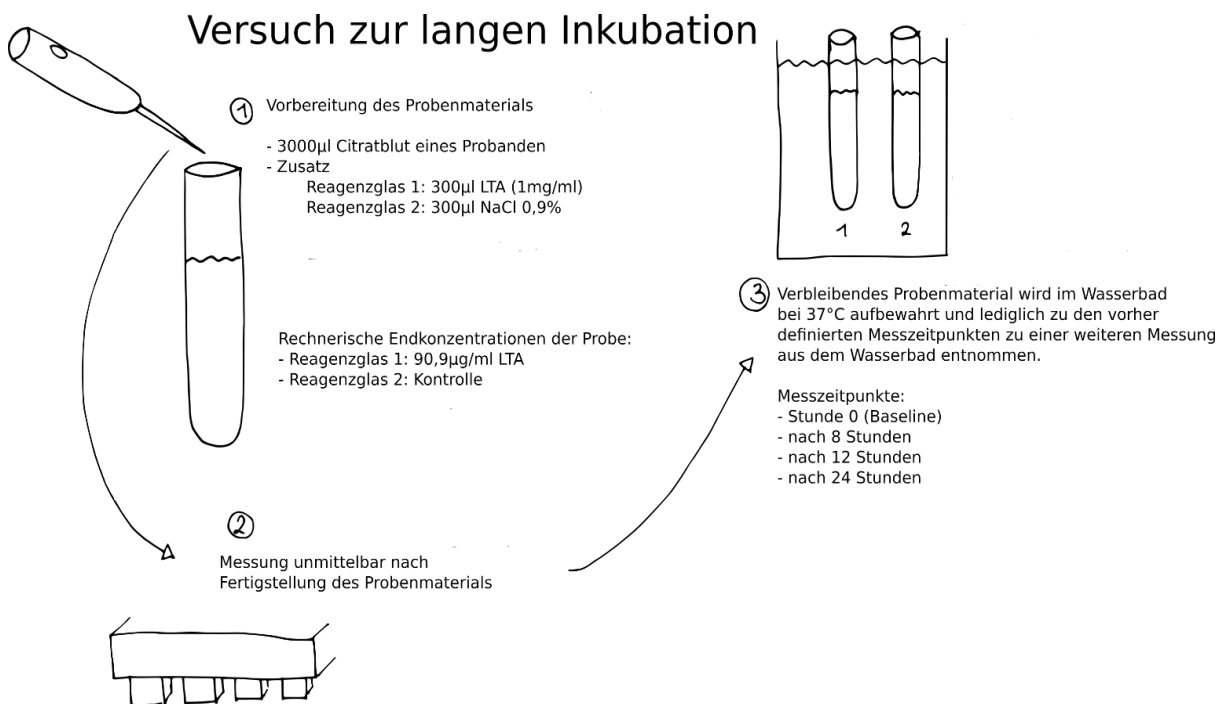


Abb. 12: Vereinfachte Darstellung eines Messvorgangs zum Langzeit-Versuch mit LTA zum besseren Verständnis der Abläufe

Ein weiterer Steckplatz wurde für eine Kontrolle genutzt, bei der 3 ml Citratblut desselben Probanden mit 300 μ l 0,9 % NaCl versetzt wurden.

Die zwei weiteren Steckplätze wurden für einen analog durchgeführten Versuch eines weiteren Probanden genutzt.

In dieser Versuchsreihe wurden die Blutproben bei 37 °C über 8, 12 und 24 Stunden inkubiert.

2.1.6.4. Versuchsreihe mit Costimulation von Lipoteichonsäure und Lipopolysaccharid

In der vierten Versuchsreihe wurden die Versuchsansätze mit LTA und LPS in der zuvor höchsten verwendeten Konzentration (Endkonzentration von 90,9 µg/ml Toxin in der Probe) direkt gegeneinander getestet. Zusätzlich wurde ein Ansatz gemessen, der beide Toxine enthält. Dafür wurden vier verschiedene Reagenzgläser mit Testsubstanzen hergestellt (Probandenanzahl n = 6). Dabei handelte es sich um 2 ml Citratblut, das den Probanden wie oben beschrieben entnommen wurde. Eines der Reagenzgläser wurde versetzt mit 200 µl LTA in der Konzentration 1 mg/ml (Endkonzentration 90,9 µg/ml LTA), ein zweites mit 200 µl LPS in der Konzentration 1 mg/ml (Endkonzentration 90,9 µg/ml LPS), ein drittes mit einem Gemisch aus 100 µl LTA und 100 µl LPS jeweils einer Konzentration von 1 mg/ml (Endkonzentration jeweils 45,45 µg/ml LTA und 45,45 µg/ml LPS). Bei jeder Messung wurde eine Kontrolle mit 2 ml Citratblut des Probanden mit 200 µl 0,9 % NaCl mitgeführt (Abb. 13). Nach einer Inkubationsdauer von jeweils 0, 2, 3 und 5 Stunden wurde eine ROTEM®-Untersuchung der Blutproben durchgeführt und die ROTEM®-Parameter bestimmt.

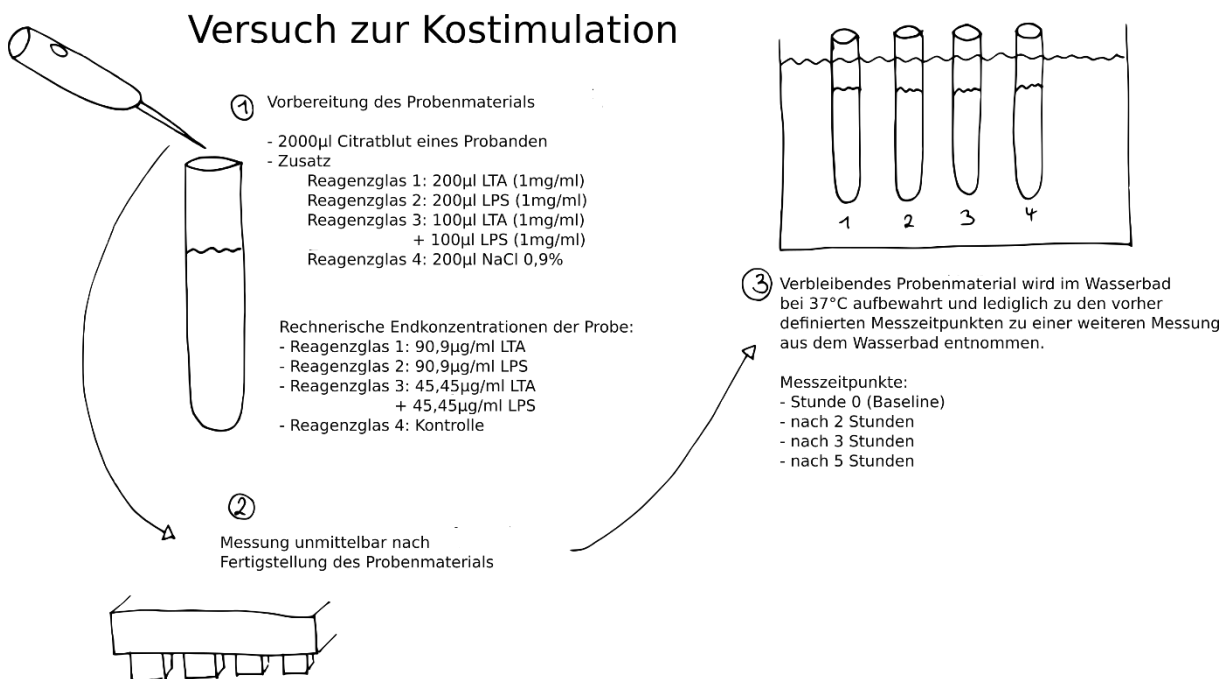


Abb. 13: Vereinfachte Darstellung eines Messvorgangs zum Versuch mit einer Costimulation zum besseren Verständnis der Abläufe

2.1.6.5. Versuchsreihe mit Proteinsynthesehemmung mittels Cycloheximid

Die fünfte Versuchsreihe wurde zur Frage der Relevanz einer Proteinsynthese im Gerinnungsablauf durchgeführt. Hierzu wurde zur Hemmung der Proteinsynthese Cycloheximid verwendet. Cycloheximid oder auch Actidione ist ein natürliches Antibiotikum, welches 1948 von Ford und Leach aus *Streptomyces griseus* isoliert wurde (Leach, Ford & Whiffen, 1947; Whiffen, 1948). Seit dieser Zeit wird es *in vitro* zur Hemmung der Proteinsynthese als Translationshemmer eingesetzt. Die genaue Wirkungsweise ist nicht vollständig geklärt, es führt bei Eukaryonten jedoch zu einer Wachstumshemmung an der 60S-Untereinheit der Ribosomen und zur Apoptose der Zelle. Aufgrund der toxischen Wirkung auf die DNA und der damit verbundenen teratogenen Wirkung wird es beim Menschen nicht eingesetzt (Siegel & Sisler, 1963; Kerridge, 1958; Schneider-Poetsch *et al.*, 2010).

Bei dieser Versuchsreihe (Probandenanzahl $n = 7$) wurden 2 Probenreihen mit Blutproben der Probanden vorbereitet, welche 1 ml Citratblut mit 100 μl LPS (1 mg/ml, Endkonzentration 90,9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS), 100 μl LTA (1 mg/ml, Endkonzentration 90,9 $\mu\text{g}/\text{ml}$) oder 100 μl eines Gemisches aus jeweils 50 μl LPS 1 mg/ml und 50 μl LTA 1 mg/ml enthielten (Endkonzentration jeweils 45,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Bei jeder Messung wurde eine Kontrolle mit 1 ml Citratblut des Probanden mit 100 μl 0,9 % NaCl mitgeführt (Abb. 14).

Einer dieser beiden Reihen wurden nun 35 mg 0,1 % Cycloheximid-Lösung zu jedem Ansatz beigefügt (Endkonzentration des Cycloheximid von 30,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bzw. 0,109 $\mu\text{mol}/\text{l}$).

ROTEM®-Messungen erfolgten in beiden Probenreihen unmittelbar nach Herstellung der Probe bzw. nach fünfstündiger Inkubation bei 37 °C.

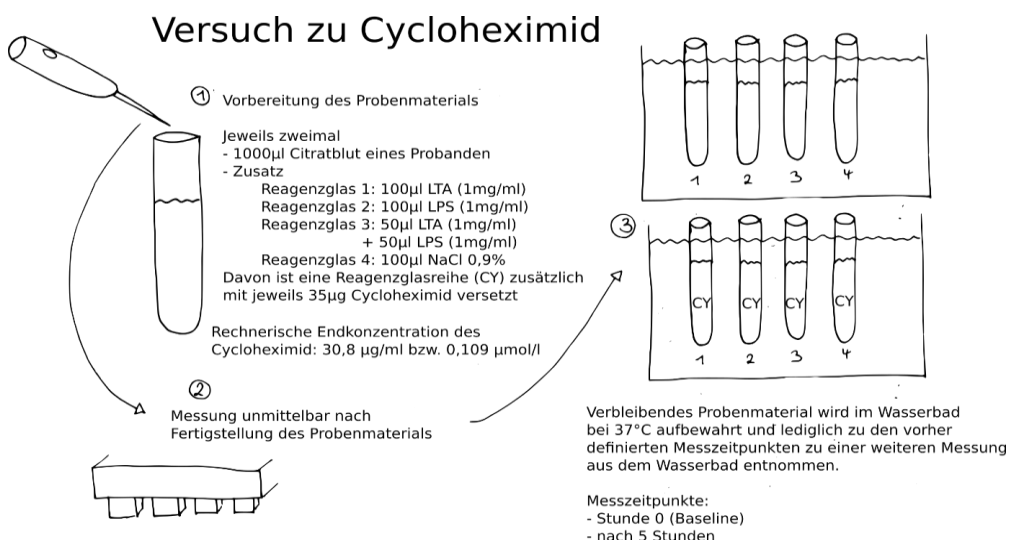


Abb. 14: Vereinfachte Darstellung eines Messvorgangs zum Versuch mit Cycloheximid zum besseren Verständnis der Abläufe

2.1.6.6. Versuchsreihe unter hyperthermen Reaktionsbedingungen

In der sechsten Versuchsreihe wurden die zuvor etablierten Probenzusammensetzungen einem künstlich erzeugten Fieber zugeführt. In diesem Versuch (Probandenanzahl $n = 10$) wurden Blutproben der Probanden (1 ml Citratblut) mit 100 μl LPS (1 mg/ml, Endkonzentration 90,9 $\mu\text{g/ml}$), 100 μl LTA (1 mg/ml, Endkonzentration 90,9 $\mu\text{g/ml}$) oder einem 100 μl Gemisch aus jeweils 50 μl LPS 1 mg/ml und 50 μl LTA 1 mg/ml versetzt (Endkonzentration jeweils 45,45 $\mu\text{g/ml}$). Bei jeder Messung wurde eine Kontrolle mit 1 ml Citratblut des Probanden mit 100 μl 0,9 % NaCl mitgeführt (Abb. 15).

Nach der *Baseline*-Messung, für die 300 μl des Probenmaterials entnommen wurden, wurde die Probe halbiert und die verbleibenden 800 μl auf 2 Reagenzgefäße mit jeweils 400 μl aufgeteilt. Die eine Probe wurde bei 37 °C und die andere bei 40 °C inkubiert. Eine ROTEM®-Messung erfolgte jeweils unmittelbar nach Abschluss der fünfstündigen Inkubation.

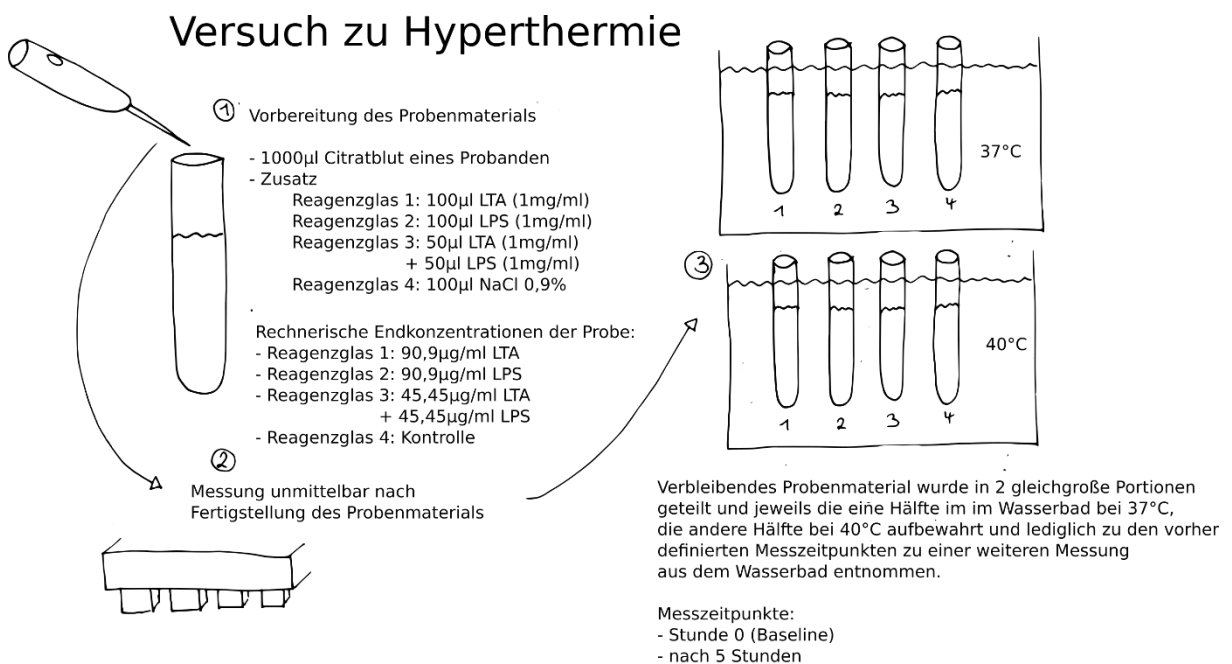


Abb. 15: Vereinfachte Darstellung eines Messvorgangs zum Hyperthermie-Versuch zum besseren Verständnis der Abläufe

2.1.7 Statistische Verfahren

Testergebnisse wurden wie von dem ROTEM®-Gerät ausgegeben als ganze Zahlen dargestellt. Dabei wurde die CT zumeist auf drei geltende Stellen dargestellt, MCF, CFT und Alpha-Winkel auf zwei geltende Stellen. Selten kam es zu so starken Verkürzungen der CT, dass lediglich zwei geltende Stellen durch das Gerät ausgegeben wurden. Bei Berechnungen des Mittelwertes und der Standardabweichung sowie des Medians, wurde auf eine Nachkommastelle gerundet.

In einer ersten Auswertungsserie wurden die Ergebnisse mit der Statistiksoftware PASW® 18 der Firma IBM mittels paarweisem Probenvergleich untersucht. Die statistischen Datenanalysen bezogen sich somit auf Differenzen von Datenwerten. Diese Werte waren nicht notwendigerweise normalverteilt, so dass zunächst nur nichtparametrisch statistische Analyseverfahren für verbundene Stichproben verwendet wurden. Für den Wilcoxon-Test (Wilcoxon, 1945) wurde dabei durchgehend ein zweiseitiges Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ (Fehler erster Art) angenommen (Neyman & Pearson, 1933).

Für diese Arbeit wurden die statistischen Ergebnisse reevaluiert. Aufgrund der Verfügbarkeit und den sich darbietenden Möglichkeiten wurden die weiteren Analysen mit der *open source*-Statistiksoftware „R“ in der Version 4.0.2 inklusive des Paketes „tidyverse 1.3.“ (The R Core Team, 2002; Wickham *et al.*, 2019) vorgenommen. Zum Einsatz kamen zusätzlich die Hilfspakete „ggplot2 Version 3.3.2“ „rstatix“ , „knitr“ und „kableExtra“(The R Core Team, 2002; Kassambara, 2020a, 2020b; Wickham *et al.*, 2019; Patil, 2020; Wickham, 2016).

2.1.8 Prüfung auf Normalverteilung

Zunächst wurden die Daten auf Normalverteilung geprüft, um gegebenenfalls statistische Verfahren für normalverteilte Daten anwenden zu können. Als Stichprobe zur Überprüfung der Daten wurden die Messwerte der Leerproben (NaCl-Zusatz) aller Versuche herangezogen. Zunächst erfolgte die optische Kontrolle auf Normalverteilung mittels Quantil-Quantil-Plot und einem Histogramm. In einem zweiten Schritt wurde der Shapiro-Wilk-Test (Shapiro & Wilk, 1965) angewendet und nur bei einem p unter 0,05 die Annahme einer Normalverteilung verworfen. Diese Tests wurden für alle gemessenen ROTEM®-Parameter (CT, CFT, MCF, Alpha-Winkel) einzeln durchgeführt.

Wir verwendeten daher für die Untersuchungen der *Clotting Time* und des Alpha-Winkels auf Normalverteilung basierende Testcharakteristiken. Für die nicht sicher normalverteilten Parameter (CFT, MCF) kamen nicht-parametrische Testverfahren zur Anwendung.

Insbesondere wurden für Gruppenvergleiche bei den normalverteilten Parametern t-Tests für

gepaarte Stichproben angewendet und bei den nicht-normalverteilten Parametern der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (Student, 1908; Wilcoxon, 1945). Nach vorangegangener visueller Kontrolle mittels gruppierender Boxplots bzw. gruppierender Linienplots wurden entweder ein- oder zweiseitige statistische Hypothesen angewendet und in den Ergebnissen angegeben. Das Signifikanzniveau für die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde immer mit $p < 0,05$ angenommen.

Häufig handelt es sich bei den Gruppenvergleichen um Mehrfachgruppenvergleiche, so dass ein statistischer Korrekturfaktor für multiple Vergleiche in einer Stichprobe angewendet werden musste. In dieser Arbeit wurde durchgängig die Korrekturstatistik nach Holm (Holm, 1979) verwendet.

2.2 Materialien

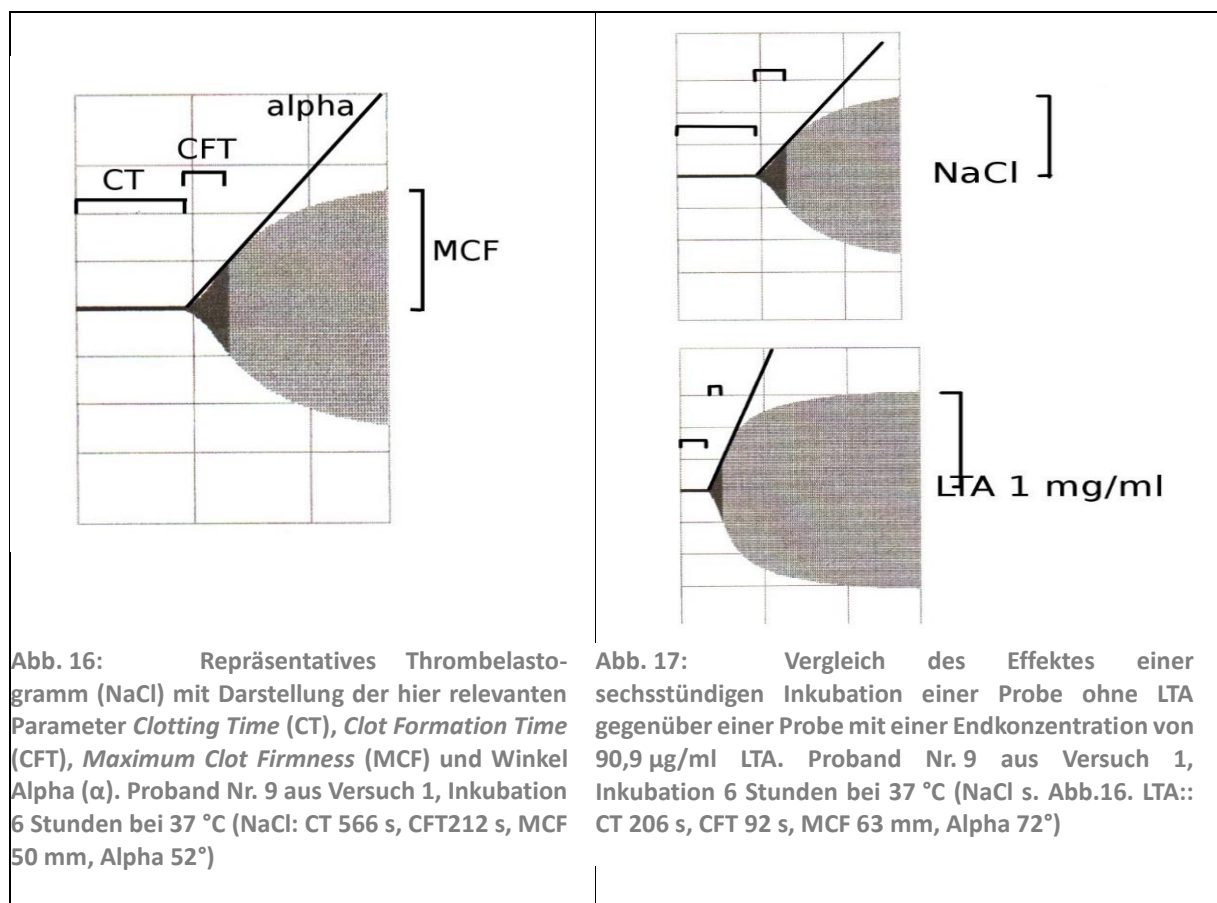
- ROTEG[®] 05 Analyser (Vollblut-Gerinnungs-Analysesystem) der Firma Pentapharm, München,
Software: ROTEM[®] GI
- star-tem[®] (0,2 mol/l CaCl₂ in HEPES Puffersubstanz pH 7,4 und 0,1 % Natriumazid) der Firma Pentapharm, München
- Lipopolysaccharid (LPS aus Echerichia coli
(MDL-Nummer MFCD00164401, Produktnummer L2630 – 10MG, Sigma-Aldrich)
- Lipoteichonsäure (LTA) Staphylococcus aureus
(MDL-Nummer MFCD00131526, Produktnummer L2515-5MG, Sigma-Aldrich)
- 0,1 % Cycloheximid-Lösung (CAS-Nr. 66-81-9, Sigma-Aldrich)
- Butterfly-Kanüle 21G, Venofix (Braun)
- Vacutainer-Adapter (Braun)
- Blutentnahme-Röhrchen der Firma BD (*Becton, Dickinson and Company*)
 - Citratblut 4,5 ml BD Vacutainer 0,129 M = 3,8 % gepuffertes Tri-Natrium-Citrat
 - EDTA-Blut 4 ml BD Vacutainer K2E 7.2 mg
- NaCl-Lösung (0,9 %) (Braun)

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Effekt von Lipoteichonsäure (LTA) und Lipopolysaccharid (LPS) auf die Vollblutgerinnung untersucht. Zu diesem Zweck wurden Analysen mit der Rotationsthembelastographie (ROTEM®) durchgeführt.

Die Darstellung der Ergebnisse umfasst die Untersuchung von Konzentrationseffekten sowie Einflüsse von Inkubationszeit und -temperatur von LTA und LPS auf die im ROTEM® gemessenen Parameter *Clotting Time* (CT), *Clot Formation Time* (CFT), *Maximum Clot Firmness* (MCF) und Alpha-Winkel (α).

Eine repräsentative ROTEM®-Aufzeichnung zeigt zunächst eine Probe ohne LTA, an der die gemessenen Parameter schematisch dargestellt werden (Abb. 16). Daneben ist der Vergleich derselben Probe ohne LTA mit einer Probe dargestellt, welche LTA in einer Konzentration von 1 mg/ml (Endkonzentration 90,9 µg/ml) enthielt (Abb. 17). Beide Proben wurden vor dieser Messung 6 Stunden lang bei 37 °C inkubiert. Deutlich zu sehen ist die signifikante Verkürzung der CT im direkten Vergleich.



3.1 Methodische Aspekte

Erste Datenanalysen zu den erhobenen Ergebnissen wurden an den Kontrollproben (NaCl-Zusatz) der jeweiligen Versuche durchgeführt. Hierzu wurden die Kontrollproben aller Versuche gemeinsam betrachtet. Zunächst erfolgte eine optische Kontrolle auf Normalverteilung mittels Quantil-Quantil-Plot (Abb. 18) und einem Histogramm (Abb. 19). Optisch stimmten die erhobenen Daten mit der Annahme Normalverteilung für die *Clotting Time* überein.

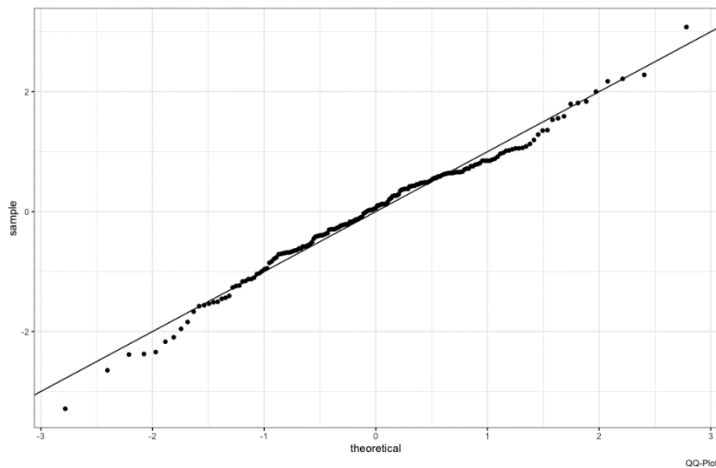


Abb. 18: Quantil-Quantil-Plot aller NaCl-Werte für *Clotting-Time*, alle Versuche vereint. Eine Gerade entspricht der vollen Übereinstimmung mit einer Normalverteilung.

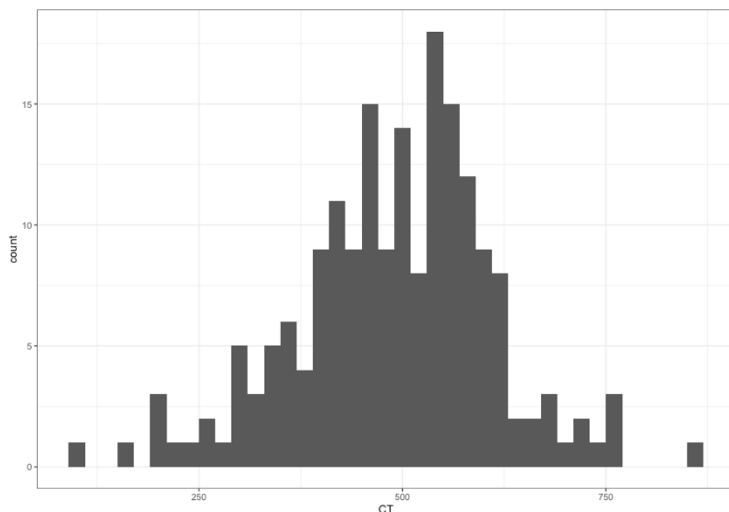


Abb. 19: Histogramm mit Darstellung der Kontroll-Werte (NaCl) über die Versuche 1 bis 6 hinweg

Trotz der unterschiedlichen Versuchsansätze der Versuche eins bis sechs scheinen die Kontrollproben (NaCl) aus allen Versuchen aus einer gemeinsamen Grundgesamtheit mit Normalverteilung zu stammen. Auch bei getrennter Betrachtung der Versuche ergaben sich keine Anhaltspunkte, die gegen die Annahme einer Normalverteilung sprachen. (Abb. 20).

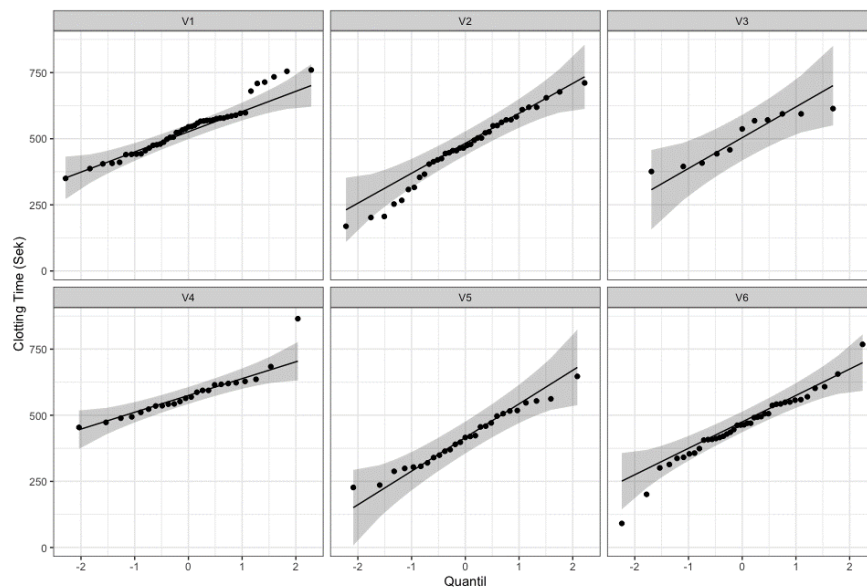


Abb. 20: Quantil-Quantil-Plot aller Werte für *Clotting Time* (NaCl, Versuch 1 bis 6), Gerade entspricht der vollen Übereinstimmung mit einer Normalverteilung

Ergänzend wurde der Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung hinzugezogen. Dieser widersprach mit einem $p = 0,09567$ nicht der Annahme einer Normalverteilung. Deshalb wurde bei den nachfolgenden Gruppenvergleichen jeweils der T-Test herangezogen.

Für den CFT-Wert konnte bereits optisch im Histogramm dargestellt werden, dass die Werte nicht einer Normalverteilung entsprachen (Abb. 21). Die Quantil-Quantil-Plots finden sich im Anhang (Abb. 63 und Abb. 64). Auch der Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung widersprach mit einem $p < 0,05$ der Annahme einer Normalverteilung. Daher wurde für die Auswertung der Gruppenvergleiche der Wilcoxon-Test verwendet.

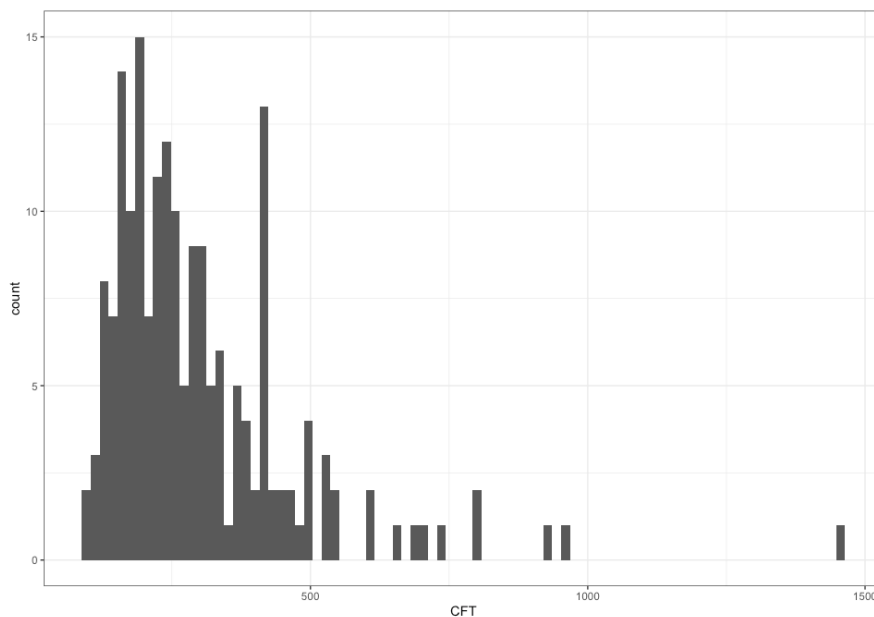


Abb. 21: Histogramm der CFT-Werte der Kontrolle (NaCl) aller 6 Versuche, optisch keiner Normalverteilung entsprechend

Für die MCF konnten dieselben Verfahren angewendet werden. Auch hier entsprach bereits das Histogramm nicht einer Normalverteilung (Abb. 22). Der Shapiro-Wilk-Test widersprach mit einem $p = 0,001891$ ebenso der Annahme einer Normalverteilung.

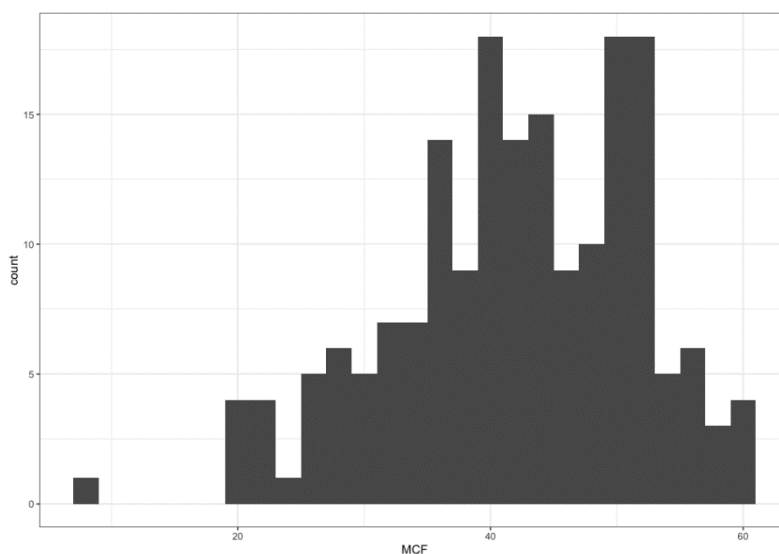


Abb. 22: Histogramm der MCF-Werte der Kontrolle (NaCl) aller 6 Versuche, nicht einer Normalverteilung entsprechend

Für den Alpha-Winkel zeigten sich hingegen sowohl in den Quantil-Quantil-Plots aller Kontroll-Versuche (NaCl) (Abb. 23), der einzelnen Kontroll-Versuche (NaCl) (Abb. 24) als auch im Histogramm (Abb. 25) optisch bereits die Annahme einer Normalverteilung. Der Shapiro-Wilk-Test bestätigte diese Annahme mit einem $p = 0,139212$, so dass für die Auswertung dieses Parameters der t-Test verwendet wurde.

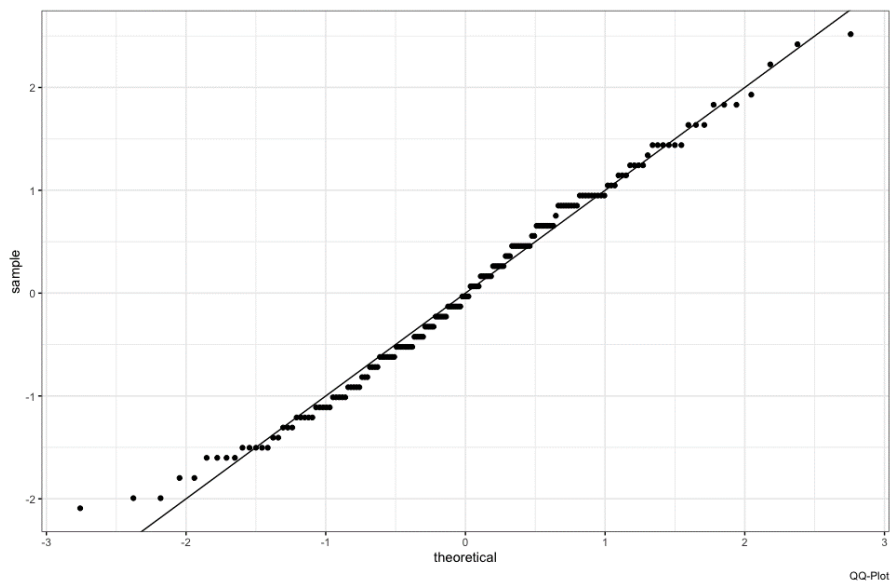


Abb. 23: Quantil-Quantil-Plot aller NaCl-Werte für den Alpha-Winkel, alle Versuche vereint. Eine Gerade entspricht der vollen Übereinstimmung mit einer Normalverteilung.

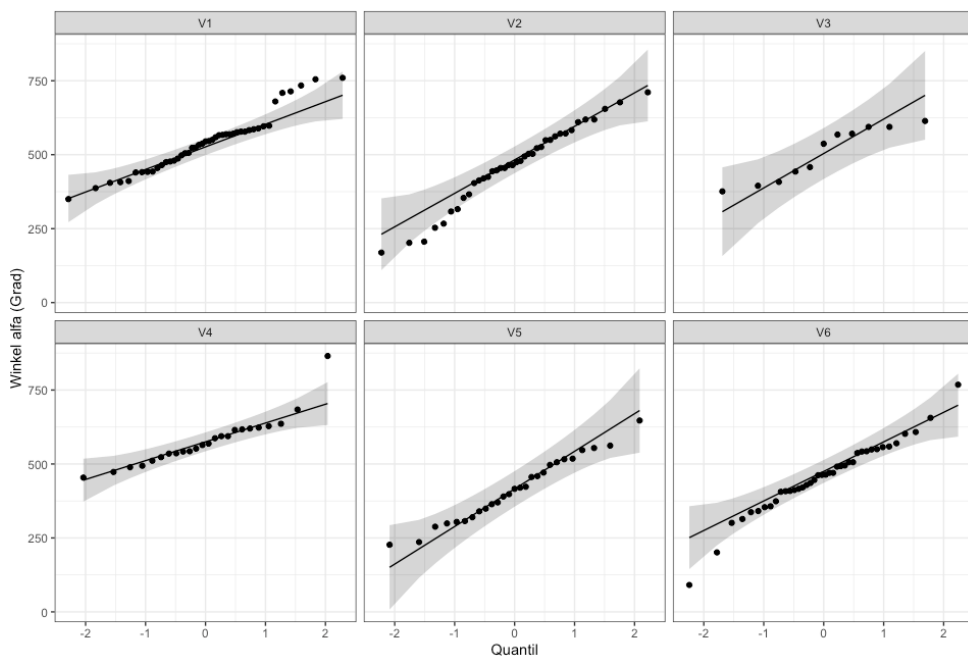


Abb. 24: Quantil-Quantil-Plot aller Werte für den Winkel Alpha (NaCl, Versuch 1 bis 6). Eine Gerade entspricht der vollen Übereinstimmung mit einer Normalverteilung.

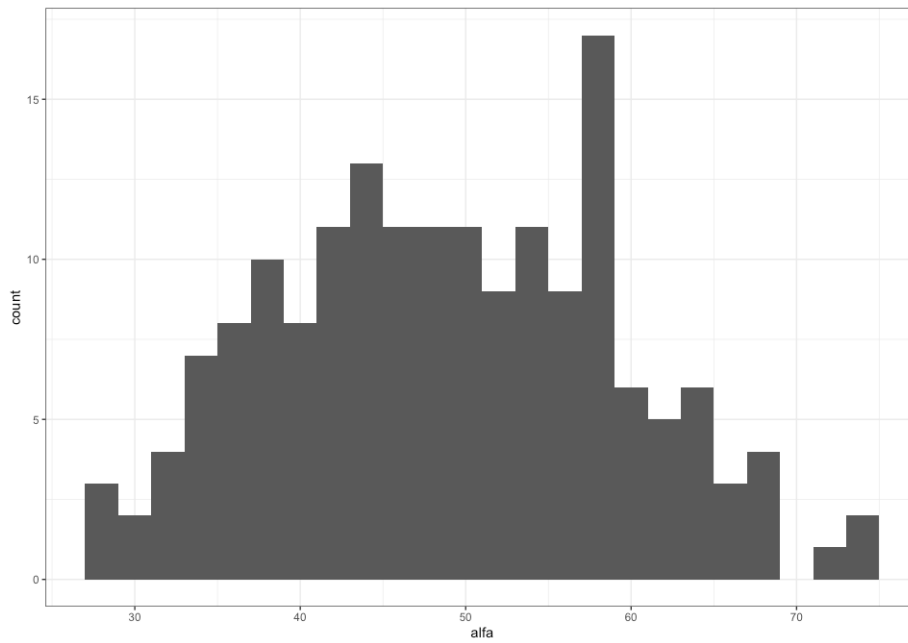


Abb. 25: Histogramm der Werte des Winkel Alpha der Kontrolle (NaCl) aller 6 Versuche, einer Normalverteilung entsprechend

3.2 Beeinflussung der ROTEM®-Parameter durch unterschiedliche LTA-Konzentrationen

Es wurde die konzentrations- und zeitabhängige Wirkung von LTA auf wichtige Parameter des ROTEM® überprüft.

Die Messungen wurden an Blutproben von 10 Probanden durchgeführt. Die Inkubation mit LTA oder der Kontrolle erfolgte für die ersten 5 Probanden für 1, 2, 3 und 4 Stunden, für eine zweite Probandenserie mit 5 Probanden nach 1, 2, 4 und 6 Stunden. In den 4 Messplätzen des ROTEM® wurden zu jedem dieser Zeitpunkte zeitgleich *Aliquots* der Proben eines Probanden gemessen. Eine ausführliche Darstellung aller Messwerte und Parameter findet sich in den Tabellen 22 bis 33 im Anhang. Ausgewählte Werte werden in den Tabelle 2 bis 5 dargestellt.

Inkubationszeitpunkt [h]	Ansatz	Variable	n	Min[s]	Mean[s]	Max[s]	Sd[s]	Median[s]
0	LTA 0.909 µg/ml	CT	10	408	571.7	871	152.042	513.5
0	LTA 9.09 µg/ml	CT	10	411	555.8	867	144.439	497.0
0	LTA 90.9 µg/ml	CT	10	392	547.4	862	147.878	511.0
0	NaCl	CT	10	407	563.8	760	120.371	558.0
4	LTA 0.909 µg/ml	CT	10	383	491.3	644	78.105	470.5
4	LTA 9.09 µg/ml	CT	10	363	456.6	562	67.377	447.0
4	LTA 90.9 µg/ml	CT	10	221	355.0	520	84.995	353.5
4	NaCl	CT	10	405	540.0	709	87.589	554.5
6	LTA 90.9 µg/ml	CT	5	206	335.4	475	108.339	336.0
6	NaCl	CT	5	537	567.4	589	19.165	569.0

Tabelle 2: Ausgesuchte Werte der CT für den konzentrationsabhängigen Versuch mit LTA, nach Inkubationszeitpunkt sortiert. Angegeben sind Mittelwert (Mean) mit Minimum (Min) und Maximum (Max) sowie Median und Standardabweichung (Sd). Alle Werte in Sekunden [s]. „n“ bezeichnet die Probandenanzahl, der Inkubationszeitpunkt ist in Stunden [h] angegeben.

Im Kontroll-Ansatz zeigte sich keine statistisch signifikante Veränderung der CT über die Inkubationszeitpunkte hinweg. Der Zusatz von LTA führte durchgängig zu einer Verkürzung der CT im Vergleich zu der Kontrolle ohne LTA (Abb. 26). Der Effekt nahm mit steigender Dosis von LTA und fortschreitender Inkubationszeit zu. Besonders ausgeprägt war er bei der hier verwendeten höchsten LTA-Konzentration von 1 mg/ml (Endkonzentration 90,9 µg/ml), der nach 4 Stunden im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,000258$, $n = 10$) statistische Signifikanz erreichte. Trotz niedriger Probandenzahl konnte bei der hier getesteten höchsten Konzentration nach 6 Stunden im Vergleich zur Kontrolle ($p = 0,01$, $n = 5$) eine statistisch signifikante Verkürzung dargestellt werden.

Dem gegenüber zeigte sich bei Konzentrationen von 0,1 mg/ml und 0,01 mg/ml LTA (Endkonzentration 9,09 µg/ml und 0,909 µg/ml) ein schwächerer Effekt. Beide Konzentrationen zeigten sich nach 4 Stunden Inkubation gegenüber der Kontrolle als signifikant verkürzt (LTA-Konzentration von 0,1 mg/ml: $p = 0,006$, $n = 10$, LTA-Konzentration von 0,01 mg/ml: $p = 0,033$, $n = 10$). Nach 6 Stunden Inkubation zeigten die beiden niedrigeren Konzentrationsstufen eine visuelle Verkürzung der CT, eine Signifikanz wurde jedoch bei geringer Probandenzahl nicht erreicht.

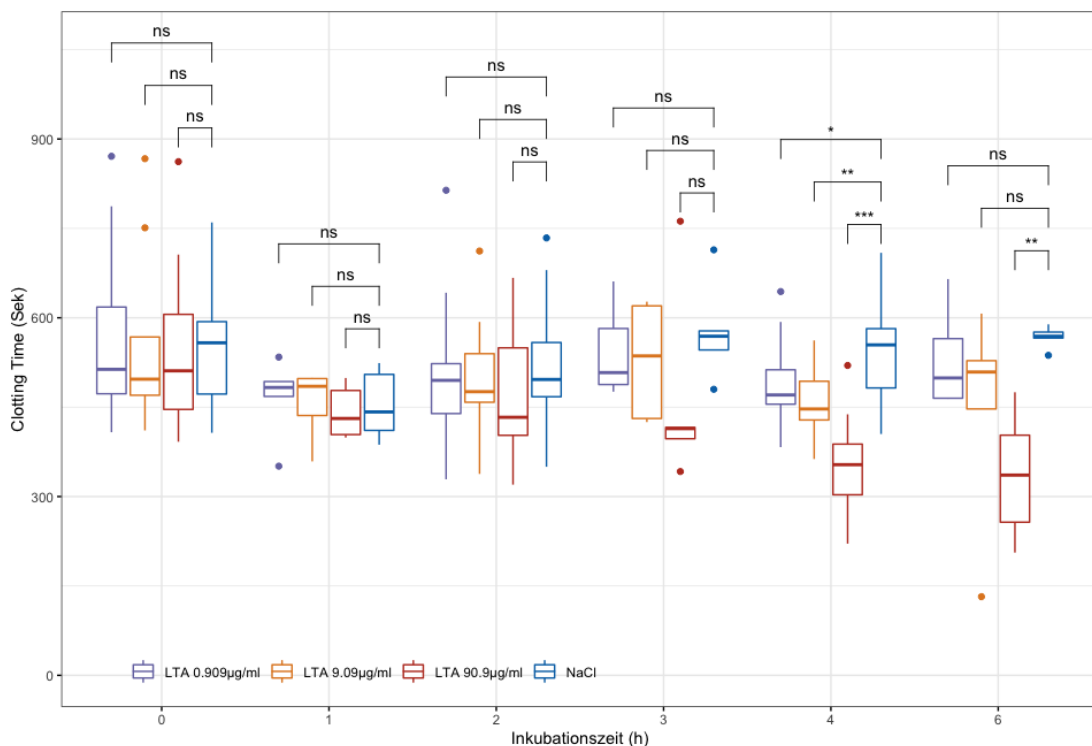


Abb. 26: Verkürzung der *Clotting Time* (CT) für alle Konzentrationstufen von LTA gegenüber Kontrolle (NaCl) (sek = Sekunden, h = Stunden, ns = nicht signifikant * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, t-Test für gepaarte Stichproben, Korrektur nach Holm, Alternative einseitig)

Im Vergleich zum Ausgangszeitpunkt gab es im Kontroll-Ansatz (NaCl) keine signifikanten Änderungen der *Clotting Time*. Es kam zu einer deutlichen Verkürzung der CT bei der höchsten Konzentrationsstufe (LTA 1 mg/ml, Endkonzentration 90,9 µg/ml), welche auch nach 2 (p = 0,012, n = 10) und 4 Stunden (p = 0,006, n = 10) Inkubation signifikante Verkürzungen im Vergleich zur *Baseline* (Stunde 0) ergaben. Optisch waren auch die Zeitpunkte 1, 3 und 6 Stunden verkürzt, aufgrund von geringerer Probandenzahl und Ausreißern kam es jedoch zu keiner statistischen Signifikanz (Abb. 27).

Die Werte nach 4 Stunden Inkubation waren gegenüber dem Ausgangswert auch bei den niedrigeren Konzentrationsstufen signifikant verkürzt (9,09 µg/ml: p = 0,021, n = 10, 0,909 µg/ml: p = 0,041, n = 10). In der geringsten Konzentrationsstufe war ebenso der CT-Wert nach 2 Stunden Inkubation im Vergleich zur *Baseline* knapp signifikant verkürzt (p = 0,047, n = 10).

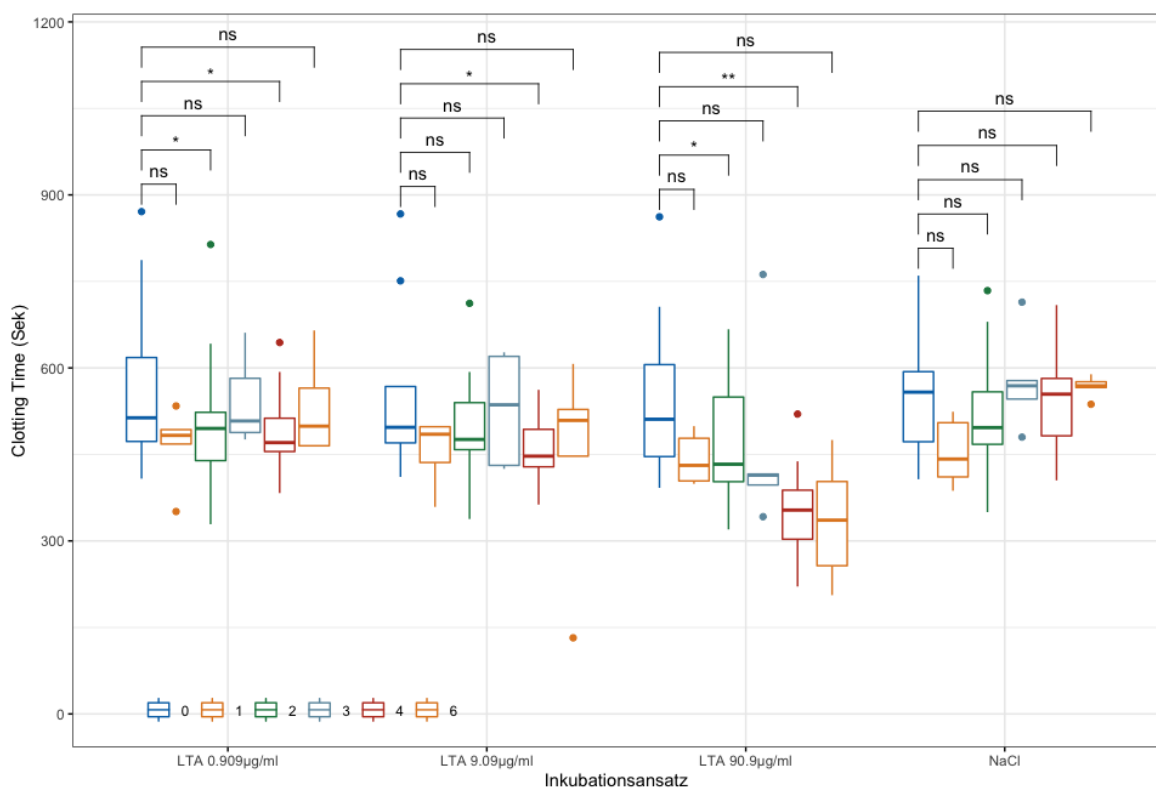


Abb. 27: Verkürzung der *Clotting Time* (CT) im Verlauf der Zeit für alle Konzentrationsstufen von LTA (90,9 µg/ml, 9,09 µg/ml, 0,909 µg/ml) gegenüber dem Ausgangswert (Inkubationszeitpunkt 0). Keine signifikanten Veränderungen für Kontrolle (NaCl) (sek = Sekunden, h = Stunden, ns = nicht signifikant, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, t-Test für gepaarte Stichproben, Korrektur nach Holm, Alternative einseitig)

Die CFT der Kontrolle zeigte eine leichte, nicht signifikante Verlängerung über die Versuchszeit hinweg ($p = 0,525$, $n = 10$). Die verschiedenen Konzentrationsstufen von LTA (1 mg/ml, 0,1 mg/ml und 0,01 mg/ml) zeigten bezüglich der CFT keine statistische Signifikanz (Abb. 28).

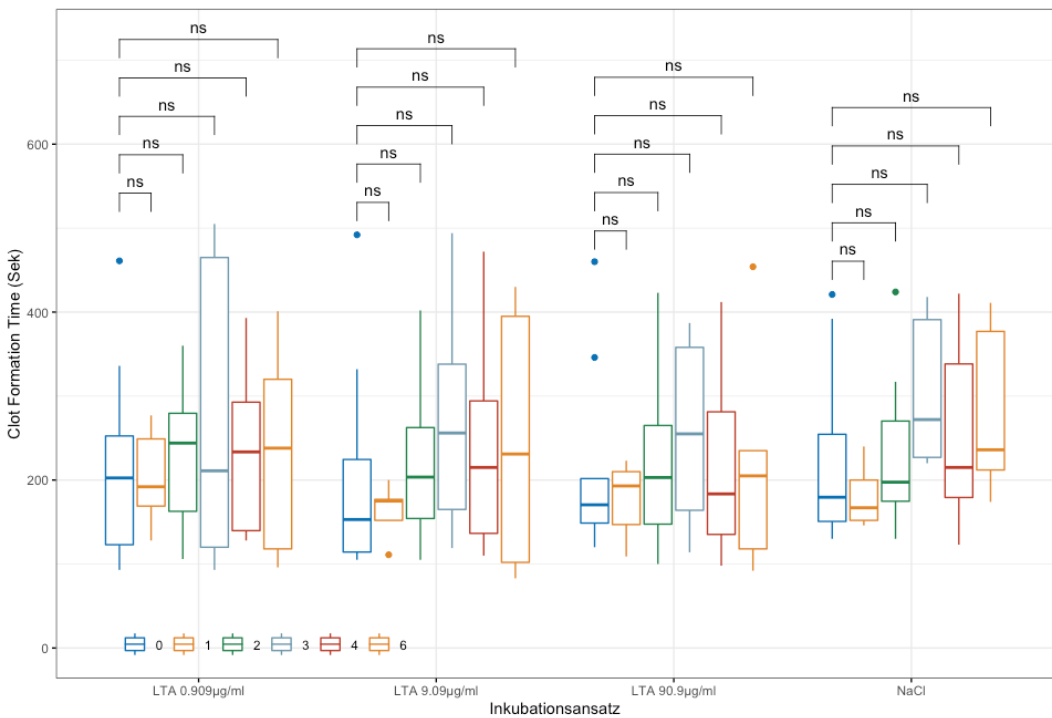


Abb. 28: Keine signifikanten Veränderungen der *Clot Formation Time* (CFT) im Verlauf der Zeit für alle Konzentrationsstufen von LTA (90,9 µg/ml, 9,09 µg/ml, 0,909 µg/ml) und Kontrolle (NaCl) gegenüber dem Ausgangswert (Inkubationszeitpunkt 0). (sek = Sekunden, h = Stunden, ns = nicht signifikant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben, Korrektur nach Holm, Alternative zweiseitig)

Inkubations-Zeitpunkt[h]	Ansatz	Variable	n	Min[s]	Mean[s]	Max[s]	Sd[s]	Median[s]
4	LTA 90.9 µg/ml	CFT	10	98	208.3	412	102.543	183.5
0	LTA 90.9 µg/ml	CFT	10	120	211.4	460	107.637	170.5

Tabelle 3: Ausgesuchte Werte der CFT für den konzentrationsabhängigen Versuch mit LTA, nach Inkubationszeitpunkt sortiert. Angegeben sind Mittelwert (Mean) mit Minimum (Min) und Maximum (Max) sowie Median und Standardabweichung (Sd). Alle Werte in Sekunden [s]. „n“ bezeichnet die Probandenanzahl, der Inkubationszeitpunkt ist in Stunden [h] angegeben.

Mit zunehmender Inkubationsdauer zeigte sich eine Verkleinerung der MCF im Kontroll-Ansatz im Vergleich zur *Baseline*, welche sich zu den Inkubationszeiten nach 2 ($p = 0,046$, $n = 1$) und 4 Stunden ($p = 0,048$, $n = 10$) knapp signifikant verkürzt zeigte (Abb. 29). Signifikante Verkürzungen im Vergleich zur *Baseline* ergaben sich in den Toxin-Ansätzen lediglich für den 2-Stunden-Wert der mittleren Konzentration (LTA $9,09 \mu\text{g/ml}$: $p = 0,047$, $n = 10$).

Im Vergleich zur Kontrolle zeigte der Ansatz mit LTA in der höchsten Konzentrationsstufe (Endkonzentration $90,0 \mu\text{g/ml}$) zu den Messzeiten nach 2 Stunden ($n = 10$, $p = 0,006$), 3 Stunden ($n = 5$, $p = 0,046$) und 4 Stunden ($n = 10$, $p = 0,003$) eine signifikant längere MCF.

Eine signifikante Verlängerung der MCF zeigte sich auch im Ansatz mit der zweithöchsten Konzentration nach 4 Stunden ($n = 10$, $p = 0,006$).

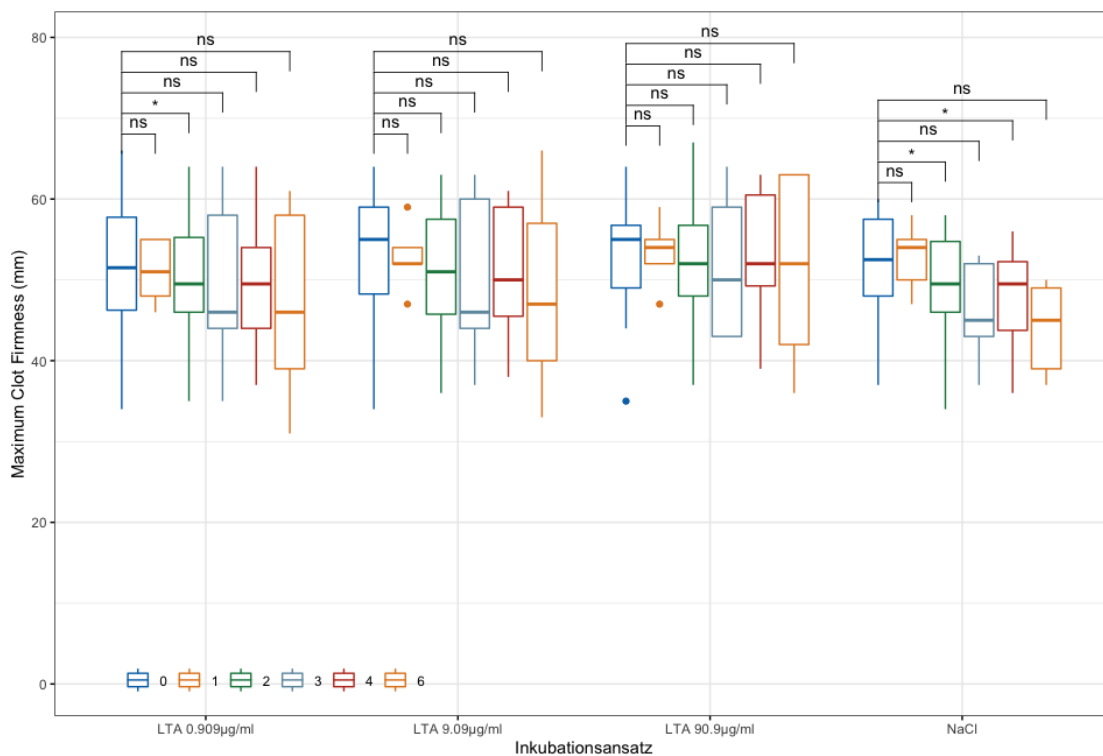


Abb. 29: Veränderungen der MCF (*Maximum Clot Firmness*) im Verlauf der Zeit für alle Konzentrationsstufen von LTA ($90,9 \mu\text{g/ml}$, $9,09 \mu\text{g/ml}$, $0,909 \mu\text{g/ml}$) und NaCl-Kontrolle. (mm = Millimeter, h = Stunden, ns = nicht signifikant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben, Korrektur nach Holm, Alternative einseitig)

Inkubations- dauer[h]	Ansatz	Variable	n	Min[mm]	Mean[mm]	Max[mm]	Sd[mm]	Median[mm]
0	LTA 9.09 µg/ml	MCF	10	34	53.2	64	9.102	55.0
0	LTA 90.9 µg/ml	MCF	10	35	52.9	64	8.582	55.0
0	NaCl	MCF	10	37	51.4	60	7.975	52.5
2	LTA 90.9 µg/ml	MCF	10	37	51.9	67	8.517	52.0
2	NaCl	MCF	10	34	49.1	58	7.430	49.5
3	LTA 90.9 µg/ml	MCF	5	43	51.8	64	9.471	50.0
3	NaCl	MCF	5	37	46.0	53	6.633	45.0
4	LTA 9.09 µg/ml	MCF	10	38	50.9	61	8.117	50.0
4	LTA 90.9 µg/ml	MCF	10	39	53.2	63	8.203	52.0
4	NaCl	MCF	10	36	48.1	56	6.420	49.5

Tabelle 4: Ausgesuchte Werte der MCF für den konzentrationsabhängigen Versuch mit LTA, nach Inkubationszeitpunkt (in Stunden = h) sortiert. Angegeben sind Mittelwert (Mean) mit Minimum (Min) und Maximum (Max) sowie Median und Standardabweichung (Sd). Alle Werte in Millimetern [mm]. „n“ bezeichnet die Probandenanzahl, die Inkubationsdauer ist in Stunden [h] angegeben.

Ohne Zusatz von Toxin (Kontrolle = NaCl) zeigte sich nach 2 und 6 Stunden Inkubation eine deutliche Verkleinerung des α -Winkel zum Ausgangswert (Abb. 30), wobei die Veränderungen jedoch statistisch nur knapp signifikant waren (2 Stunden: $p = 0,038$, $n = 10$, 6 Stunden: $p = 0,046$, $n = 5$). Zusätzlich zeigte die mittlere Konzentrationsstufe zum Inkubationszeitpunkt 4 Stunden eine knapp signifikante Verkleinerung des Winkels Alpha im Vergleich zum Ausgangswert ($p = 0,05$, $n = 10$).

Signifikante Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle gab es zu keinem Zeitpunkt für keine Konzentrationsstufe.

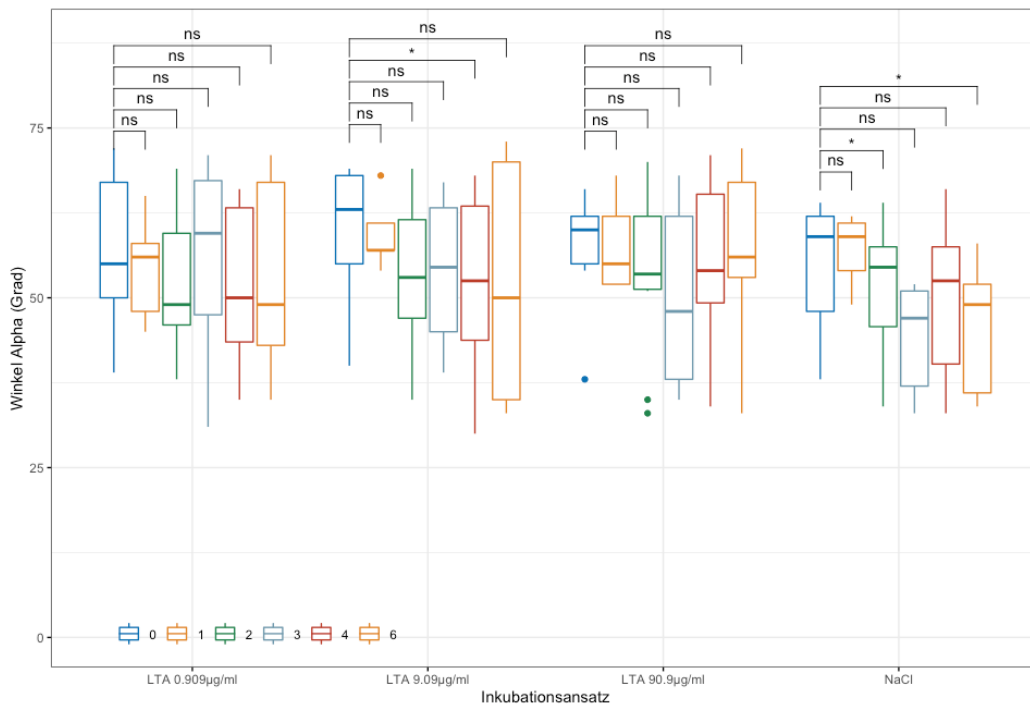


Abb. 30: Veränderungen des Alpha-Winkels im Verlauf der Zeit für alle Konzentrationstufen von LTA (90,9 µg/ml, 9,09 µg/ml, 0,909 µg/ml) und NaCl-Kontrolle. (h = Stunden, ns = nicht signifikant, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 t-Test für gepaarte Stichproben, Korrektur nach Holm, Alternative einseitig)

Inkubations- dauer[h]	Ansatz	Variable	n	Min[°]	Mean[°]	Max[°]	Sd[°]	Median[°]
0	LTA 90.9 µg/ml	alfa	9	38	57.667	66	8.602	60.0
0	NaCl	alfa	9	38	55.333	64	9.206	59.0
6	LTA 90.9 µg/ml	alfa	5	33	56.200	72	15.123	56.0
6	NaCl	alfa	5	34	45.800	58	10.402	49.0

Tabelle 5: Ausgesuchte Werte des Alpha-Winkels für den konzentrationsabhängigen Versuch mit LTA, nach Inkubationszeitpunkt (in Stunden = h) sortiert. Angegeben sind Mittelwert (Mean) mit Minimum (Min) und Maximum (Max) sowie Median und Standardabweichung (Sd). Alle Werte in Grad [°]. „n“ bezeichnet die Probandenanzahl, die Inkubationsdauer ist in Stunden [h] angegeben.

Zusammenfassend ist eine konzentrations- und zeitabhängige Veränderung der CT nach Zugabe von 1 mg/ml LTA (entsprechend einer Endkonzentration von 90,9 µg/ml) festzustellen. Mit zunehmender Konzentration kam es zu einer stärkeren Verkürzung der *Clotting Time* im Vergleich zur Kontrolle und zum Ausgangswert (Abb. 31 A). Im Verlauf konnte für die höchste Konzentrationsstufe eine Verkürzung um 30 % im Vergleich zum Ausgangswert dargestellt werden.

Die weiteren Parameter CFT, MCF und Alpha-Winkel zeigten keine eindeutigen Unterschiede

zur Kontrolle im Versuch mit LTA (Abb. 31 B bis D).

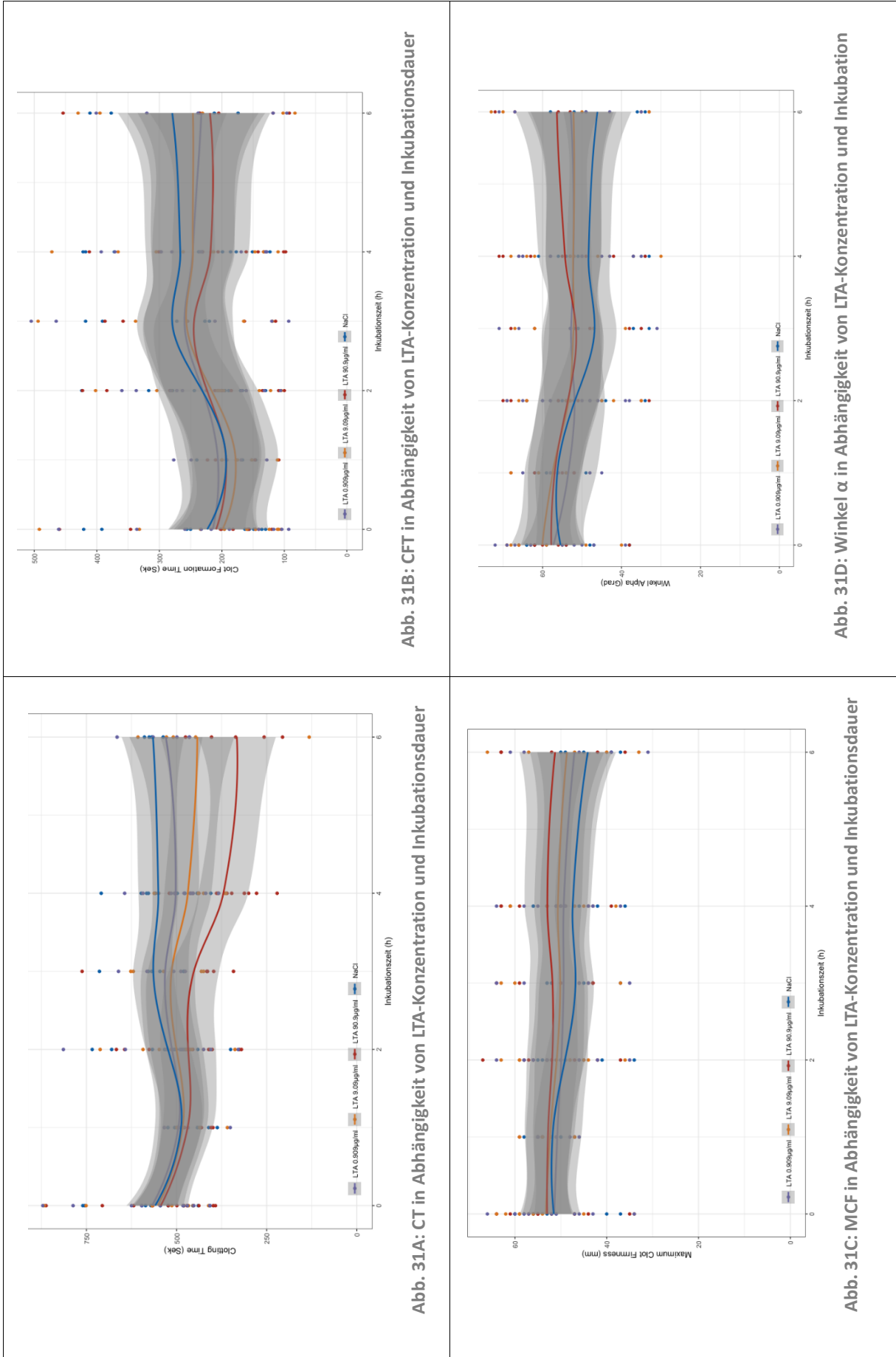


Abb. 31 A-D: Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit von LTA mit Herausstellung der CT, CFT, MCF und des Alpha-Winkels. (sek = Sekunden, mm = Millimeter, h = Stunden)

3.3 Beeinflussung der ROTEM®-Parameter durch unterschiedliche LPS-Konzentrationen

Für die Erfassung der Auswirkungen von LPS auf die ROTEM®-Parameter wurden die Versuchsreihen mit verschiedenen Konzentrationsstufen analog zu den Versuchen mit Lipoteichonsäure (LTA) durchgeführt. Dieser Versuchsansatz sollte die Vorergebnisse aus der Arbeitsgruppe reproduzieren und damit eine Vergleichbarkeit der vorliegenden Arbeit mit vorherigen Arbeiten herstellen.

Die Messungen wurden an Blutproben von insgesamt 9 Probanden durchgeführt. Die Inkubation mit LPS in drei Konzentrationsstufen oder der Kontrolle erfolgte über bis zu 8 Stunden. Nach 2, 3 und 5 Stunden wurden jeweils *Aliquots* der weiter inkubierenden Proben entnommen, um in den vier Messplätzen des ROTEM® zeitgleich alle Proben eines Messzeitpunktes analysieren zu können. Eine ausführliche Darstellung aller Messwerte und Parameter findet sich in den Tabellen 34 bis 45 im Anhang. Ausgewählte Werte werden aus Gründen der besseren Lesbarkeit nicht im Text, sondern in den Tabellen 6 bis 9 erläutert.

Bereits nach 2 Stunden zeigte sich für alle Konzentrationsstufen der LPS-Versuche eine deutliche Verkürzung der *Clotting Time* gegenüber der Kontrolle, die sich im Laufe der Zeit weiter ausprägte (Abb. 32). Dabei zeigte sich die Verkürzung mit der höchsten Signifikanz bei der Probe mit der höchsten Konzentration von LPS (1 mg/ml = Endkonzentration 90,9 µg/ml nach 2 Stunden: $p = 0,009$, $n = 8$), nach 5 Stunden war dieser Effekt sogar noch deutlicher ausgeprägt ($p = 0,001$, $n = 8$) und zeigte sich nach 8 Stunden etwas schwächer ($p = 0,024$, $n = 4$) (Abb. 32).

Eine signifikante Verkürzung der *Clotting Time* gegenüber der Kontrolle wurde auch in den Versuchsreihen der geringeren Konzentrationen bereits nach 2 Stunden festgestellt. Bei 0,1 mg/ml (Endkonzentration 9,09 µg/ml) zeigte sich nach 2 Stunden eine signifikante Verkürzung ($p = 0,009$, $n = 9$), welche sich nach 5 Stunden ($p = 0,001$, $n = 8$) und 8 Stunden weiter ausprägte ($p = 0,025$, $n = 4$). Bei 0,01 mg/ml (Endkonzentration 0,909 µg/ml) konnte eine Verkürzung der CT gegenüber der Kontrolle ebenfalls nach 2 Stunden festgestellt ($p = 0,043$, $n = 9$), genau wie bei den anderen Konzentrationen waren auch alle weiteren Messungen der CT gegenüber Kontrolle signifikant (8 Stunden: $p = 0,041$, $n = 9$).

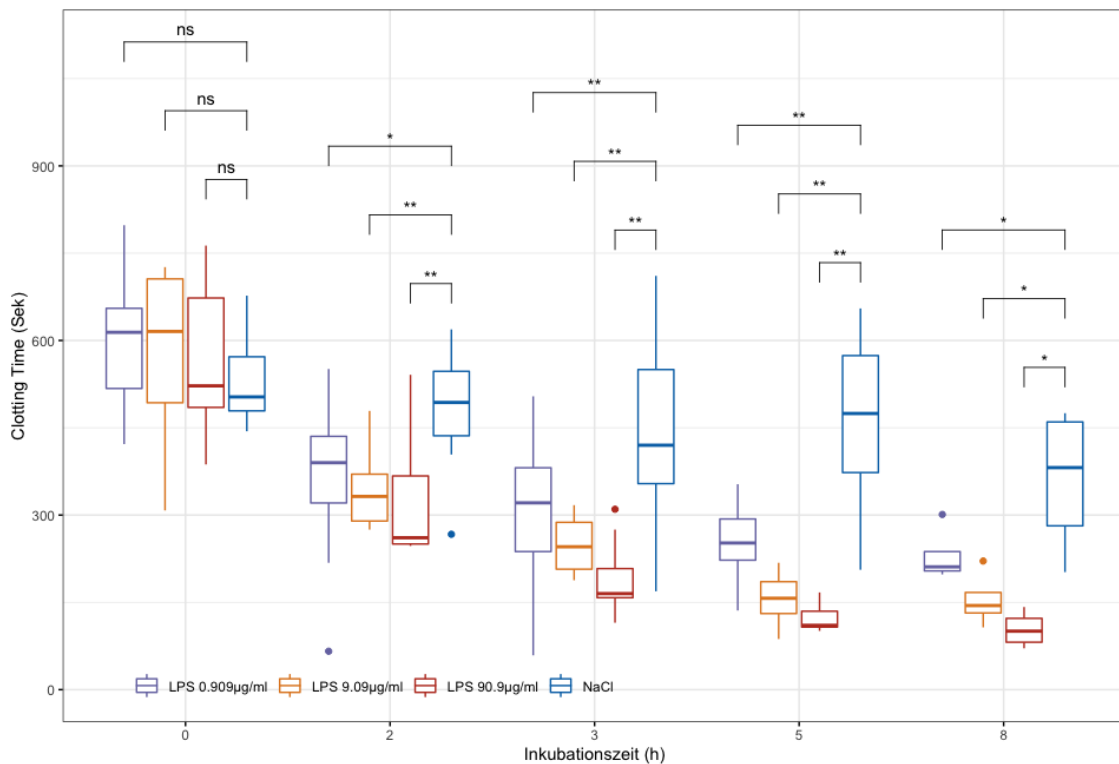


Abb. 32: Verkürzung der *Clotting Time* (CT) für alle Konzentrationstufen von LPS (Endkonzentration 90,9 µg/ml, 9,09 µg/ml, 0,909 µg/ml) gegenüber Kontrolle (NaCl) (sek = Sekunden, h = Stunden, n = nicht signifikant, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001, t-Test für gepaarte Stichproben, Korrektur nach Holm, Alternative einseitig)

Inkubations- dauer[h]	Ansatz	Variable	n	Min[s]	Mean[s]	Max[s]	Sd[s]	Median[s]
0	LPS 0.909 µg/ml	CT	8	422	593.125	798	124.673	614.0
0	LPS 9.09 µg/ml	CT	8	308	576.250	726	153.763	615.5
0	LPS 90.9 µg/ml	CT	9	387	551.556	763	129.423	522.0
0	NaCl	CT	9	444	534.556	677	76.769	503.0
2	LPS 0.909 µg/ml	CT	8	66	357.375	551	151.737	390.0
2	LPS 9.09 µg/ml	CT	8	275	345.000	479	71.402	332.0
2	LPS 90.9 µg/ml	CT	8	247	324.750	541	112.186	261.0
2	NaCl	CT	8	267	482.500	619	114.960	493.5
5	LPS 0.909 µg/ml	CT	8	136	251.500	353	66.080	252.0

Inkubations- dauer[h]	Ansatz	Variable	n	Min[s]	Mean[s]	Max[s]	Sd[s]	Median[s]
5	LPS 9.09 µg/ml	CT	8	87	155.750	218	43.601	157.0
5	LPS 90.9 µg/ml	CT	8	101	124.000	167	26.522	110.5
5	NaCl	CT	8	206	453.750	655	158.528	474.5

Tabelle 6: Ausgesuchte Werte der CT für den konzentrationsabhängigen Versuch mit LPS, nach Inkubationszeitpunkt sortiert. Angegeben für die verschiedenen Konzentrationsstufen für LPS und Kontrolle sind Mittelwert (Mean) mit Minimum (Min) und Maximum (Max) sowie Median und Standardabweichung (Sd). Alle Werte in Sekunden [s]. „n“ bezeichnet die Probandenanzahl, die Inkubationsdauer ist in Stunden [h] angegeben.

Im zeitlichen Verlauf gegen den Ausgangswert gerechnet zeigten sich hochsignifikante Verkürzungen der CT für alle Konzentrationsstufen von LPS. Im Vergleich zur *Baseline* (Ausgangswert Stunde 0) zeigte die höchste Konzentration von LPS (1 mg/ml = Endkonzentration 90,9 µg/ml) nach 2 Stunden eine signifikante Verkürzung der *Clotting Time* ($p = 0,003$, $n = 9$), diese Verkürzung nahm über die Zeit zu (5 Stunden $p < 0,0001$, $n = 8$) (Abb. 33). Nach 8 Stunden erfährt die Verkürzung der CT ihr Maximum, optisch flacht der zunächst steile Abfall der *Clotting Time* sich im Verlauf der Zeit ab (Abb. 34). Auch für die niedrigeren Konzentrationsstufen konnte diese signifikante Verkürzung der *Clotting Time* nachgewiesen werden (Endkonzentration von 9,09 µg/ml und Inkubation von 5 Stunden gegenüber *Baseline* $p < 0,0001$, $n = 8$, Endkonzentration von 0,909 µg/ml und Inkubation von 5 Stunden gegenüber *Baseline* $p < 0,0001$, $n = 8$).

Der Kontrollansatz mit NaCl zeigte keine signifikanten Veränderungen der CT im Vergleich zum Ausgangswert.

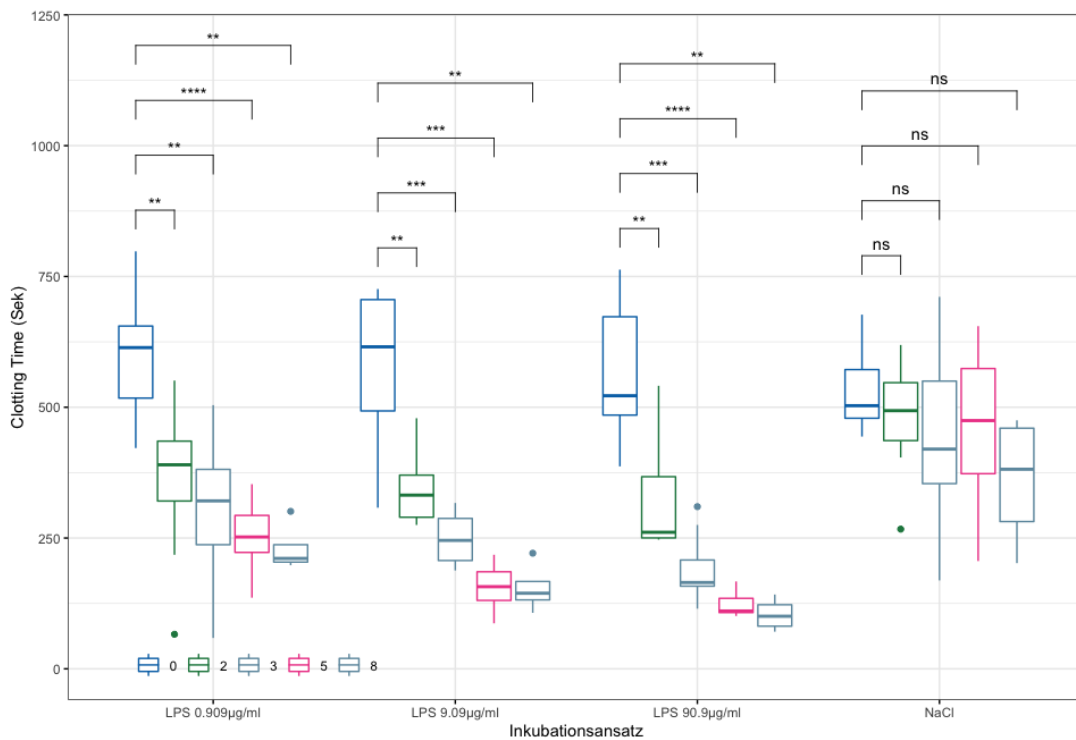


Abb. 33: Verkürzung der *Clotting Time* (CT) für alle Konzentrationstufen von LPS (Endkonzentration 90,9 µg/ml, 9,09 µg/ml, 0,909 µg/ml) und Kontrolle (NaCl) gegenüber Ausgangswert (Stunde 0) (sek = Sekunden, h = Stunden, ns = nicht signifikant, * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001, **** < 0,0001, t-Test für gepaarte Stichproben, Korrektur nach Holm, Alternative einseitig)

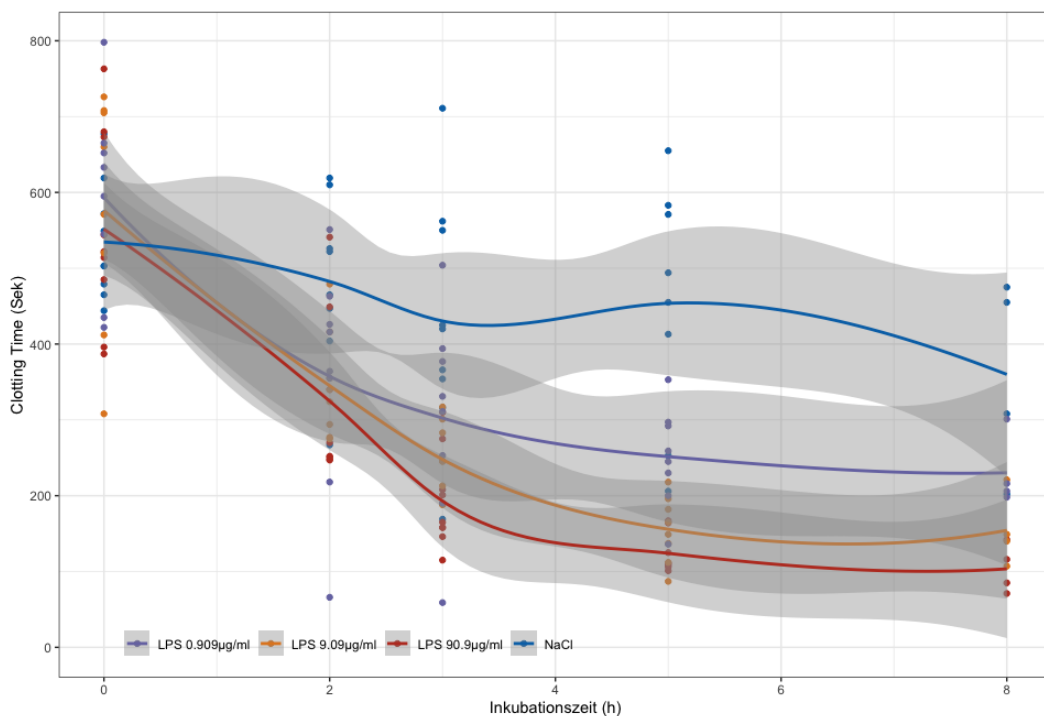


Abb. 34: Verkürzung der *Clotting Time* (CT) für alle Konzentrationstufen von LPS (Endkonzentration 90,9 µg/ml, 9,09 µg/ml, 0,909 µg/ml) und Kontrolle (NaCl) über die Inkubationszeit hinweg. Optisch ist eine Abflachung der zunächst steil abfallenden Werte auszumachen. (sek = Sekunden, h = Stunden, t-Test für gepaarte Stichproben, Korrektur nach Holm, Alternative einseitig)

Es zeigte sich beim Versuch mit der höchsten Konzentration von LPS (Endkonzentration 90,9 µg/ml) eine signifikante Verkürzung der CFT bereits nach 2 Stunden gegenüber *Baseline* ($p = 0,025$, $n = 9$), der sich über bis 5 Stunden noch weiter ausprägte ($p = 0,016$, $n = 8$). Nach 8 Stunden zeigte sich in den Messungen mit allen Konzentrationsstufen (1 mg/ml, 0,1 mg/ml und 0,01 mg/ml LPS) keine signifikanten Veränderungen der CFT (Abb. 35). Die geringste Konzentrationsstufe (0,01mg/ml, entspricht Endkonzentration 0,909 µg/ml) zeigte lediglich für die Werte nach 5 Stunden gegenüber *Baseline* ($p = 0,047$, $n = 8$) eine Signifikanz. Die mittlere Konzentrationsstufe (0,1 mg/ml = Endkonzentration 9,09 µg/ml) zeigte erste Signifikanzen bei 2 Stunden ($p = 0,016$, $n = 9$), dies konnte bis zu 5 Stunden gegenüber *Baseline* nachgewiesen werden ($p = 0,016$, $n = 8$). Hingegen zeigten die Versuche mit der Kontrollprobe ohne LPS keine statistisch signifikanten Ergebnisse (5 Stunden gegen *Baseline* $p = 1,0$, $n = 8$).

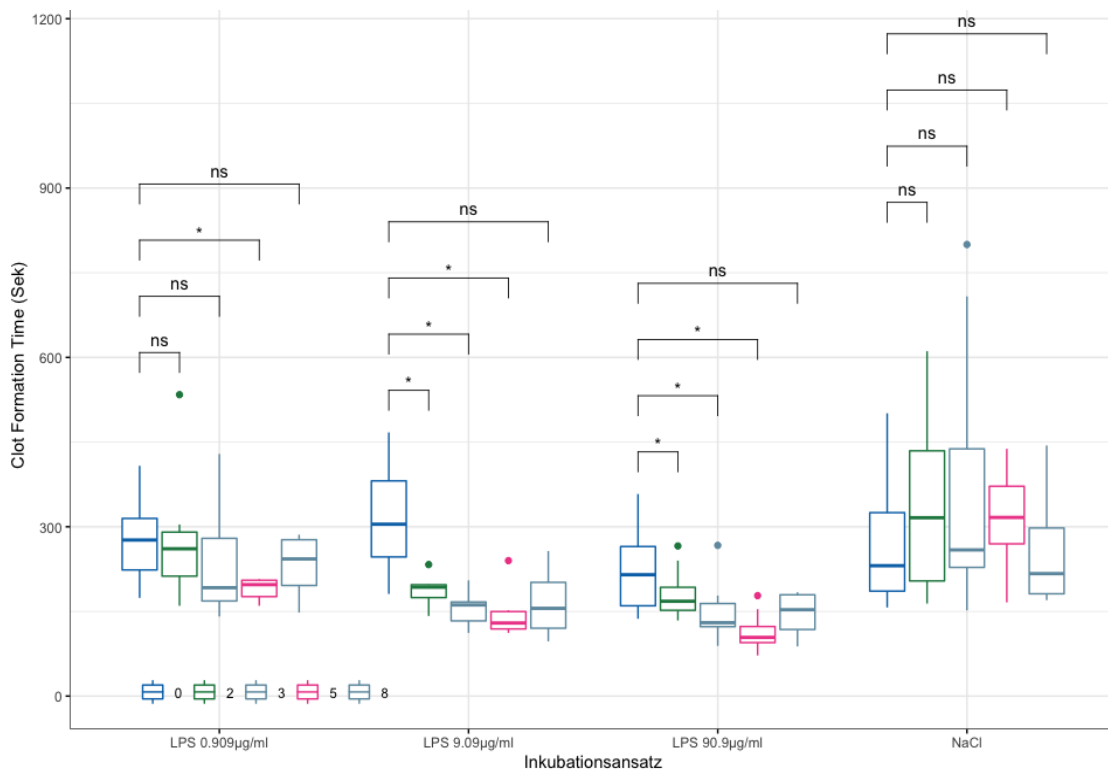


Abb. 35: Verkürzung der *Clot Formation Time* (CFT) für alle Konzentrationsstufen von LPS (Endkonzentration 90,9 µg/ml, 9,09 µg/ml, 0,909 µg/ml) und Kontrolle (NaCl) gegenüber Ausgangswert (Stunde 0) (sek = Sekunden, h = Stunden, ns = nicht signifikant, * $< 0,05$, ** $< 0,01$, *** $< 0,001$, **** $< 0,0001$, Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben, Korrektur nach Holm, Alternative einseitig).

Auch im Vergleich zur Kontrollprobe (NaCl) konnten für die beiden höchsten Konzentrationsstufen von LPS (1 mg/ml und 0,1 mg/ml, dies entspricht Endkonzentrationen von 90,9 µg/ml und 9,09 µg/ml) signifikante Verkürzungen der CFT festgestellt werden, die sich erstmals nach 2 Stunden darstellte (1 mg/ml gegen Kontrolle: $p = 0,012$, $n = 9$, 0,1 mg/ml: $p = 0,016$, $n = 9$) und ihr Maximum nach 5 Stunden Inkubation zeigte (1 mg/ml gegen Kontrolle: $p = 0,012$, $n = 8$; 0,1 mg/ml gegen Kontrolle: $p = 0,012$, $n = 8$). Die geringste Konzentrationsstufe zeigte erstmals nach 3 Stunden Inkubation eine signifikante Verkürzung gegenüber der Kontrolle (0,01 mg/ml: $p = 0,039$, $n = 9$), der Wert zeigte sich maximal nach 5 Stunden ($p = 0,02$, $n = 8$).

Inkubations-dauer[h]	Ansatz	Variable	n	Min[s]	Mean[s]	Max[s]	Sd[s]	Median[s]
0	LPS 9.09 µg/ml	CFT	8	181	315.250	467	94.607	304.5
0	LPS 90.9 µg/ml	CFT	9	137	227.556	358	74.584	215.0
0	NaCl	CFT	9	157	272.556	501	120.108	231.0
2	LPS 90.9 µg/ml	CFT	8	134	181.375	266	46.934	168.0
2	NaCl	CFT	8	164	339.625	611	157.359	316.0
5	LPS 0.909 µg/ml	CFT	8	160	190.500	207	17.768	197.5
5	LPS 9.09 µg/ml	CFT	8	112	143.250	240	41.999	129.5
5	LPS 90.9 µg/ml	CFT	8	72	113.000	178	36.008	104.0
5	NaCl	CFT	8	166	311.875	438	94.608	316.5

Tabelle 7: Ausgesuchte Werte der CFT für den konzentrationsabhängigen Versuch mit LPS, nach Inkubationszeitpunkt sortiert. Angegeben für die verschiedenen Konzentrationsstufen für LPS und Kontrolle sind Mittelwert (Mean) mit Minimum (Min) und Maximum (Max) sowie Median und Standardabweichung (Sd). Alle Werte in Sekunden [s]. „n“ bezeichnet die Probandenanzahl, die Inkubationsdauer ist in Stunden [h] angegeben.

Bei Zugabe von LPS zeigte sich eine mit der Inkubationsdauer zunehmende Vergrößerung der MCF, welche in allen Konzentrationsstufen nach 2 Stunden Inkubation signifikante Ergebnisse im Vergleich zur Kontrolle zeigte (für alle Konzentrationsstufen $p = 0,035$, $n = 9$ gegen Kontrolle nach 2 Stunden). Diese Verlängerung der MCF vergrößerte sich im weiteren Verlauf und erreichte ihr Maximum nach 5 Stunden (alle Konzentrationsstufen gegen Kontrolle bei 5

Stunden n = 8, p = 0,021). Die 8-Stunden-Werte zeigten sich hingegen nicht signifikant (Abb. 36).

Gegenüber dem Ausgangswert (Stunde 0) zeigten sich lediglich zwei Werte signifikant verlängert, jeweils die MCF nach 5 Stunden Inkubation der beiden höchsten Konzentrationsstufen (90,9 µg/ml: p = 0,044, n = 9 und 9,09 µg/ml: p = 0,031, n = 8).

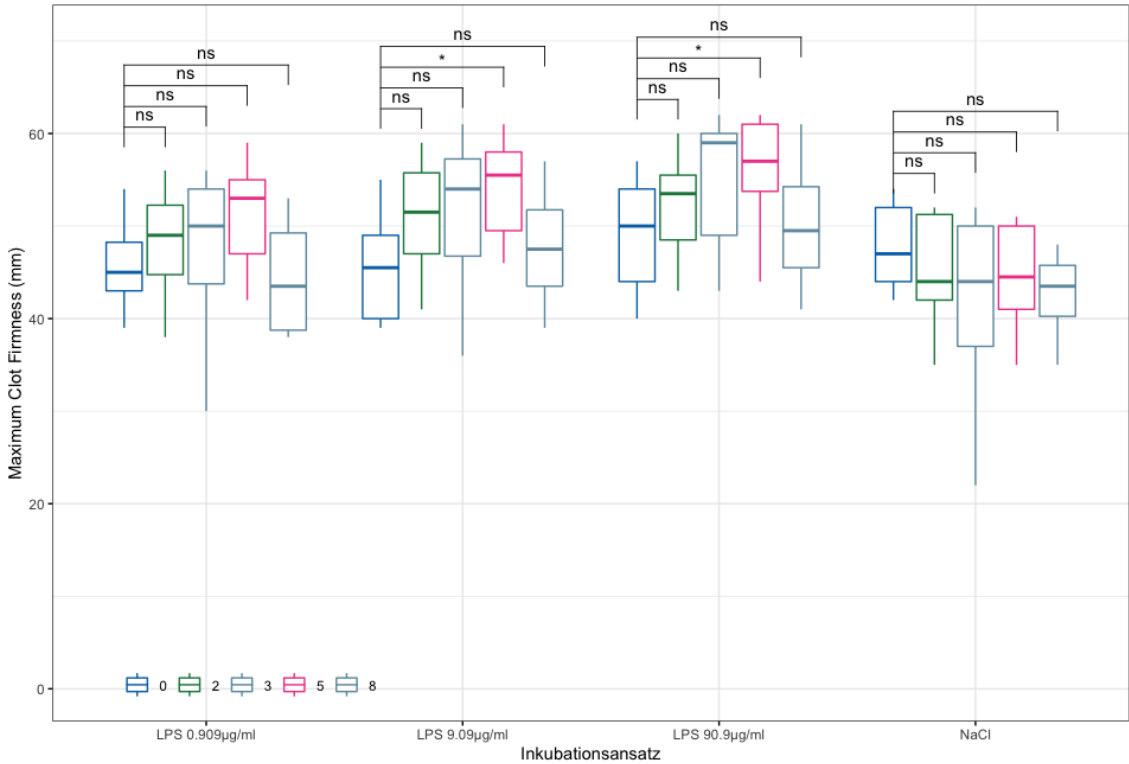


Abb. 36: Vergrößerung der *Maximum Clot Firmness* (MCF) für alle Konzentrationstufen von LPS (Endkonzentration 90,9 µg/ml, 9,09 µg/ml, 0,909 µg/ml) und Kontrolle (NaCl) gegenüber Ausgangswert (Stunde 0) (mm = Millimeter, h = Stunden, ns = nicht signifikant, * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001, **** < 0,0001, Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben, Korrektur nach Holm, Alternative einseitig)

Inkubations- dauer[h]	Ansatz	Variable	n	Min[mm]	Mean[mm]	Max[mm]	Sd[mm]	Median[mm]
0	LPS 0.909 µg/ml	MCF	8	39	45.500	54	4.899	45.0
0	LPS 9.09 µg/ml	MCF	8	39	45.375	55	5.731	45.5
0	LPS 90.9 µg/ml	MCF	9	40	49.222	57	6.140	50.0
0	NaCl	MCF	9	42	47.667	54	4.873	47.0

Inkubations- dauer[h]	Ansatz	Variable	n	Min[mm]	Mean[mm]	Max[mm]	Sd[mm]	Median[mm]
2	LPS 0.909 µg/ml	MCF	8	38	48.500	56	6.141	49.0
2	LPS 9.09 µg/ml	MCF	8	41	51.250	59	6.112	51.5
2	LPS 90.9 µg/ml	MCF	8	43	52.000	60	6.000	53.5
2	NaCl	MCF	8	35	45.000	52	6.279	44.0
5	LPS 0.909 µg/ml	MCF	8	42	51.125	59	5.890	53.0
5	LPS 9.09 µg/ml	MCF	8	46	54.000	61	5.425	55.5
5	LPS 90.9 µg/ml	MCF	8	44	56.125	62	5.939	57.0
5	NaCl	MCF	8	35	44.625	51	5.630	44.5

Tabelle 8: Ausgesuchte Werte der MCF für den Versuch mit LPS, nach Inkubationszeitpunkt sortiert. Angegeben für die verschiedenen Konzentrationsstufen für LPS und Kontrolle sind Mittelwert (Mean) mit Minimum (Min) und Maximum (Max) sowie Median und Standardabweichung (Sd). Alle Werte in Millimetern [s]. „n“ bezeichnet die Probandenanzahl, die Inkubationsdauer ist in Stunden [h] angegeben.

In Bezug auf den Alpha-Winkel zeigte sich eine optische Winkelvergrößerung im Vergleich zur Kontrolle für alle Konzentrationsstufen. Bei dem Ansatz mit der mittleren Konzentration (Endkonzentration 9,09 µg/ml: $p = 0,006$, $n = 9$) kam es erstmals nach 3 Stunden Inkubation zu einer signifikanten Winkelvergrößerung im Vergleich zur Kontrolle, bei den übrigen Ansätzen erst nach 5 Stunden (90,9 µg/ml: $p = 0,002$, $n = 9$ und 9,09 µg/ml: $p = 0,005$, $n = 9$ und 0,909 µg/ml: $p = 0,041$, $n = 9$). Zum Zeitpunkt nach 8 Stunden Inkubation zeigte sich lediglich in der höchsten Konzentrationsstufe eine signifikante Vergrößerung gegenüber der Kontrolle ($p = 0,044$, $n = 4$).

Im Vergleich zum Ausgangswert gab es in der niedrigsten Konzentrationsstufe sowie dem Kontroll-Ansatz kein signifikantes Ergebnis. Für die beiden höchsten Konzentrationsstufen zeigten sich erstmals signifikante Winkelvergrößerungen nach 3 Stunden Inkubation (90,9 µg/ml: $p = 0,012$, $n = 9$ und 9,09 µg/ml: $p = 0,013$, $n = 9$). Diese Signifikanzen konnten bis zum Inkubationszeitpunkt 8 Stunden nachgewiesen werden (90,9 µg/ml: $p = 0,012$, $n = 9$ und 9,09 µg/ml: $p = 0,013$, $n = 9$) (Abb. 37).

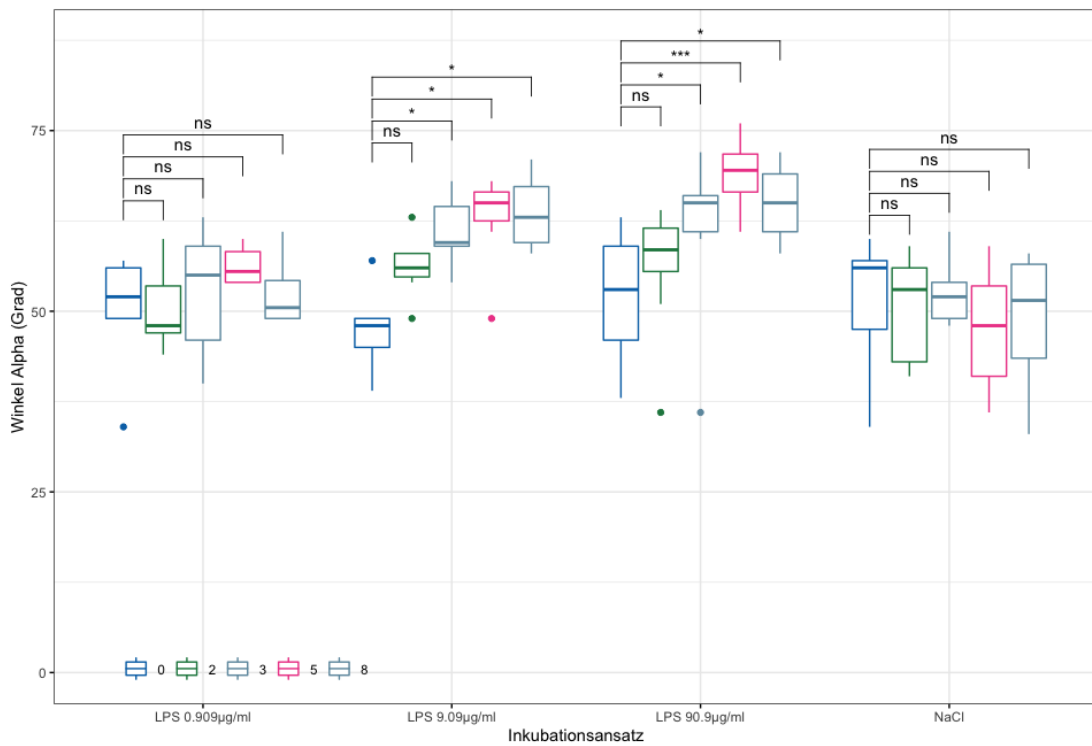


Abb. 37: Vergrößerung des Alpha-Winkels für alle Konzentrationsstufen von LPS und Kontrolle (NaCl) gegenüber Ausgangswert (Stunde 0) (h = Stunden, ns = nicht signifikant, * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001, t-Test für gepaarte Stichproben, Korrektur nach Holm, Alternative einseitig)

Inkubations- dauer[h]	Ansatz	Variable	n	Min[°]	Mean[°]	Max[°]	Sd[°]	Median[°]
0	LPS 90.9 µg/ml	alfa	9	38	51.444	63	8.734	53.0
0	NaCl	alfa	7	34	51.286	60	9.178	56.0
5	LPS 9.09 µg/ml	alfa	8	49	63.125	68	6.198	65.0
5	LPS 90.9 µg/ml	alfa	8	61	68.875	76	5.249	69.5
5	NaCl	alfa	6	36	47.500	59	8.894	48.0

Tabelle 9: Ausgesuchte Werte des Alpha-Winkels im Versuch mit LPS für alle Konzentrationsstufen und Kontrolle (NaCl), nach Inkubationszeitpunkt sortiert. Angegeben sind Mittelwert (Mean) mit Minimum (Min) und Maximum (Max) sowie Median und Standardabweichung (Sd). Alle Werte in Grad [°]. „n“ bezeichnet die Probandenanzahl, die Inkubationsdauer ist in Stunden [h] angegeben.

Zusammenfassend ist eine deutliche konzentrations- und zeitabhängige Veränderung der CT nach Zugabe von 1 mg/ml LPA (entsprechend einer Endkonzentration von 90,9 µg/ml) festzustellen. Mit zunehmender Konzentration kam es zu einer stärkeren Verkürzung der *Clotting Time* im Vergleich zur Kontrolle und zum Ausgangswert (Abb. 38A). Im Verlauf konnte für die höchste Konzentrationsstufe eine Verkürzung um 78 % im Vergleich zum Ausgangswert dargestellt werden (Abb. 38 A).

Für die CFT konnte für die höchste Konzentrationsstufe eine signifikante Verkürzung nach 5 Stunden Inkubation nachgewiesen werden. Ebenso zeigte sich nach 5 Stunden eine signifikante Verlängerung der MCF. Dieser Effekt war bei den niedrigeren Konzentrationsstufen angedeutet, teilweise aber nicht signifikant. Für den Winkel Alpha zeigte sich nach 5 Stunden Inkubation mit der höchsten Konzentrationsstufe sogar eine hochsignifikante Vergrößerung. Für andere Inkubations- und Konzentrationsstufen zeigte sich diese Veränderung ebenfalls, jedoch in abgeschwächter Form (Abb. 38 B bis D).

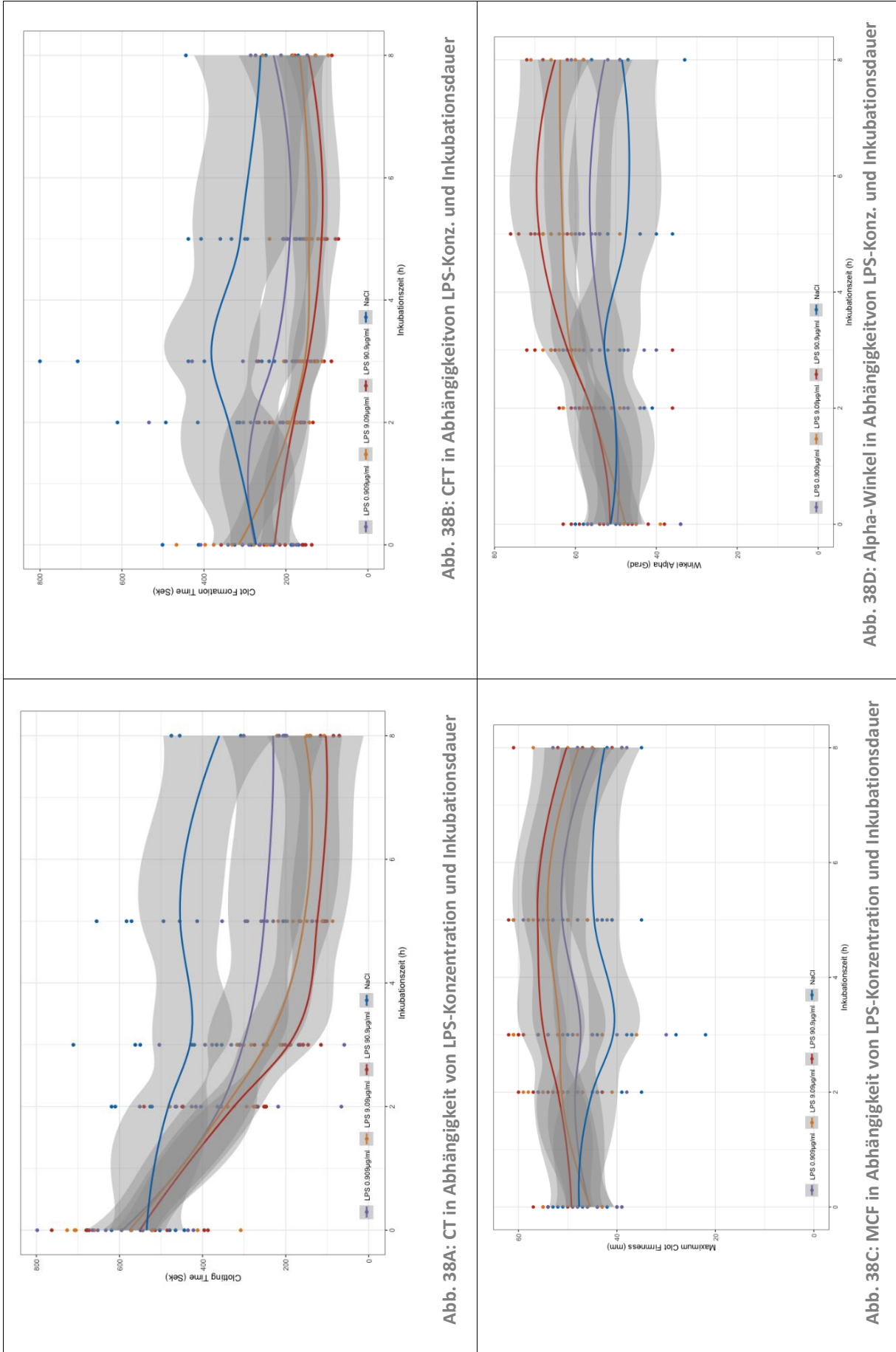


Abb. 38 A-D: Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit von LPS mit Herausstellung der CT, CFT, MCF und des Alpha-Winkels (sek = Sekunden, mm = Millimeter, h = Stunden)

3.4 Zeitabhängigkeiten der ROTEM®-Parameter in der Langzeitinkubation mit LTA

Im weiteren Verlauf wurde der Einfluss der Inkubationsdauer mit LTA auf die Parameter CT, CFT, MCF und Alpha-Winkel untersucht. Hierfür wurde die in dem ersten Versuch getestete höchste Konzentrationsstufe von LTA (1 mg/ml = Endkonzentration 90,9 µg/ml) gegen Kontrolle (NaCl) getestet.

Die Messungen wurden an Blutproben von 6 Probanden durchgeführt. Die Inkubation mit 1 mg/ml LTA oder der Kontrolle (NaCl) erfolgte über 24 Stunden bei 37° C. Nach 8 und 12 Stunden wurden jeweils *Aliquots* der weiter inkubierten Proben entnommen. Eine ausführliche Darstellung aller Messwerte und Parameter findet sich in den Tabellen 46 bis 57 im Anhang. Ausgewählte Werte werden aus Gründen der besseren Lesbarkeit nicht im Text, sondern in den Tabellen 10 bis 12 erläutert.

Wie aus den vorhergegangenen Versuchen anzunehmen, zeigte sich eine starke Verkürzung CT des LTA-Ansatzes nach 8 Stunden im Vergleich zum Ausgangswert ($p = 0,016$, $n = 6$). Die Werte nach 12 Stunden ($p = 0,004$, $n = 6$) und 24 Stunden ($p = 0,002$, $n = 6$) Inkubation waren ebenfalls signifikant verkürzt zum Ausgangswert, zeigten in der optischen Kontrolle jedoch ein Plateau (Abb. 39). Die Kontroll-Proben mit NaCl zeigten keine signifikante Veränderung zum Ausgangswert. Signifikant verkürzt zeigten sich auch der 12-Stunden-Wert ($p = 0,010$, $n = 6$) und 24-Stunden-Wert ($p = 0,002$, $n = 6$) des LTA-Ansatzes gegenüber der Kontrolle (Abb. 40).

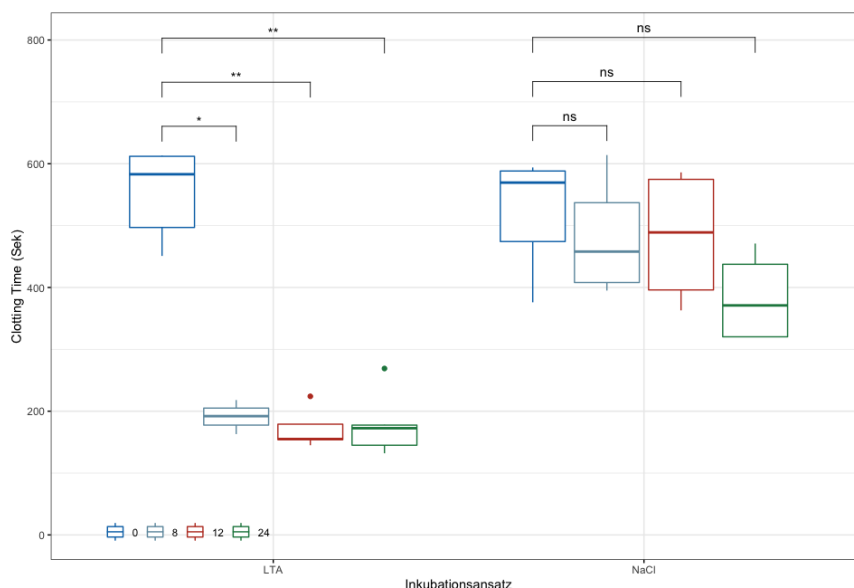


Abb. 39: Verkürzung der *Clotting Time* (CT) für LTA (90,9 µg/ml) und NaCl über 0,8,12 und 24 Stunden. (sek = Sekunden, h = Stunden, ns = nicht signifikant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, T-Test für gepaarte Stichproben, Korrektur nach Holm, Alternative einseitig)

Ansatz	Inkubations- dauer[h]	Variable	n	Min[s]	Mean[s]	Max[s]	Sd[s]	Median[s]
LTA 90.9 µg/ml	0	CT	5	451	551.200	613	73.323	583.0
NaCl	0	CT	6	376	524.333	594	92.097	569.5
LTA 90.9 µg/ml	12	CT	5	145	171.400	224	31.989	155.0
NaCl	12	CT	4	363	481.750	586	113.318	489.0
LTA 90.9 µg/ml	24	CT	6	132	176.833	269	49.305	172.5
NaCl	24	CT	6	320	382.667	471	70.099	371.0

Tabelle 10: Ausgesuchte Werte der CT im Langzeit-Versuch mit LTA 1 mg/ml (Endkonzentration 90,9 µg/ml) und Kontrolle (NaCl), nach Inkubationszeitpunkt sortiert. Angegeben sind Mittelwert (Mean) mit Minimum (Min) und Maximum (Max) sowie Median und Standardabweichung (Sd). Alle Werte in Sekunden [s]. „n“ bezeichnet die Probandenanzahl, die Inkubationsdauer ist in Stunden [h] angegeben.

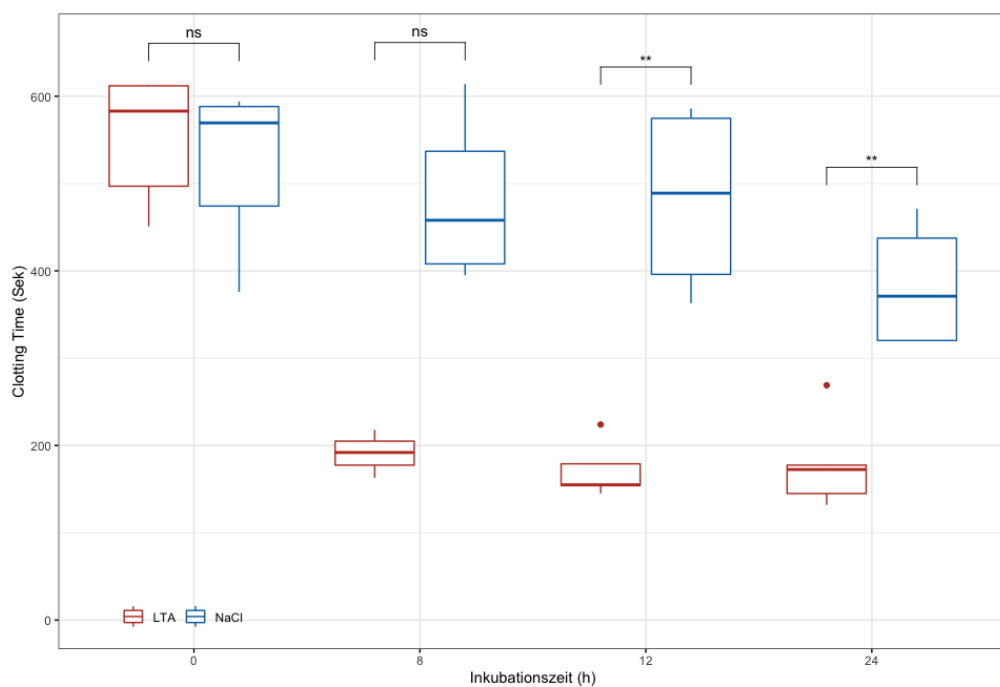


Abb. 40: Boxplot zum zeitlichen Verlauf der *Clotting Time* mit LTA (90,9 µg/ml) und NaCl über 0,8,12 und 24 Stunden. (sek = Sekunden, h = Stunden, ns = nicht signifikant, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, T-Test für gepaarte Stichproben, Korrektur nach Holm, Alternative einseitig)

Bei der Untersuchung der CFT-Werte kam es bei keiner der untersuchten Messwerte zu einer signifikanten Veränderung bei dem LTA-Ansatz oder der Kontrolle. Rein visuell zeigt sich in der Grafik jedoch eine Verlängerung der NaCl-Werte bis 12 Stunden, welche nach 24 Stunden rückläufig war. Die CFT-Werte des Versuches mit LTA als Toxin zeigten auch optisch keine signifikanten Veränderungen (Abb. 41).

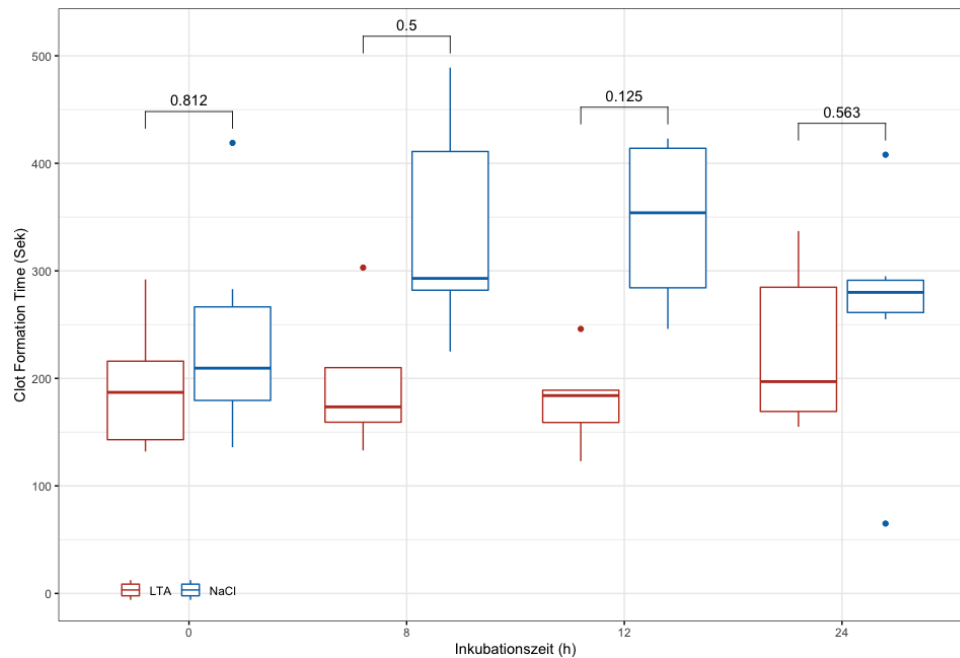


Abb. 41: Boxplot zum zeitlichen Verlauf der *Clot Formation Time* mit LTA (90,9 µg/ml) und NaCl über 0,8,12 und 24 Stunden. (sek = Sekunden, h = Stunden, ns = nicht signifikant, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben, Korrektur nach Holm, Alternative zweiseitig)

Ansatz	Inkubations- dauer[h]	Variable	n	Min[s]	Mean[s]	Max[s]	Sd[s]	Median[s]
LTA 90.9 µg/ml	0	CFT	5	132	194.000	292	64.386	187.0
NaCl	0	CFT	6	136	238.167	419	101.275	209.5
LTA 90.9 µg/ml	12	CFT	5	123	180.200	246	45.119	184.0
NaCl	12	CFT	4	246	344.250	423	86.685	354.0
LTA 90.9 µg/ml	24	CFT	6	155	226.667	337	77.446	197.0
NaCl	24	CFT	6	65	263.833	408	111.257	280.0

Tabelle 11: Ausgesuchte Werte der CFT im Langzeit-Versuch mit LTA 1 mg/ml (Endkonzentration 90,9 µg/ml) und Kontrolle (NaCl), nach Inkubationszeitpunkt sortiert. Angegeben sind Mittelwert (Mean) mit Minimum (Min) und Maximum (Max) sowie Median und Standardabweichung (Sd). Alle Werte in Sekunden [s]. „n“ bezeichnet die Probandenanzahl, die Inkubationsdauer ist in Stunden [h] angegeben.

Keine der hier durchgeführten Untersuchungen der MCF führte zu einem statistisch signifikanten Ergebnis (Abb. 42).

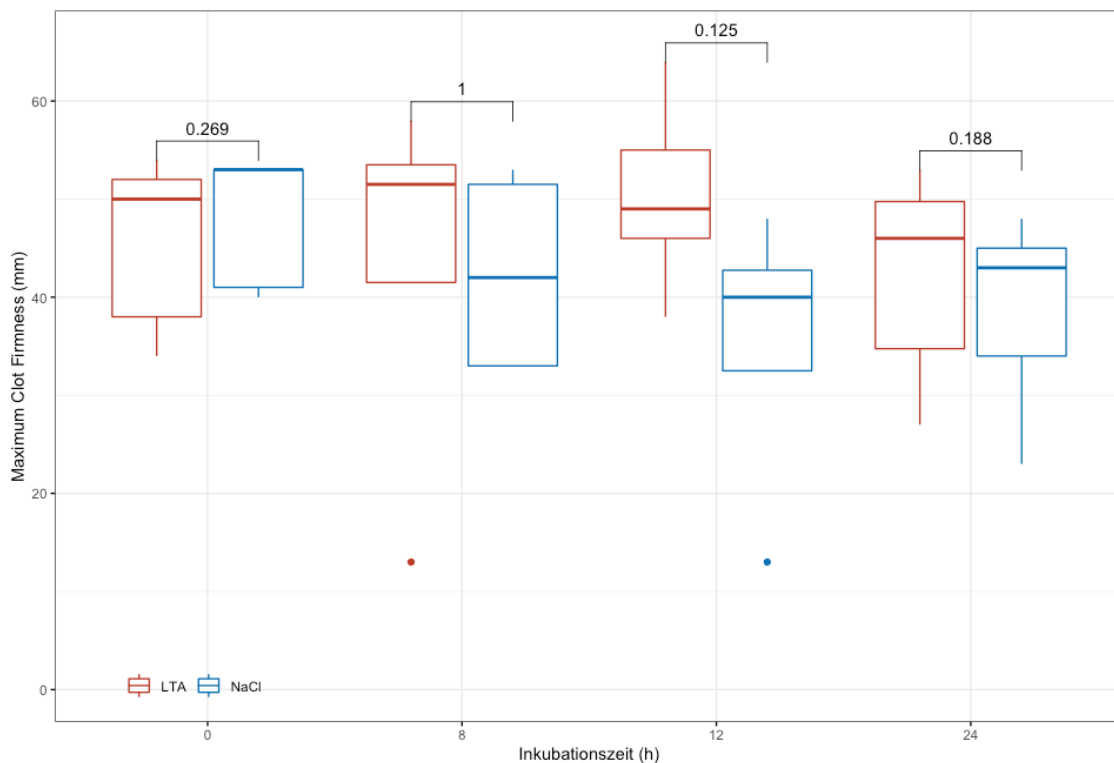


Abb. 42: Boxplot zum zeitlichen Verlauf der MCF mit LTA (90,9 µg/ml) und NaCl über 0,8,12 und 24 Stunden. (mm = Millimeter, h = Stunden, ns = nicht signifikant, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben, Korrektur nach Holm, Alternative zweiseitig)

Der Alpha-Winkel zeigte bei Zugabe von 1 mg/ml LTA (Endkonzentration 90,9 µg/ml) eine Konstanz der Werte ohne signifikante Änderungen. Die Kontroll-Werte (NaCl) verkleinerten sich im Verlauf der Messungen jedoch deutlich (alle Messzeitpunkte signifikant verkleinert zur *Baseline* mit $p = 0,03$, $n = 6$) (Abb. 43).

Der 24-Stunden-Messpunkt des Alpha-Winkels zeigte eine signifikante Verkleinerung des NaCl-Messwertes im Vergleich zu LTA ($p < 0,0001$, $n = 6$). Rein optisch zeigten sich die Kurven ab 8 Stunden parallel verlaufend.

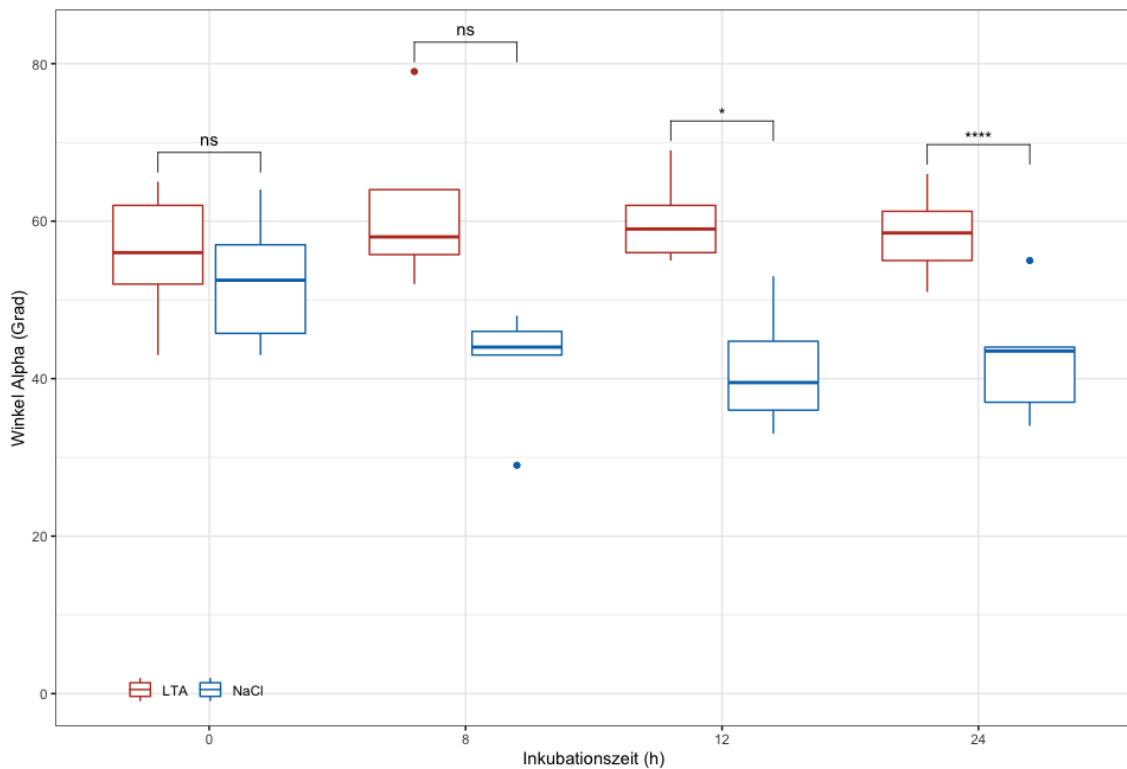


Abb. 43: Boxplot zum zeitlichen Verlauf des Alpha-Winkels mit LTA (90,9 µg/ml) und NaCl über 0,8,12 und 24 Stunden. (h = Stunden, ns = nicht signifikant, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, T-Test für gepaarte Stichproben, Korrektur nach Holm, Alternative einseitig)

Ansatz	Inkubations- dauer[h]	Variable	n	Min[°]	Mean[°]	Max[°]	Sd[°]	Median[°]
LTA 90.9 µg/ml	0	alfa	5	43	55.600	65	8.678	56.0
NaCl	0	alfa	6	43	52.333	64	8.116	52.5
LTA 90.9 µg/ml	24	alfa	6	51	58.333	66	5.391	58.5
NaCl	24	alfa	6	34	42.500	55	7.609	43.5

Tabelle 12: Ausgesuchte Werte des Winkels Alpha im Langzeit-Versuch mit LTA 1 mg/ml (Endkonzentration 90,9 µg/ml) und Kontrolle (NaCl), nach Inkubationszeitpunkt sortiert. Angegeben sind Mittelwert (Mean) mit Minimum (Min) und Maximum (Max) sowie Median und Standardabweichung (Sd). Alle Werte in Grad [°]. „n“ bezeichnet die Probandenanzahl, die Inkubationsdauer ist in Stunden [h] angegeben.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass nach 8 Stunden Inkubation die gemessenen Veränderungen der *Clotting Time* ein Plateau erreichen. Nach 8 Stunden Inkubation treten keine weitergehenden Veränderungen auf (Abb. 44 A).

Die CFT zeigte im Toxin-Ansatz nach 8 Stunden Inkubation eine signifikante Verkürzung gegenüber der Kontrolle, während die CFT des NaCl-Ansatzes sich deutlich verlängerte. Im Vergleich zum Ausgangswert gibt es im Verlauf von 24 Stunden keine Veränderungen der CFT im Toxin-Ansatz. Auch die MCF zeigte weder zur Kontrolle noch zum Ausgangswert signifikante Veränderungen über die lange Inkubationsdauer. Ebenso zeigte der Alpha-Winkel keine statistischen Veränderungen über die Zeit hinweg. Interessant ist jedoch, dass sowohl der Alpha-Winkel als auch die MCF der Kontroll-Versuche im Verlauf der 24 Stunden signifikant abnimmt (Abb. 44 B bis D).

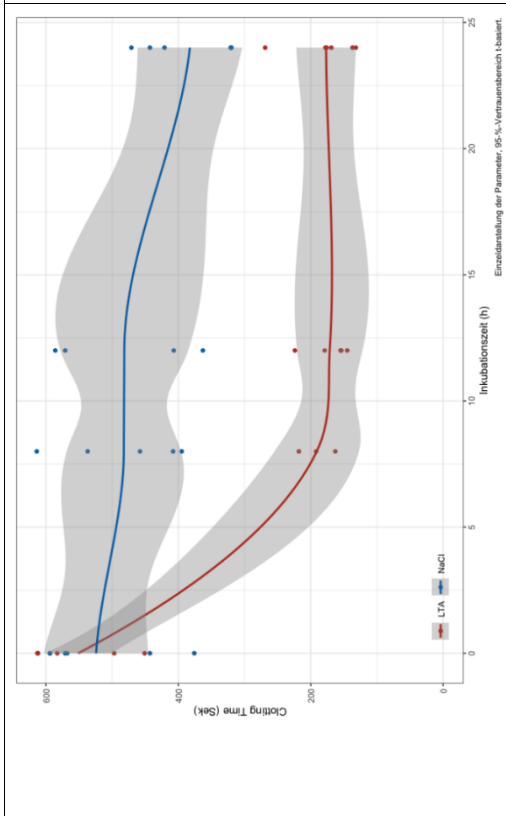


Abb. 44A: Zeitliche Entwicklung der Clotting Time

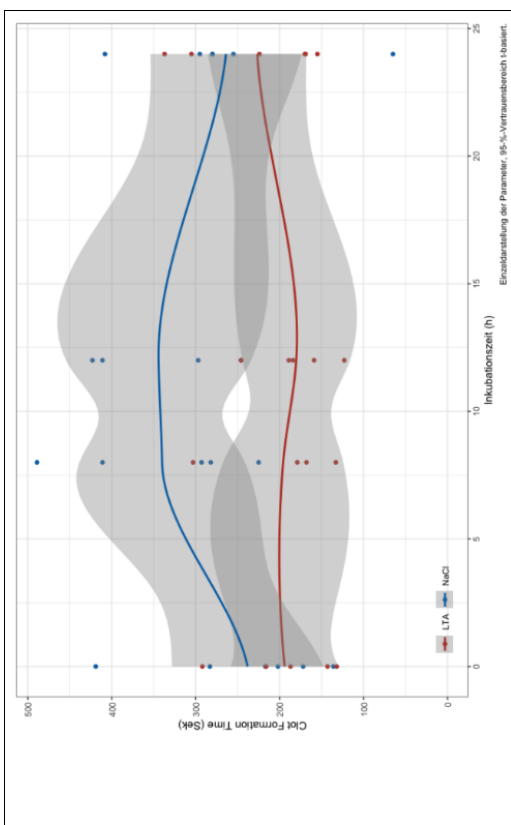


Abb. 44B: Zeitliche Entwicklung der Clot Formation Time

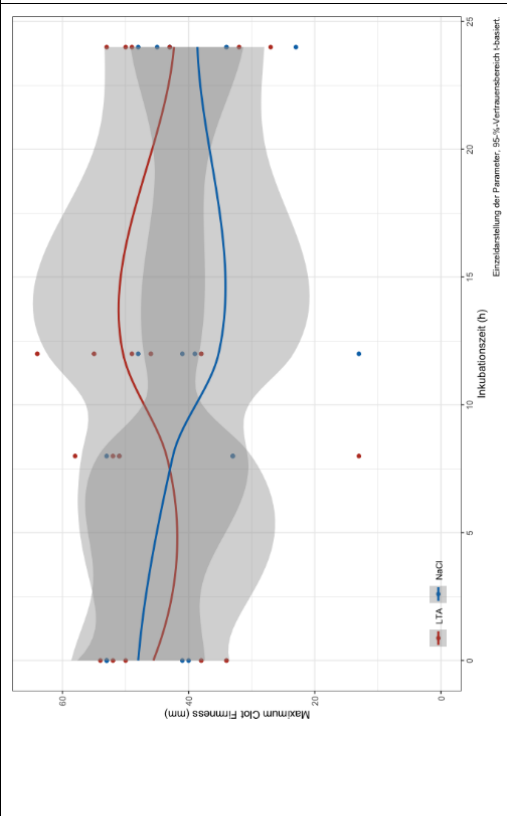


Abb. 44C: Zeitliche Entwicklung der MCF

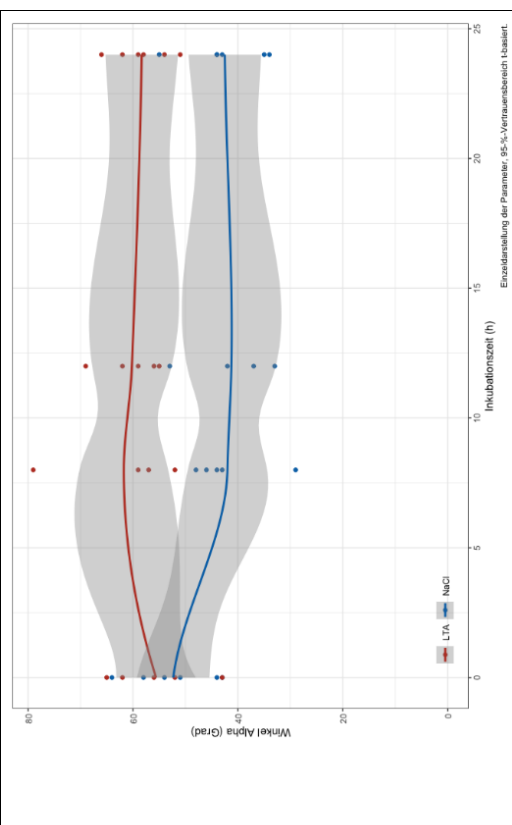


Abb. 44D: Zeitliche Entwicklung des Alpha-Winkels

Abb. 44A-D: Verlauf relevanter Parameter im ROTEM® bei Inkubation von Proben ohne LTA und Proben mit LTA (Konzentration 1 mg/ml) über 24 Stunden (sek = Sekunden, mm = Millimeter, h = Stunden)

3.5 Beeinflussung der ROTEM®-Parameter durch Costimulation mit LTA und LPS

Bei dieser Versuchsreihe wurde eine Costimulation mit LTA und LPS durchgeführt.

Es wurde daher die höchste in den vorangegangenen Experimenten benutzte Konzentrationsstufe von LPS (1 mg/ml) und LTA (1 mg/ml) mit einer Endkonzentration von 90,9 µg/ml gegen Kontrolle und eine mit beiden Toxinen versetzte Probe getestet (jeweils 1 mg/ml LTA und LPS, Endkonzentration 45,5 µg/ml) und der Einfluss auf die Parameter CT, CFT, MCF und Alpha-Winkel bestimmt.

Die Messungen wurden an Blutproben von 6 Probanden durchgeführt. Es wurden zeitgleich vier Proben (NaCl = Kontrolle, 1 mg/ml LTA, 1 mg/ml LPS und jeweils 1 mg/ml LTA/LPS) bis zu 8 Stunden inkubiert. Nach 0, 2, 3 und 5 Stunden wurden jeweils *Aliquots* der Proben entnommen. Eine ausführliche Darstellung aller Messwerte und Parameter findet sich in den Tabellen 58 bis 69 im Anhang. Ausgewählte Werte werden aus Gründen der besseren Lesbarkeit nicht im Text, sondern in den Tabellen 13 bis 16 erläutert.

Die Verkürzung der *Clotting Time* wurde im gegenüberstellenden Vergleich mit einer alleinigen Inkubation mit LPS oder LTA deutlich. Dabei zeigt sich wie in den vorangegangenen Experimenten, dass der native Untersuchungsansatz fast keine Verkürzung der *Clotting Time* zeigt (nach 5 Stunden gegenüber Ausgangswert $p = 0,206$, $n = 6$), die mit Toxinen versetzten Proben allerdings alle starke Verkürzungen im zeitlichen Verlauf hervorriefen (Abb. 45).

Dabei zeigten sich für alle Toxine signifikante Verkürzungen der CT bereits nach 2 Stunden Inkubation gegenüber Ausgangswert (LTA: $p = 0,022$, $n = 6$ // LPS: $p = 0,002$, $n = 6$ // LTA/LPS: $p = 0,003$, $n = 6$). Diese Verkürzung nahm im Laufe der Zeit zu und erreichte ein Maximum zum Zeitpunkt 5 Stunden (LTA: $p = 0,003$, $n = 6$ // LPS: $p = 0,001$, $n = 6$ // LTA/LPS: $p = 0,003$, $n = 6$).

Optisch ist auffallend, dass die Kurve der LPS-Werte fast deckungsgleich mit der LPS/LTA-Kurve verläuft (Abb. 46).

Im Vergleich zur Kontrolle zeigten sich ebenfalls in allen Versuchen die Werte ab 2 Stunden Inkubation signifikant (LTA: $p = 0,002$, $n = 6$ // LPS: $p = 0,002$, $n = 6$ // LTA/LPS: $p = 0,0002$, $n = 6$), dies verstärkte sich weiter im Verlauf der Zeit und erreichte das Maximum nach 5 Stunden Inkubation (LTA: $p = 0,000729$, $n = 6$ // LPS: $p = 0,000729$, $n = 6$ // LTA/LPS: $p = 0,000729$, $n = 6$).

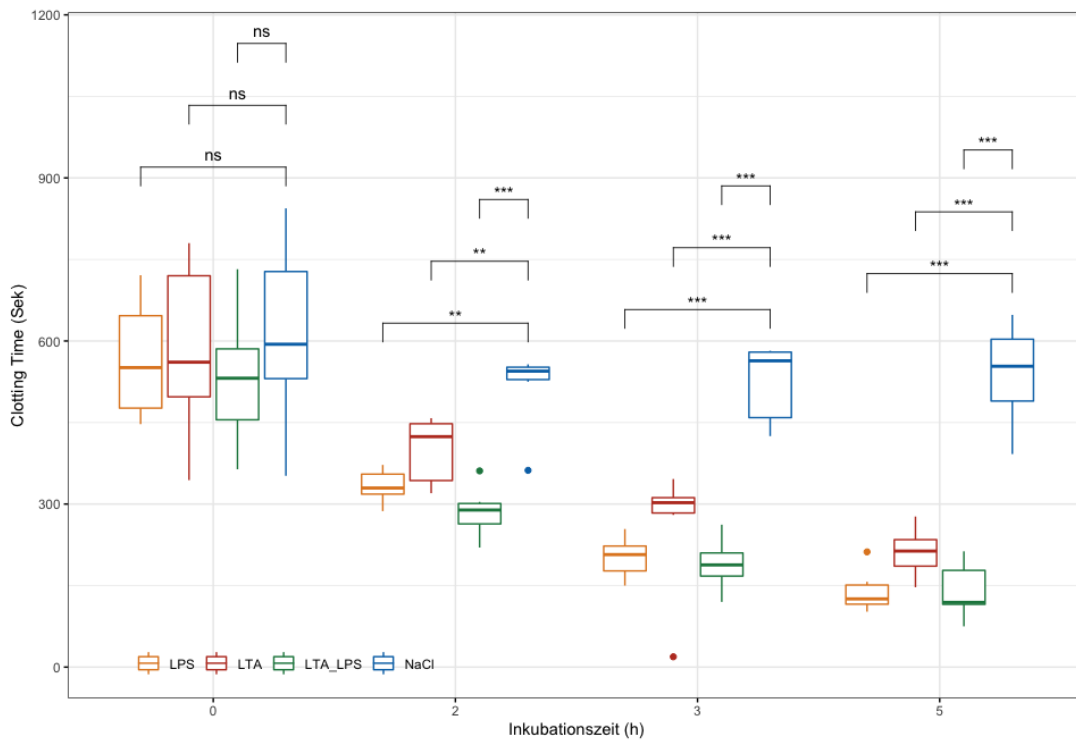


Abb. 45: Verkürzung der *Clotting Time* (CT) für Werte der CT im Costimulationsversuch mit LTA und LPS 1 mg/ml (Endkonzentration 90,9 µg/ml), Costimulationsansatz (je 45 µg/ml) und Kontrolle (NaCl) über die Inkubationszeit hinweg. Deutlich wird die Verkürzung der CT in allen Toxin-Ansätzen gegenüber Kontrolle (sek = Sekunden, h = Stunden, ns = nicht signifikant, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, T-Test für gepaarte Stichproben, Korrektur nach Holm, Alternative einseitig)

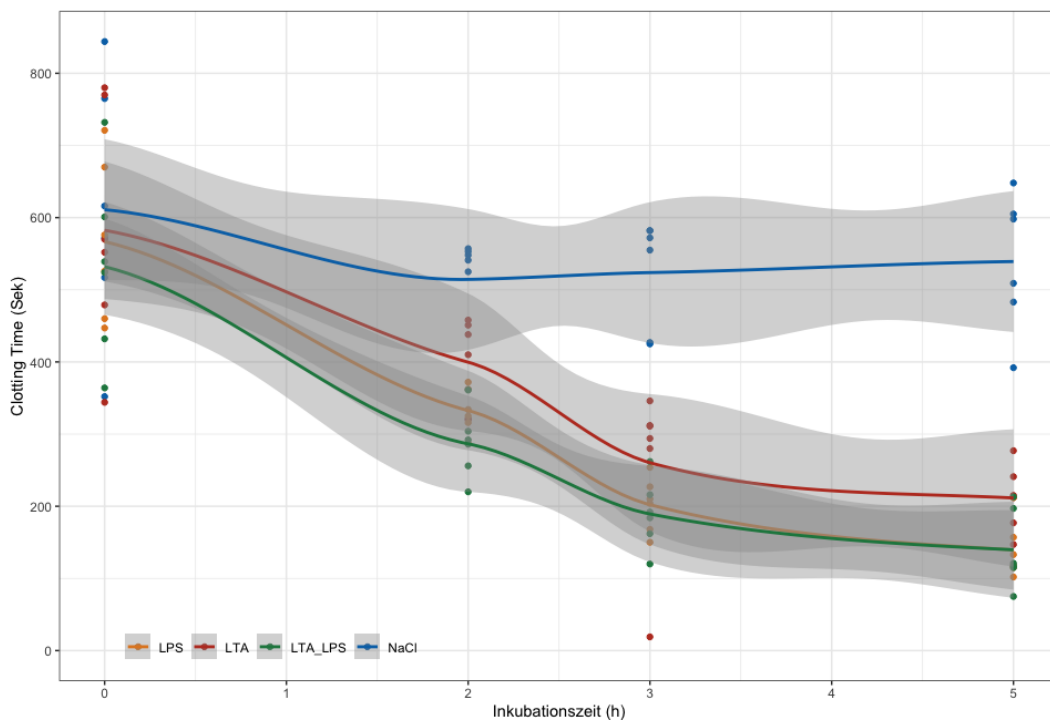


Abb. 46: Verkürzung der *Clotting Time* (CT) für Werte der CT im Costimulationsversuch mit LTA und LPS 1 mg/ml (Endkonzentration 90,9 µg/ml), Costimulationsansatz (je 45 µg/ml) und Kontrolle (NaCl) über die Inkubationszeit hinweg. Deutlich wird die Verkürzung der CT in allen Toxin-Ansätzen gegenüber Kontrolle (sek = Sekunden, h = Stunden).

Ansatz	Inkubations- dauer[h]	Variable	n	Min[s]	Mean[s]	Max[s]	Sd[s]	Median[s]
LPS 90,9 µg/ml	0	CT	6	447	566.667	721	111.297	551.0
LTA 90,9 µg/ml	0	CT	6	344	582.500	780	169.023	561.0
LTA_LPS (je 45,45µg/ml)	0	CT	6	364	532.000	732	128.917	531.5
NaCl	0	CT	6	352	611.000	844	176.334	594.0
LPS 90,9 µg/ml	5	CT	6	102	139.500	212	40.183	125.5
LTA 90,9 µg/ml	5	CT	6	147	211.500	277	45.877	213.5
LTA_LPS (je 45,45µg/ml)	5	CT	6	75	139.667	213	53.511	119.0
NaCl	5	CT	6	392	539.167	648	95.250	553.5

Tabelle 13: Ausgesuchte Werte der CT im Costimulationsversuch mit LTA und LPS 1 mg/ml (Endkonzentration 90,9 µg/ml), Costimulationsansatz (je und 45,45 µg/ml) und Kontrolle (NaCl), nach Inkubationszeitpunkt sortiert. Angegeben sind Mittelwert (Mean) mit Minimum (Min) und Maximum (Max) sowie Median und Standardabweichung (Sd). Alle Werte in Sekunden [s]. „n“ bezeichnet die Probandenanzahl, die Inkubationsdauer wird in Stunden [h] angegeben.

Im Vergleich zum Ausgangswert zeigte der LPS-Ansatz (1 mg/ml = Endkonzentration 90,9 µg/ml) über alle gemessenen Inkubationszeitpunkte eine signifikante Verkürzung der CFT (jeweils $p = 0,047$, $n = 6$). Auch der costimulierte Ansatz (jeweils 45,45 µg/ml Toxin in der Probe) zeigte nach 3 und 5 Stunden Inkubation signifikante Verkürzungen der CFT im Vergleich zum Ausgangswert (jeweils $p = 0,047$, $n = 6$). Bei dem LTA-Ansatz und der Kontrolle konnten keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden.

Im Vergleich zur Kontrolle zeigten sich alle gemessenen Werte der Toxin-Proben signifikant verkürzt. Die ersten signifikant verkürzten Werte konnten nach 2 Stunden Inkubation erzielt werden (jeweils $p = 0,047$, $n = 6$) und erreichten ein Maximum nach 5 Stunden (jeweils $p = 0,047$, $n = 6$) (Abb. 47).

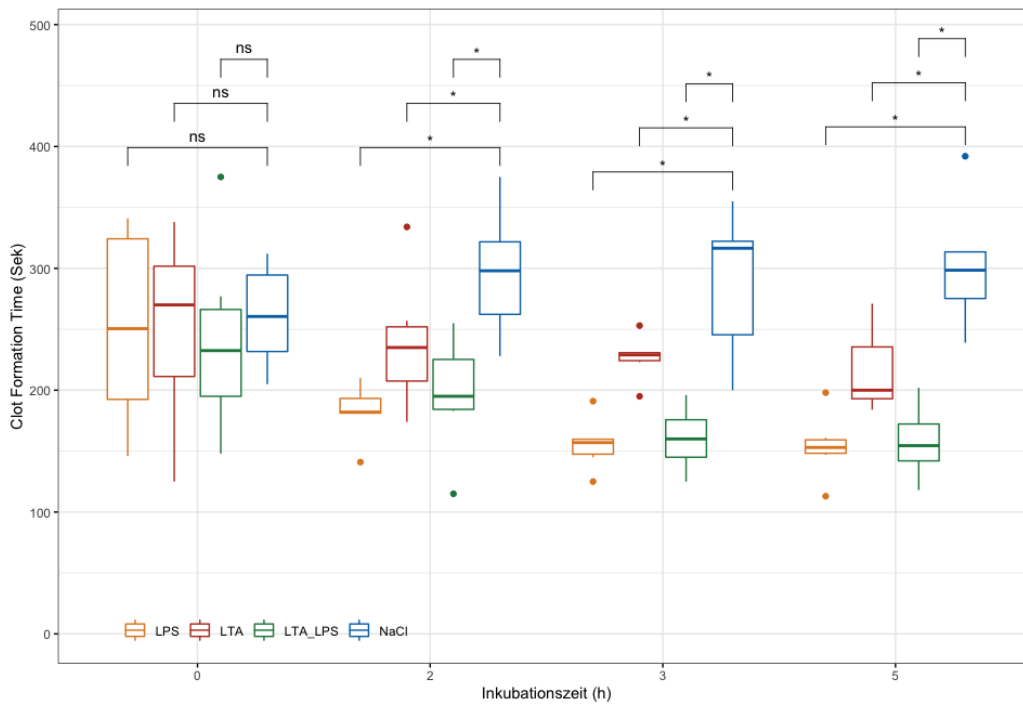


Abb. 47: Veränderungen der *Clot Formation Time* für Werte im Costimulationsversuch mit LTA und LPS 1 mg/ml (Endkonzentration 90,9 µg/ml), Costimulationsansatz (je 45 µg/ml) und Kontrolle (NaCl) über die Inkubationszeit hinweg. Deutlich wird die Verkürzung der CFT in allen Toxin-Ansätzen gegenüber Kontrolle (sek = Sekunden, h = Stunden, ns = nicht signifikant, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben, Korrektur nach Holm, Alternative einseitig).

Ansatz	Inkubations- dauer[h]	Variable	n	Min[s]	Mean[s]	Max[s]	Sd[s]	Median[s]
LPS 90,9 µg/ml	0	CFT	6	146	251.667	341	83.940	250.5
LTA 90,9 µg/ml	0	CFT	6	125	251.167	338	78.397	270.0
LTA_LPS je 45,45µg/ml	0	CFT	6	148	241.333	375	79.263	232.5
NaCl	0	CFT	6	205	261.000	312	42.289	260.5
LPS 90,9 µg/ml	5	CFT	6	113	154.167	198	27.272	153.0
LTA 90,9 µg/ml	5	CFT	6	184	215.500	271	35.064	200.0
LTA_LPS je 45,45µg/ml	5	CFT	6	118	157.500	202	29.528	154.5
NaCl	5	CFT	6	239	302.333	392	51.964	298.5

Tabelle 14: Ausgesuchte Werte der CFT im Costimulationsversuch mit LTA und LPS 1 mg/ml (Endkonzentration 90,9 µg/ml), Costimulationsansatz (je 45,45 µg/ml) und Kontrolle (NaCl), nach Inkubationszeitpunkt sortiert. Angegeben sind Mittelwert (Mean) mit Minimum (Min) und Maximum (Max) sowie Median und Standardabweichung (Sd). Alle Werte in Sekunden [s]. „n“ bezeichnet die Probandenanzahl, die Inkubationsdauer wird in Stunden [h] angegeben.

Im Vergleich zu der jeweiligen *Baseline* der MCF kam es bei keinem der Versuche zu einem signifikanten Ergebnis. Es kommt jedoch bei allen Proben nach 3 und nach 5 Stunden zu einer signifikant verkürzten MCF im Vergleich zur Kontrolle (jeweils $p = 0,047$, $n = 6$) (Abb. 48). Optisch fällt eine im Verlauf deutlich abnehmende MCF der Kontrolle auf.

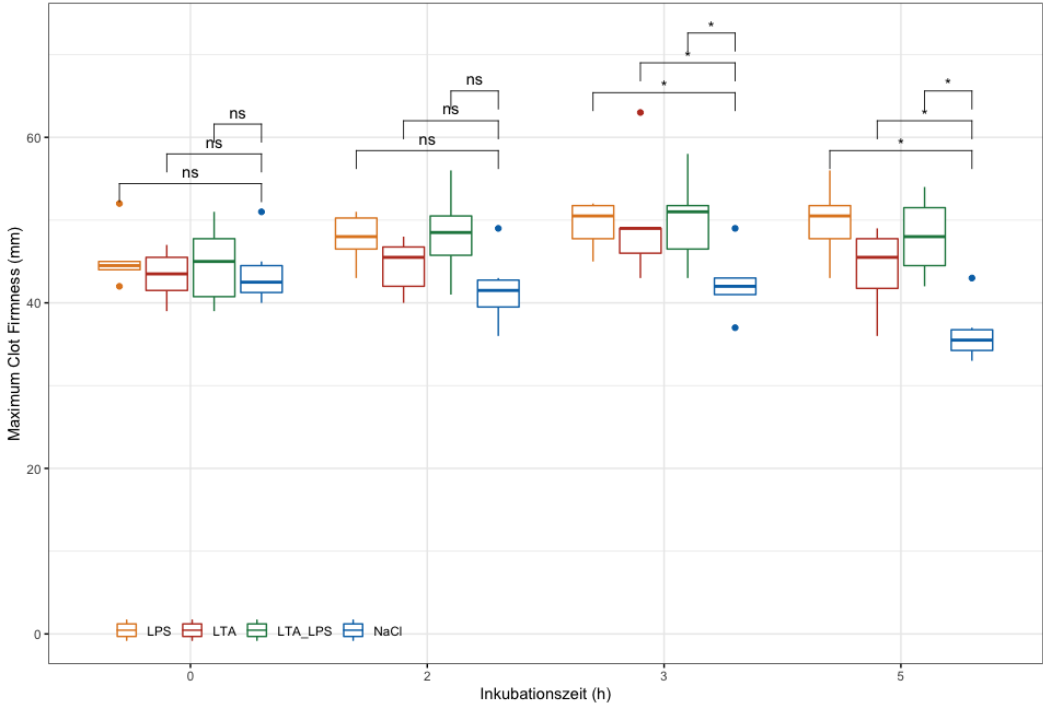


Abb. 48: Veränderungen der *Maximum Clot Firmness* (MCF) für Werte im Costimulationsversuch mit LTA und LPS 1 mg/ml (Endkonzentration 90,9 $\mu\text{g/ml}$), Costimulationsansatz (je 45 $\mu\text{g/ml}$) und Kontrolle (NaCl) über die Inkubationszeit hinweg. (mm = Millimeter, h = Stunden, ns = nicht signifikant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben, Korrektur nach Holm, Alternative einseitig).

Ansatz	Inkubations- dauer[h]	Variable	n	Min[mm]	Mean[mm]	Max[mm]	Sd[mm]	Median[mm]
LPS 90,9 $\mu\text{g/ml}$	0	MCF	6	42	45.333	52	3.445	44.5
LTA 90,9 $\mu\text{g/ml}$	0	MCF	6	39	43.333	47	3.011	43.5
LTA_LPS je 45,45 $\mu\text{g/ml}$	0	MCF	6	39	44.667	51	4.761	45.0
NaCl	0	MCF	6	40	43.667	51	3.983	42.5
LPS 90,9 $\mu\text{g/ml}$	5	MCF	6	43	49.833	56	4.446	50.5
LTA 90,9 $\mu\text{g/ml}$	5	MCF	6	36	44.167	49	4.956	45.5

Ansatz	Inkubations- dauer[h]	Variable	n	Min[mm]	Mean[mm]	Max[mm]	Sd[mm]	Median[mm]
LTA_LPS je 45,45µg/ml	5	MCF	6	42	48.000	54	4.733	48.0
NaCl	5	MCF	6	33	36.333	43	3.559	35.5

Tabelle 15: Ausgesuchte Werte der MCF im Costimulationsversuch mit LTA und LPS 1 mg/ml (Endkonzentration 90,9 µg/ml), Costimulationsansatz (je 45,45 µg/ml) und Kontrolle (NaCl), nach Inkubationszeitpunkt sortiert. Angegeben sind Mittelwert (Mean) mit Minimum (Min) und Maximum (Max) sowie Median und Standardabweichung (Sd). Alle Werte in Millimetern [mm]. „n“ bezeichnet die Probandenanzahl, die Inkubationsdauer wird in Stunden [h] angegeben.

Im Vergleich zum jeweiligen Ausgangswert zeigten sich bei allen Messungen des Alpha-Winkels mit LPS (Endkonzentration 90,9 µg/ml) signifikante Vergrößerungen. Diese zeigten sich erstmals nach 2 Stunden ($p = 0,033$, $n = 6$), konnten jedoch auch nach 3 und 5 Stunden nachgewiesen werden (jeweils $p = 0,016$, $n = 6$). Für LTA (Endkonzentration 90,9 µg/ml) zeigte sich lediglich nach 3 Stunden Inkubation eine signifikante Vergrößerung des Alpha-Winkels im Vergleich zum Ausgangswert ($p = 0,019$, $n = 6$).

Im Vergleich zur Kontrolle zeigten sich alle Werte des Alpha-Winkels ab 2 Stunden Inkubation signifikant vergrößert (LTA: $p = 0,001$, $n = 6$ /LPS: $p = 0,0003$, $n = 6$ /LTA+LPS: $p = 0,002$, $n = 6$). Diese Vergrößerung des Winkels nahm im Verlauf der Zeit weiter zu und zeigte ein Maximum nach 5 Stunden (LTA: $p = 0,0004$, $n = 6$ /LPS: $p = 0,0004$, $n = 6$ /LTA+LPS: $p = 0,0002$, $n = 6$) (Abb. 49).

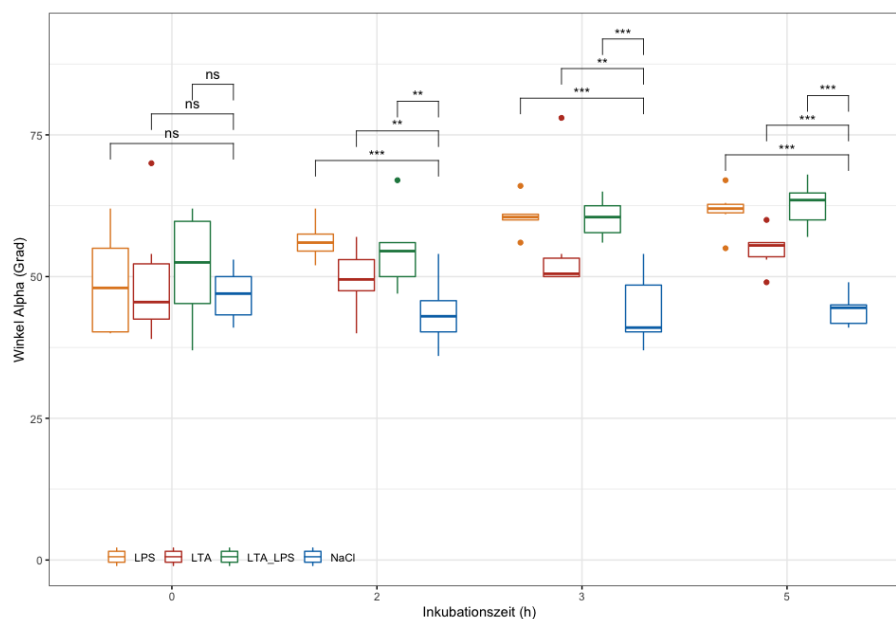


Abb. 49: Signifikante Verkürzung des Winkels Alpha im Costimulationsversuch mit LTA und LPS 1 mg/ml (Endkonzentration 90,9 µg/ml), Costimulationsansatz (je 45 µg/ml) und Kontrolle (NaCl) über die Inkubationszeit hinweg (h = Stunden, ns = nicht signifikant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, t-Test für gepaarte Stichproben, Korrektur nach Holm, Alternative einseitig).

Ansatz	Inkubations- dauer [h]	Variable	n	Min[°]	Mean[°]	Max[°]	Sd[°]	Median[°]
LPS 90,9 µg/ml	0	alfa	6	40	48.833	62	9.663	48.0
LTA 90,9 µg/ml	0	alfa	6	39	49.333	70	11.343	45.5
LTA_LPS je 45,45µg/ml	0	alfa	6	37	51.500	62	9.935	52.5
NaCl	0	alfa	6	41	46.833	53	4.750	47.0
LPS 90,9 µg/ml	5	alfa	6	55	61.667	67	3.882	62.0
LTA 90,9 µg/ml	5	alfa	6	49	54.833	60	3.656	55.5
LTA_LPS je 45,45µg/ml	5	alfa	6	57	62.667	68	4.033	63.5
NaCl	5	alfa	6	41	44.167	49	2.994	44.5

Tabelle 16: Ausgesuchte Werte des Alpha-Winkels im Costimulationsversuch mit LTA und LPS 1 mg/ml (Endkonzentration 90,9 µg/ml), Costimulationsansatz (je 45,45 µg/ml) und Kontrolle (NaCl), nach Inkubationszeitpunkt sortiert. Angegeben sind Mittelwert (Mean) mit Minimum (Min) und Maximum (Max) sowie Median und Standardabweichung (Sd). Alle Werte in Grad [°]. „n“ bezeichnet die Probandenanzahl, die Inkubationsdauer wird in Stunden [h] angegeben.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die vorangegangenen Versuche bestätigt werden konnten und sich die CT für LTA und LPS wie erwartet nach 5 Stunden gegenüber dem Ausgangswert signifikant verkürzt hat (Verkürzung der LTA um 61,9 %, Verkürzung der LPS um 77,2 %). Zusätzlich zeigte sich im costimulierten Ansatz ebenso eine deutliche Verkürzung, die nach 5 Stunden im Vergleich zum Ausgangswert 77,6 % betrug (Abb. 50 A).

Die CFT zeigte sich ebenso stark verkürzt nach 5 Stunden Inkubation im Vergleich zum Ausgangswert in allen Ansätzen (Verkürzung der LTA um 25,9 %, Verkürzung der LPS um 38,9 % und Verkürzung des LTA/LPS-Ansatzes um 33,5 %). Auch bei der MCF kam es zu Veränderungen nach 5 Stunden Inkubation. Im Vergleich zum Ausgangswert vergrößerte sich die MCF nur leicht, da jedoch die Werte aus dem Kontroll-Ansatz stark abnahmen, zeigte sich eine signifikante Verkürzung der MCF nach 5 Stunden gegenüber der Kontrolle. Der Alpha-Winkel vergrößerte sich im Verlauf der Inkubationszeit im Vergleich zum Ausgangswert und zur Kontrolle (Abb. 50 B bis D).

Insgesamt erscheinen die Veränderungen jeweils für alle Toxin-Ansätze zu gelten, wobei optisch die Veränderung der Werte des LTA-Versuchs schwächer ausgeprägt scheint. Die Ergebnisse des LPS- bzw. Costimulations-Versuches erscheinen ähnlich, optisch zeigte sich

eine gering stärkere Ausprägung für LTA/LPS.

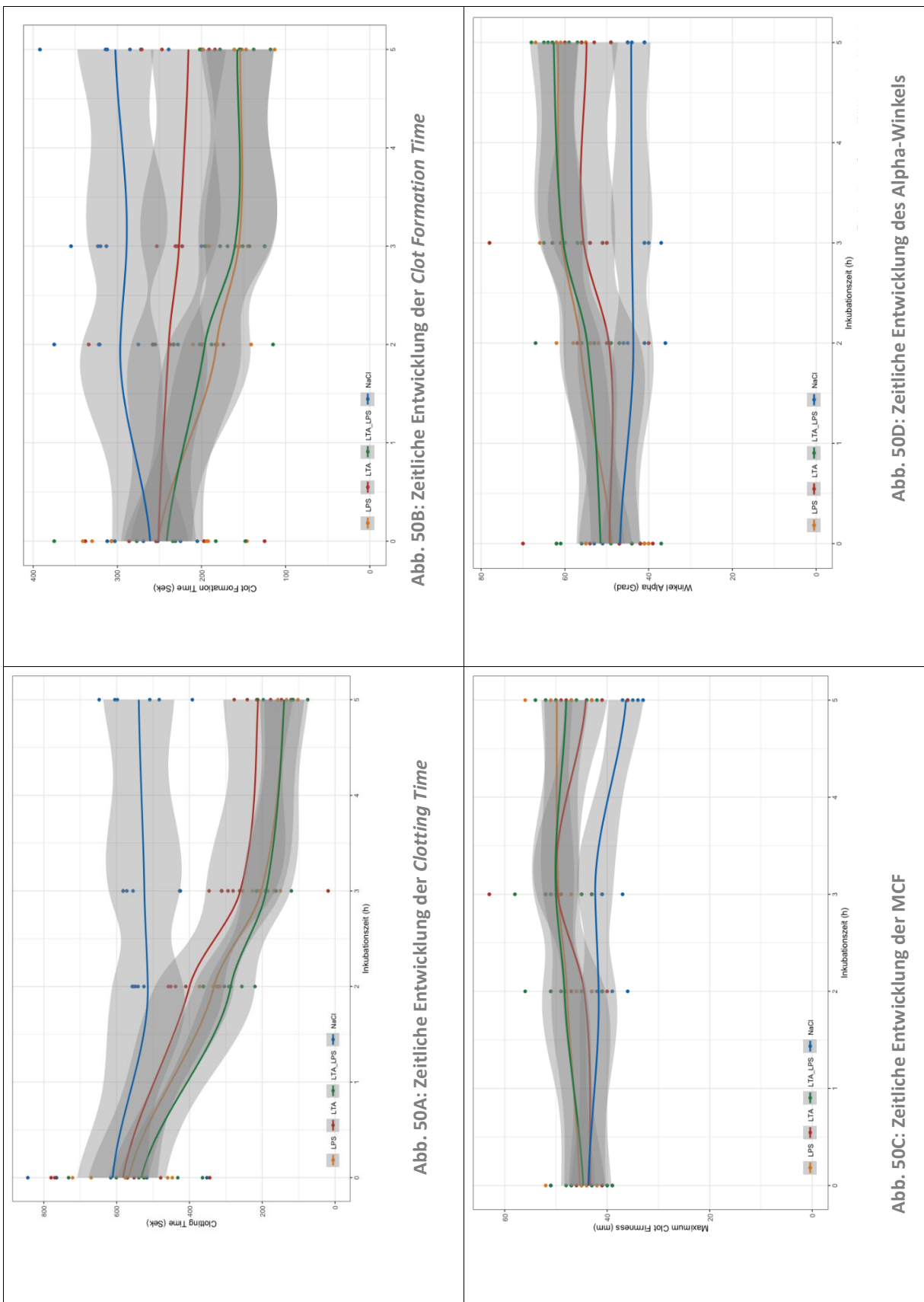


Abb. 50A-D: Verlauf relevanter ROTEM®-Parameter bei Inkubation von Proben mit LTA/ LPS, LTA allein (1mg/ml), LPS allein (1mg/ml) und ohne Toxin (sek = Sekunden, mm = Millimeter, h = Stunden)

3.6 Einfluss von Cycloheximid auf die Effekte von LPS und LTA im ROTEM®

Es wurden LPS (1 mg/ml, Endkonzentration 90,9 µg/ml) und LTA (1 mg/ml, Endkonzentration 90,9 µg/ml) gegen Kontrolle (NaCl) und eine Probe mit beiden Toxinen (jeweils 1 mg/ml, Endkonzentration jeweils 45,5 µg/ml) mit dem Proteinsyntheseinhibitor Cycloheximid (Endkonzentration 30,8 µg/ml bzw. 0,109 µmol/l) versetzt und gegen einen nativen Untersuchungsansatz 5 Stunden inkubiert, um den Einfluss auf die Parameter *Clotting Time*, CFT, MCF und Alpha-Winkel zu bestimmen.

Die Messungen wurden an Blutproben von 7 Probanden durchgeführt. Eine ausführliche Darstellung aller Messwerte und Parameter findet sich in den Tabellen 70 bis 81 im Anhang. Ausgewählte Werte werden aus Gründen der besseren Lesbarkeit nicht im Text, sondern in Tabelle 17 erläutert.

In vorangegangenen Versuchen führte die Zugabe von Toxinen zu einer deutlichen Verkürzung der *Clotting Time*. In diesem Versuchsansatz lässt sich dieser Effekt sowohl für LTA, LPS sowie die Kombination beider erneut nachweisen. Gegenüber der Kontrolle mit NaCl ist die Verkürzung der *Clotting Time* nach 5 Stunden für alle Ansätze statistisch signifikant (LTA: $p = 0,021$, $n = 7$ // LPS: $p = 0,0006$, $n = 7$ // LTA+LPS: $p = 0,002$, $n = 7$). Demgegenüber war weder optisch noch statistisch eine Veränderung der *Clotting Time* nach einer 5-Stündigen Inkubation mit Cycloheximid-Zusatz nachweisbar (Abb. 51).

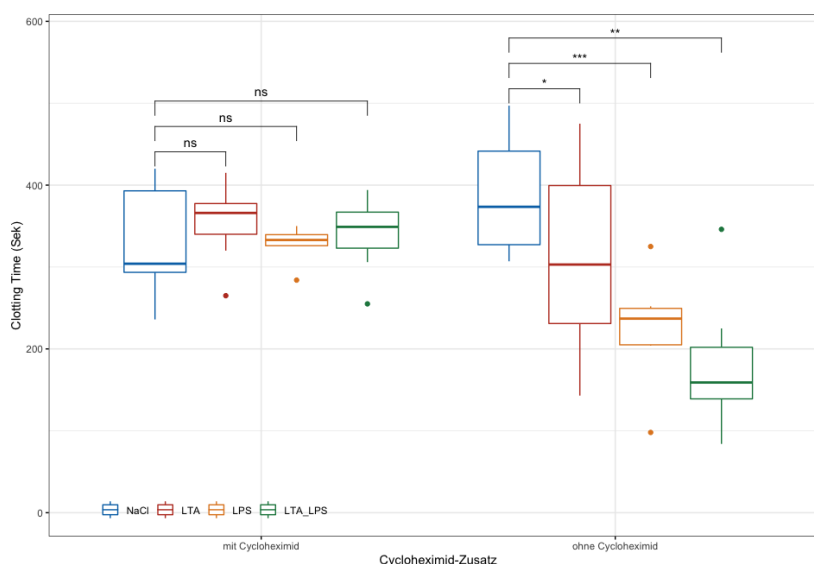


Abb. 51: Darstellung der CT für einen Versuch mit und ohne Cycloheximid-Zugabe. Verkürzung der *Clotting Time* (CT) im Costimulationsversuch mit LTA und LPS 1mg/ml (Endkonzentration 90,9 µg/ml), Costimulationsansatz (je 45 mg/ml) und (NaCl) nach 5 Stunden Inkubation. Deutlich wird die ausbleibende Verkürzung für den Versuch mit Cycloheximid (sek = Sekunden, h = Stunden, ns = nicht signifikant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, t-Test für gepaarte Stichproben, Korrektur nach Holm, Alternative einseitig)

Es zeigte sich, dass Cycloheximid den Effekt, den die Toxine auf die CT haben, aufhebt. Im direkten Vergleich der korrespondierenden Versuche zeigte der Versuch mit LTA/LPS ($p = 0,002$, $n = 7$) bzw. LPS ($p = 0,005$, $n = 7$) nach 5 Stunden Inkubation signifikante Ergebnisse (Abb. 52). Hingegen gab es keinen signifikanten Einfluss von Cycloheximid auf die CFT, MCF und den Alpha-Winkel (Abb. 53A bis D).

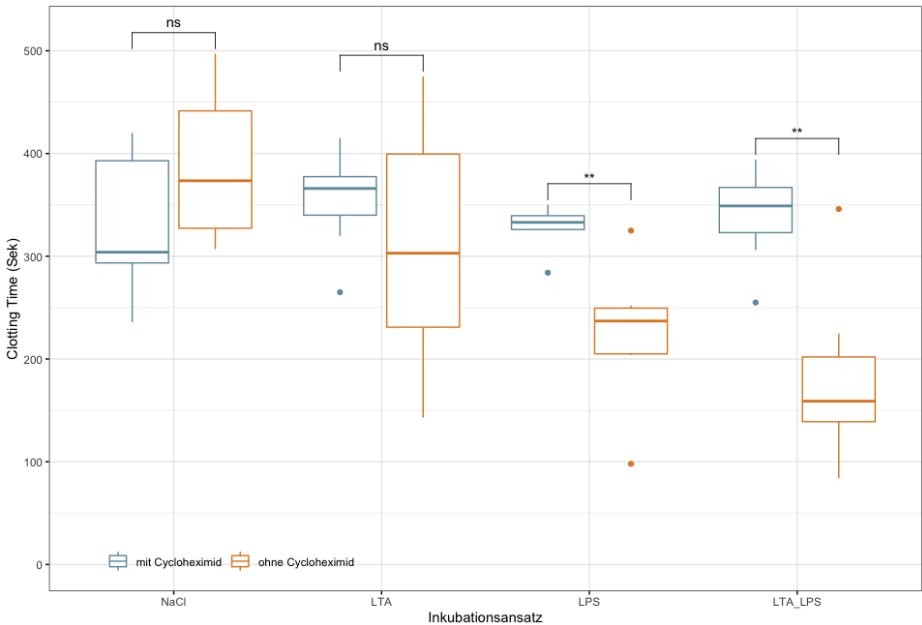


Abb. 52: Direkte Gegenüberstellung der Werte der *Clotting Time* (CT) für einen Versuch mit und ohne Cycloheximid-Zugabe. Verkürzung der *Clotting Time* (CT) im Costimulationsversuch mit LTA und LPS 1 mg/ml (Endkonzentration 90,9 µg/ml), Costimulationsansatz (je 45 mg/ml) und (NaCl) nach 5 Stunden Inkubation. Deutlich wird die ausbleibende Verkürzung für den Versuch mit Cycloheximid (sek = Sekunden, h = Stunden, ns = nicht signifikant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, t-Test für gepaarte Stichproben, Korrektur nach Holm, Alternative einseitig)

Ansatz	Inkubations-dauer[h]	Cycloheximid	Variable	n	Min[s]	Mean[s]	Max[s]	Sd[s]	Median[s]
NaCl	0	mit Cycloheximid	CT	7	227	457.000	554	116.034	506.0
NaCl	0	ohne Cycloheximid	CT	7	340	475.000	647	109.748	471.0
LTA	0	mit Cycloheximid	CT	6	238	441.500	556	120.464	466.0
LTA	0	ohne Cycloheximid	CT	6	168	433.833	583	142.575	470.0

Ansatz	Inkubations- dauer[h]	Cycloheximid	Variable	n	Min[s]	Mean[s]	Max[s]	Sd[s]	Median[s]
LPS	0	mit Cycloheximid	CT	6	225	470.833	600	131.741	499.5
LPS	0	ohne Cycloheximid	CT	6	408	494.500	539	53.031	514.5
LTA_LPS	0	mit Cycloheximid	CT	6	245	446.000	511	99.704	481.5
LTA_LPS	0	ohne Cycloheximid	CT	6	458	512.000	561	43.257	516.0
NaCl	5	mit Cycloheximid	CT	7	236	333.286	420	69.830	304.0
NaCl	5	ohne Cycloheximid	CT	6	307	387.833	497	76.565	373.5
LTA	5	mit Cycloheximid	CT	7	265	354.429	415	48.445	366.0
LTA	5	ohne Cycloheximid	CT	7	143	311.714	475	129.716	303.0
LPS	5	mit Cycloheximid	CT	7	284	328.286	350	21.282	333.0
LPS	5	ohne Cycloheximid	CT	7	98	224.143	325	68.657	237.0
LTA_LPS	5	mit Cycloheximid	CT	7	255	339.714	394	46.482	349.0
LTA_LPS	5	ohne Cycloheximid	CT	7	84	181.571	346	84.815	159.0

Tabelle 17: Ausgesuchte Werte der CT für den Cycloheximid-Versuch mit LTA und LPS 1 mg/ml (Endkonzentration 90,9 µg/ml), Costimulationsansatz (je und Kontrolle 45,45 mg/ml) und (NaCl), nach Inkubationszeitpunkt sortiert. Angegeben sind Mittelwert (Mean) mit Minimum (Min) und Maximum (Max) sowie Median und Standardabweichung (Sd). Alle Werte in Sekunden [s]. „n“ bezeichnet die Probandenanzahl, die Inkubationsdauer wird in Stunden [h] angegeben.

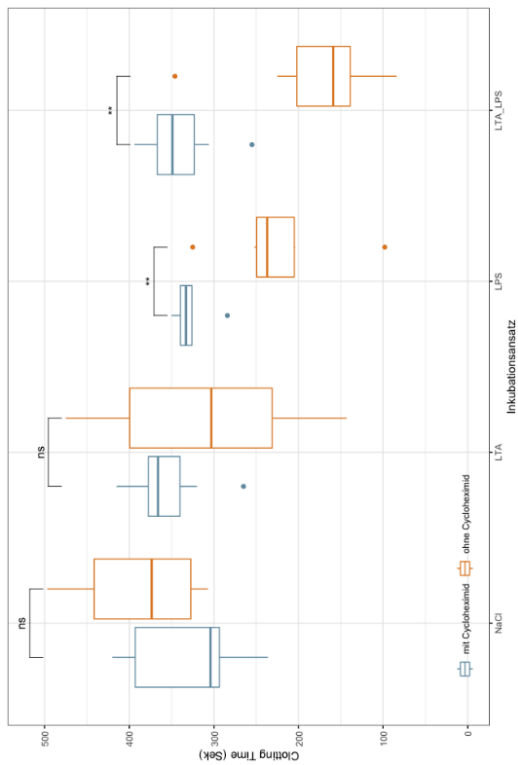


Abb. 53A: Entwicklung der *Clotting Time* mit und ohne Cycloheximid

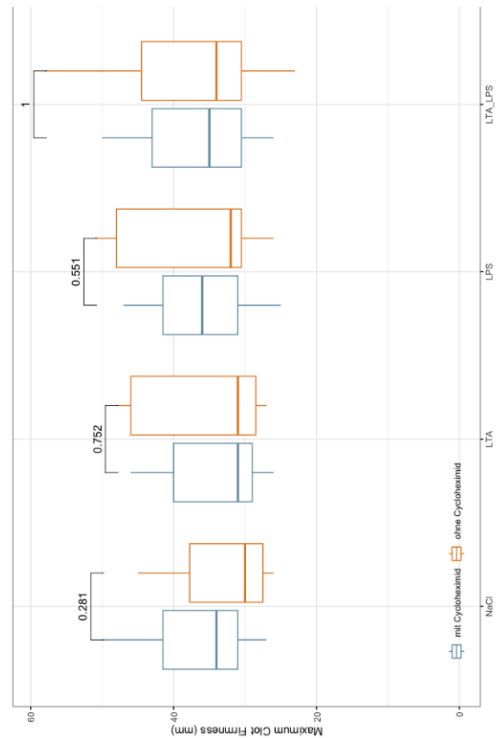


Abb. 53C: Entwicklung der MCF mit und ohne Cycloheximid

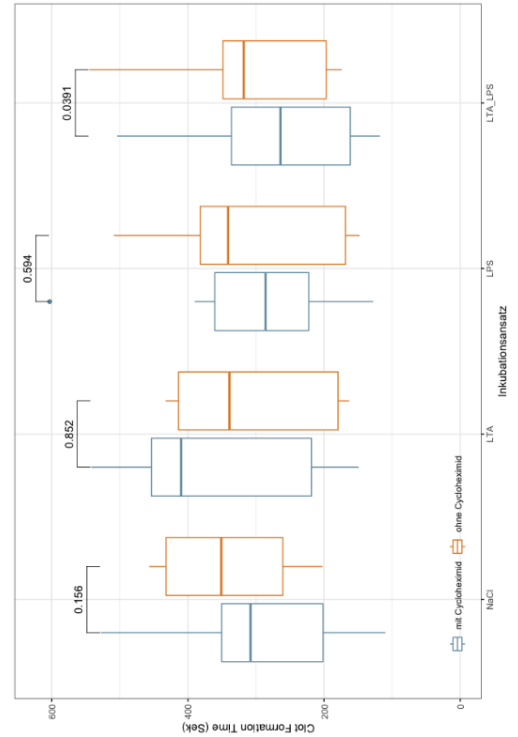


Abb. 53B: Entwicklung der CFT mit und ohne Cycloheximid

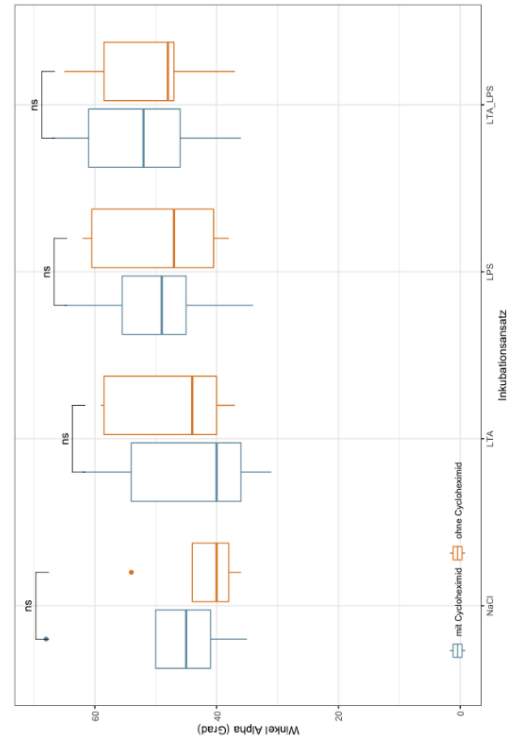


Abb. 53D: Entwicklung des Alpha-Winkels mit und ohne Cycloheximid

Abb. 53A-D: Einfluss von Cycloheximid auf die Effekte von LPS und LTA in der Thrombelastographie (sek = Sekunden, mm = Millimeter, h = Stunden)

3.7 Einfluss hoher Temperatur auf die Effekte von LPS und LTA im ROTEM®

Es wurden LPS (1 mg/ml = Endkonzentration 90,9 µg/ml) und LTA (1 mg/ml = Endkonzentration 90,9 µg/ml) gegen Kontrolle (NaCl) und eine mit beiden Toxinen versetzte Probe (je 1 mg/ml, entspricht einer Endkonzentration von 45,5 µg/ml pro Toxin) 5 Stunden mit einerseits 37° C und andererseits 40° C inkubiert und der Einfluss auf die Parameter CT, CFT, MCF und Alpha-Winkel bestimmt.

Die Messungen wurden an Blutproben von 10 Probanden durchgeführt. Eine ausführliche Darstellung aller Messwerte und Parameter findet sich in den Tabellen 82 bis 93 im Anhang. Ausgewählte Werte werden aus Gründen der besseren Lesbarkeit nicht im Text, sondern in den Tabellen 18 bis 21 erläutert.

Die Ergebnisse zeigten eine Inhibition der durch Toxine induzierten Verkürzung der CT bei 40° C. Wie in den vorangegangenen Versuchen zeigte sich eine signifikante Verkürzung der CT am deutlichsten mit dem Probenansatz mit LTA/LPS ($p = 0,000147$, $n = 10$), signifikante Ergebnisse zeigten sich allerdings auch bei LTA ($p = 0,000316$, $n = 10$) und LPS ($p = 0,000165$, $n = 10$) nach 5 Stunden Inkubation gegenüber der Kontrolle (Abb. 54). In dem Versuchsetting mit erhöhter Inkubations-Temperatur zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der CT im Vergleich zur Kontrolle (NaCl).

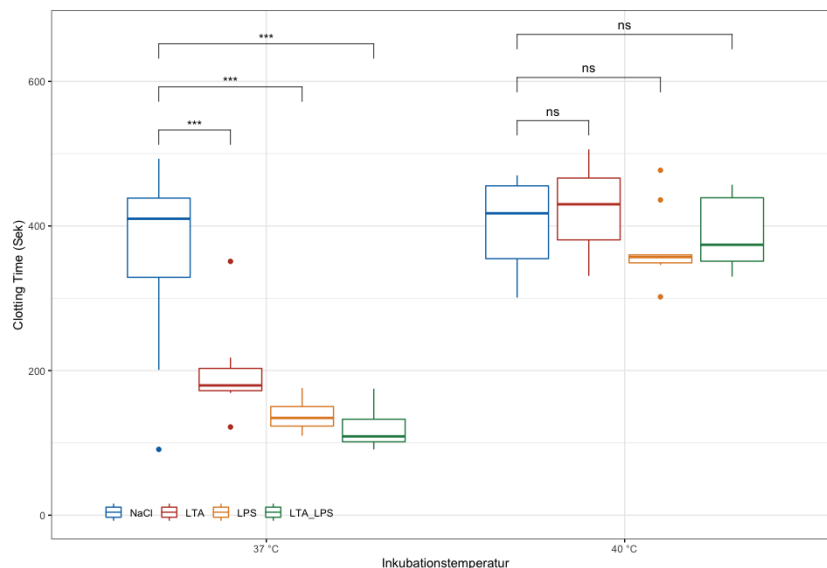


Abb. 54: Darstellung der Werte der *Clotting Time* (CT) für einen Versuch mit physiologischer (37°C) und erhöhter Temperatur (40°C). Verkürzung der *Clotting Time* (CT) für Werte der CT im Costimulationsversuch mit LTA und LPS 1 mg/ml (Endkonzentration 90,9 µg/ml), Costimulationsansatz (je 45 mg/ml) und (NaCl) nach 5 Stunden Inkubation. Deutlich wird die fehlende Verkürzung für den Versuch mit erhöhter Temperatur (sek = Sekunden, h = Stunden, ns = nicht signifikant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, t-Test für gepaarte Stichproben, Korrektur nach Holm, Alternative einseitig)

In der direkten Gegenüberstellung der Werte nach 5 Stunden Inkubation mit entweder 37 ° C oder 40 ° C Temperatur im Wasserbad zeigt sich die hochsignifikante Verkürzung der CT bei physiologischer Temperatur im Vergleich zum Ansatz mit erhöhter Temperatur für alle Toxin-Gruppen (jeweils $p < 0,0001$, $n = 10$) (Abb. 55)

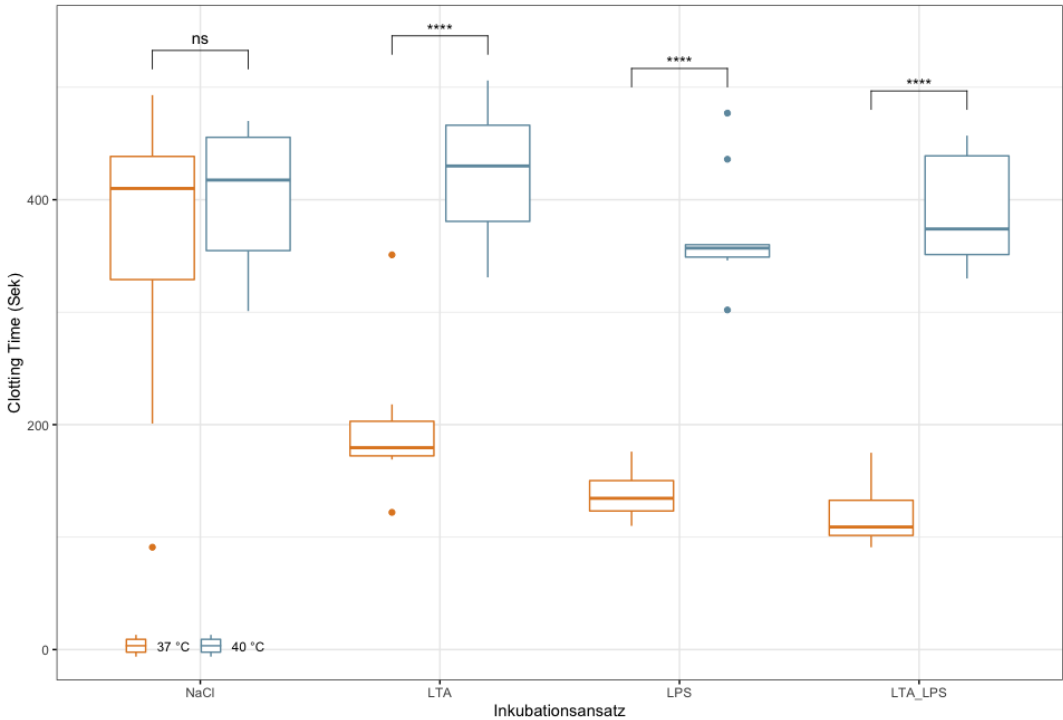


Abb. 55: Direkte Gegenüberstellung der Werte der *Clotting Time* (CT) für einen Versuch mit physiologischer (37°C)und erhöhter Temperatur (40°C). Verkürzung der *Clotting Time* (CT) für Werte der CT im Costimulationsversuch mit LTA und LPS 1mg/ml (Endkonzentration 90,9 µg/ml), Costimulationsansatz (je 45mg/ml) und (NaCl) über die nach 5 Stunden Inkubation.Deutlich wird die fehlende Verkürzung für den Versuch mit erhöhter Temperatur (sek = Sekunden, h = Stunden, ns = nicht signifikant,* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $< 0,0001$, t-Test für gepaarte Stichproben, Korrektur nach Holm, Alternative einseitig)

Ansatz	Inkubations- dauer[h]	Temperatur[°C]	Variable	n	Min[s]	Mean[s]	Max[s]	Sd[s]	Median[s]
NaCl	0	37 °C	CT	10	341	552.8	768	107.069	550.0
LTA	0	37 °C	CT	10	331	546.0	665	96.534	547.5
LPS	0	37 °C	CT	10	373	534.5	646	83.332	544.5
LTA_LPS	0	37 °C	CT	10	402	543.2	649	74.689	553.0
NaCl	5	37 °C	CT	10	91	361.8	493	126.385	410.0

Ansatz	Inkubations- dauer[h]	Temperatur[°C]	Variable	n	Min[s]	Mean[s]	Max[s]	Sd[s]	Median[s]
NaCl	5	40 °C	CT	10	301	402.2	470	61.013	417.5
LTA	5	37 °C	CT	10	122	196.4	351	60.028	179.5
LTA	5	40 °C	CT	10	331	424.6	506	58.319	430.0
LPS	5	37 °C	CT	10	110	138.5	176	21.849	134.5
LPS	5	40 °C	CT	9	302	371.0	477	52.559	357.0
LTA_LPS	5	37 °C	CT	10	91	119.0	175	25.893	109.0
LTA_LPS	5	40 °C	CT	10	330	388.7	457	48.573	374.0

Tabelle 18: Ausgesuchte Werte der CT für den Temperatur-Versuch mit LTA und LPS 1 mg/ml (Endkonzentration 90,9 µg/ml), Costimulationsansatz (je und Kontrolle 45,45 mg/ml) und (NaCl), nach Inkubationszeitpunkt sortiert. Angegeben sind Mittelwert (Mean) mit Minimum (Min) und Maximum (Max) sowie Median und Standardabweichung (Sd). Alle Werte in Sekunden (s). „n“ bezeichnet die Probandenanzahl, die Inkubationsdauer wird in Stunden [h] angegeben.

Für die CFT zeigte sich optisch eine Verkürzung für den Ansatz mit einer physiologischen Temperatur im Vergleich zur erhöhten Temperatur, jedoch auch die CFT-Werte der Kontrolle mit NaCl waren signifikant verkürzt (NaCl: $p < 0,001$, $n = 10$, LTA: $p < 0,001$, $n = 10$, LPS: $p < 0,001$, $n = 10$, LTA+LPS: $p = 0,0019$, $n = 10$). Signifikante Unterschiede zur Kontrolle gab es lediglich im Versuch mit LTA 1 mg/ml (Endkonzentration 90,9 µg/ml: $p = 0,018$, $n = 10$) (Abb. 56).

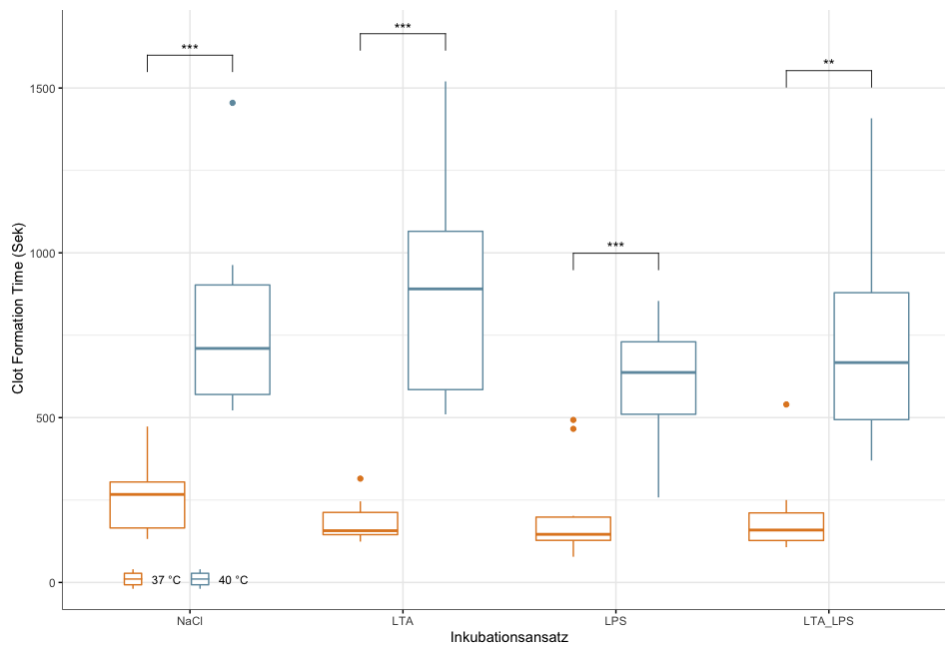


Abb. 56: Direkte Gegenüberstellung der Werte der *Clot Formation Time* (CFT) für einen Versuch mit physiologischer (37°C) und erhöhter Temperatur (40°C) im Rahmen des Costimulationsversuches. Verkürzung der CFT für Versuche mit LTA und LPS 1mg/ml (Endkonzentration 90,9 µg/ml), Costimulationsansatz (je 45mg/ml) und (NaCl) nach 5 Stunden Inkubation. Deutlich wird die fehlende Verkürzung für den Versuch mit erhöhter Temperatur (sek = Sekunden, h = Stunden, °C = Grad Celsius, ns = nicht signifikant, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben, Korrektur nach Holm, Alternative einseitig)

Ansatz	Inkubations- dauer[h]	Temperatur[°C]	Variable	n	Min[s]	Mean[s]	Max[s]	Sd[s]	Median[s]
NaCl	0	37 °C	CFT	10	89	184.200	283	62.912	178.5
LTA	0	37 °C	CFT	10	88	172.400	274	61.659	154.0
LPS	0	37 °C	CFT	10	88	173.600	281	64.724	158.5
LTA_LPS	0	37 °C	CFT	10	112	185.100	232	40.325	191.5
NaCl	5	37 °C	CFT	10	132	261.000	473	112.586	267.0
NaCl	5	40 °C	CFT	10	522	783.600	1455	282.898	710.0
LTA	5	37 °C	CFT	10	124	182.100	315	61.387	157.0
LTA	5	40 °C	CFT	10	510	873.100	1520	321.107	890.5
LPS	5	37 °C	CFT	10	78	210.500	493	145.932	146.0

Ansatz	Inkubations- dauer[h]	Temperatur[°C]	Variable	n	Min[s]	Mean[s]	Max[s]	Sd[s]	Median[s]
LPS	5	40 °C	CFT	10	258	608.800	854	185.467	637.0
LTA_LPS	5	37 °C	CFT	10	107	201.600	540	127.605	159.0
LTA_LPS	5	40 °C	CFT	9	370	761.556	1408	360.741	667.0

Tabelle 19: Ausgesuchte Werte der CFT für den Temperatur-Versuch mit LTA und LPS 1 mg/ml (Endkonzentration 90,9 µg/ml), Costimulationsansatz (je und Kontrolle 45,45 mg/ml) und (NaCl), nach Inkubationszeitpunkt sortiert. Angegeben sind Mittelwert (Mean) mit Minimum (Min) und Maximum (Max) sowie Median und Standardabweichung (Sd). Alle Werte in Sekunden [s]. „n“ bezeichnet die Probandenanzahl, die Inkubationsdauer wird in Stunden [h] angegeben.

Die MCF-Werte zeigten ebenfalls eine hochsignifikante Veränderung zwischen den Messungen der physiologischen zur erhöhten Temperatur. Der Versuch mit 40 °C zeigte deutlich niedrigere Werte für die MCF (NaCl: $p < 0,001$, $n = 10$, LTA: $p < 0,001$, $n = 10$, LPS $< 0,005$, $n = 10$, LTA+LPS: $p < 0,005$, $n = 10$) als der Versuch mit 37 °C. Die verschiedenen Ansätze (Toxine und Kontrolle) der Hochtemperatur-Reihe zeigten keine signifikanten Unterschiede zueinander (Abb. 57).

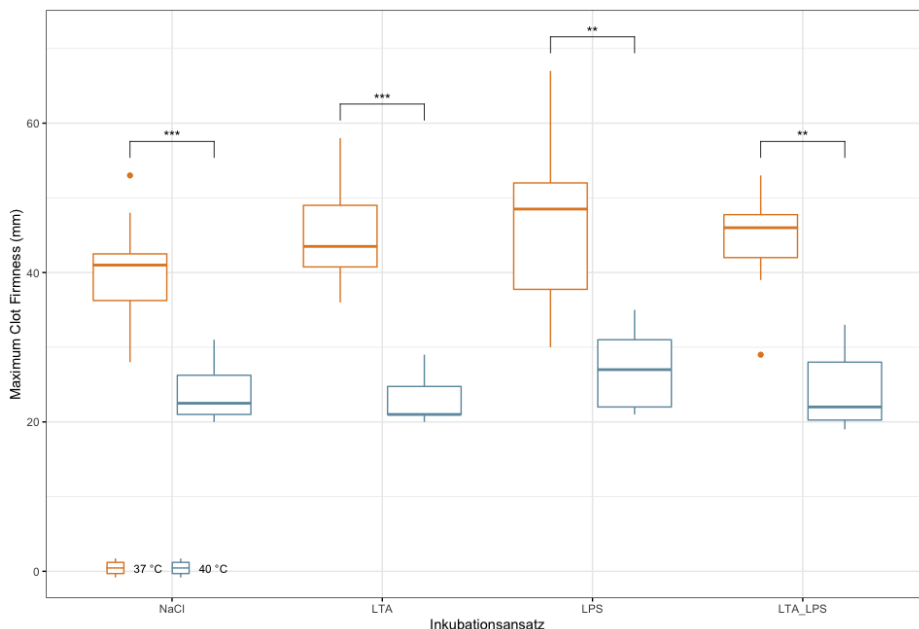


Abb. 57: Direkte Gegenüberstellung der Werte der *Maximum Clot Firmness* (MCF) für einen Versuch mit physiologischer (37°C) und erhöhter Temperatur (40°C) im Rahmen des Costimulationsversuches. Verlängerung der CFT für Versuche mit LTA und LPS 1 mg/ml (Endkonzentration 90,9 µg/ml), Costimulationsansatz (je 45 mg/ml) und (NaCl) nach 5 Stunden Inkubation. Deutlich wird die fehlende Verlängerung für den Versuch mit erhöhter Temperatur (mm = Millimeter, h = Stunden, °C = Grad Celsius ns = nicht signifikant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben, Korrektur nach Holm, Alternative einseitig)

Ansatz	Inkubations- dauer[h]	Temperatur [°C]	Variable	n	Min[mm]	Mean[mm]	Max [mm]	Sd [mm]	Median [mm]
NaCl	0	37 °C	MCF	10	41	50.100	61	6.855	49.5
LTA	0	37 °C	MCF	10	43	49.600	60	6.077	48.5
LPS	0	37 °C	MCF	10	43	50.600	65	6.931	49.5
LTA_LPS	0	37 °C	MCF	10	44	47.900	58	4.254	48.0
NaCl	5	37 °C	MCF	10	28	39.600	53	7.863	41.0
NaCl	5	40 °C	MCF	10	20	23.900	31	3.814	22.5
LTA	5	37 °C	MCF	10	36	45.700	58	7.212	43.5
LTA	5	40 °C	MCF	10	20	23.000	29	3.333	21.0
LPS	5	37 °C	MCF	10	30	46.500	67	11.578	48.5
LPS	5	40 °C	MCF	9	21	27.222	35	5.215	27.0
LTA_LPS	5	37 °C	MCF	10	29	44.700	53	7.072	46.0
LTA_LPS	5	40 °C	MCF	10	19	24.600	33	5.441	22.0

Tabelle 20: Ausgesuchte Werte der MCF für den Temperatur-Versuch mit LTA und LPS 1 mg/ml (Endkonzentration 90,9 µg/ml), Costimulationsansatz (je und Kontrolle 45,45 mg/ml) und (NaCl), nach Inkubationszeitpunkt sortiert. Angegeben sind Mittelwert (Mean) mit Minimum (Min) und Maximum (Max) sowie Median und Standardabweichung (Sd). Alle Werte in Millimetern [mm]. „n“ bezeichnet die Probandenanzahl, die Inkubationsdauer wird in Stunden [h] angegeben.

Bezüglich des Winkels Alpha zeigten sich im Ansatz mit der physiologischen Temperatur wie zuvor in den Versuchen auch ein signifikant vergrößerter Winkel für den 5-Stunden-Wert im Vergleich zur Kontrolle mit NaCl (LTA: $p = 0,014$, $n = 10$, LPS: $p = 0,014$, $n = 10$, LTA+LPS: $p = 0,014$, $n = 10$). Im direkten Vergleich der Toxine bzw. Kontrolle gegeneinander zeigte sich, dass alle Ansätze mit physiologischer Temperatur hochsignifikant größere Winkel zeigen als die mit erhöhter Temperatur (NaCl: $p < 0,01$, $n = 10$, LTA: $p < 0,0001$, $n = 10$, LPS: $p < 0,001$, $n = 10$, LTA+LPS: $p < 0,0001$). Der Ansatz mit der erhöhten Temperatur zeigte keine Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 58).

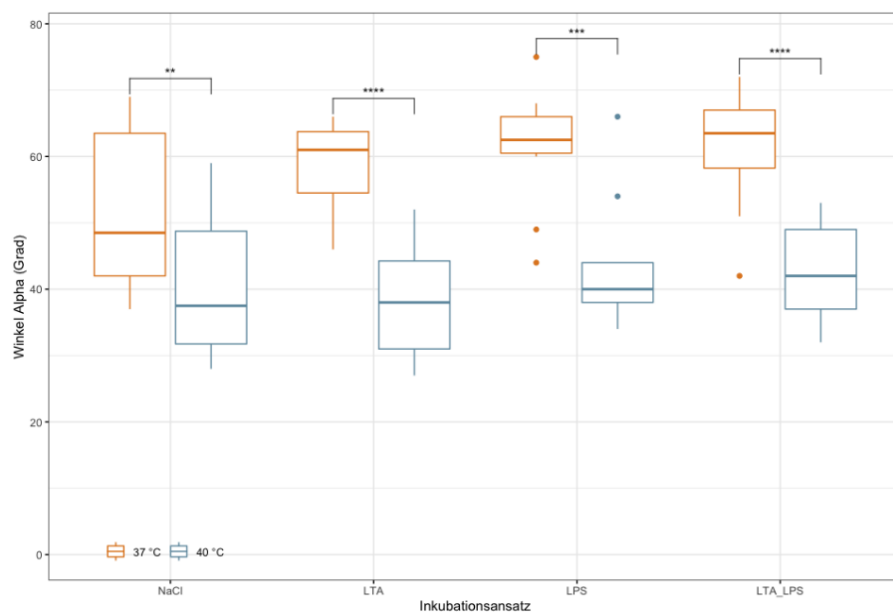


Abb. 58: Darstellung der Werte des Alpha-Winkels für einen Versuch mit physiologischer (37°C) und erhöhter Temperatur (40°C) im Rahmen des Costimulationsversuches. Verkürzung der CFT für Versuche mit LTA und LPS 1mg/ml (Endkonzentration 90,9 µg/ml), Costimulationsansatz (je 45mg/ml) und (NaCl) nach 5 Stunden Inkubation. Deutlich wird die fehlende Vergrößerung des Winkels für den Versuch mit erhöhter Temperatur (h = Stunden, °C = Grad Celsius, ns = nicht signifikant, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001, t-Test für gepaarte Stichproben, Korrektur nach Holm, Alternative einseitig)

Ansatz	Inkubations- dauer[h]	Temperatur [°C]	Variable	n	Min[°]	Mean[°]	Max[°]	Sd[°]	Median[°]
NaCl	0	37 °C	alfa	10	44	56.900	72	9.146	57.0
LTA	0	37 °C	alfa	10	45	58.500	72	9.217	60.5
LPS	0	37 °C	alfa	10	44	58.500	73	9.372	60.0
LTA_LPS	0	37 °C	alfa	10	49	56.500	68	6.133	55.0
NaCl	5	37 °C	alfa	10	37	51.200	69	12.318	48.5
NaCl	5	40 °C	alfa	10	28	40.700	59	11.076	37.5
LTA	5	37 °C	alfa	10	46	59.000	66	6.815	61.0
LTA	5	40 °C	alfa	10	27	38.400	52	8.618	38.0
LPS	5	37 °C	alfa	10	44	61.500	75	9.022	62.5

Ansatz	Inkubations- dauer[h]	Temperatur [°C]	Variable	n	Min[°]	Mean[°]	Max[°]	Sd[°]	Median[°]
LPS	5	40 °C	alfa	9	34	43.667	66	10.149	40.0
LTA_LPS	5	37 °C	alfa	10	42	61.200	72	9.090	63.5
LTA_LPS	5	40 °C	alfa	9	32	42.000	53	7.632	42.0

Tabelle 21: Ausgesuchte Werte des Alpha-Winkels für den Temperatur-Versuch mit LTA und LPS 1 mg/ml (Endkonzentration 90,9 µg/ml), Costimulationsansatz (je und Kontrolle 45,45 mg/ml) und (NaCl), nach Inkubationszeitpunkt sortiert. Angegeben sind Mittelwert (Mean) mit Minimum (Min) und Maximum (Max) sowie Median und Standardabweichung (Sd). Alle Werte in Grad [°]. „n“ bezeichnet die Probandenanzahl, die Inkubationsdauer wird in Stunden [h] angegeben.

Zusammenfassend sind die Veränderungen, die durch Zugabe von Toxinen in den vorangegangenen Versuchen dargestellt werden konnten unter einer erhöhten Temperatur weniger ausgeprägt, bis gar nicht mehr nachweisbar waren. Vor allem bei der Betrachtung der *Clotting Time* ist die zuvor beobachtete Verkürzung nicht mehr nachzuweisen und die mit Toxin versetzten Proben verhielten sich im Experiment ähnlich wie die nativen Proben mit Zusatz von NaCl (Abb. 59A-D).

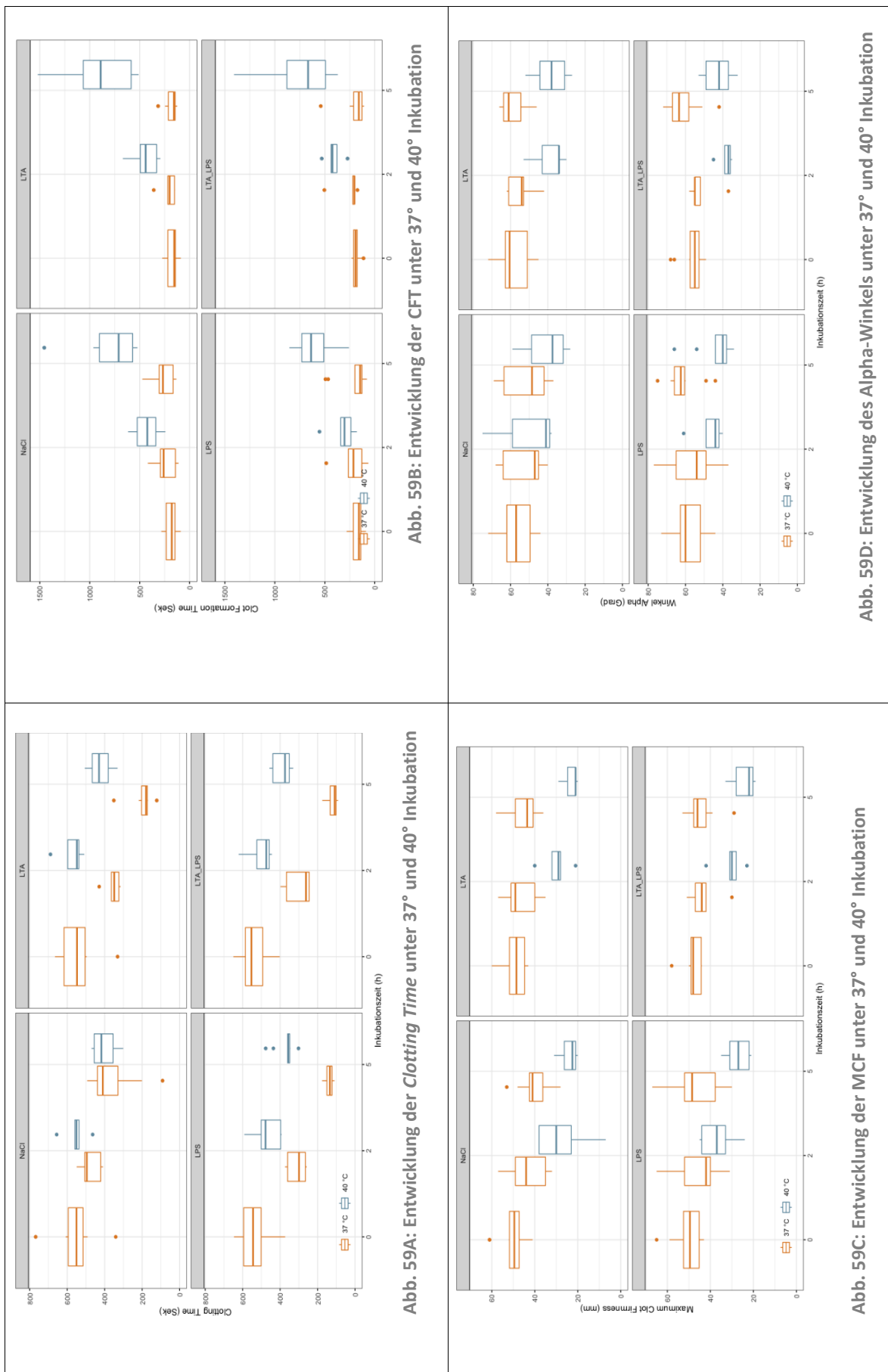


Abb. 59 A-D: Einfluss der Temperatur auf die Veränderungen der ROTEM®-Parameter durch LPS (1 mg/ml), LTA (1 mg/ml) und LPS/LTA (je 1 mg/ml) (sek = Sekunden, mm = Millimeter, h = Stunden)..

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen der Arbeitsgruppe Gerinnungsphysiologie am Institut für Hämostaseologie, Hämotherapie und Transfusionsmedizin am Universitätsklinikum Düsseldorf. Die Fragestellung entwickelte sich aus Arbeiten von Sucker und Hartmann zu einem gerinnungsphysiologischen Sepsis-Modell (Sucker & Hartmann, 2006; Sucker *et al.*, 2007).

Die Rotationsthrombelastographie als Verfahren zur quantitativen Beschreibung des Gerinnungsvorgangs in Vollblut erschien besonders geeignet, tiefere Einblicke in die gerinnungsphysiologischen Abläufe einer komplexen Gerinnungsstörung wie einer Verbrauchskoagulopathie zu erlangen. Die Funktion des Endothels oder auch des muskulären Gefäßverschlusses (primäre Hämostase) kann mit dieser Untersuchungsmethode nicht abgebildet werden (Lang & von Depka, 2006). Die Rotationsthrombelastographie gilt als klinisch etabliertes Verfahren zur Beobachtung des Gerinnungsvorgangs im Vollblut. Sie liefert reproduzierbare Ergebnisse, die klinisch bei verschiedenen Fragestellungen, vor allem im perioperativen Bereich, herangezogen werden (Whiting & DiNardo, 2014).

4.1 Methodische Aspekte der Rotationsthrombelastographie

Alle Daten dieser Arbeit wurden mit Hilfe der Rotationsthrombelastographie (ROTEM®) gewonnen. Analytische Befunde der Rotationsthrombelastographie lassen sich mit vier verschiedenen Parametern beschreiben: die *Clotting Time* (CT), *Clot Formation Time* (CFT), *Maximum Clot Firmness* (MCF) und *Alpha angle* (Alpha-Winkel) (Abb. 60). Details zur Methodik, vor allem zu diesen Parametern, wurden im Methodenteil erläutert (Görlinger, Dirkmann & Hanke, 2016).

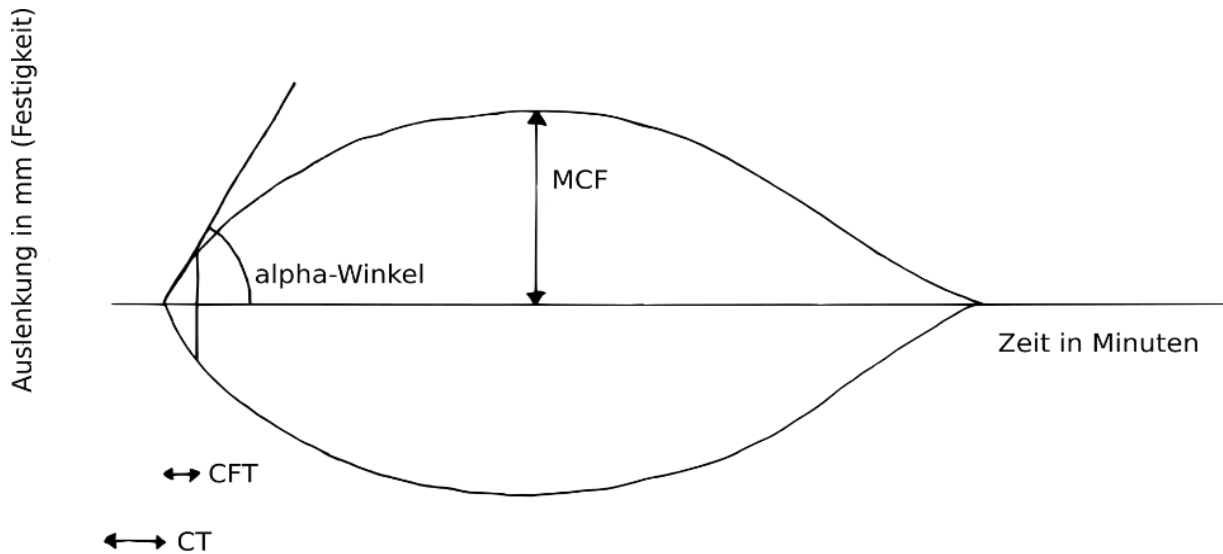


Abb. 60: Beispielhaftes TEMOGRAMM mit Darstellung der gemessenen Parameter CT (*Clotting Time*), CFT (*Clot Formation Time*), MCF (*Maximum Clot Firmness*) und Alpha-Winkel.

Der Gerinnungsvorgang wird bei der Rotationsthrombelastographie durch Zusatz verschiedener Aktivatoren zur Citrat-haltigen Vollblutprobe induziert. Wir verwendeten in dieser Arbeit einen in der Routinediagnostik seltener gebrauchten, aber physiologischeren Untersuchungsansatz. Dabei werden keine Aktivatoren des intrinsischen und extrinsischen Systems verwendet, sondern der Gerinnungsprozess der Rotationsthrombelastographie lediglich durch eine Recalcifizierung mittels Zugabe von Calciumchlorid (star-tem®-Reagenz) eingeleitet. Diese als NATEM bezeichnete Form der ROTEM®-Analyse gilt als sensitiver im Vergleich zu Methoden, die einen Aktivator verwenden, vor allem gegenüber endogenen Faktoren wie z.B. *Tissue factor* (Görlinger, Dirkmann & Hanke, 2016; Durila, Sevcikova & Vymazal, 2016).

Anhand der nicht-stimulierten Proben (NaCl-Kontrollen aller Versuchsreihen) konnte gezeigt werden, dass sowohl die Messwerte zur *Clotting Time* als auch zum Alpha-Winkel einer statistischen Normalverteilung folgen. Für die Parameter CFT und MCF konnte dies nicht gezeigt werden, so dass für diese beiden Parameter lediglich statistische Vergleichsverfahren

angewendet wurden, die keine Normalverteilung voraussetzen.

Referenzwerte gesunder Probanden unter NATEM-Bedingungen sind noch immer Bestandteil von Untersuchungen. Bei Spiezia *et al.* wurden Werte gesunder Menschen gegen Affen verglichen, dort waren CT-Werte von 689 ± 114 s, CFT-Werte von 257 ± 76 s, MCF-Werte von 48 ± 6 mm und Alpha-Winkel von $47 \pm 9^\circ$ (unter NATEM-Bedingungen, jeweils Median $\pm$ Standardabweichung) dokumentiert worden (Spiezia *et al.*, 2010). Dies entspricht den in der vorliegenden Arbeit festgestellten Ergebnissen der Kontroll-Werte.

Lange Inkubationszeiten sind jedoch kritisch zu interpretieren. Gerinnungsfaktoren sind nicht im Überschuss im Ansatz, sondern wirken für den Gerinnungsablauf limitierend. Dies zeigt sich in diesem Versuch daran, dass mit fortschreitender Inkubationszeit (ab ca. 8 bis 12 Stunden) auch die CT-Werte der Kontrollen sich verkürzten. Zudem wirken hier beginnende Fibrinolyse-Effekte, die jedoch nicht Teil dieser Untersuchung waren und damit nicht weiter quantifiziert werden können. Somit wird hier die Grenze der Methodik dargestellt.

In einer Studie zum Effekt von Messungenauigkeiten bei häufiger Probenentnahme 2004 zeigten Zambruni *et al.*, dass die *Clotting Time* in Kontrolluntersuchungen über einen Zeitraum von 4 Stunden abnimmt, wenn wiederholt Blut aus derselben Küvette pipettiert wird. Es wird diskutiert, dass durch den wiederholten Kontakt mit der Pipettenspitze Kontaktaktivierungen ausgelöst werden (Zambruni *et al.*, 2004).

Auch Meesters *et al.* diskutieren, dass allein eine Verzögerung der Untersuchung durch Liegezeiten eine Verkürzung der CT und CFT hervorruft, ohne jedoch die MCF zu beeinflussen (Meesters *et al.*, 2015). Dieses Problem wurde auch bei Camenzind *et al.* diskutiert, die eine maximale Liegezeit der Citratblut-Proben von 8 Stunden postulieren (Camenzind *et al.*, 2000).

Diese methodischen Probleme werden in der vorliegenden Arbeit durch den kontinuierlichen und steten Einsatz von Kontrollproben ohne Toxinzusatz ausgeglichen und in statistischen Untersuchungen im Vergleich zur Kontroll-Probe aufgefangen.

4.2 Rotationsthrombelastographie als Sepsis-Modell

Die genannte gerinnungsphysiologische Arbeitsgruppe hatte bereits erarbeitet, dass Zugaben von Lipopolysaccharid zu Vollblut als Modell einer gramnegativen Sepsis zu einer relevanten und reproduzierbaren Verkürzung der *Clotting Time* (CT) bei der Rotationsthrombelastographie führten (Sucker & Hartmann, 2006).

Die vorliegende Arbeit soll diese Ergebnisse der Arbeitsgruppe zum Modell der gramnegativen Sepsis um Daten zu einem gerinnungsphysiologischen Modell der grampositiven Sepsis ergänzen.

Hierzu diene die *in vitro*-Zugabe von Lipoteichonsäure (LTA), einer Substanz, die in den Zellwänden grampositiver Bakterien zu finden ist und als deren Pathogenitätsfaktor dient (Wicken & Knox, 1975). Während bei gramnegativen Bakterien Lipopolysaccharid (LPS) als einziger Pathogenitätsfaktor existiert (Woodward, 2015), gibt es bei grampositiven Bakterien mehrere parallel vorkommende biochemisch definierte Pathogenitätsfaktoren, neben LTA u.a. Peptidoglykane (Rohde, 2019) (vergl. Einleitung, 1.3).

Das hier verwendete LTA ist kommerziell erhältlich. Herkunft und Reinheit der Substanz konnten deshalb nicht beeinflusst werden. In vorangegangenen Arbeiten ist diskutiert worden, ob kommerziell erhältliches LTA tatsächlich so aufgereinigt sei, dass es auch keine Spuren von LPS enthalte (Gao *et al.*, 2001). Diese Frage war nicht Gegenstand dieser Arbeit. Hier wird in allen Schlussfolgerungen davon ausgegangen, dass das für die Methodik kommerziell erworbene LTA einen so hohen Reinheitsgrad aufwies, dass Verunreinigungen keinen eigenständigen Effekt verursachten.

4.3 Gerinnungsaktivierung im Modell der Rotationsthrombelastographie

Der Gerinnungsvorgang wurde jeweils an frisch entnommenen, mittels Citratzugabe antikoagulierten, Vollblutproben gesunder Freiwilliger untersucht. Alle Untersuchungsvorgänge dieser Arbeit erfolgten dann *in vitro*. Der normale Gerinnungsablauf wurde über die Zeit quantitativ erfasst. Im Vergleich wurden die Abläufe im Rahmen von unterschiedlichen Inkubationsbedingungen wie z.B. bei Zusatz chemisch definierter Substanzen oder verschiedenen Inkubations-Temperaturen untersucht.

Gerinnungsphysiologisch ist im Rahmen einer Aktivierung der Gerinnung mit einer Verkürzung der Zeit bis zum Einsetzen der Gerinnung zu rechnen, welches in der Rotationsthrombelastographie einer Verkürzung der CT entspricht. Die CFT, die eine Zeit zwischen zwei definierten Punkten beschreibt, sollte sich ebenfalls verkürzen, während der Alpha-Winkel und die MCF sich vergrößern sollten (Görlinger, Dirkmann & Hanke, 2016).

Die Verkürzung der CT war in den Untersuchungen der Arbeitsgruppe zu LPS bereits deutlich herausgestellt worden (Sucker & Hartmann, 2006). Dort waren statistisch signifikante Verkürzungen der *Clotting Time* nach 4 Stunden Inkubation darstellbar. Zu den weiteren Parametern (CFT, MCF und Alpha-Winkel) wurden keine relevanten Änderungen beschrieben. In der vorliegenden Arbeit zeigten die Untersuchungen, dass die Rotationsthrombelastographie an den Vollblutproben gesunder Spender mit Toxin versetzt intraindividuell gut reproduzierbare Ergebnisse liefern. Diese sind gut mit der Arbeit von Sucker *et al.* vergleichbar. Zusätzlich konnten die theoretisch herleitbaren Veränderungen an CFT, MCF und Alpha-Winkel ebenfalls dargestellt werden.

4.4 Ähnlichkeit der Effekte von LTA und LPS in der Rotationsthrombelastographie

In der Arbeitsgruppe wurden die Veränderungen der Rotationsthrombelastographie in einem gramnegativen Sepsismodell bereits belegt. Dort waren statistisch signifikante Verkürzungen der CT in einem Versuchsansatz mit 1 mg/ml LPS ab 4 Stunden Inkubation darstellbar, eine maximale Verkürzung der CT war nach 5 Stunden beschrieben. Die CT verkürzte sich nach 5 Stunden Inkubation bei 37 °C um 86 % von 578 ± 94 s auf 80 ± 20 s (angegeben jeweils Mediane $\pm$ Standardabweichung).

Diese Ergebnisse konnten in der hier vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Es kam zu einer signifikanten Verkürzung der CT bei dem Versuchsansatz mit 1mg/ml LPS um 77 % von $551,6/522 \pm 129,4$ s auf $124,5/107 \pm 26,5$ s (angegeben jeweils Mittelwerte/ Median $\pm$ Standardabweichung).

Zusätzlich zeigten sich bei der CFT in dem Versuch mit LPS signifikante Verkürzungen für die höchste Konzentrationsstufe beginnend nach 2 Stunden Inkubation. Auch die MCF zeigte signifikant vergrößerte Werte nach 2 bzw. 4 Stunden. Im Vergleich dazu zeigten die vorangegangenen Versuche der Arbeitsgruppe keine Signifikanz für Parameter außer der CT (Sucker & Hartmann, 2006). Zusammenfassend verhalten sich unter LPS alle Parameter in der vorliegenden Arbeit entsprechend einer Gerinnungsaktivierung (s. Abschnitt 4.3).

Der Versuchsansatz der Arbeitsgruppe wurde in der hier vorliegenden Arbeit um das Modell einer grampositiven Sepsis erweitert. Mit LTA ließen sich die ersten Veränderungen im Vergleich zur *Baseline* und im Vergleich zur Kontrolle optisch bereits nach einer Stunde nachweisen. Zu einer statistisch signifikanten Veränderung gegenüber NaCl kam es allerdings bei allen eingesetzten Konzentrationen von LTA erst nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden. Ein Soforteffekt der Zugabe von LTA zum Vollblutansatz wurde nicht gesehen. Die Verkürzung der CT erreichte ihr Maximum nach 4 bis 6 Stunden und war in ihrem Ausmaß abhängig von der Konzentration des Toxins. Nach 4 Stunden Inkubation kam es bei einer Konzentration von 1 mg/ml (Endkonzentration $90,9 \mu\text{g/ml}$ in der Probe) zu einer Verkürzung der CT um 35,1 % von $547,4 \pm 148$ s auf $355,0 \pm 85$ s (jew. Mittelwerte und Standardabweichung).

Tatsächlich ähneln sich die Gerinnungsabläufe, die durch Zusatz von LPS oder von LTA erzeugt wurden, insbesondere durch diese zeitabhängige Dynamik. Auch das Ausmaß der Änderung der Parameter zueinander und die Konzentrationsabhängigkeit entsprechen einander. Dies impliziert einen verwandten Mechanismus der Gerinnungsaktivierung durch LPS und LTA. Im weiteren Verlauf (Kapitel 4.5 bis 4.8) werden weitere Aspekte des Vorganges diskutiert und dort zusammengefasst.

Die Gerinnungsaktivierung nach Erkennung der Toxine als Pathogen verläuft über *Toll-Like*-Rezeptoren (vergl. Einleitung). Dabei wird LPS über TLR-4, LTA hingegen über TLR-2 erkannt (Lu, Yeh & Ohashi, 2008; Foley Jonathan H. & Conway Edward M., 2016; Barton & Medzhitov, 2003). Die beiden Toxine induzieren über die beiden *Toll-Like*-Rezeptoren unterschiedliche Zytokine. Während LPS z.B. NF- κ B, IL-8 und IL-10 sowie TNF- α und Interferon- γ induziert, verläuft die Signaltransduktion von LTA z.B. über NF- κ B und IL-8 (Finney *et al.*, 2012; Kimbrell *et al.*, 2008).

TNF- α , Interferon- γ , IL-1, IL-6 und IL-8 sind daraufhin Vermittler der Expression von *Tissue factor* auf Makrophagen und Monozyten (Grignani & Maiolo, 2000; Margetic, 2012; van der Poll, de Jonge & ten Cate, 2013). Unter diesem Blickwinkel erscheint LPS eine mächtigere Reaktion auszulösen als LTA.

Zusätzlich zu der zeitabhängigen Dynamik der Gerinnungsabläufe von LTA und LPS ist in der vorliegenden Arbeit auch die konzentrationsabhängige Wirkung untersucht worden. Es zeigte sich eine Zunahme der Gerinnungsaktivierung mit steigender Konzentration von LTA bzw. LPS. Festzuhalten ist hierbei, dass LTA in der höchsten Dosierung (90,9 μ g/ml) deutlich geringere Verkürzungen der CT hervorrief als LPS in niedrigeren Konzentrationen. Passend dazu wird in der Literatur LTA im Vergleich zu LPS stets als der weniger potente Induktor der Gerinnung bezeichnet (Islam *et al.*, 2013; Finney *et al.*, 2012).

In einem Versuch an 23 Freiwilligen zeigten Hoogerwerf *et al.*, die Auswirkungen einer bronchoskopischen Toxinapplikation (einerseits LTA von *S. aureus* und andererseits LPS von *E. coli*) auf Alveolarmakrophagen (Hoogerwerf *et al.*, 2009). Untersucht wurden in der bronchioalveolären Lavage coagulatorische Marker, u.a. *Tissue factor*. Dabei zeigte sich, dass LTA und LPS ähnliche Ergebnisse erbrachten in der Induktion von *Tissue factor*, jedoch dass von LTA 25-fach höhere Dosen gebraucht wurden, um die Ergebnisse von LPS widerzuspiegeln (100 ng/kg LTA im Gegensatz zu 4 ng/kg LPS) (Hoogerwerf *et al.*, 2009).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Zugabe von kommerziell erhältlichem LTA zu Vollblut zu einer relevanten und signifikanten Verkürzung der CT führte. Dabei waren die Veränderungen sowohl konzentrations- als auch zeitabhängig. Die CT zeigte von allen Parametern die deutlichsten und konsistentesten Veränderungen, so dass die CT als Leitparameter für die weiteren Ausführungen herangenommen wurde.

4.5 Vergleichbarkeit der Reaktion auf LTA, LPS oder bei Costimulation

Nachfolgend wurde die Versuchsanordnung um eine Costimulation erweitert. Dies sollte experimentell eine Superinfektion mit grampositiven und gramnegativen Toxinen simulieren. In einer eigenen Versuchsreihe wurde jede Probe eines Probanden parallel mit LTA, LPS, eine Kombination aus LTA/LPS sowie eine Kontrolle getestet. Dieser vergleichende Ansatz erlaubte auch eine gegenüberstellende Aussage über die Stärke der Effekte von LTA und LPS.

Dabei zeigte sich sehr deutlich, dass die Verkürzung der *Clotting Time* durch LPS (mit und ohne LTA) optisch stärkere Effekte erreichte als durch LTA allein. Bei gleichen Konzentrationen im Ansatz führt LPS im parallelen Vergleich zu einer stärkeren Gerinnungsaktivierung als LTA. Die Kombination aus beiden Toxinen führt zu keiner weiteren signifikanten Verkürzung der CT. Es zeigte sich, dass der Versuchsansatz mit LTA/LPS zwar nur einen geringen Unterschied zur Kurve mit LPS allein zeigte, jedoch einen deutlichen Unterschied zum Versuch mit LTA. Dies gilt ebenso für die CFT.

Wie zuvor erläutert, kann die unterschiedliche gerinnungsaktivierende Antwort auf LTA, LPS und LTA/LPS mit den verschiedenen TLRs, dem Signalweg und den induzierten Cytokinen erklärt werden. Während LTA über TLR2 und den MyD88-abhängigen Signalweg die Cytokininduktion auslöst, geschieht dies bei LPS über TLR4 zusätzlich über den MyD88-unabhängigen Signalweg (vergl. Einleitung und Kapitel 4.4). Ebenfalls induzieren sie verschiedene Cytokine und signalgebende Moleküle (LTA vorwiegend IL-8, LPS TNF- α , IL-8, IL-10, bei NF- κ B wird die Wirkung als äquipotent beschrieben) (Grignani & Maiolo, 2000; Finney *et al.*, 2012; Kimbrell *et al.*, 2008). Dabei ist in der Literatur LTA stets als der niedrigpotentere Induktor beschrieben (Islam *et al.*, 2013; Finney *et al.*, 2012; Kimbrell *et al.*, 2008).

Islam *et al.* untersuchten 2013 die Effekte von LTA, LPS und einer Costimulation (LTA+LPS) auf die *in vitro* Cytokinproduktion der Alveolarmakrophagen von Ferkeln. Dabei wurde LPS (Konzentration von 1 μ g/ml) und LTA (Konzentration von 10 μ g/ml) verwendet (Islam *et al.*, 2013). Untersucht wurden die Einflüsse nach einer 24-stündigen Inkubation von LPS und LTA sowie beiden zusammen auf Cytokine und signalbildende Moleküle (u.a. TLR-2, TLR-4, CD18, MyD88, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α). Bis auf TNF- α und TLR2 zeigte LPS dabei die potentere Reaktion, obwohl es in einer 10-fach niedrigeren Dosierung im Vergleich zu LTA verwendet wurde. In dem costimulierten Ansatz zeigten sich die Ergebnisse durchweg leicht bis deutlich ausgeprägter als bei LTA oder LPS allein (Islam *et al.*, 2013).

Dies ist nicht ganz kongruent mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Hier konnte durch

eine Costimulation keine Steigerung der Gerinnungsaktivierung (dargestellt durch eine verkürzte CT) im Vergleich zu LPS allein dargestellt werden.

Das könnte an den in den vorliegenden Versuchen verwendeten Konzentrationen der Toxine liegen. Für den costimulierten Versuch wurde in der vorliegenden Arbeit eine äquivalente Konzentration von LPS und LTA von 90,9 µg/ml benutzt, die zudem deutlich über der Dosierung von Islam *et al.* lag. So ist anzunehmen, dass durch die hier verwendete Konzentration von LPS die biochemischen Prozesse des Signalweges gesättigt sind. In der Folge ist der Verbrauch der Gerinnungsfaktoren bereits maximal stimuliert und kann durch Zugabe von LTA nicht weiter gesteigert werden kann. Bei niedrigeren Konzentrationen ist ein additiver Effekt, wie bei Islam *et al.* Beschrieben, denkbar. Weiterführende Untersuchungen mit niedrigeren Konzentrationen von LTA und LPS könnten diese These untermauern.

4.6 Zeitliche Dynamik der Gerinnungsaktivierung unter LTA oder LPS

Die Verkürzung der CT ist sowohl bei LTA- als auch bei LPS-Zusatz ein zeitabhängiger Vorgang. Der Effekt begann, wie in den vorgenannten Versuchsansätzen beschrieben (Kapitel 4.4 und 4.5), nach einer Latenzzeit und nahm dann zunächst mit fortschreitender Zeit zu. Der Vorgang ist darüber hinaus konzentrationsabhängig. Höhere Konzentrationsstufen zeigten eine ausgeprägtere Verkürzung der CT. Die Latenzzeit wurde dabei nicht verkürzt.

Bei allen beobachteten Parametern (CT, CFT, MCF, Alpha-Winkel) erreichten die Veränderungen über die Zeit ein Plateau. Dies konnte im Langzeit-Versuch deutlich dargestellt werden. Im Verlauf einer 24-stündigen Inkubation zeigte sich eine maximale Verkürzung der CT nach Ablauf von etwa 8 Stunden, es wurde keine statistisch relevante oder auch optisch feststellbare Verkürzung nach 12 oder 24 Stunden mehr aufgezeigt. Dies ist mit einem endlichen Prozess der Aktivierung der Gerinnungsfaktoren *in vitro* gut vereinbar.

Eine Erklärung könnte sein, dass in der *in vitro*-Umgebung alle Gerinnungsfaktoren aufgebraucht und alle Thrombozyten aktiviert sind und somit keine weitere Gerinnungsaktivierung stattfinden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurden weder Gerinnungsfaktoren noch Thrombozytenzahl im Verlauf der Experimente bestimmt, aber nach theoretischem Verständnis kann angenommen werden, dass in dieser Umgebung keine neuen Gerinnungsfaktoren gebildet werden können (Hoffman & Monroe, 2001; Palta, Saroa & Palta, 2014).

Die zeitliche Dynamik endet nach spätestens 8 Stunden, so dass vermutet werden kann, dass die Gerinnungsaktivierung zu diesem Zeitpunkt abgeschlossen ist. Giannoudis *et al.* beschrieben 2004 unter anderem, dass TNF- α eine Halbwertszeit von 14 bis 18 Minuten in Plasma hat. Es zeigt die größten Konzentrationen im Rahmen einer SIRS nach 1 bis 2 Stunden, um nach 4 bis 6 Stunden signifikant zu reduzieren (Giannoudis, Hildebrand & Pape, 2004).

Gregory *et al.* zeigten, dass eine *in vitro*-Stimulation von Monozyten mit LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) zu einem deutlichen Nachweis von TF-Aktivität führte. Diese war 2 Stunden nach Zugabe des LPS erstmals nachweisbar und zeigte einen Peak nach 4 Stunden. Nach 8 Stunden war nur noch 20 % der maximalen Ausprägung der TF-Aktivität nachweisbar (Gregory, Morrissey & Edgington, 1989).

Sowohl die experimentelle Erkenntnis der vorliegenden Arbeit als auch diese Arbeiten zu Cytokinwirkungen sprachen dafür, die folgenden Untersuchungen auf einen Untersuchungszeitraum bis zu 5 Stunden zu begrenzen, da die wesentlichen Veränderungen des Gerinnungsablaufs in dieser Zeit zu erwarten waren.

4.7 Proteinsynthesehemmer Cycloheximid schwächt Wirkung der Toxine ab

Es konnte aufgezeigt werden, dass die Rotationsthrombelastographie das Potential hat, die Folgen einer Gerinnungsaktivierung durch Toxine darzustellen.

Ergänzend stellte sich die Frage, welche biochemischen Vorgänge der durch die Toxine hervorgerufenen Gerinnungsaktivierung zugrunde liegen. In der Arbeitsgruppe wurden vorher bereits Versuche durch Hinzugabe von Cycloheximid sowie durch Anwenden eines höher temperierten Reaktionsansatzes („Fieber“) durchgeführt. Methodisch sollte an diese angeschlossen werden.

Cycloheximid ist ein Proteinsyntheseinhibitor, der in der Forschung seit Jahrzehnten benutzt wird, um die Translation zu hemmen (Whiffen, 1948). Zunächst wurde er in der Literatur als Actidione bezeichnet und als Antibiotikum aus *Streptomyces griseus* gewonnen. Es führt bei Eukaryonten zur Apoptose der Zelle. (Schneider-Poetsch *et al.*, 2010).

Zusammenfassend führte in der vorliegenden Arbeit die Hinzugabe von Cycloheximid zu einer signifikanten Abschwächung der zuvor beobachteten Toxin-induzierten Verkürzung der *Clotting Time*. Diese Abschwächung war in allen Ansätzen mit Toxinen (LTA, LPS und einer Kombination aus LTA/LPS) beobachtbar.

Ebenso blieb in dieser Konstellation die Gerinnungsaktivierung für die weiteren von ROTEM® gemessenen Parameter aus. Im Vergleich zu den Ansätzen ohne Cycloheximid nach 5 Stunden Inkubation zeigte sich die CFT signifikant verlängert, die MCF verkürzt und der Alpha-Winkel verkleinert in den Ansätzen mit Cycloheximid.

Diese Beobachtungen sind gut vereinbar mit der Annahme, dass die Effekte der Toxin-Zugabe auf die Blutgerinnung eine Proteinsynthese erfordern, die durch Cycloheximid inhibiert wird.

Cycloheximid blockiert die Translation von Proteinen an der 60S-Untereinheit von Ribosomen (Siegel & Sisler, 1963; Schneider-Poetsch *et al.*, 2010). In Studien konnte dargelegt werden, dass Cycloheximid dadurch die Signalweitergabe von TLR unterbindet (Asrat, Dugan & Isberg, 2014; van der Poll, 2008; Schneider-Poetsch *et al.*, 2010). Bei Asrat *et al.* kam es in Versuchen unter anderem mit den Toxinen LTA und LPS nach Zugabe von Cycloheximid zu einer kompletten Inhibition der Translation von TNF- α und IL-1 α und IL-1 β (Asrat, Dugan & Isberg, 2014).

Wie bereits in der Einleitung erläutert (vergleiche Kapitel 1.3), sind TNF- α und die Interleukine 6 und 1 im Rahmen der Signaltransduktion wichtig für die Expression von TF auf

Makrophagen und Monozyten (Grignani & Maiolo, 2000). Die Gabe von Cycloheximid führt zu einer verminderten *Tissue factor*-Expression (van der Poll, 2008; Asrat, Dugan & Isberg, 2014; Schneider-Poetsch *et al.*, 2010).

4.8 Hitzestress (40°C) inhibiert die Effekte von LTA und LPS

Die Inkubation mit einer erhöhten Temperatur des Wasserbades von 40 °C diente zur Simulation eines Fiebers.

Sowohl in den Ansätzen mit LPS und LTA als auch mit LPS/LTA blieb bei einer Inkubationstemperatur von 40 °C die zuvor bei 37 °C beobachtete Verkürzung der CT aus.

Das Ausbleiben der Aktivierung der Gerinnung im Hitzestress wurde bereits von Sucker *et al.* beobachtet, allerdings in einem Ansatz mit LPS, der für 2 Stunden bei 43 ° inkubiert wurde (Sucker *et al.*, 2007).

Denkbar wäre in diesem Zusammenhang ein Zelltod der Bestandteile des Vollblutes als Grund für die veränderte Gerinnungsaktivierung. Die in der vorliegenden Arbeit benutzte Temperatur von 40 °C lag jedoch unter der in der Literatur beschriebenen zelltoxischen Temperatur von oberhalb von 43°C (Hildebrandt, 2002). In Studien wurde gezeigt, dass eine kurzzeitige Applikation von Hitze (42°C bis 45°C für 30 Minuten) bzw. längerdauernde moderate Applikation von Hitze (39,5°C bis 41,5°C über 3 bis 24 Stunden) bei Zellen *in vitro* sogar zu einer Thermotoleranz führen kann (Glory, Bettaieb & Averill-Bates, 2014; Ahmed *et al.*, 2020). Daher wird eine Apoptose der für die Gerinnungsaktivierung wichtigen Monozyten und der Thrombozyten zur Formierung eines Gerinnsels nicht angenommen.

In einer Studie zeigten Djaldetti *et al.*, dass bei einer Temperatur von 40°C über 2 Stunden im Blut deutlich mehr (37 % erhöhte Anzahl) aktive Monozyten nachweisbar waren als bei der Kontrollgruppe, welche bei 37°C inkubiert wurden (Djaldetti & Bessler, 2015). Auch dies spricht gegen einen Zelltod der Monozyten.

Eine weitere Möglichkeit für das Ausbleiben der Gerinnungsaktivierung ist die Beeinträchtigung der Cytokine oder des *Tissue factors* aufgrund des Hitzestresses.

Hitzestress führt zu einer Reduktion der allgemeinen Proteinsynthese, während die Produktion von schützenden Heat-shock-Proteinen hochreguliert wird (Kochevar, Aucoin & Cooper, 1991; Lindquist & Craig, 1988; Young, 1990).

Fairchild *et al.* untersuchten Blut, das bei 37 °C oder 40 °C für 30 Minuten inkubiert und daraufhin mit 100ng/ml LPS versetzt wurde (Fairchild *et al.*, 2000). Nach 2, 6 und 24 Stunden wurde die Konzentration von TNF- α , IL-1 β und IL-6 untersucht. Dabei zeigte sich, dass bei einer Inkubation von 40°C die Konzentrationen von TNF- α und den Interleukinen signifikant niedriger lagen als bei einer Inkubationstemperatur von 37° C.

Eine Untersuchung von Kappel *et al.* zeigte, dass eine 24-stündige Inkubation mit LPS bei

39 °C zu einer 50 % Reduzierung der IL-6-Expression auf Monozyten führte (Kappel *et al.*, 1991). Nair *et al.* zeigten reduzierte TNF- α - und IL-6 Produktion von Makrophagen, welche 2 Stunden bei 42 °C inkubiert wurden, bevor sie mit LPS stimuliert wurden. Gleichzeitig konnte die letztgenannte Arbeitsgruppe über eine spezifische Stimulation einzelner TLRs zeigen, dass sowohl der *MyD88-dependent* als auch der *MyD88-independent-pathway* von dieser durch Hitzeapplikation reduzierten Cytokinproduktion betroffen sind.

Basi *et al.* zeigten in einer Studie an Endothelzellen, dass eine Inkubation der Zellen mit 43 °C für 3 Stunden und nachfolgender Stimulation mit LPS zu einer signifikant verkürzten TF-Aktivität führte (Basi *et al.*, 2003).

Diese Beobachtungen aus der vorliegenden Arbeit und der beschriebenen anderen Arbeitsgruppen lässt die Hypothese zu, dass Hitzestress zu einem gewissen Schutz vor den gerinnungsphysiologischen Veränderungen von LTA und LPS führt. Tatsächlich kann die Körpertemperatur bei Sepsis den klinischen Ausgang verändern. In verschiedenen klinischen Studien wurde das *Outcome* von Patienten in der Sepsis mit und ohne Temperatursenkung verglichen. Es zeigte sich wiederholt eine deutliche Reduktion der Mortalität in der Gruppe der Patienten mit höherer Körpertemperatur (Sundén-Cullberg *et al.*, 2017; Su *et al.*, 2005).

4.9 Rotationsthrombelastographie bei Sepsis

In einem *Review* von insgesamt 18 Arbeiten zeigten Müller *et al.* 2014, dass mittels ROTEM® Gerinnungsveränderungen bei Patienten mit Sepsis dargestellt werden können (Müller *et al.*, 2014). Die in diesen Arbeiten verwendeten Methoden waren jedoch nur begrenzt miteinander vergleichbar. Neben unterschiedlichen Untersuchungsansätzen (nur vereinzelt wurde die NATEM-Methode verwendet), kamen auch unterschiedliche Rotationsthrombelastographie-Geräte und damit auch unterschiedliche Referenzwerte (ROTEM® bzw. TEG®) zum Einsatz. Letztlich waren auch, wie bei einem so komplexen Geschehen wie einer Sepsis zu erwarten, die untersuchten Krankheitsbilder und die Untersuchungszeitpunkte im Vergleich zum Sepsisbeginn nur begrenzt vergleichbar.

In einer Arbeit von Koch wurden ROTEM®-Untersuchungen an Patienten mit zwei oder mehr SIRS-Kriterien durchgeführt (Koch *et al.*, 2013). Es wurde ein Versuchsansatz mit NATEM verwendet und der *Clotting Time* eine Endotoxin-Aktivität gegenübergestellt. Es zeigte sich eine verkürzte CT im Vergleich zu Ausgangswerten mit steigender Endotoxin-Aktivität.

In einer prospektiven Studie an Patienten mit Sepsis untersuchten Daudel *et al.* Blut von Patienten, bei denen der SOFA-Score eine Sepsis indizierte, mittels der Rotationsthrombelastographie (Untersuchungen vorwiegend mit EXTEM) (Daudel *et al.*, 2009). Dabei zeigte sich, dass die Patienten keine signifikant reduzierte CT zeigten, wie man zuvor vermutet hatte. Allerdings ist bei diesen Patienten auch nicht näher aufgeführt, um welche Art von Sepsis es sich handelte. Die Patienten erhielten während der Sepsis eine intravenöse Antikoagulation mit Heparin, die ebenso eine Veränderung der ROTEM®-Parameter verursacht haben könnte. Die Arbeitsgruppe schließt dies jedoch nach eigenen Angaben nach Überprüfung der Ergebnisse mittels HEPTM aus.

Ebenso wurde bei Andersen *et al.* das Blut von Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock untersucht (Andersen *et al.*, 2014). Bei diesen zeigte sich eine normale CT, die innerhalb der Referenzwerte der Rotationsthrombelastographie lagen. Die Untersuchungen wurden an EXTEM/ INTEM/ HEPTM und FIBTEM durchgeführt (nicht NATEM). Von der Arbeitsgruppe wird jedoch diskutiert, dass die frühen Veränderungen nicht detektiert werden konnten, da die Patienten oft erst nach 24-stündiger Krankheit in die Studie inkludiert wurden. Aber auch bei manifester DIC, welche gegenregulatorische Maßnahmen wie z.B. Applikation von *Fresh Frozen Plasma* (FFP) nötig machten, kam es nicht zu einer Veränderung der ROTEM®-Messwerte gegenüber den Referenzwerten.

Velik-Salchner *et al.* untersuchten bereits 2009 experimentell ausgelöste *in vivo*-Endotoxinämie

(LPS von E.coli) an Schweinen (Velik-Salchner *et al.*, 2009). Die Untersuchungen wurden mittels EXTEM und FIBTEM gemessen. Die CT verkürzte sich signifikant im INTEM-Ansatz, jedoch nicht im EXTEM-Ansatz. Der Alpha-Winkel vergrößerte sich signifikant.

Schöchl *et al.* untersuchten 2010 die *in vivo*-Auswirkungen einer experimentell ausgelösten Endotoxinämie (LPS) auf die Rotationsthrombelastographie an Schweinen (Schöchl *et al.*, 2011). Dabei zeigte sich mittels des NATEM eine signifikante Verkürzung der CT bereits 2 Stunden nach Applikation des Toxins in die Blutbahn der Schweine. Interessanterweise kam es danach jedoch zu einer Verlängerung der CT, die zum Ende des Experimentes den 2-Stunden-Wert signifikant überstieg. Die CFT zeigte eine konstante Steigerung, der Alpha-Winkel eine signifikante Reduktion im Verlauf des Experimentes. Die initiale CT-Verkürzung deckt sich mit unseren Untersuchungsergebnissen.

Spiel und Mitarbeiter injizierten in einer Untersuchung LPS in gesunde Probanden, und untersuchten deren Blut in einem Zeitraum von 0 bis 24 Stunden (Spiel *et al.*, 2006). Die Arbeitsgruppe benutzte zur Gerinnungsanalyse das NATEM-Verfahren wie in der hier vorliegenden Arbeit. In diesem *in vivo* Setting wurden verkürzte CT beschrieben mit ersten signifikanten Ergebnissen 4 Stunden nach Beginn der Injektion, welche bis 8 Stunden nach Injektion darstellbar blieben. Der 24-Stunden-Messwert zeigte jedoch einen Anstieg auf Ausgangswerte zurück. Sie konnten keine signifikanten Änderungen der CFT oder MCF feststellen.

In der zusammenfassenden Betrachtung ist die *in vitro* regelhaft nachzuweisende Verkürzung der CT unter Einfluss von Toxinen in der klinischen Situation nicht verlässlich darstellbar. Dies gilt sowohl für grampositive als auch für gramnegative Sepsis-Situationen.

Das mag einerseits daran liegen, dass die Sepsis-Diagnose anhand von klinisch definierten Sepsis-Kriterien keine Frühdiagnose sein kann (vergl. Einleitung). Diese Kriterien werden häufig erst nach Verschlechterung des Allgemeinzustandes des Patienten (auch außerklinisch) oder bei Eintritt eines Fiebers erhoben. Im Gegensatz dazu wurden in der hier vorliegenden Arbeit unter *in vitro*-Bedingungen ab Stunde 0 die Auswirkungen der bakteriellen Toxine studiert. So kann man davon ausgehen, dass die ersten kritischen Stunden einer bakteriellen Infektion in denen bereits entscheidende Veränderungen der Gerinnung eintreten, in den klinischen Studien nicht miterfasst sind. Deswegen ist eine direkte Messung wie bei den absichtlich durchgeführten Toxin-Injektionen in gesunde Tiere oder Probanden am ehesten mit der hier angewandten Messmethode zu vergleichen. Und tatsächlich zeigen die Arbeiten von Velik-Salchner, Schöchl und Spiel einen Abfall der CT innerhalb von 2 Stunden nach Injektion des Toxins (Velik-Salchner *et al.*, 2009; Schöchl *et al.*, 2011; Spiel *et al.*, 2006). Die

Untersuchung von Schöchel an Schweinen beschreibt einen Anstieg der CT im Verlauf des Experimentes. Auch bei Spiel deuten die Daten auf eine Normalisierung der CT im Verlauf hin, was der Hypothese entspricht, dass im *in vivo*-Verlauf gegenregulatorische Maßnahmen und Neusynthese von Gerinnungsfaktoren stattfinden (Schöchel *et al.*, 2011; Spiel *et al.*, 2006).

Andererseits liegen die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Toxinkonzentrationen teils erheblich über den in Patientenuntersuchungen festgestellten bakteriellen Toxin-Konzentrationen. Diese betragen laut einer Studie von Opal an 253 Patienten mit beginnender bis fulminanter Sepsis im Median 300pg/ml (Variationsbreite zwischen 110 und 726pg/ml) (Opal *et al.*, 1999). Dies erklärt die teils uneinheitlichen Ergebnisse in klinischen Untersuchungen septischer Patienten.

4.10 Epikritische Überlegungen

Zusammenfassend konnte die vorliegende Arbeit frühere Ergebnisse der Arbeit von Sucker und Hartmann *et al.* bestätigen (Sucker & Hartmann, 2006; Sucker *et al.*, 2007). Das gerinnungsphysiologische Modell der Hinzugabe von Bakterienwand-Toxinen führt zu Effekten der Blutgerinnung, die im Sinne einer erhöhten Thrombogenität interpretiert werden können (Hartert, 1948; Lang & von Depka, 2006). Diese Effekte sind sowohl bei Toxinen gramnegativer Bakterien als auch bei Toxinen grampositiver Bakterien auslösbar und gehorchen einer zeitlichen Dynamik, die allerdings in einer *in vitro*-Umgebung nach mehreren Stunden erschöpfbar erscheint. Das Ausmaß der Effekte ist abhängig von der Konzentration der Toxine, und erreicht ein maximales Ausmaß unter LPS, während LTA schwächere Effekte auslöste. Eine Costimulation mit LPS und LTA führte gegenüber LPS zu keiner weiteren Wirkverstärkung.

Die Rotationsthrombelastographie ist im klinischen Alltag kein diagnostischer Frühtest für eine Sepsis. Dies liegt an der zeitlichen Verzögerung, die durch den verspäteten Auftritt klinischer Symptome bei Patienten eintritt. In dem vorliegenden *in vitro*-Setting sind die Veränderungen noch nach 24 Stunden mittels ROTEM® nachweisbar, in Versuchen von Schöchel und Spiel wird jedoch deutlich, dass dies in einer *in vivo*-Umgebung nicht der Fall ist (Schöchel *et al.*, 2011; Spiel *et al.*, 2006).

Ein vorstellbares klinisches Anwendungsgebiet für Rotationsthrombelastographie ist der Einsatz als Screeningtest auf Intensivstationen bei Patienten mit vermuteter DIC aufgrund von Sepsis. Dies ist bereits in einer Studie von Koami *et al.* untersucht worden. Dort war das Blut von Patienten mit einem positiven Scoring-System für DIC in kurzen Zeitabständen innerhalb einer Stunde mittels ROTEM® (mit dem Verfahren EXTEM) untersucht worden (Koami *et al.*, 2015). Es konnte gezeigt werden, dass die Patienten, bei denen sich im Verlauf eine DIC entwickelte, präzise mittels des Scoring-Tests und der ROTEM® detektiert werden konnten. Da die Untersuchung am Bett des Patienten durchgeführt werden kann, ist kein Zeitverzug der Diagnosestellung zu verzeichnen. Weitere klinische Studien sind dafür jedoch nötig.

Bis dahin ist die Rotationsthrombelastographie jedoch ein sehr gutes Instrument, um in experimentellen Untersuchungen schnelle Gerinnungsveränderungen nach Toxin-Applikation zu detektieren. Die gerinnungsphysiologischen Vorgänge sind wiederholbar und in verschiedenen Studien als reproduzierbar dargestellt worden.

5 Literatur und Quellenverzeichnis

- Ahmed, K., Zaidi, S.F., Mati-Ur-Rehman, null, Rehman, R., et al. (2020) Hyperthermia and protein homeostasis: Cytoprotection and cell death. *Journal of Thermal Biology*. [Online] 91, 102615. Available from: doi:10.1016/j.jtherbio.2020.102615.
- Albiger, B., Dahlberg, S., Henriques-Normark, B. & Normark, S. (2007) Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors. *Journal of Internal Medicine*. [Online] 261 (6), 511–528. Available from: doi:10.1111/j.1365-2796.2007.01821.x.
- Andersen, M.G., Hvas, C.L., Tønnesen, E. & Hvas, A.-M. (2014) Thromboelastometry as a supplementary tool for evaluation of hemostasis in severe sepsis and septic shock. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*. [Online] 58 (5), 525–533. Available from: doi:10.1111/aas.12290.
- Asrat, S., Dugan, A. & Isberg, R. (2014) The Frustrated Host Response to *Legionella pneumophila* Is Bypassed by MyD88-Dependent Translation of Pro-inflammatory Cytokines. *PLoS pathogens*. [Online] 10, e1004229. Available from: doi:10.1371/journal.ppat.1004229.
- Barton, G.M. & Medzhitov, R. (2003) Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Science*. [Online] 300 (5625), 1524–1525. Available from: doi:10.1126/science.1085536.
- Basi, D.L., Ross, K.F., Hodges, J.S. & Herzberg, M.C. (2003) The modulation of tissue factor by endothelial cells during heat shock. *The Journal of Biological Chemistry*. [Online] 278 (13), 11065–11071. Available from: doi:10.1074/jbc.M211540200.
- Bone, R.C., Balk, R.A., Cerra, F.B., Dellinger, R.P., et al. (1992) Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis. *CHEST*. [Online] 101 (6), 1644–1655. Available from: doi:10.1378/chest.101.6.1644.
- Boral, B.M., Williams, D.J. & Boral, L.I. (2016) Disseminated Intravascular Coagulation. *American Journal of Clinical Pathology*. [Online] aqw195. Available from: doi:10.1093/ajcp/aqw195.
- Camenzind, V., Bombeli, T., Seifert, B., Jamnicki, M., et al. (2000) Citrate Storage Affects Thrombelastograph® Analysis. *Anesthesiology*. [Online] 92 (5), 1242–1249. Available from: doi:10.1097/00000542-200005000-00011.
- Celes, M.R.N., Prado, C.M. & Rossi, M.A. (2013) Sepsis: going to the heart of the matter. *Pathobiology: Journal of Immunopathology, Molecular and Cellular Biology*. [Online] 80 (2), 70–86. Available from: doi:10.1159/000341640.
- Chandler, C.E. & Ernst, R.K. (2017) Bacterial lipids: powerful modifiers of the innate immune response. *F1000Research*. [Online] 6. Available from: doi:10.12688/f1000research.11388.1.
- Daudel, F., Kessler, U., Folly, H., Lienert, J.S., et al. (2009) Thromboelastometry for the assessment of coagulation abnormalities in early and established adult sepsis: a prospective cohort study. *Critical Care (London, England)*. [Online] 13 (2), R42.

- Dhingra, N., Safe Injection Global Network, & World Health Organization (2010) *WHO guidelines on drawing blood: best practices in phlebotomy*. [Online]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK138650/> [Accessed: 12 October 2020].
- Djaldetti, M. & Bessler, H. (2015) High temperature affects the phagocytic activity of human peripheral blood mononuclear cells. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. [Online] 75 (6), 482–486. Available from: doi:10.3109/00365513.2015.1052550.
- Durila, M., Sevcikova, S. & Vymazal, T. (2016) Stability of Non-Activated Rotational Thromboelastometry Assay in Time of Citrated Blood (Appropriate Time Interval for Analysis). *Clinical Laboratory*. [Online] 62 (11), 2145–2148. Available from: doi:10.7754/Clin.Lab.2016.160328.
- Ebinger, T. (2008) Concerning Hänecke P, Klouche M: Thrombelastography Today: Practicability and Analytical Power. *Transfus Med Hemother* 2007;34:421–428. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. [Online] 35 (4), 324–326. Available from: doi:10.1159/000143229.
- Fairchild, K.D., Viscardi, R.M., Hester, L., Singh, I.S., et al. (2000) Effects of Hypothermia and Hyperthermia on Cytokine Production by Cultured Human Mononuclear Phagocytes from Adults and Newborns. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. [Online] 20 (12), 1049–1055. Available from: doi:10.1089/107999000750053708.
- Finney, S.J., Leaver, S.K., Evans, T.W. & Burke-Gaffney, A. (2012) Differences in lipopolysaccharide- and lipoteichoic acid-induced cytokine/chemokine expression. *Intensive Care Medicine*. [Online] 38 (2), 324–332. Available from: doi:10.1007/s00134-011-2444-5.
- Foley Jonathan H. & Conway Edward M. (2016) Cross Talk Pathways Between Coagulation and Inflammation. *Circulation Research*. [Online] 118 (9), 1392–1408. Available from: doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.306853.
- Gando, S., Levi, M. & Toh, C.-H. (2016) Disseminated intravascular coagulation. *Nature Reviews. Disease Primers*. [Online] 2, 16037. Available from: doi:10.1038/nrdp.2016.37.
- Gao, J.J., Xue, Q., Zuvanich, E.G., Haghi, K.R., et al. (2001) Commercial Preparations of Lipoteichoic Acid Contain Endotoxin That Contributes to Activation of Mouse Macrophages In Vitro. *Infection and Immunity*. [Online] 69 (2), 751–757. Available from: doi:10.1128/IAI.69.2.751-757.2001.
- Geroulanos, S. & Douka, E.T. (2006) Historical perspective of the word “sepsis”. *Intensive Care Medicine*. [Online] 32 (12), 2077–2077. Available from: doi:10.1007/s00134-006-0392-2.
- Giannoudis, P.V., Hildebrand, F. & Pape, H.C. (2004) Inflammatory serum markers in patients with multiple trauma: CAN THEY PREDICT OUTCOME? *The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume*. [Online] 86-B (3), 313–323. Available from: doi:10.1302/0301-620X.86B3.15035.

- Glory, A., Bettaieb, A. & Averill-Bates, D.A. (2014) Mild thermotolerance induced at 40 °C protects cells against hyperthermia-induced pro-apoptotic changes in Bcl-2 family proteins. *International Journal of Hyperthermia*. [Online] 30 (7), 502–512. Available from: doi:10.3109/02656736.2014.968641.
- Görlinger, K., Dirkmann, D. & Hanke, A.A. (2016) Rotational Thromboelastometry (ROTEM®). In: Eduardo Gonzalez, Hunter B. Moore, & Ernest E. Moore (eds.). *Trauma Induced Coagulopathy*. [Online]. Cham, Springer International Publishing. pp. 267–298. Available from: doi:10.1007/978-3-319-28308-1_18 [Accessed: 22 April 2020].
- Gregory, S.A., Morrissey, J.H. & Edgington, T.S. (1989) Regulation of tissue factor gene expression in the monocyte procoagulant response to endotoxin. *Molecular and Cellular Biology*. [Online] 9 (6), 2752–2755. Available from: doi:10.1128/MCB.9.6.2752.
- Grignani, G. & Maiolo, A. (2000) Cytokines and hemostasis. *Haematologica*. 85 (9), 967–972.
- Guha, M. & Mackman, N. (2001) LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cellular Signalling*. [Online] 13 (2), 85–94. Available from: doi:10.1016/S0898-6568(00)00149-2.
- Hartert, H. (1948) Blutgerinnungsstudien mit der Thrombelastographie; einem neuen Untersuchungs verfahren. *Klinische Wochenschrift*. 26 (37–38), 577–583.
- Hildebrandt, B. (2002) The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. [Online] 43 (1), 33–56. Available from: doi:10.1016/S1040-8428(01)00179-2.
- Hoffman, M. & Monroe, D.M. (2001) A Cell-based Model of Hemostasis. *Thrombosis and Haemostasis*. 85 (6), 958–965.
- Holm, S. (1979) A Simple Sequentially Rejective Multiple Test Procedure. *Scandinavian Journal of Statistics*. 6 (2), 65–70.
- Hoogerwerf, J.J., de Vos, A.F., Levi, M., Bresser, P., et al. (2009) Activation of coagulation and inhibition of fibrinolysis in the human lung on bronchial instillation of lipoteichoic acid and lipopolysaccharide*. *Critical Care Medicine*. [Online] 37 (2), 619–625. Available from: doi:10.1097/CCM.0b013e31819584f9.
- Islam, M.A., Pröll, M., Hölker, M., Tholen, E., et al. (2013) Alveolar macrophage phagocytic activity is enhanced with LPS priming, and combined stimulation of LPS and lipoteichoic acid synergistically induce pro-inflammatory cytokines in pigs. *Innate Immunity*. [Online] 19 (6), 631–643. Available from: doi:10.1177/1753425913477166.
- Janeway, C.A. & Medzhitov, R. (2002) Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*. [Online] 20, 197–216. Available from: doi:10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359.
- Kaisho, T. & Akira, S. (2006) Toll-like receptor function and signaling. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. [Online] 117 (5), 979–987; quiz 988. Available from: doi:10.1016/j.jaci.2006.02.023.

- Kappel, M., Diamant, M., Hansen, M.B., Klokke, M., et al. (1991) Effects of in vitro hyperthermia on the proliferative response of blood mononuclear cell subsets, and detection of interleukins 1 and 6, tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma. *Immunology*. 73 (3), 304–308.
- Kassambara, A. (2020a) *ggpubr: 'ggplot2' Based Publication Ready Plots*. [Online]. Available from: <https://CRAN.R-project.org/package=ggpubr> [Accessed: 29 September 2020].
- Kassambara, A. (2020b) *rstatix: Pipe-Friendly Framework for Basic Statistical Tests*. [Online]. Available from: <https://CRAN.R-project.org/package=rstatix> [Accessed: 29 September 2020].
- Kaukonen, K.-M., Bailey, M., Pilcher, D., Cooper, D.J., et al. (2015) Systemic inflammatory response syndrome criteria in defining severe sepsis. *The New England Journal of Medicine*. [Online] 372 (17), 1629–1638. Available from: doi:10.1056/NEJMoa1415236.
- Kawasaki, T. & Kawai, T. (2014) Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Frontiers in Immunology*. [Online] 5. Available from: doi:10.3389/fimmu.2014.00461.
- Kerridge, D. (1958) The Effect of Actidione and other Antifungal Agents on Nucleic Acid and Protein Synthesis in *Saccharomyces carlsbergensis*. *Journal of General Microbiology*. [Online] 19 (3), 497–506. Available from: doi:10.1099/00221287-19-3-497.
- Kimbrell, M.R., Warshakoon, H., Cromer, J.R., Malladi, S., et al. (2008) Comparison of the Immunostimulatory and Proinflammatory Activities of Candidate Gram-Positive Endotoxins, Lipoteichoic Acid, Peptidoglycan, and Lipopeptides in Murine and Human Cells. *Immunology letters*. [Online] 118 (2), 132–141. Available from: doi:10.1016/j.imlet.2008.03.009.
- Koami, H., Sakamoto, Y., Ohta, M., Goto, A., et al. (2015) Can rotational thromboelastometry predict septic disseminated intravascular coagulation? *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. [Online] 26 (7), 778–783. Available from: doi:10.1097/MBC.0000000000000351.
- Koch, A., Meesters, M.I., Scheller, B., Boer, C., et al. (2013) Systemic endotoxin activity correlates with clot formation: an observational study in patients with early systemic inflammation and sepsis. *Critical Care*. [Online] 17 (5), R198. Available from: doi:10.1186/cc12892.
- Koch, R. (1882) Über die Ätiologie der Tuberkulose. *Verhandlungen vor dem Wiesbadener Kongress*. [Online] Available from: doi:10.25646/5089 [Accessed: 11 November 2020].
- Kochevar, D.T., Aucoin, M.M. & Cooper, J. (1991) Mammalian heat shock proteins: An overview with a systems perspective. *Toxicology Letters*. [Online] 56 (3), 243–267. Available from: doi:10.1016/0378-4274(91)90154-X.
- Lane, N. (2015) The unseen world: reflections on Leeuwenhoek (1677) ‘Concerning little animals’. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. [Online] 370 (1666), 20140344. Available from: doi:10.1098/rstb.2014.0344.

- Lang, T., Bauters, A., Braun, S.L., Pötzsch, B., et al. (2005) Multi-centre investigation on reference ranges for ROTEM thromboelastometry. *Blood Coagulation & Fibrinolysis: An International Journal in Haemostasis and Thrombosis*. 16 (4), 301–310.
- Lang, T. & von Depka, M. (2006) Diagnostische Möglichkeiten und Grenzen der Thrombelastometrie/-graphie. *Hämostaseologie*. 26 (5), 20–29.
- Leach, B.E., Ford, J.H. & Whiffen, A.J. (1947) ACTIDIONE, AN ANTIBIOTIC FROM STREPTOMYCES GRISEUS. *Journal of the American Chemical Society*. [Online] 69 (2), 474–474. Available from: doi:10.1021/ja01194a519.
- Levi, M. & ten Cate, H. (1999) Disseminated Intravascular Coagulation. *New England Journal of Medicine*. [Online] 341 (8), 586–592. Available from: doi:10.1056/NEJM199908193410807.
- Levi, M. & van der Poll, T. (2017) Coagulation and sepsis. *Thrombosis Research*. [Online] 149, 38–44. Available from: doi:10.1016/j.thromres.2016.11.007.
- Lindquist, S. & Craig, E.A. (1988) The heat-shock proteins. *Annual Review of Genetics*. [Online] 22, 631–677. Available from: doi:10.1146/annurev.ge.22.120188.003215.
- Lu, Y.-C., Yeh, W.-C. & Ohashi, P.S. (2008) LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*. [Online] 42 (2), 145–151. Available from: doi:10.1016/j.cyto.2008.01.006.
- Margetic, S. (2012) Inflammation and haemostasis. *Biochemia Medica*. 22 (1), 49–62.
- Medzhitov, R. & Janeway, C. (2000a) Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunological Reviews*. [Online] 173, 89–97. Available from: doi:10.1034/j.1600-065x.2000.917309.x.
- Medzhitov, R. & Janeway, C.Jr. (2000b) Innate Immunity. *New England Journal of Medicine*. [Online] 343 (5), 338–344. Available from: doi:10.1056/NEJM200008033430506.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. & Janeway, C.A. (1997) A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. [Online] 388 (6640), 394–397. Available from: doi:10.1038/41131.
- Meesters, M.I., Koch, A., Kuiper, G., Zacharowski, K., et al. (2015) Instability of the non-activated rotational thromboelastometry assay (NATEM) in citrate stored blood. *Thrombosis Research*. [Online] 136 (2), 481–483. Available from: doi:10.1016/j.thromres.2015.05.026.
- Mogensen, T.H. (2009) Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses. *Clinical Microbiology Reviews*. [Online] 22 (2), 240–273. Available from: doi:10.1128/CMR.00046-08.
- Müller, M.C., Meijers, J.C.M., Vroom, M.B. & Juffermans, N.P. (2014) Utility of thromboelastography and/or thromboelastometry in adults with sepsis: a systematic review. *Critical Care (London, England)*. [Online] 18 (1), R30. Available from: doi:10.1186/cc13721.
- Neyman, J. & Pearson, E.S. (1933) On the Problem of the Most Efficient Tests of Statistical Hypotheses. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical or Physical Character*. 231, 289–337.

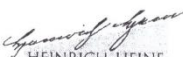
- Oliveira-Nascimento, L., Massari, P. & Wetzler, L.M. (2012) The Role of TLR2 in Infection and Immunity. *Frontiers in Immunology*. [Online] 3. Available from: doi:10.3389/fimmu.2012.00079.
- Opal, S.M., Scannon, P.J., Vincent, J.-L., White, M., et al. (1999) Relationship between Plasma Levels of Lipopolysaccharide (LPS) and LPS-Binding Protein in Patients with Severe Sepsis and Septic Shock. *The Journal of Infectious Diseases*. [Online] 180 (5), 1584–1589. Available from: doi:10.1086/315093.
- Østerud, B. & Bjørklid, E. (2001) The tissue factor pathway in disseminated intravascular coagulation. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. [Online] 27 (6), 605–617. Available from: doi:10.1055/s-2001-18866.
- Palta, S., Saroa, R. & Palta, A. (2014) Overview of the coagulation system. *Indian Journal of Anaesthesia*. [Online] 58 (5), 515–523. Available from: doi:10.4103/0019-5049.144643.
- Patil, I. (2020) *ggstatsplot: 'ggplot2' Based Plots with Statistical Details*. [Online]. Available from: <https://CRAN.R-project.org/package=ggstatsplot> [Accessed: 29 September 2020].
- Percy, M.G. & Gründling, A. (2014) Lipoteichoic Acid Synthesis and Function in Gram-Positive Bacteria. *Annual Review of Microbiology*. [Online] 68 (1), 81–100. Available from: doi:10.1146/annurev-micro-091213-112949.
- van der Poll, T. (2008) Tissue factor as an initiator of coagulation and inflammation in the lung. *Critical Care*. [Online] 12 (6), S3. Available from: doi:10.1186/cc7026.
- van der Poll, T., de Jonge, E. & ten Cate, H. (2013) *Cytokines as Regulators of Coagulation*. [Online]. Landes Bioscience. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6207/> [Accessed: 15 October 2017].
- Purcarea, A. & Sovaila, S. (2020) Sepsis, a 2020 review for the internist. *Romanian Journal of Internal Medicine*. [Online] 1 (ahead-of-print). Available from: doi:10.2478/rjim-2020-0012 [Accessed: 4 June 2020].
- Rhodes, A., Evans, L.E., Alhazzani, W., Levy, M.M., et al. (2017) Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Critical Care Medicine*. [Online] 45 (3), 486–552. Available from: doi:10.1097/CCM.0000000000002255.
- Rohde, M. (2019) The Gram-Positive Bacterial Cell Wall. *Microbiology Spectrum*. [Online] 7 (3). Available from: doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0044-2018 [Accessed: 26 March 2020].
- Schneider-Poetsch, T., Ju, J., Eyler, D.E., Dang, Y., et al. (2010) Inhibition of Eukaryotic Translation Elongation by Cycloheximide and Lactimidomycin. *Nature chemical biology*. [Online] 6 (3), 209–217. Available from: doi:10.1038/nchembio.304.
- Schöchl, H., Solomon, C., Schulz, A., Voelckel, W., et al. (2011) Thromboelastometry (TEM®) Findings in Disseminated Intravascular Coagulation in a Pig Model of Endotoxemia. *Molecular Medicine*. [Online] 17 (3–4), 266–272. Available from: doi:10.2119/molmed.2010.00159.

- Seeley, E.J., Matthay, M.A. & Wolters, P.J. (2012) Inflection points in sepsis biology: from local defense to systemic organ injury. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. [Online] 303 (5), L355–L363. Available from: doi:10.1152/ajplung.00069.2012.
- Shapiro, S.S. & Wilk, M.B. (1965) An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). *Biometrika*. [Online] 52 (3/4), 591–611. Available from: doi:10.2307/2333709.
- Siegel, M.R. & Sisler, H.D. (1963) Inhibition of Protein Synthesis in vitro by Cycloheximide. *Nature*. [Online] 200 (4907), 675–676. Available from: doi:10.1038/200675a0.
- Spiel, A.O., Mayr, F.B., Firbas, C., Quehenberger, P., et al. (2006) Validation of rotation thrombelastography in a model of systemic activation of fibrinolysis and coagulation in humans. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. [Online] 4 (2), 411–416. Available from: doi:10.1111/j.1538-7836.2006.01715.x.
- Spiezia, L., Bertini, D., Boldrin, M., Radu, C., et al. (2010) Reference values for thromboelastometry (ROTEM®) in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Thrombosis Research*. [Online] 126 (4), e294–e297. Available from: doi:10.1016/j.thromres.2010.07.016.
- Student (1908) The Probable Error of a Mean. *Biometrika*. [Online] 6 (1), 1–25. Available from: doi:10.2307/2331554.
- Su, F., Nguyen, N.D., Wang, Z., Cai, Y., et al. (2005) Fever control in septic shock: beneficial or harmful? *Shock (Augusta, Ga.)*. 23 (6), 516–520.
- Sucker, C. & Hartmann, M. (2006) Thrombelastography for the monitoring of lipopolysaccharide induced activation of coagulation. *Thrombosis and Haemostasis*. [Online] 95 (3), 557–561. Available from: doi:10.1160/TH05-06-0420.
- Sucker, C., Hartmann, M., Zacharowski, K. & Thielmann, M. (2007) Heat shock inhibits lipopolysaccharide-induced tissue factor activity in human whole blood. *Thrombosis Journal*. [Online] 5, 13. Available from: doi:10.1186/1477-9560-5-13.
- Sucker, C., Paniczek, S., Scharf, R.E., Litmathe, J., et al. (2013) Rotation thromboelastography for the detection and characterization of lipoteichoic acid-induced activation of haemostasis in an in vitro sepsis model. *Perfusion*. [Online] 28 (2), 146–151. Available from: doi:10.1177/0267659112464712.
- Sundén-Cullberg, J., Rylance, R., Svefors, J., Norrby-Teglund, A., et al. (2017) Fever in the Emergency Department Predicts Survival of Patients With Severe Sepsis and Septic Shock Admitted to the ICU. *Critical Care Medicine*. [Online] 45 (4), 591–599. Available from: doi:10.1097/CCM.0000000000002249.
- Tem Innovations GmbH (2012) *RotemR Delta US Operating Manual*.
- The R Core Team (2002) *R: The R Project for Statistical Computing*. [Online]. 2002. Available from: <https://www.r-project.org/> [Accessed: 29 September 2020].
- Theusinger, O.M., Nürnberg, J., Asmis, L.M., Seifert, B., et al. (2010) Rotation thromboelastometry (ROTEM) stability and reproducibility over time. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery: Official Journal of the European Association for*

- Cardio-Thoracic Surgery*. [Online] 37 (3), 677–683. Available from: doi:10.1016/j.ejcts.2009.07.038.
- Thomas, L. (1972) Germs. *New England Journal of Medicine*. [Online] 287 (11), 553–555. Available from: doi:10.1056/NEJM197209142871109.
- Uhle, F., Chousterman, B.G., Grützmann, R., Brenner, T., et al. (2016) Pathogenic, immunologic, and clinical aspects of sepsis - update 2016. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. [Online] 14 (10), 917–927. Available from: doi:10.1080/14787210.2016.1224971.
- Velik-Salchner, C., Streif, W., Innerhofer, P., Maier, S., et al. (2009) Endotoxemia-induced changes in coagulation as measured by rotation thrombelastometry technique and conventional laboratory tests: results of a pilot study on pigs. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. [Online] 20 (1), 41. Available from: doi:10.1097/MBC.0b013e32831be9ad.
- Vincent, J.L., Moreno, R., Takala, J., Willatts, S., et al. (1996) The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Medicine*. 22 (7), 707–710.
- Whiffen, A.J. (1948) The Production, Assay, and Antibiotic Activity of Actidione, an Antibiotic from *Streptomyces griseus*. *Journal of Bacteriology*. 56 (3), 283–291.
- Whiting, D. & DiNardo, J.A. (2014) TEG and ROTEM: Technology and clinical applications. *American Journal of Hematology*. [Online] 89 (2), 228–232. Available from: doi:10.1002/ajh.23599.
- Wicken, A.J. & Knox, K.W. (1975) Lipoteichoic acids: a new class of bacterial antigen. *Science*. [Online] 187 (4182), 1161–1167. Available from: doi:10.1126/science.46620.
- Wickham, H. (2016) Google-Books-ID: XgFkDAAAQBAJ. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer.
- Wickham, H., Averick, M., Bryan, J., Chang, W., et al. (2019) Welcome to the Tidyverse. *Journal of Open Source Software*. [Online] 4 (43), 1686. Available from: doi:10.21105/joss.01686.
- Wilcoxon, F. (1945) Individual Comparisons by Ranking Methods. *Biometrics Bulletin*. [Online] 1 (6), 80–83. Available from: doi:10.2307/3001968.
- Woodward, S. (2015) E. coli: a brief overview. *British Journal of Nursing (Mark Allen Publishing)*. [Online] 24 (3), 158, 160. Available from: doi:10.12968/bjon.2015.24.3.158.
- Young, R.A. (1990) Stress Proteins and Immunology. *Annual Review of Immunology*. [Online] 8 (1), 401–420. Available from: doi:10.1146/annurev.iy.08.040190.002153.
- Zambruni, A., Thalheimer, U., Leandro, G., Perry, D., et al. (2004) Thromboelastography with citrated blood: comparability with native blood, stability of citrate storage and effect of repeated sampling. *Blood Coagulation & Fibrinolysis: An International Journal in Haemostasis and Thrombosis*. 15 (1), 103–107.

6 Anhang

Universitätsklinikum Düsseldorf


HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN

Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin

Patienten-/Probandeninformation:

Zu den Hauptaufgaben des Instituts für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin gehört die Untersuchung und Behandlung von Patienten mit Blutungsleiden („Bluter“) und von Patienten mit Blutgerinnungsstörungen (Thrombosen) sowie die Erforschung dieser Krankheitsbilder. Mit dieser Studie, zu deren Teilnahme wir Sie bitten wollen, möchten wir die Einflussfaktoren einer Blutungsneigung oder einer Thromboseneigung untersuchen. Dazu ist es nötig, von gesunden Personen Daten zu erheben, um Normalwertbereiche erstellen zu können.

Anhand von den aus Ihren Blutproben und Fragebögen erhobenen Daten ist es möglich, Informationen über Blut und speziell die Blutgerinnung zusammenzutragen, die helfen, die künftige Behandlung der Patienten zu verbessern. Zur klinischen und laboranalytischen Diagnostik gehören dabei unterschiedliche Methoden, die auch molekulare und molekulargenetische Untersuchungen umfassen. Es ist nötig, Rückstellproben Ihres Blutes aufzubewahren, um über biologisches Material zu verfügen, falls die Gewinnung neuer Erkenntnisse eine erneute Testung sinnvoll machen.

Ihre Bereitschaft, Ihre Daten zur Verfügung zu stellen, ist völlig freiwillig und kann jederzeit von Ihnen mit Wirkung für die Zukunft zurückgenommen werden, d. h. die bis zu Ihrem Widerruf verarbeiteten Daten können nicht zurückgezogen werden. Im Falle des Widerrufs ist sichergestellt, dass Ihre Daten gelöscht werden. Aus einer Zurücknahme Ihrer Einwilligung entsteht Ihnen kein Nachteil. Sie bringt keine Risiken gesundheitlicher oder jedweder anderer Art mit sich.

Ihre Daten werden vertraulich behandelt und nicht öffentlich zugänglich gemacht. Sie werden in elektronischer sowie in Papierform für 15 Jahre am Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin aufbewahrt, danach werden sie vernichtet. Die Ergebnisse werden statistisch ausgewertet und können veröffentlicht werden. **Dabei bleibt Ihre Identität jedoch vertraulich und in jedem Falle anonym.** Ihre medizinischen Daten können nur von dem für die Durchführung des Forschungsvorhabens verantwortlichen Studienleiter, Studienleiter, Herrn PD Dr. Zotz, und von ihm autorisierte wissenschaftliche Mitarbeiter und Doktoranden eingesehen werden. Dies bedeutet, dass ausschließlich der genannte Personenkreis die Erlaubnis hat, alle Daten und Berichte, die für die statistische Auswertung von Bedeutung sind, durchzusehen, zu prüfen und auszuwerten. **In allen Fällen geschieht dies ohne Vertraulichkeitsverletzung und in einem Umfang, der durch die entsprechenden Gesetze erlaubt ist** (Gesundheitsdatenschutzgesetz NRW, Datenschutzgesetz NRW, Gesetz zur ärztlichen Schweigepflicht, Berufsordnung der nordrheinischen Ärztinnen und Ärzte).

Wenn Sie weitere Fragen haben, sind Sie eingeladen, sich an einen Mitarbeiter des Instituts für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin oder direkt den Studienleiter und stellvertretenden Institutsleiter,

PD Dr. med. Rainer B. Zotz
Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin
Universitätsklinikum Düsseldorf
Moorenstrasse 5
D-40225 Düsseldorf
Tel 0211-8117237
Fax 0211-8116221
e-mail: zotz@med.uni-duesseldorf.de

zu wenden.

Direktor des Instituts

Univ.-Prof. Dr. R.E. Scharf, F.A.H.A.

Sekretariat

Frau E. Walter
Tel.: (0211) 81 - 17344 / 17345
Fax: (0211) 81 - 16221
e-mail:
sekretariat-IHTM@med.uni-duesseldorf.de

Stellvertretender Institutsdirektor

Ltd. OA PD Dr. med. R. B. Zotz
Tel.: (0211) 81 - 17237
Fax.: (0211) 81 - 16221
e-mail: Zotz@med.uni-duesseldorf.de

Webseiten der Klinik

www.uniklinik-duesseldorf/transfusionsmedizin
www.ihm.de
www.uni-blutspende.de

Abb. 61A: Fragebogen des Institutes für Gerinnungsmedizin für Patienten und Probanden, die an Studien teilnehmen (Vorderseite).

Einverständniserklärung (nicht Zutreffendes bitte streichen):

Ich bestätige, dass ich über alle mir ausgehändigten Fragebögen und die Blutabnahme **ausreichend aufgeklärt** worden bin. Ich habe verstanden, mit welchen Auswirkungen das Ausfüllen der Fragebögen und die Blutabnahme verbunden ist. Ich hatte ausreichend Zeit, über die Erhebung von Daten in dieser Form nachzudenken sowie die **Gelegenheit, Fragen zu stellen, und alle Fragen wurden zu meiner Zufriedenheit beantwortet**. Es wurde mir angeboten, **über individuelle Untersuchungsbefunde informiert** zu werden, wenn ich es wünsche.

Ich bin damit einverstanden, dass meine medizinischen Daten **durch den Studienleiter Herrn PD Dr. med. Zotz und von ihm autorisierte wissenschaftliche Mitarbeiter und Doktoranden eingesehen und aufgezeichnet werden dürfen**. Es wird gewährleistet, dass personenbezogene Daten von mir nicht an diesem Personenkreis nicht zugehörige Dritte weitergegeben werden. **Meine persönlichen Daten unterliegen dem Datenschutzgesetz und der ärztlichen Schweigepflicht.**

Ich erkläre mein Einverständnis für die **statistische Auswertung** der erhobenen Daten der Fragebögen und Blutuntersuchungen, die dem allgemeinen Erkenntnisgewinn dienen. Außerdem erkläre ich mich einverstanden, dass bei mir **umfangreiche Gerinnungsuntersuchungen, einschließlich molekulargenetischer Diagnostik**, durchgeführt werden. Ich bin damit einverstanden, dass **biologisches Material in Form von pseudonymisierten Rückstellproben aus meinem Blut aufbewahrt wird**, um zu einem späteren Zeitpunkt für **notwendige weiterführende Gerinnungsuntersuchungen** genutzt werden zu können. Ich erkläre mein Einverständnis, dass eine **anonymisierte Auswertung** der erhobenen Daten erfolgt. Bei Veröffentlichungen in einer wissenschaftlichen Zeitschrift wird aus den Daten nicht hervorgehen, wer an dieser Untersuchung teilgenommen hat.

Ich verstehe, dass das Ausfüllen der Fragebögen und die Blutabnahme **völlig freiwillig** ist, und dass ich **mein Einverständnis jederzeit mit Wirkung für die Zukunft** durch eine entsprechende Information an meinen behandelnden Arzt am Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin oder einen anderen Mitarbeiter des Instituts **zurücknehmen kann**. Die bis dahin erfolgte Datenverarbeitung kann nicht widerrufen werden. Ein Widerruf ist für mich mit **keinerlei Nachteil für meine medizinische Versorgung verbunden**.

Mein Ansprechpartner am IHTM: PD Dr. med. Rainer B. Zotz
Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin
Universitätsklinikum Düsseldorf
Moorenstrasse 5
D-40225 Düsseldorf
Tel 0211-8117237
Fax 0211-8116221
e-mail: zotz@med.uni-duesseldorf.de

Name _____
(Druckbuchstaben)

Ort, Datum _____ Unterschrift _____

Direktor des Instituts
Univ.-Prof. Dr. R.E. Scharf, F.A.H.A.

Sekretariat
Frau E. Walter
Tel.: (0211) 81 - 17344 / 17345
Fax: (0211) 81 - 16221
e-mail:
sekretariat-IHTM@med.uni-duesseldorf.de

Stellvertretender Institutsdirektor
Ltd. OA PD Dr. med. R. B. Zotz
Tel.: (0211) 81 - 17237
Fax.: (0211) 81 - 16221
e-mail: zotz@med.uni-duesseldorf.de

Webseiten der Klinik
www.uniklinik-duesseldorf/transfusionsmedizin
www.ihm.de
www.uni-blutspende.de

Abb. 61B: Fragebogen des Institutes für Gerinnungsmedizin für Patienten und Probanden, die an Studien teilnehmen (Rückseite).

Fragebogen

Name

Vorname

Geburtsdatum

Adresse

- ☐ Hiermit versichere ich, in den letzten 3 Wochen keine Medikamente eingenommen zu haben
- ☐ Folgende Medikamente habe ich in den letzten 3 Wochen eingenommen:

- ☐ Ich nehme regelmäßig folgende Medikamente ein:

- ☐ Ich versichere, völlig gesund zu sein

Ich habe diesen Bogen nach bestem Wissen und Gewissen ausgefüllt. Die Einverständniserklärung und die Probandeninformation habe ich gelesen, verstanden und unterschrieben.

Ich habe jederzeit die Möglichkeit gehabt, Fragen zu stellen und meine Fragen wurden zu meiner vollen Zufriedenheit beantwortet.

Ort, Datum

Unterschrift

Abb. 62: Fragebogen zur Medikamentenanamnese für diese Arbeit, wurde allen Probanden vorgelegt

Abbildungen und Tabellen

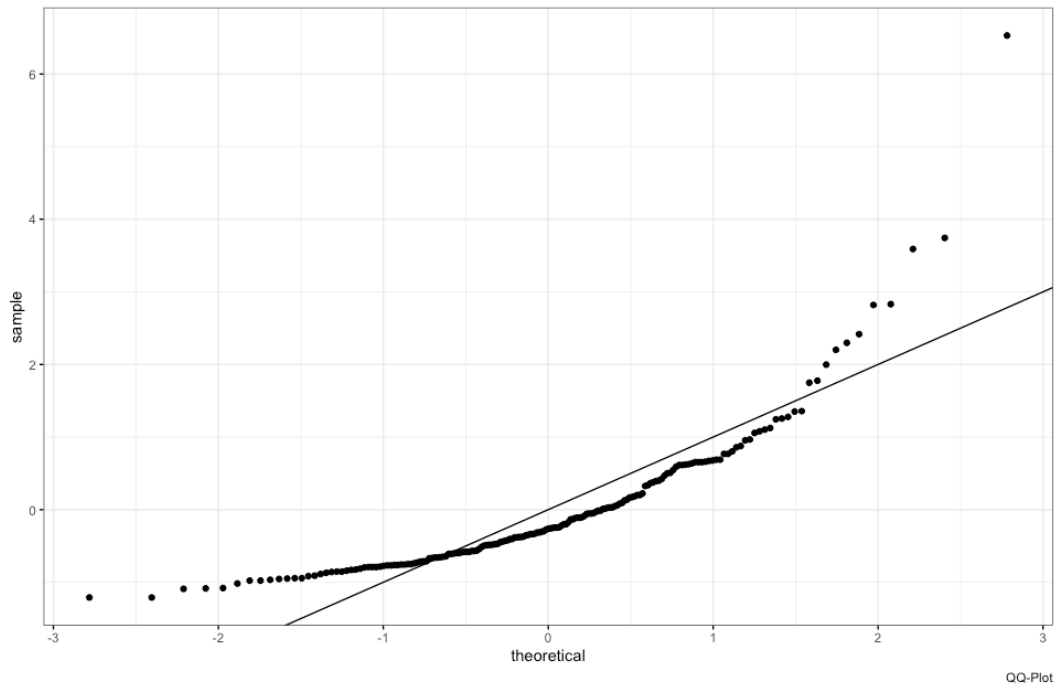


Abb. 63: Quantil-Quantil-Plot aller NaCl-Werte für CFT, alle Versuche vereint. Die Gerade entspricht der vollen Übereinstimmung mit einer Normalverteilung.

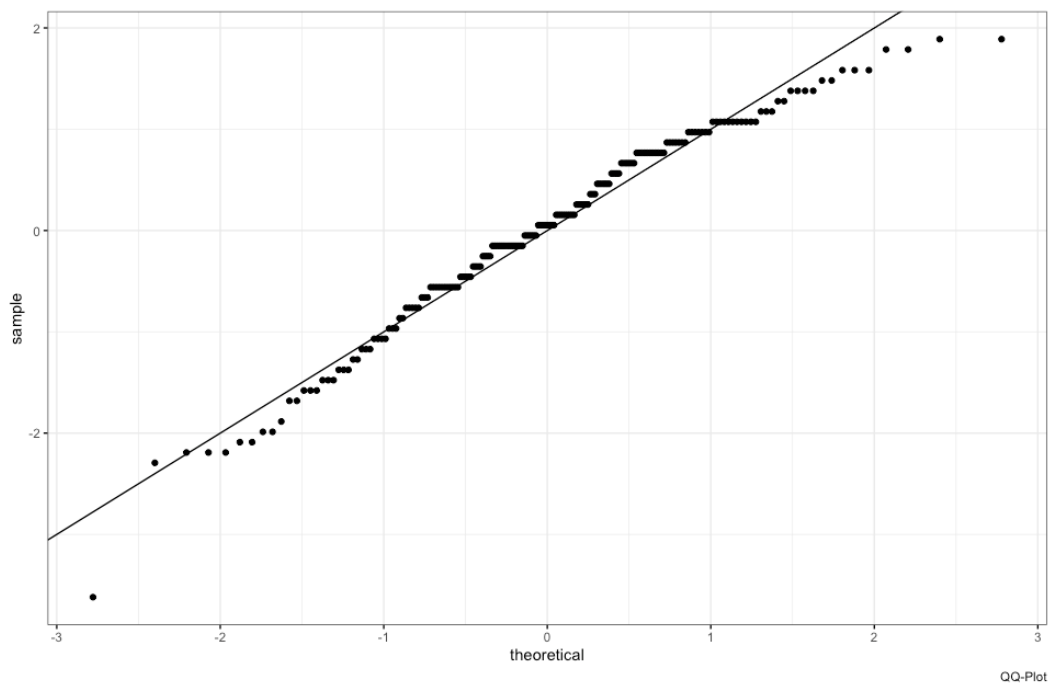


Abb. 64: Quantil-Quantil-Plot aller NaCl-Werte für MCF, alle Versuche vereint. Die Gerade entspricht der vollen Übereinstimmung mit einer Normalverteilung.

Statistische Tabellen für Versuch 1

Inkubation	Ansatz	variable	n	min	mean	max	sd	median	q1	q3
0	LTA 0.909µg/ml	CT	10	408	571.7	871	152.042	513.5	472.50	618.00
0	LTA 9.09µg/ml	CT	10	411	555.8	867	144.439	497.0	470.00	567.75
0	LTA 90.9µg/ml	CT	10	392	547.4	862	147.878	511.0	446.25	605.75
0	NaCl	CT	10	407	563.8	760	120.371	558.0	472.00	593.50
1	LTA 0.909µg/ml	CT	5	351	465.8	534	68.686	483.0	468.00	493.00
1	LTA 9.09µg/ml	CT	5	359	455.4	499	59.710	485.0	436.00	498.00
1	LTA 90.9µg/ml	CT	5	399	442.2	499	44.606	431.0	404.00	478.00
1	NaCl	CT	5	387	453.8	524	59.124	442.0	411.00	505.00
2	LTA 0.909µg/ml	CT	10	329	512.5	814	134.314	495.0	439.25	523.00
2	LTA 9.09µg/ml	CT	10	338	500.2	712	101.362	476.0	458.25	539.75
2	LTA 90.9µg/ml	CT	10	320	467.8	667	122.846	433.0	402.75	549.50
2	NaCl	CT	10	350	523.8	734	113.091	496.5	467.50	558.50
3	LTA 0.909µg/ml	CT	5	476	543.0	661	77.756	508.0	488.00	582.00
3	LTA 9.09µg/ml	CT	5	425	527.8	627	97.912	536.0	431.00	620.00
3	LTA 90.9µg/ml	CT	5	342	466.2	762	168.045	414.0	397.00	416.00
3	NaCl	CT	5	480	577.4	714	85.445	569.0	546.00	578.00
4	LTA 0.909µg/ml	CT	10	383	491.3	644	78.105	470.5	455.00	512.75
4	LTA 9.09µg/ml	CT	10	363	456.6	562	67.377	447.0	428.50	493.50
4	LTA 90.9µg/ml	CT	10	221	355.0	520	84.995	353.5	303.00	388.00
4	NaCl	CT	10	405	540.0	709	87.589	554.5	482.25	581.75
6	LTA 0.909µg/ml	CT	5	464	531.6	665	85.116	499.0	465.00	565.00
6	LTA 9.09µg/ml	CT	5	132	444.6	607	183.849	509.0	447.00	528.00
6	LTA 90.9µg/ml	CT	5	206	335.4	475	108.339	336.0	257.00	403.00
6	NaCl	CT	5	537	567.4	589	19.165	569.0	566.00	576.00

Tabelle 22: Summierende Statistik der *Clotting Time* für den Versuch mit LTA in verschiedenen Konzentrationen, gruppiert nach Ansatz

Inkubation	.y.	group1	group2	n1	n2	statistic	df	p	p.adj	p.adj.signif
0	CT	NaCl	LTA 90.9µg/ml	10	10	0.6760921	9	2.58e-01	0.774000	ns
0	CT	NaCl	LTA 9.09µg/ml	10	10	0.3684554	9	3.61e-01	0.774000	ns
0	CT	NaCl	LTA 0.909µg/ml	10	10	-0.3265414	9	6.24e-01	0.774000	ns
1	CT	NaCl	LTA 90.9µg/ml	10	10	1.0041126	4	1.86e-01	0.558000	ns
1	CT	NaCl	LTA 9.09µg/ml	10	10	-0.0959858	4	5.36e-01	1.000000	ns
1	CT	NaCl	LTA 0.909µg/ml	10	10	-0.6277648	4	7.18e-01	1.000000	ns
2	CT	NaCl	LTA 90.9µg/ml	10	10	2.3203446	9	2.30e-02	0.068000	ns
2	CT	NaCl	LTA 9.09µg/ml	10	10	1.3611258	9	1.03e-01	0.206000	ns
2	CT	NaCl	LTA 0.909µg/ml	10	10	0.5091898	9	3.11e-01	0.311000	ns
3	CT	NaCl	LTA 90.9µg/ml	10	10	1.4004171	4	1.17e-01	0.247000	ns
3	CT	NaCl	LTA 9.09µg/ml	10	10	1.6979134	4	8.20e-02	0.247000	ns
3	CT	NaCl	LTA 0.909µg/ml	10	10	1.4275702	4	1.13e-01	0.247000	ns
4	CT	NaCl	LTA 90.9µg/ml	10	10	6.1348630	9	8.59e-05	0.000258	***
4	CT	NaCl	LTA 9.09µg/ml	10	10	3.5641749	9	3.00e-03	0.006000	**
4	CT	NaCl	LTA 0.909µg/ml	10	10	2.0991704	9	3.30e-02	0.033000	•
6	CT	NaCl	LTA 90.9µg/ml	10	10	5.1933936	4	3.00e-03	0.010000	**
6	CT	NaCl	LTA 9.09µg/ml	10	10	1.4475899	4	1.11e-01	0.222000	ns
6	CT	NaCl	LTA 0.909µg/ml	10	10	0.7840176	4	2.38e-01	0.238000	ns

Tabelle 23: Vergleich der Konzentrationsansätze gegen die Kontrolle: *Clotting Time* für den Versuch mit LTA in verschiedenen Konzentrationen, gruppiert nach Ansatz. T-Test für gepaarte Stichproben. Korrektur für multiple Gruppenvergleiche nach Holm. Alternative einseitig. $p < 0,05$

Ansatz	.y.	group1	group2	n1	n2	statistic	df	p	p.adj	p.adj.signif
LTA 0.909µg/ml	CT	0	1	10	10	1.7405911	4	0.078	0.193	ns
LTA 0.909µg/ml	CT	0	2	10	10	2.7279336	9	0.012	0.047	•
LTA 0.909µg/ml	CT	0	3	10	10	1.2477133	4	0.140	0.193	ns
LTA 0.909µg/ml	CT	0	4	10	10	2.9463664	9	0.008	0.041	•
LTA 0.909µg/ml	CT	0	6	10	10	1.9106207	4	0.064	0.193	ns
LTA 9.09µg/ml	CT	0	1	10	10	1.1420805	4	0.159	0.159	ns
LTA 9.09µg/ml	CT	0	2	10	10	2.4694884	9	0.018	0.071	ns
LTA 9.09µg/ml	CT	0	3	10	10	2.5584860	4	0.031	0.071	ns
LTA 9.09µg/ml	CT	0	4	10	10	3.3620444	9	0.004	0.021	•
LTA 9.09µg/ml	CT	0	6	10	10	2.9150825	4	0.022	0.071	ns
LTA 90.9µg/ml	CT	0	1	10	10	2.2333236	4	0.045	0.089	ns
LTA 90.9µg/ml	CT	0	2	10	10	3.5885479	9	0.003	0.012	•
LTA 90.9µg/ml	CT	0	3	10	10	1.5223563	4	0.101	0.101	ns
LTA 90.9µg/ml	CT	0	4	10	10	4.2334149	9	0.001	0.006	**
LTA 90.9µg/ml	CT	0	6	10	10	2.6794644	4	0.028	0.083	ns
NaCl	CT	0	1	10	10	2.6957813	4	0.027	0.109	ns
NaCl	CT	0	2	10	10	2.5135645	9	0.017	0.083	ns
NaCl	CT	0	3	10	10	1.4529071	4	0.110	0.330	ns
NaCl	CT	0	4	10	10	0.9490553	9	0.184	0.330	ns
NaCl	CT	0	6	10	10	1.1832812	4	0.151	0.330	ns

Tabelle 24: Vergleich der Konzentrationsansätze gegen den Ausgangswert: *Clotting Time* für den Versuch mit LTA in verschiedenen Konzentrationen, gruppiert nach Ansatz. T-Test für gepaarte Stichproben. Korrektur für multiple Gruppenvergleiche nach Holm. Alternative einseitig. $p < 0,05$

Inkubation	Ansatz	variable	n	min	mean	max	sd	median	q1	q3
0	LTA 0.909µg/ml	CFT	10	93	214.9	461	115.679	202.5	123.00	252.50
0	LTA 9.09µg/ml	CFT	10	105	200.9	492	124.441	153.0	114.25	224.50
0	LTA 90.9µg/ml	CFT	10	120	211.4	460	107.637	170.5	148.75	201.75
0	NaCl	CFT	10	130	224.9	421	105.440	179.5	150.75	254.50
1	LTA 0.909µg/ml	CFT	5	128	203.0	277	60.196	192.0	169.00	249.00
1	LTA 9.09µg/ml	CFT	5	111	163.0	200	33.667	175.0	152.00	177.00
1	LTA 90.9µg/ml	CFT	5	109	176.4	223	47.390	193.0	147.00	210.00
1	NaCl	CFT	5	146	181.0	240	39.064	167.0	152.00	200.00
2	LTA 0.909µg/ml	CFT	10	106	230.6	360	86.610	244.0	162.75	279.50
2	LTA 9.09µg/ml	CFT	10	105	216.5	402	90.832	203.5	154.25	262.50
2	LTA 90.9µg/ml	CFT	10	100	223.6	423	109.439	203.0	147.50	265.00
2	NaCl	CFT	10	130	231.5	424	87.657	197.5	174.75	270.25
3	LTA 0.909µg/ml	CFT	5	93	278.8	505	193.761	211.0	120.00	465.00
3	LTA 9.09µg/ml	CFT	5	119	274.4	494	148.934	256.0	165.00	338.00
3	LTA 90.9µg/ml	CFT	5	114	255.6	387	118.526	255.0	164.00	358.00
3	NaCl	CFT	5	220	305.6	418	92.953	272.0	227.00	391.00
4	LTA 0.909µg/ml	CFT	10	128	236.4	393	98.536	233.5	139.75	292.75
4	LTA 9.09µg/ml	CFT	10	110	235.5	472	117.645	215.0	136.50	294.25
4	LTA 90.9µg/ml	CFT	10	98	208.3	412	102.543	183.5	135.25	281.25
4	NaCl	CFT	10	123	251.6	422	111.132	215.0	179.25	338.25
6	LTA 0.909µg/ml	CFT	5	96	234.6	401	130.191	238.0	118.00	320.00
6	LTA 9.09µg/ml	CFT	5	83	248.2	430	160.906	231.0	102.00	395.00
6	LTA 90.9µg/ml	CFT	5	92	220.8	454	143.170	205.0	118.00	235.00
6	NaCl	CFT	5	174	282.0	411	105.292	236.0	212.00	377.00

Tabelle 25: Summierende Statistik der *Clot Formation Time* für den Versuch mit LTA in verschiedenen Konzentrationen, gruppiert nach Ansatz

Inkubation	y.	group1	group2	n1	n2	statistic	p	p.adj	p.adj.signif
0	CFT	NaCl	LTA 90.9µg/ml	10	10	39.5	0.241	0.482	ns
0	CFT	NaCl	LTA 9.09µg/ml	10	10	35.0	0.155	0.465	ns
0	CFT	NaCl	LTA 0.909µg/ml	10	10	35.0	0.492	0.492	ns
1	CFT	NaCl	LTA 90.9µg/ml	10	10	9.0	0.812	0.936	ns
1	CFT	NaCl	LTA 9.09µg/ml	10	10	8.0	0.361	0.936	ns
1	CFT	NaCl	LTA 0.909µg/ml	10	10	3.0	0.312	0.936	ns
2	CFT	NaCl	LTA 90.9µg/ml	10	10	35.5	0.444	0.888	ns
2	CFT	NaCl	LTA 9.09µg/ml	10	10	39.0	0.262	0.786	ns
2	CFT	NaCl	LTA 0.909µg/ml	10	10	32.0	0.695	0.888	ns
3	CFT	NaCl	LTA 90.9µg/ml	10	10	12.0	0.312	0.936	ns
3	CFT	NaCl	LTA 9.09µg/ml	10	10	10.0	0.625	1.000	ns
3	CFT	NaCl	LTA 0.909µg/ml	10	10	10.0	0.625	1.000	ns
4	CFT	NaCl	LTA 90.9µg/ml	10	10	44.0	0.105	0.315	ns
4	CFT	NaCl	LTA 9.09µg/ml	10	10	35.0	0.492	0.864	ns
4	CFT	NaCl	LTA 0.909µg/ml	10	10	36.0	0.432	0.864	ns
6	CFT	NaCl	LTA 90.9µg/ml	10	10	13.0	0.188	0.564	ns
6	CFT	NaCl	LTA 9.09µg/ml	10	10	12.0	0.312	0.624	ns
6	CFT	NaCl	LTA 0.909µg/ml	10	10	12.0	0.312	0.624	ns

Tabelle 26: Vergleich der Konzentrationsansätze gegen die Kontrolle: CFT für den Versuch mit LTA in verschiedenen Konzentrationen, gruppiert nach Ansatz. Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben. Korrektur für multiple Gruppenvergleiche nach Holm. Alternative zweiseitig. $p < 0,05$

Ansatz	y.	group1	group2	n1	n2	statistic	p	p.adj	p.adj.signif
LTA 0.909µg/ml	CFT	0	1	10	10	7.0	1.000	1.000	ns
LTA 0.909µg/ml	CFT	0	2	10	10	17.0	0.308	0.924	ns
LTA 0.909µg/ml	CFT	0	3	10	10	0.0	0.100	0.500	ns
LTA 0.909µg/ml	CFT	0	4	10	10	14.0	0.185	0.740	ns
LTA 0.909µg/ml	CFT	0	6	10	10	8.0	1.000	1.000	ns
LTA 9.09µg/ml	CFT	0	1	10	10	4.0	0.438	1.000	ns
LTA 9.09µg/ml	CFT	0	2	10	10	13.0	0.286	1.000	ns
LTA 9.09µg/ml	CFT	0	3	10	10	3.0	0.312	1.000	ns
LTA 9.09µg/ml	CFT	0	4	10	10	5.0	0.020	0.098	ns
LTA 9.09µg/ml	CFT	0	6	10	10	8.5	0.892	1.000	ns
LTA 90.9µg/ml	CFT	0	1	10	10	6.5	0.892	1.000	ns
LTA 90.9µg/ml	CFT	0	2	10	10	23.0	0.695	1.000	ns
LTA 90.9µg/ml	CFT	0	3	10	10	7.0	1.000	1.000	ns
LTA 90.9µg/ml	CFT	0	4	10	10	26.0	0.922	1.000	ns
LTA 90.9µg/ml	CFT	0	6	10	10	10.0	0.625	1.000	ns
NaCl	CFT	0	1	10	10	7.5	1.000	1.000	ns
NaCl	CFT	0	2	10	10	18.0	0.359	1.000	ns
NaCl	CFT	0	3	10	10	3.0	0.312	1.000	ns
NaCl	CFT	0	4	10	10	11.0	0.105	0.525	ns
NaCl	CFT	0	6	10	10	4.0	0.438	1.000	ns

Tabelle 27: Vergleich der Konzentrationsansätze gegen den Ausgangswert: CFT für den Versuch mit LTA in verschiedenen Konzentrationen, gruppiert nach Ansatz. Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben. Korrektur für multiple Gruppenvergleiche nach Holm. Alternative zweiseitig. $p < 0,05$

Inkubation	Ansatz	variable	n	min	mean	max	sd	median	q1	q3
0	LTA 0.909µg/ml	MCF	10	34	51.4	66	9.336	51.5	46.25	57.75
0	LTA 9.09µg/ml	MCF	10	34	53.2	64	9.102	55.0	48.25	59.00
0	LTA 90.9µg/ml	MCF	10	35	52.9	64	8.582	55.0	49.00	56.75
0	NaCl	MCF	10	37	51.4	60	7.975	52.5	48.00	57.50
1	LTA 0.909µg/ml	MCF	5	46	51.0	55	4.062	51.0	48.00	55.00
1	LTA 9.09µg/ml	MCF	5	47	52.8	59	4.324	52.0	52.00	54.00
1	LTA 90.9µg/ml	MCF	5	47	53.4	59	4.393	54.0	52.00	55.00
1	NaCl	MCF	5	47	52.8	58	4.324	54.0	50.00	55.00
2	LTA 0.909µg/ml	MCF	10	35	49.9	64	8.346	49.5	46.00	55.25
2	LTA 9.09µg/ml	MCF	10	36	50.9	63	8.185	51.0	45.75	57.50
2	LTA 90.9µg/ml	MCF	10	37	51.9	67	8.517	52.0	48.00	56.75
2	NaCl	MCF	10	34	49.1	58	7.430	49.5	46.00	54.75
3	LTA 0.909µg/ml	MCF	5	35	49.4	64	11.567	46.0	44.00	58.00
3	LTA 9.09µg/ml	MCF	5	37	50.0	63	11.068	46.0	44.00	60.00
3	LTA 90.9µg/ml	MCF	5	43	51.8	64	9.471	50.0	43.00	59.00
3	NaCl	MCF	5	37	46.0	53	6.633	45.0	43.00	52.00
4	LTA 0.909µg/ml	MCF	10	37	49.5	64	7.990	49.5	44.00	54.00
4	LTA 9.09µg/ml	MCF	10	38	50.9	61	8.117	50.0	45.50	59.00
4	LTA 90.9µg/ml	MCF	10	39	53.2	63	8.203	52.0	49.25	60.50
4	NaCl	MCF	10	36	48.1	56	6.420	49.5	43.75	52.25
6	LTA 0.909µg/ml	MCF	5	31	47.0	61	12.629	46.0	39.00	58.00
6	LTA 9.09µg/ml	MCF	5	33	48.6	66	13.164	47.0	40.00	57.00
6	LTA 90.9µg/ml	MCF	5	36	51.2	63	12.194	52.0	42.00	63.00
6	NaCl	MCF	5	37	44.0	50	5.831	45.0	39.00	49.00

Tabelle 28: Summierende Statistik der MCF für den Versuch mit LTA in verschiedenen Konzentrationen, gruppiert nach Ansatz

Inkubation	y.	group1	group2	n1	n2	statistic	p	p.adj	p.adj.signif
0	MCF	NaCl	LTA 90.9µg/ml	10	10	8.5	0.053	0.159	ns
0	MCF	NaCl	LTA 9.09µg/ml	10	10	8.0	0.091	0.181	ns
0	MCF	NaCl	LTA 0.909µg/ml	10	10	18.0	0.528	0.528	ns
1	MCF	NaCl	LTA 90.9µg/ml	10	10	0.0	0.186	0.558	ns
1	MCF	NaCl	LTA 9.09µg/ml	10	10	5.0	0.574	1.000	ns
1	MCF	NaCl	LTA 0.909µg/ml	10	10	10.0	0.979	1.000	ns
2	MCF	NaCl	LTA 90.9µg/ml	10	10	0.0	0.003	0.008	**
2	MCF	NaCl	LTA 9.09µg/ml	10	10	3.5	0.024	0.048	•
2	MCF	NaCl	LTA 0.909µg/ml	10	10	16.0	0.235	0.235	ns
3	MCF	NaCl	LTA 90.9µg/ml	10	10	0.0	0.050	0.146	ns
3	MCF	NaCl	LTA 9.09µg/ml	10	10	0.0	0.049	0.146	ns
3	MCF	NaCl	LTA 0.909µg/ml	10	10	3.0	0.139	0.146	ns
4	MCF	NaCl	LTA 90.9µg/ml	10	10	2.0	0.005	0.013	•
4	MCF	NaCl	LTA 9.09µg/ml	10	10	0.0	0.004	0.013	•
4	MCF	NaCl	LTA 0.909µg/ml	10	10	16.0	0.122	0.122	ns
6	MCF	NaCl	LTA 90.9µg/ml	10	10	1.0	0.062	0.188	ns
6	MCF	NaCl	LTA 9.09µg/ml	10	10	3.0	0.156	0.312	ns
6	MCF	NaCl	LTA 0.909µg/ml	10	10	2.0	0.181	0.312	ns

Tabelle 29: Vergleich der Konzentrationsansätze gegen die Kontrolle: MCF für den Versuch mit LTA in verschiedenen Konzentrationen, gruppiert nach Ansatz. Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben. Korrektur für multiple Gruppenvergleiche nach Holm. Alternative einseitig. $p < 0,05$

Ansatz	y.	group1	group2	n1	n2	statistic	p	p.adj	p.adj.signif
LTA 0.909µg/ml	MCF	0	1	10	10	10.0	0.049	0.125	ns
LTA 0.909µg/ml	MCF	0	2	10	10	42.5	0.009	0.047	•
LTA 0.909µg/ml	MCF	0	3	10	10	11.0	0.204	0.204	ns
LTA 0.909µg/ml	MCF	0	4	10	10	37.5	0.038	0.125	ns
LTA 0.909µg/ml	MCF	0	6	10	10	15.0	0.031	0.125	ns
LTA 9.09µg/ml	MCF	0	1	10	10	10.0	0.049	0.164	ns
LTA 9.09µg/ml	MCF	0	2	10	10	41.5	0.014	0.070	ns
LTA 9.09µg/ml	MCF	0	3	10	10	9.0	0.392	0.496	ns
LTA 9.09µg/ml	MCF	0	4	10	10	45.0	0.041	0.164	ns
LTA 9.09µg/ml	MCF	0	6	10	10	10.5	0.248	0.496	ns
LTA 90.9µg/ml	MCF	0	1	10	10	10.0	0.049	0.244	ns
LTA 90.9µg/ml	MCF	0	2	10	10	22.0	0.098	0.392	ns
LTA 90.9µg/ml	MCF	0	3	10	10	4.0	0.708	1.000	ns
LTA 90.9µg/ml	MCF	0	4	10	10	27.5	0.520	1.000	ns
LTA 90.9µg/ml	MCF	0	6	10	10	8.0	0.500	1.000	ns
NaCl	MCF	0	1	10	10	10.0	0.049	0.146	ns
NaCl	MCF	0	2	10	10	51.0	0.009	0.046	•
NaCl	MCF	0	3	10	10	8.0	0.179	0.179	ns
NaCl	MCF	0	4	10	10	42.0	0.012	0.048	•
NaCl	MCF	0	6	10	10	10.0	0.050	0.146	ns

Tabelle 30: Vergleich der Konzentrationsansätze gegen den Ausgangswert: MCF für den Versuch mit LTA in verschiedenen Konzentrationen, gruppiert nach Ansatz. Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben. Korrektur für multiple Gruppenvergleiche nach Holm. Alternative einseitig. $p < 0,05$

Inkubation	Ansatz	variable	n	min	mean	max	sd	median	q1	q3
0	LTA 0.909µg/ml	alfa	9	39	57.111	72	11.219	55.0	50.00	67.00
0	LTA 9.09µg/ml	alfa	9	40	59.778	69	10.109	63.0	55.00	68.00
0	LTA 90.9µg/ml	alfa	9	38	57.667	66	8.602	60.0	55.00	62.00
0	NaCl	alfa	9	38	55.333	64	9.206	59.0	48.00	62.00
1	LTA 0.909µg/ml	alfa	5	45	54.400	65	8.019	56.0	48.00	58.00
1	LTA 9.09µg/ml	alfa	5	54	59.400	66	5.413	57.0	57.00	61.00
1	LTA 90.9µg/ml	alfa	5	52	57.800	68	7.014	55.0	52.00	62.00
1	NaCl	alfa	5	49	57.000	62	5.431	59.0	54.00	61.00
2	LTA 0.909µg/ml	alfa	10	38	51.900	69	10.619	49.0	46.00	59.50
2	LTA 9.09µg/ml	alfa	10	35	53.400	69	10.824	53.0	47.00	61.50
2	LTA 90.9µg/ml	alfa	10	33	53.600	70	12.340	53.5	51.25	62.00
2	NaCl	alfa	10	34	51.800	64	8.979	54.5	45.75	57.50
3	LTA 0.909µg/ml	alfa	4	31	55.250	71	17.858	59.5	47.50	67.25
3	LTA 9.09µg/ml	alfa	4	39	53.750	67	12.997	54.5	45.00	63.25
3	LTA 90.9µg/ml	alfa	5	35	50.200	68	14.498	48.0	38.00	62.00
3	NaCl	alfa	5	33	44.000	52	8.544	47.0	37.00	51.00
4	LTA 0.909µg/ml	alfa	10	35	51.400	66	11.635	50.0	43.50	63.25
4	LTA 9.09µg/ml	alfa	10	30	52.000	68	12.893	52.5	43.75	63.50
4	LTA 90.9µg/ml	alfa	10	34	55.300	71	12.202	54.0	49.25	65.25
4	NaCl	alfa	10	33	50.000	66	11.585	52.5	40.25	57.50
6	LTA 0.909µg/ml	alfa	5	35	53.000	71	15.492	49.0	43.00	67.00
6	LTA 9.09µg/ml	alfa	5	33	52.200	73	18.833	50.0	35.00	70.00
6	LTA 90.9µg/ml	alfa	5	33	56.200	72	15.123	56.0	53.00	67.00
6	NaCl	alfa	5	34	45.800	58	10.402	49.0	36.00	52.00

Tabelle 31: Summierende Statistik des Alpha-Winkels für den Versuch mit LTA in verschiedenen Konzentrationen, gruppiert nach Ansatz

Inkubation	y.	group1	group2	n1	n2	statistic	df	p	p.adj	p.adj.signif
0	alfa	NaCl	LTA 90.9µg/ml	10	10	-1.9273820	7	0.095	0.271	ns
0	alfa	NaCl	LTA 9.09µg/ml	10	10	-1.9641831	7	0.090	0.271	ns
0	alfa	NaCl	LTA 0.909µg/ml	10	10	-0.8198873	7	0.439	0.439	ns
1	alfa	NaCl	LTA 90.9µg/ml	10	10	-0.2803999	4	0.793	0.793	ns
1	alfa	NaCl	LTA 9.09µg/ml	10	10	-1.1239030	4	0.324	0.753	ns
1	alfa	NaCl	LTA 0.909µg/ml	10	10	1.3408476	4	0.251	0.753	ns
2	alfa	NaCl	LTA 90.9µg/ml	10	10	-0.9865585	9	0.350	1.000	ns
2	alfa	NaCl	LTA 9.09µg/ml	10	10	-1.0132808	9	0.337	1.000	ns
2	alfa	NaCl	LTA 0.909µg/ml	10	10	-0.0421367	9	0.967	1.000	ns
3	alfa	NaCl	LTA 90.9µg/ml	10	10	-1.4975671	4	0.209	0.603	ns
3	alfa	NaCl	LTA 9.09µg/ml	10	10	-1.5348708	3	0.222	0.603	ns
3	alfa	NaCl	LTA 0.909µg/ml	10	10	-1.6352596	3	0.201	0.603	ns
4	alfa	NaCl	LTA 90.9µg/ml	10	10	-2.0628486	9	0.069	0.208	ns
4	alfa	NaCl	LTA 9.09µg/ml	10	10	-0.8808303	9	0.401	0.802	ns
4	alfa	NaCl	LTA 0.909µg/ml	10	10	-0.5890423	9	0.570	0.802	ns
6	alfa	NaCl	LTA 90.9µg/ml	10	10	-2.4608923	4	0.070	0.209	ns
6	alfa	NaCl	LTA 9.09µg/ml	10	10	-1.4470900	4	0.221	0.221	ns
6	alfa	NaCl	LTA 0.909µg/ml	10	10	-2.1868443	4	0.094	0.209	ns

Tabelle 32: Vergleich der Konzentrationsansätze gegen die Kontrolle: Alpha-Winkel für den Versuch mit LTA in verschiedenen Konzentrationen, gruppiert nach Ansatz. t-Test für gepaarte Stichproben. Korrektur für multiple Gruppenvergleiche nach Holm. Alternative zweiseitig. p < 0,05

Ansatz	y.	group1	group2	n1	n2	statistic	df	p	p.adj	p.adj.signif
LTA 0.909µg/ml	alfa	0	1	10	10	0.4703392	4	0.331	0.586	ns
LTA 0.909µg/ml	alfa	0	2	10	10	1.9445436	8	0.044	0.176	ns
LTA 0.909µg/ml	alfa	0	3	10	10	2.2514363	3	0.055	0.176	ns
LTA 0.909µg/ml	alfa	0	4	10	10	2.5543363	8	0.017	0.085	ns
LTA 0.909µg/ml	alfa	0	6	10	10	0.6078307	3	0.293	0.586	ns
LTA 9.09µg/ml	alfa	0	1	10	10	1.0706068	4	0.172	0.516	ns
LTA 9.09µg/ml	alfa	0	2	10	10	2.1818715	8	0.030	0.121	ns
LTA 9.09µg/ml	alfa	0	3	10	10	1.0718844	3	0.181	0.516	ns
LTA 9.09µg/ml	alfa	0	4	10	10	2.8971439	8	0.010	0.050	*
LTA 9.09µg/ml	alfa	0	6	10	10	-0.0705346	3	0.526	0.526	ns
LTA 90.9µg/ml	alfa	0	1	10	10	0.8181818	4	0.230	0.845	ns
LTA 90.9µg/ml	alfa	0	2	10	10	1.0180556	8	0.169	0.845	ns
LTA 90.9µg/ml	alfa	0	3	10	10	1.0215078	3	0.191	0.845	ns
LTA 90.9µg/ml	alfa	0	4	10	10	0.3948511	8	0.352	0.845	ns
LTA 90.9µg/ml	alfa	0	6	10	10	-0.3086067	3	0.611	0.845	ns
NaCl	alfa	0	1	10	10	0.0000000	4	0.500	0.500	ns
NaCl	alfa	0	2	10	10	3.0792014	8	0.008	0.038	*
NaCl	alfa	0	3	10	10	2.2404915	3	0.056	0.149	ns
NaCl	alfa	0	4	10	10	1.8626095	8	0.050	0.149	ns
NaCl	alfa	0	6	10	10	4.3234602	3	0.011	0.046	*

Tabelle 33: Vergleich der Konzentrationsansätze gegen den Ausgangswert: Alpha-Winkel für den Versuch mit LTA in verschiedenen Konzentrationen, gruppiert nach Ansatz. t-Test für gepaarte Stichproben. Korrektur für multiple Gruppenvergleiche nach Holm. Alternative zweiseitig. $p < 0,05$

Statistische Tabellen für Versuch 2

Inkubation	Ansatz	variable	n	min	mean	max	sd	median	q1	q3
0	LPS 0.909µg/ml	CT	8	422	593.125	798	124.673	614.0	517.50	655.25
0	LPS 9.09µg/ml	CT	8	308	576.250	726	153.763	615.5	493.00	705.75
0	LPS 90.9µg/ml	CT	9	387	551.556	763	129.423	522.0	485.00	673.00
0	NaCl	CT	9	444	534.556	677	76.769	503.0	479.00	572.00
2	LPS 0.909µg/ml	CT	8	66	357.375	551	151.737	390.0	320.75	435.25
2	LPS 9.09µg/ml	CT	8	275	345.000	479	71.402	332.0	289.75	370.25
2	LPS 90.9µg/ml	CT	8	247	324.750	541	112.186	261.0	250.25	367.25
2	NaCl	CT	8	267	482.500	619	114.960	493.5	436.25	547.00
3	LPS 0.909µg/ml	CT	8	59	302.375	504	136.176	321.0	237.25	381.25
3	LPS 9.09µg/ml	CT	8	188	247.750	317	49.445	245.5	207.00	287.50
3	LPS 90.9µg/ml	CT	9	115	192.889	310	63.471	165.0	158.00	208.00
3	NaCl	CT	9	169	430.333	711	158.862	420.0	354.00	550.00
5	LPS 0.909µg/ml	CT	8	136	251.500	353	66.080	252.0	222.50	293.25
5	LPS 9.09µg/ml	CT	8	87	155.750	218	43.601	157.0	130.75	185.50
5	LPS 90.9µg/ml	CT	8	101	124.000	167	26.522	110.5	107.50	134.75
5	NaCl	CT	8	206	453.750	655	158.528	474.5	373.00	574.00
8	LPS 0.909µg/ml	CT	4	198	230.250	301	47.738	211.0	204.00	237.25
8	LPS 9.09µg/ml	CT	4	107	154.250	221	48.023	144.5	131.75	167.00
8	LPS 90.9µg/ml	CT	4	71	103.500	142	31.817	100.5	81.50	122.50
8	NaCl	CT	4	202	360.000	475	128.994	381.5	281.50	460.00

Tabelle 34: Summierende Statistik der CT für den Versuch mit LPS in verschiedenen Konzentrationen, gruppiert nach Ansatz

Inkubation	.y.	group1	group2	n1	n2	statistic	df	p	p.adj	p.adj.signif
0	CT	NaCl	LPS 90.9µg/ml	9	9	-0.4158108	8	0.656000	1.000	ns
0	CT	NaCl	LPS 9.09µg/ml	9	9	-0.6587683	7	0.734000	1.000	ns
0	CT	NaCl	LPS 0.909µg/ml	9	9	-1.2552748	7	0.875000	1.000	ns
2	CT	NaCl	LPS 90.9µg/ml	9	9	3.8776762	7	0.003000	0.009	**
2	CT	NaCl	LPS 9.09µg/ml	9	9	3.5739267	7	0.005000	0.009	**
2	CT	NaCl	LPS 0.909µg/ml	9	9	2.0019136	7	0.043000	0.043	•
3	CT	NaCl	LPS 90.9µg/ml	9	9	4.9386055	8	0.000569	0.002	**
3	CT	NaCl	LPS 9.09µg/ml	9	9	3.9559637	7	0.003000	0.003	**
3	CT	NaCl	LPS 0.909µg/ml	9	9	5.1585090	7	0.000656	0.002	**
5	CT	NaCl	LPS 90.9µg/ml	9	9	5.4459846	7	0.000480	0.001	**
5	CT	NaCl	LPS 9.09µg/ml	9	9	5.3232779	7	0.000548	0.001	**
5	CT	NaCl	LPS 0.909µg/ml	9	9	3.3772093	7	0.006000	0.006	**
8	CT	NaCl	LPS 90.9µg/ml	9	9	4.9288204	3	0.008000	0.024	•
8	CT	NaCl	LPS 9.09µg/ml	9	9	4.2060841	3	0.012000	0.025	•
8	CT	NaCl	LPS 0.909µg/ml	9	9	2.5746231	3	0.041000	0.041	•

Tabelle 35: Vergleich der Konzentrationsansätze gegen die Kontrolle: CT für den Versuch mit LPS in verschiedenen Konzentrationen, gruppiert nach Ansatz. t-Test für gepaarte Stichproben. Korrektur für multiple Gruppenvergleiche nach Holm. Alternative einseitig. $p < 0,05$

Ansatz	.y.	group1	group2	n1	n2	statistic	df	p	p.adj	p.adj.signif
LPS 0.909µg/ml	CT	0	2	9	9	4.108691	7	2.00e-03	5.00e-03	**
LPS 0.909µg/ml	CT	0	3	9	9	5.639228	7	3.92e-04	1.00e-03	**
LPS 0.909µg/ml	CT	0	5	9	9	9.628161	7	1.37e-05	5.48e-05	****
LPS 0.909µg/ml	CT	0	8	9	9	4.753480	3	9.00e-03	9.00e-03	**
LPS 9.09µg/ml	CT	0	2	9	9	4.946120	7	8.32e-04	2.00e-03	**
LPS 9.09µg/ml	CT	0	3	9	9	6.542949	7	1.60e-04	4.80e-04	***
LPS 9.09µg/ml	CT	0	5	9	9	7.541290	7	6.63e-05	2.65e-04	***
LPS 9.09µg/ml	CT	0	8	9	9	5.069132	3	7.00e-03	7.00e-03	**
LPS 90.9µg/ml	CT	0	2	9	9	3.965786	7	3.00e-03	3.00e-03	**
LPS 90.9µg/ml	CT	0	3	9	9	7.081285	8	5.19e-05	1.56e-04	***
LPS 90.9µg/ml	CT	0	5	9	9	9.795609	7	1.23e-05	4.92e-05	****
LPS 90.9µg/ml	CT	0	8	9	9	9.818335	3	1.00e-03	2.00e-03	**
NaCl	CT	0	2	9	9	1.154098	7	1.43e-01	3.18e-01	ns
NaCl	CT	0	3	9	9	1.554124	8	7.90e-02	3.18e-01	ns
NaCl	CT	0	5	9	9	1.486844	7	9.00e-02	3.18e-01	ns
NaCl	CT	0	8	9	9	1.766630	3	8.80e-02	3.18e-01	ns

Tabelle 36: Vergleich der Konzentrationsansätze gegen den Ausgangswert: CT für den Versuch mit LPS in verschiedenen Konzentrationen, gruppiert nach Ansatz. t-Test für gepaarte Stichproben. Korrektur für multiple Gruppenvergleiche nach Holm. Alternative einseitig. p < 0,05

Inkubation	Ansatz	variable	n	min	mean	max	sd	median	q1	q3
0	LPS 0.909µg/ml	CFT	8	174	275.250	408	78.816	276.5	223.50	314.75
0	LPS 9.09µg/ml	CFT	8	181	315.250	467	94.607	304.5	246.50	381.25
0	LPS 90.9µg/ml	CFT	9	137	227.556	358	74.584	215.0	160.00	265.00
0	NaCl	CFT	9	157	272.556	501	120.108	231.0	186.00	325.00
2	LPS 0.909µg/ml	CFT	8	160	278.500	534	113.372	261.0	212.50	290.50
2	LPS 9.09µg/ml	CFT	8	142	188.000	233	26.099	193.0	174.50	197.25
2	LPS 90.9µg/ml	CFT	8	134	181.375	266	46.934	168.0	152.00	192.75
2	NaCl	CFT	8	164	339.625	611	157.359	316.0	204.00	434.50
3	LPS 0.909µg/ml	CFT	8	141	232.000	429	97.857	192.0	168.50	279.50
3	LPS 9.09µg/ml	CFT	8	112	154.500	205	29.331	161.5	133.25	166.75
3	LPS 90.9µg/ml	CFT	9	89	148.222	267	52.399	130.0	123.00	164.00
3	NaCl	CFT	9	152	380.889	800	231.323	259.0	228.00	438.00
5	LPS 0.909µg/ml	CFT	8	160	190.500	207	17.768	197.5	176.25	205.25
5	LPS 9.09µg/ml	CFT	8	112	143.250	240	41.999	129.5	119.00	149.75
5	LPS 90.9µg/ml	CFT	8	72	113.000	178	36.008	104.0	94.75	123.25
5	NaCl	CFT	8	166	311.875	438	94.608	316.5	269.75	371.75
8	LPS 0.909µg/ml	CFT	4	148	230.000	286	63.561	243.0	196.00	277.00
8	LPS 9.09µg/ml	CFT	4	97	166.250	257	70.178	155.5	120.25	201.50
8	LPS 90.9µg/ml	CFT	4	88	144.500	184	45.266	153.0	118.00	179.50
8	NaCl	CFT	4	170	262.000	444	126.077	217.0	181.25	297.75

Tabelle 37: Summierende Statistik der CFT für den Versuch mit LPS in verschiedenen Konzentrationen, gruppiert nach Ansatz

Inkubation	y.	group1	group2	n1	n2	statistic	p	p.adj	p.adj.signif
0	CFT	NaCl	LPS 90.9µg/ml	9	9	34.5	0.086	0.259	ns
0	CFT	NaCl	LPS 9.09µg/ml	9	9	17.0	0.578	0.578	ns
0	CFT	NaCl	LPS 0.909µg/ml	9	9	26.0	0.156	0.312	ns
2	CFT	NaCl	LPS 90.9µg/ml	9	9	36.0	0.004	0.012	•
2	CFT	NaCl	LPS 9.09µg/ml	9	9	35.0	0.008	0.016	•
2	CFT	NaCl	LPS 0.909µg/ml	9	9	26.0	0.156	0.156	ns
3	CFT	NaCl	LPS 90.9µg/ml	9	9	44.0	0.004	0.012	•
3	CFT	NaCl	LPS 9.09µg/ml	9	9	36.0	0.004	0.012	•
3	CFT	NaCl	LPS 0.909µg/ml	9	9	31.0	0.039	0.039	•
5	CFT	NaCl	LPS 90.9µg/ml	9	9	36.0	0.004	0.012	•
5	CFT	NaCl	LPS 9.09µg/ml	9	9	36.0	0.004	0.012	•
5	CFT	NaCl	LPS 0.909µg/ml	9	9	33.0	0.020	0.020	•
8	CFT	NaCl	LPS 90.9µg/ml	9	9	10.0	0.062	0.188	ns
8	CFT	NaCl	LPS 9.09µg/ml	9	9	9.0	0.125	0.250	ns
8	CFT	NaCl	LPS 0.909µg/ml	9	9	7.0	0.312	0.312	ns

Tabelle 38: Vergleich der Konzentrationsansätze gegen die Kontrolle: CFT für den Versuch mit LPS in verschiedenen Konzentrationen, gruppiert nach Ansatz. Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben. Korrektur für multiple Gruppenvergleiche nach Holm. Alternative einseitig. $p < 0,05$

Ansatz	y.	group1	group2	n1	n2	statistic	p	p.adj	p.adj.signif
LPS 0.909µg/ml	CFT	0	2	9	9	21.0	0.363	0.690	ns
LPS 0.909µg/ml	CFT	0	3	9	9	24.0	0.230	0.690	ns
LPS 0.909µg/ml	CFT	0	5	9	9	34.0	0.012	0.047	•
LPS 0.909µg/ml	CFT	0	8	9	9	7.0	0.312	0.690	ns
LPS 9.09µg/ml	CFT	0	2	9	9	36.0	0.004	0.016	•
LPS 9.09µg/ml	CFT	0	3	9	9	36.0	0.004	0.016	•
LPS 9.09µg/ml	CFT	0	5	9	9	36.0	0.004	0.016	•
LPS 9.09µg/ml	CFT	0	8	9	9	9.0	0.125	0.125	ns
LPS 90.9µg/ml	CFT	0	2	9	9	34.5	0.012	0.025	•
LPS 90.9µg/ml	CFT	0	3	9	9	43.5	0.008	0.023	•
LPS 90.9µg/ml	CFT	0	5	9	9	36.0	0.004	0.016	•
LPS 90.9µg/ml	CFT	0	8	9	9	10.0	0.062	0.062	ns
NaCl	CFT	0	2	9	9	13.0	0.770	1.000	ns
NaCl	CFT	0	3	9	9	11.0	0.918	1.000	ns
NaCl	CFT	0	5	9	9	11.0	0.844	1.000	ns
NaCl	CFT	0	8	9	9	7.0	0.312	1.000	ns

Tabelle 39: Vergleich der Konzentrationsansätze gegen den Ausgangswert: CFT für den Versuch mit LPS in verschiedenen Konzentrationen, gruppiert nach Ansatz. Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben. Korrektur für multiple Gruppenvergleiche nach Holm. Alternative einseitig. $p < 0,05$

Inkubation	Ansatz	variable	n	min	mean	max	sd	median	q1	q3
0	LPS 0.909µg/ml	MCF	8	39	45.500	54	4.899	45.0	43.00	48.25
0	LPS 9.09µg/ml	MCF	8	39	45.375	55	5.731	45.5	40.00	49.00
0	LPS 90.9µg/ml	MCF	9	40	49.222	57	6.140	50.0	44.00	54.00
0	NaCl	MCF	9	42	47.667	54	4.873	47.0	44.00	52.00
2	LPS 0.909µg/ml	MCF	8	38	48.500	56	6.141	49.0	44.75	52.25
2	LPS 9.09µg/ml	MCF	8	41	51.250	59	6.112	51.5	47.00	55.75
2	LPS 90.9µg/ml	MCF	8	43	52.000	60	6.000	53.5	48.50	55.50
2	NaCl	MCF	8	35	45.000	52	6.279	44.0	42.00	51.25
3	LPS 0.909µg/ml	MCF	8	30	47.375	56	8.782	50.0	43.75	54.00
3	LPS 9.09µg/ml	MCF	8	36	51.625	61	8.831	54.0	46.75	57.25
3	LPS 90.9µg/ml	MCF	9	43	54.778	62	7.345	59.0	49.00	60.00
3	NaCl	MCF	9	22	40.778	52	10.497	44.0	37.00	50.00
5	LPS 0.909µg/ml	MCF	8	42	51.125	59	5.890	53.0	47.00	55.00
5	LPS 9.09µg/ml	MCF	8	46	54.000	61	5.425	55.5	49.50	58.00
5	LPS 90.9µg/ml	MCF	8	44	56.125	62	5.939	57.0	53.75	61.00
5	NaCl	MCF	8	35	44.625	51	5.630	44.5	41.00	50.00
8	LPS 0.909µg/ml	MCF	4	38	44.500	53	7.234	43.5	38.75	49.25
8	LPS 9.09µg/ml	MCF	4	39	47.750	57	7.632	47.5	43.50	51.75
8	LPS 90.9µg/ml	MCF	4	41	50.250	61	8.461	49.5	45.50	54.25
8	NaCl	MCF	4	35	42.500	48	5.568	43.5	40.25	45.75

Tabelle 40: Summierende Statistik der MCF für den Versuch mit LPS in verschiedenen Konzentrationen, gruppiert nach Ansatz

Inkubation	y.	group1	group2	n1	n2	statistic	p	p.adj	p.adj.signif
0	MCF	NaCl	LPS 90.9µg/ml	9	9	7.0	0.037	0.110	ns
0	MCF	NaCl	LPS 9.09µg/ml	9	9	28.0	0.930	1.000	ns
0	MCF	NaCl	LPS 0.909µg/ml	9	9	15.0	0.985	1.000	ns
2	MCF	NaCl	LPS 90.9µg/ml	9	9	2.0	0.012	0.035	•
2	MCF	NaCl	LPS 9.09µg/ml	9	9	2.0	0.015	0.035	•
2	MCF	NaCl	LPS 0.909µg/ml	9	9	4.5	0.034	0.035	•
3	MCF	NaCl	LPS 90.9µg/ml	9	9	0.0	0.005	0.012	•
3	MCF	NaCl	LPS 9.09µg/ml	9	9	0.0	0.004	0.012	•
3	MCF	NaCl	LPS 0.909µg/ml	9	9	0.0	0.007	0.012	•
5	MCF	NaCl	LPS 90.9µg/ml	9	9	0.0	0.007	0.021	•
5	MCF	NaCl	LPS 9.09µg/ml	9	9	1.0	0.008	0.021	•
5	MCF	NaCl	LPS 0.909µg/ml	9	9	3.0	0.021	0.021	•
8	MCF	NaCl	LPS 90.9µg/ml	9	9	0.0	0.062	0.188	ns
8	MCF	NaCl	LPS 9.09µg/ml	9	9	1.0	0.125	0.250	ns
8	MCF	NaCl	LPS 0.909µg/ml	9	9	4.0	0.438	0.438	ns

Tabelle 41: Vergleich der Konzentrationsansätze gegen die Kontrolle: CFT für den Versuch mit LPS in verschiedenen Konzentrationen, gruppiert nach Ansatz. Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben. Korrektur für multiple Gruppenvergleiche nach Holm. Alternative einseitig. $p < 0,05$

Ansatz	y.	group1	group2	n1	n2	statistic	p	p.adj	p.adj.signif
LPS 0.909µg/ml	MCF	0	2	9	9	6	0.102	0.306	ns
LPS 0.909µg/ml	MCF	0	3	9	9	6	0.201	0.402	ns
LPS 0.909µg/ml	MCF	0	5	9	9	4	0.029	0.117	ns
LPS 0.909µg/ml	MCF	0	8	9	9	7	0.821	0.821	ns
LPS 9.09µg/ml	MCF	0	2	9	9	2	0.026	0.077	ns
LPS 9.09µg/ml	MCF	0	3	9	9	6	0.053	0.106	ns
LPS 9.09µg/ml	MCF	0	5	9	9	1	0.008	0.031	•
LPS 9.09µg/ml	MCF	0	8	9	9	4	0.438	0.438	ns
LPS 90.9µg/ml	MCF	0	2	9	9	7	0.136	0.272	ns
LPS 90.9µg/ml	MCF	0	3	9	9	7	0.037	0.112	ns
LPS 90.9µg/ml	MCF	0	5	9	9	0	0.011	0.044	•
LPS 90.9µg/ml	MCF	0	8	9	9	3	0.312	0.312	ns
NaCl	MCF	0	2	9	9	20	0.982	1.000	ns
NaCl	MCF	0	3	9	9	35	0.993	1.000	ns
NaCl	MCF	0	5	9	9	32	0.979	1.000	ns
NaCl	MCF	0	8	9	9	10	1.000	1.000	ns

Tabelle 42: Vergleich der Konzentrationsansätze gegen den Ausgangswert: MCF für den Versuch mit LPS in verschiedenen Konzentrationen, gruppiert nach Ansatz. Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben. Korrektur für multiple Gruppenvergleiche nach Holm. Alternative einseitig. $p < 0,05$

Inkubation	Ansatz	variable	n	min	mean	max	sd	median	q1	q3
0	LPS 0.909µg/ml	alfa	5	34	49.600	57	9.290	52.0	49.00	56.00
0	LPS 9.09µg/ml	alfa	5	39	47.600	57	6.542	48.0	45.00	49.00
0	LPS 90.9µg/ml	alfa	9	38	51.444	63	8.734	53.0	46.00	59.00
0	NaCl	alfa	7	34	51.286	60	9.178	56.0	47.50	57.00
2	LPS 0.909µg/ml	alfa	7	44	50.429	60	5.503	48.0	47.00	53.50
2	LPS 9.09µg/ml	alfa	8	49	56.125	63	3.980	56.0	54.75	58.00
2	LPS 90.9µg/ml	alfa	8	36	56.125	64	9.078	58.5	55.50	61.50
2	NaCl	alfa	5	41	50.400	59	7.987	53.0	43.00	56.00
3	LPS 0.909µg/ml	alfa	8	40	52.875	63	8.626	55.0	46.00	59.00
3	LPS 9.09µg/ml	alfa	8	54	61.125	68	4.549	59.5	59.00	64.50
3	LPS 90.9µg/ml	alfa	9	36	61.889	72	10.529	65.0	61.00	66.00
3	NaCl	alfa	5	48	52.800	61	5.167	52.0	49.00	54.00
5	LPS 0.909µg/ml	alfa	8	54	56.250	60	2.435	55.5	54.00	58.25
5	LPS 9.09µg/ml	alfa	8	49	63.125	68	6.198	65.0	62.50	66.50
5	LPS 90.9µg/ml	alfa	8	61	68.875	76	5.249	69.5	66.50	71.75
5	NaCl	alfa	6	36	47.500	59	8.894	48.0	41.00	53.50
8	LPS 0.909µg/ml	alfa	4	49	52.750	61	5.679	50.5	49.00	54.25
8	LPS 9.09µg/ml	alfa	4	58	63.750	71	5.909	63.0	59.50	67.25
8	LPS 90.9µg/ml	alfa	4	58	65.000	72	6.218	65.0	61.00	69.00
8	NaCl	alfa	4	33	48.500	58	11.387	51.5	43.50	56.50

Tabelle 43: Summierende Statistik des Alpha-Winkels für den Versuch mit LPS in verschiedenen Konzentrationen, gruppiert nach Ansatz

Inkubation	.y.	group1	group2	n1	n2	statistic	df	p	p.adj	p.adj.signif
0	alfa	NaCl	LPS 90.9µg/ml	9	9	-0.8058374	6	0.226000	0.576	ns
0	alfa	NaCl	LPS 9.09µg/ml	9	9	-0.1901173	3	0.431000	0.576	ns
0	alfa	NaCl	LPS 0.909µg/ml	9	9	-0.9754262	4	0.192000	0.576	ns
2	alfa	NaCl	LPS 90.9µg/ml	9	9	-1.2255430	4	0.144000	0.288	ns
2	alfa	NaCl	LPS 9.09µg/ml	9	9	-2.6095434	4	0.030000	0.089	ns
2	alfa	NaCl	LPS 0.909µg/ml	9	9	-0.5872202	4	0.294000	0.294	ns
3	alfa	NaCl	LPS 90.9µg/ml	9	9	-1.2566994	4	0.139000	0.278	ns
3	alfa	NaCl	LPS 9.09µg/ml	9	9	-8.0036756	3	0.002000	0.006	**
3	alfa	NaCl	LPS 0.909µg/ml	9	9	0.0781664	3	0.529000	0.529	ns
5	alfa	NaCl	LPS 90.9µg/ml	9	9	-6.7312506	5	0.000549	0.002	**
5	alfa	NaCl	LPS 9.09µg/ml	9	9	-4.8666538	5	0.002000	0.005	**
5	alfa	NaCl	LPS 0.909µg/ml	9	9	-2.1693046	5	0.041000	0.041	•
8	alfa	NaCl	LPS 90.9µg/ml	9	9	-3.9163795	3	0.015000	0.044	•
8	alfa	NaCl	LPS 9.09µg/ml	9	9	-2.8960192	3	0.031000	0.063	ns
8	alfa	NaCl	LPS 0.909µg/ml	9	9	-0.9014203	3	0.217000	0.217	ns

Tabelle 44: Vergleich der Konzentrationsansätze gegen die Kontrolle: Alpha-Winkel für den Versuch mit LPS in verschiedenen Konzentrationen, gruppiert nach Ansatz. t-Test für gepaarte Stichproben. Korrektur für multiple Gruppenvergleiche nach Holm. Alternative einseitig. $p < 0,05$

Ansatz	.y.	group1	group2	n1	n2	statistic	df	p	p.adj	p.adj.signif
LPS 0.909µg/ml	alfa	0	2	9	9	0.0000000	3	5.00e-01	0.831000	ns
LPS 0.909µg/ml	alfa	0	3	9	9	-0.6459705	4	2.77e-01	0.831000	ns
LPS 0.909µg/ml	alfa	0	5	9	9	-1.5920595	4	9.30e-02	0.373000	ns
LPS 0.909µg/ml	alfa	0	8	9	9	-0.6232890	3	2.89e-01	0.831000	ns
LPS 9.09µg/ml	alfa	0	2	9	9	-1.7646124	4	7.60e-02	0.076000	ns
LPS 9.09µg/ml	alfa	0	3	9	9	-4.7755924	4	4.00e-03	0.013000	•
LPS 9.09µg/ml	alfa	0	5	9	9	-5.5692268	4	3.00e-03	0.010000	•
LPS 9.09µg/ml	alfa	0	8	9	9	-5.9659528	3	5.00e-03	0.013000	•
LPS 90.9µg/ml	alfa	0	2	9	9	-0.8358636	7	2.15e-01	0.215000	ns
LPS 90.9µg/ml	alfa	0	3	9	9	-3.4971071	8	4.00e-03	0.012000	•
LPS 90.9µg/ml	alfa	0	5	9	9	-7.4151691	7	7.38e-05	0.000295	***
LPS 90.9µg/ml	alfa	0	8	9	9	-5.9265415	3	5.00e-03	0.012000	•
NaCl	alfa	0	2	9	9	-0.1551955	3	4.43e-01	0.886000	ns
NaCl	alfa	0	3	9	9	-0.9583148	4	1.96e-01	0.784000	ns
NaCl	alfa	0	5	9	9	1.2269651	4	8.56e-01	0.886000	ns
NaCl	alfa	0	8	9	9	-1.0000000	3	1.96e-01	0.784000	ns

Tabelle 45: Vergleich der Konzentrationsansätze gegen den Ausgangswert: Alpha-Winkel für den Versuch mit LPS in verschiedenen Konzentrationen, gruppiert nach Ansatz. t-Test für gepaarte Stichproben. Korrektur für multiple Gruppenvergleiche nach Holm. Alternative einseitig. $p < 0,05$

Statistische Tabellen für Versuch 3

Ansatz	Inkubation	variable	n	min	mean	max	sd	median	q1	q3
LTA	0	CT	5	451	551.200	613	73.323	583.0	497.00	612.00
NaCl	0	CT	6	376	524.333	594	92.097	569.5	474.25	588.25
LTA	8	CT	3	163	191.000	218	27.514	192.0	177.50	205.00
NaCl	8	CT	5	395	482.400	614	92.289	458.0	408.00	537.00
LTA	12	CT	5	145	171.400	224	31.989	155.0	154.00	179.00
NaCl	12	CT	4	363	481.750	586	113.318	489.0	396.00	574.75
LTA	24	CT	6	132	176.833	269	49.305	172.5	145.00	177.50
NaCl	24	CT	6	320	382.667	471	70.099	371.0	320.25	437.50

Tabelle 46: Summierende Statistik der CT für den Langzeit-Versuch mit LTA, gruppiert nach Ansatz

Inkubation	y.	group1	group2	n1	n2	statistic	df	p	p.adj	p.adj.signif
0	CT	NaCl	LTA	6	6	0.0913872	4	0.466	0.466	ns
8	CT	NaCl	LTA	6	6	2.4559387	1	0.123	0.123	ns
12	CT	NaCl	LTA	6	6	4.5573859	3	0.010	0.010	**
24	CT	NaCl	LTA	6	6	5.2766889	5	0.002	0.002	**

Tabelle 47: Vergleich der Ansätze gegen die Kontrolle: CT für den Langzeit-Versuch mit LTA, gruppiert nach Ansatz. t-Test für gepaarte Stichproben. Korrektur für multiple Gruppenvergleiche nach Holm. Alternative einseitig. $p < 0,05$

Ansatz	y.	group1	group2	n1	n2	statistic	df	p	p.adj	p.adj.signif
LTA	CT	0	8	6	6	5.4337412	2	0.016000	0.016	•
LTA	CT	0	12	6	6	8.3828260	3	0.002000	0.004	**
LTA	CT	0	24	6	6	8.3817534	4	0.000554	0.002	**
NaCl	CT	0	8	6	6	0.5198273	4	0.315000	0.315	ns
NaCl	CT	0	12	6	6	1.6266174	3	0.101000	0.202	ns
NaCl	CT	0	24	6	6	2.7362695	5	0.020000	0.062	ns

Tabelle 48: Vergleich der Ansätze gegen den Ausgangswert: CT für den Langzeit-Versuch mit LTA, gruppiert nach Ansatz. t-Test für gepaarte Stichproben. Korrektur für multiple Gruppenvergleiche nach Holm. Alternative einseitig. $p < 0,05$

Ansatz	Inkubation	variable	n	min	mean	max	sd	median	q1	q3
LTA	0	CFT	5	132	194.000	292	64.386	187.0	143.00	216.00
NaCl	0	CFT	6	136	238.167	419	101.275	209.5	179.50	266.50
LTA	8	CFT	4	133	195.750	303	74.141	173.5	159.25	210.00
NaCl	8	CFT	5	225	340.000	489	107.285	293.0	282.00	411.00
LTA	12	CFT	5	123	180.200	246	45.119	184.0	159.00	189.00
NaCl	12	CFT	4	246	344.250	423	86.685	354.0	284.25	414.00
LTA	24	CFT	6	155	226.667	337	77.446	197.0	169.25	284.75
NaCl	24	CFT	6	65	263.833	408	111.257	280.0	261.25	291.25

Tabelle 49: Summierende Statistik der CFT für den Langzeit-Versuch mit LTA, gruppiert nach Ansatz

Inkubation	.y.	group1	group2	n1	n2	statistic	p
0	CFT	NaCl	LTA	6	6	6	0.812
8	CFT	NaCl	LTA	6	6	5	0.500
12	CFT	NaCl	LTA	6	6	10	0.125
24	CFT	NaCl	LTA	6	6	14	0.563

Tabelle 50: Vergleich der Ansätze gegen die Kontrolle: CFT für den Langzeit-Versuch mit LTA, gruppiert nach Ansatz. Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben. Korrektur für multiple Gruppenvergleiche nach Holm. Alternative zweiseitig. $p < 0,05$

Ansatz	.y.	group1	group2	n1	n2	statistic	p	p.adj	p.adj.signif
LTA	CFT	0	8	6	6	3	0.625	1.000	ns
LTA	CFT	0	12	6	6	7	0.625	1.000	ns
LTA	CFT	0	24	6	6	5	0.625	1.000	ns
NaCl	CFT	0	8	6	6	1	0.125	0.375	ns
NaCl	CFT	0	12	6	6	0	0.125	0.375	ns
NaCl	CFT	0	24	6	6	6	0.438	0.438	ns

Tabelle 51: Vergleich der Ansätze gegen den Ausgangswert: CFT für den Langzeit-Versuch mit LTA, gruppiert nach Ansatz. Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben. Korrektur für multiple Gruppenvergleiche nach Holm. Alternative zweiseitig. $p < 0,05$

Ansatz	Inkubation	variable	n	min	mean	max	sd	median	q1	q3
LTA	0	MCF	5	34	45.600	54	8.989	50.0	38.00	52.00
NaCl	0	MCF	5	40	48.000	53	6.856	53.0	41.00	53.00
LTA	8	MCF	4	13	43.500	58	20.567	51.5	41.50	53.50
NaCl	8	MCF	4	33	42.500	53	11.000	42.0	33.00	51.50
LTA	12	MCF	5	38	50.400	64	9.762	49.0	46.00	55.00
NaCl	12	MCF	4	13	35.250	48	15.327	40.0	32.50	42.75
LTA	24	MCF	6	27	42.333	53	10.577	46.0	34.75	49.75
NaCl	24	MCF	5	23	38.600	48	10.164	43.0	34.00	45.00

Tabelle 52: Summierende Statistik der MCF für den Langzeit-Versuch mit LTA, gruppiert nach Ansatz

Inkubation	.y.	group1	group2	n1	n2	statistic	p
0	MCF	NaCl	LTA	6	6	8.5	0.269
8	MCF	NaCl	LTA	6	6	3.0	1.000
12	MCF	NaCl	LTA	6	6	0.0	0.125
24	MCF	NaCl	LTA	6	6	2.0	0.188

Tabelle 53: Vergleich der Ansätze gegen die Kontrolle: MCF für den Langzeit-Versuch mit LTA, gruppiert nach Ansatz. Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben. Korrektur für multiple Gruppenvergleiche nach Holm. Alternative zweiseitig. $p < 0,05$

Ansatz	.y.	group1	group2	n1	n2	statistic	p	p.adj	p.adj.signif
LTA	MCF	0	8	6	6	3	1.000	1.000	ns
LTA	MCF	0	12	6	6	1	0.250	0.750	ns
LTA	MCF	0	24	6	6	11	0.416	0.832	ns
NaCl	MCF	0	8	6	6	6	0.181	0.250	ns
NaCl	MCF	0	12	6	6	10	0.125	0.250	ns
NaCl	MCF	0	24	6	6	15	0.062	0.188	ns

Tabelle 54: Vergleich der Ansätze gegen den Ausgangswert: MCF für den Langzeit-Versuch mit LTA, gruppiert nach Ansatz. Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben. Korrektur für multiple Gruppenvergleiche nach Holm.

Alternative zweiseitig. $p < 0,05$

Ansatz	Inkubation	variable	n	min	mean	max	sd	median	q1	q3
LTA	0	alfa	5	43	55.600	65	8.678	56.0	52.00	62.00
NaCl	0	alfa	6	43	52.333	64	8.116	52.5	45.75	57.00
LTA	8	alfa	4	52	61.750	79	11.871	58.0	55.75	64.00
NaCl	8	alfa	5	29	42.000	48	7.517	44.0	43.00	46.00
LTA	12	alfa	5	55	60.200	69	5.630	59.0	56.00	62.00
NaCl	12	alfa	4	33	41.250	53	8.655	39.5	36.00	44.75
LTA	24	alfa	6	51	58.333	66	5.391	58.5	55.00	61.25
NaCl	24	alfa	6	34	42.500	55	7.609	43.5	37.00	44.00

Tabelle 55: Summierende Statistik des Alpha-Winkels für den Langzeit-Versuch mit LTA, gruppiert nach Ansatz

Inkubation	.y.	group1	group2	n1	n2	statistic	df	p	p.adj	p.adj.signif
0	alfa	NaCl	LTA	6	6	-0.5687111	4	3.00e-01	3.00e-01	ns
8	alfa	NaCl	LTA	6	6	-2.7051003	2	5.70e-02	5.70e-02	ns
12	alfa	NaCl	LTA	6	6	-3.4117236	3	2.10e-02	2.10e-02	•
24	alfa	NaCl	LTA	6	6	-13.5714286	5	1.95e-05	1.95e-05	****

Tabelle 56: Vergleich der Ansätze gegen die Kontrolle: Alpha-Winkel für den Langzeit-Versuch mit LTA, gruppiert nach Ansatz. t-Test für gepaarte Stichproben. Korrektur für multiple Gruppenvergleiche nach Holm. Alternative einseitig. $p < 0,05$

Ansatz	.y.	group1	group2	n1	n2	statistic	df	p	p.adj	p.adj.signif
LTA	alfa	0	8	6	6	-0.6459246	3	0.718	1.00	ns
LTA	alfa	0	12	6	6	-0.9004503	3	0.783	1.00	ns
LTA	alfa	0	24	6	6	-1.1860432	4	0.849	1.00	ns
NaCl	alfa	0	8	6	6	3.5355339	4	0.012	0.03	•
NaCl	alfa	0	12	6	6	4.5260720	3	0.010	0.03	•
NaCl	alfa	0	24	6	6	2.9975898	5	0.015	0.03	•

Tabelle 57: Vergleich der Ansätze gegen den Ausgangswert: Alpha-Winkel für den Langzeit-Versuch mit LTA, gruppiert nach Ansatz. t-Test für gepaarte Stichproben. Korrektur für multiple Gruppenvergleiche nach Holm. Alternative einseitig. $p < 0,05$

Statistische Tabellen für Versuch 4

Ansatz	Inkubation	variable	n	min	mean	max	sd	median	q1	q3
LPS	0	CT	6	441	604.667	789	127.982	581.5	530.00	687.00
LTA	0	CT	6	432	572.500	773	120.141	557.5	498.00	617.00
LTA_LPS	0	CT	6	362	626.167	928	190.296	612.0	541.75	696.50
NaCl	0	CT	6	454	619.833	865	137.753	618.5	555.50	626.00
LPS	2	CT	6	303	399.000	487	62.302	405.0	373.00	425.00
LTA	2	CT	6	342	449.000	587	92.133	420.0	396.25	507.50
LTA_LPS	2	CT	6	296	372.500	472	57.951	366.5	350.25	383.50
NaCl	2	CT	6	489	575.333	684	63.755	566.5	555.00	587.75
LPS	3	CT	6	159	224.833	275	41.344	224.0	209.50	252.75
LTA	3	CT	6	263	327.000	384	43.932	324.5	304.75	357.00
LTA_LPS	3	CT	6	164	241.833	283	46.413	255.5	220.25	277.25
NaCl	3	CT	6	473	546.500	623	53.268	542.5	518.75	576.00
LPS	5	CT	6	115	149.833	198	27.903	149.0	136.00	154.50
LTA	5	CT	6	175	250.167	333	52.232	246.5	230.75	267.50
LTA_LPS	5	CT	6	101	141.667	210	36.473	134.0	129.00	141.25
NaCl	5	CT	6	494	566.333	636	56.599	565.0	526.25	609.75

Tabelle 58: Summierende Statistik der CT für den Costimulations-Versuch, gruppiert nach Ansatz

Inkubation	y.	group1	group2	n1	n2	statistic	df	p	p.adj	p.adj.signif
0	CT	NaCl	LPS	6	6	0.4779515	5	3.26e-01	6.52e-01	ns
0	CT	NaCl	LTA	6	6	1.6291090	5	8.20e-02	2.46e-01	ns
0	CT	NaCl	LTA_LPS	6	6	-0.2043602	5	5.77e-01	6.52e-01	ns
2	CT	NaCl	LPS	6	6	7.5108410	5	3.31e-04	9.93e-04	***
2	CT	NaCl	LTA	6	6	5.4023915	5	1.00e-03	2.00e-03	**
2	CT	NaCl	LTA_LPS	6	6	5.8212077	5	1.00e-03	2.00e-03	**
3	CT	NaCl	LPS	6	6	9.5789954	5	1.05e-04	3.15e-04	***
3	CT	NaCl	LTA	6	6	6.1190191	5	8.45e-04	8.45e-04	***
3	CT	NaCl	LTA_LPS	6	6	8.0845078	5	2.35e-04	4.70e-04	***
5	CT	NaCl	LPS	6	6	12.9643459	5	2.43e-05	7.29e-05	****
5	CT	NaCl	LTA	6	6	8.0283253	5	2.42e-04	2.42e-04	***
5	CT	NaCl	LTA_LPS	6	6	12.4957221	5	2.91e-05	7.29e-05	****

Tabelle 59: Vergleich der Ansätze gegen die Kontrolle: CT für den Costimulations-Versuch, gruppiert nach Ansatz. t-Test für gepaarte Stichproben. Korrektur für multiple Gruppenvergleiche nach Holm. Alternative einseitig. $p < 0,05$

Ansatz	.y.	group1	group2	n1	n2	statistic	df	p	p.adj	p.adj.signif
LPS	CT	0	2	6	6	7.024984	5	0.000451	0.000918	***
LPS	CT	0	3	6	6	6.463751	5	0.000660	0.000918	***
LPS	CT	0	5	6	6	7.640254	5	0.000306	0.000918	***
LTA	CT	0	2	6	6	5.343451	5	0.002000	0.003000	**
LTA	CT	0	3	6	6	4.396717	5	0.004000	0.004000	**
LTA	CT	0	5	6	6	6.058036	5	0.000884	0.003000	**
LTA_LPS	CT	0	2	6	6	3.287823	5	0.011000	0.011000	•
LTA_LPS	CT	0	3	6	6	4.237734	5	0.004000	0.008000	**
LTA_LPS	CT	0	5	6	6	5.734397	5	0.001000	0.003000	**
NaCl	CT	0	2	6	6	1.367290	5	0.115000	0.236000	ns
NaCl	CT	0	3	6	6	1.662645	5	0.079000	0.236000	ns
NaCl	CT	0	5	6	6	1.352006	5	0.117000	0.236000	ns

Tabelle 60: Vergleich der Ansätze gegen den Ausgangswert: CT für den Costimulations-Versuch, gruppiert nach Ansatz. t-Test für gepaarte Stichproben. Korrektur für multiple Gruppenvergleiche nach Holm. Alternative einseitig. $p < 0,05$

Ansatz	Inkubation	variable	n	min	mean	max	sd	median	q1	q3
LPS	0	CFT	6	152	230.167	298	53.139	235.5	199.25	263.50
LTA	0	CFT	6	206	262.833	434	85.420	233.0	220.75	249.00
LTA_LPS	0	CFT	6	203	285.833	417	83.622	253.5	232.00	335.75
NaCl	0	CFT	6	176	252.167	300	48.006	261.5	227.50	288.75
LPS	2	CFT	6	172	211.833	253	33.979	210.0	185.50	239.00
LTA	2	CFT	6	183	246.833	313	49.592	250.0	211.50	277.25
LTA_LPS	2	CFT	6	150	210.667	268	42.141	215.5	186.25	232.75
NaCl	2	CFT	6	168	248.000	293	45.616	262.0	232.25	276.00
LPS	3	CFT	6	159	207.000	349	71.386	179.0	171.50	200.00
LTA	3	CFT	6	143	221.333	328	64.482	200.0	195.50	247.25
LTA_LPS	3	CFT	6	125	158.500	214	30.058	149.5	148.25	161.25
NaCl	3	CFT	6	135	263.667	327	71.037	283.0	246.75	310.25
LPS	5	CFT	6	133	202.667	394	95.985	167.0	159.25	190.50
LTA	5	CFT	6	109	204.667	337	83.565	185.0	154.00	247.50
LTA_LPS	5	CFT	6	123	154.000	188	25.931	156.0	132.75	171.00
NaCl	5	CFT	6	154	291.500	373	88.061	322.5	238.00	356.00

Tabelle 61: Summierende Statistik der CFT für den Costimulations-Versuch, gruppiert nach Ansatz

Inkubation	.y.	group1	group2	n1	n2	statistic	p	p.adj	p.adj.signif
0	CFT	NaCl	LPS	6	6	16.0	0.147	0.441	ns
0	CFT	NaCl	LTA	6	6	11.0	0.500	1.000	ns
0	CFT	NaCl	LTA_LPS	6	6	6.0	0.844	1.000	ns
2	CFT	NaCl	LPS	6	6	19.5	0.037	0.088	ns
2	CFT	NaCl	LTA	6	6	10.0	0.578	0.578	ns
2	CFT	NaCl	LTA_LPS	6	6	20.0	0.029	0.088	ns
3	CFT	NaCl	LPS	6	6	17.0	0.109	0.218	ns
3	CFT	NaCl	LTA	6	6	15.0	0.219	0.219	ns
3	CFT	NaCl	LTA_LPS	6	6	21.0	0.016	0.047	•
5	CFT	NaCl	LPS	6	6	18.0	0.078	0.094	ns
5	CFT	NaCl	LTA	6	6	19.0	0.047	0.094	ns
5	CFT	NaCl	LTA_LPS	6	6	21.0	0.016	0.047	•

Tabelle 62: Vergleich der Ansätze gegen die Kontrolle: CFT für den Costimulations-Versuch, gruppiert nach Ansatz. Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben. Korrektur für multiple Gruppenvergleiche nach Holm. Alternative einseitig. $p < 0,05$

Ansatz	.y.	group1	group2	n1	n2	statistic	p	p.adj	p.adj.signif
LPS	CFT	0	2	6	6	16.0	0.156	0.468	ns
LPS	CFT	0	3	6	6	14.0	0.281	0.468	ns
LPS	CFT	0	5	6	6	14.5	0.231	0.468	ns
LTA	CFT	0	2	6	6	13.0	0.344	0.657	ns
LTA	CFT	0	3	6	6	14.0	0.281	0.657	ns
LTA	CFT	0	5	6	6	15.0	0.219	0.657	ns
LTA_LPS	CFT	0	2	6	6	21.0	0.016	0.047	•
LTA_LPS	CFT	0	3	6	6	21.0	0.016	0.047	•
LTA_LPS	CFT	0	5	6	6	21.0	0.016	0.047	•
NaCl	CFT	0	2	6	6	14.0	0.281	0.843	ns
NaCl	CFT	0	3	6	6	6.0	0.844	1.000	ns
NaCl	CFT	0	5	6	6	3.0	0.953	1.000	ns

Tabelle 63: Vergleich der Ansätze gegen den Ausgangswert: CFT für den Costimulations-Versuch, gruppiert nach Ansatz. Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben. Korrektur für multiple Gruppenvergleiche nach Holm. Alternative einseitig. $p < 0,05$

Ansatz	Inkubation	variable	n	min	mean	max	sd	median	q1	q3
LPS	0	MCF	6	39	43.833	50	3.817	43.0	42.00	45.50
LTA	0	MCF	6	39	43.667	51	4.082	42.5	42.00	44.50
LTA_LPS	0	MCF	6	31	38.833	54	8.841	36.5	32.25	42.25
NaCl	0	MCF	6	37	43.000	53	5.477	42.0	40.25	43.75
LPS	2	MCF	6	43	49.167	56	4.215	49.0	48.00	50.00
LTA	2	MCF	6	41	45.167	51	3.488	44.5	43.25	46.50
LTA_LPS	2	MCF	6	44	48.833	59	5.345	47.0	46.25	49.25
NaCl	2	MCF	6	39	44.167	53	5.076	42.5	41.25	46.00
LPS	3	MCF	6	39	48.333	57	6.653	49.0	44.00	52.50
LTA	3	MCF	6	41	47.667	52	4.033	49.0	45.75	50.00
LTA_LPS	3	MCF	6	45	50.500	56	4.324	51.5	47.00	53.00
NaCl	3	MCF	6	37	41.333	50	4.967	39.5	38.00	43.25
LPS	5	MCF	6	34	47.167	58	7.985	48.0	44.75	50.50
LTA	5	MCF	6	36	48.167	55	6.616	50.5	47.00	51.00
LTA_LPS	5	MCF	6	46	50.500	59	5.010	49.5	46.50	52.50
NaCl	5	MCF	6	31	36.833	47	5.529	36.5	33.75	37.00

Tabelle 64: Summierende Statistik der MCF für den Costimulations-Versuch, gruppiert nach Ansatz

Inkubation	.y.	group1	group2	n1	n2	statistic	p	p.adj	p.adj.signif
0	MCF	NaCl	LPS	6	6	7.0	0.264	0.792	ns
0	MCF	NaCl	LTA	6	6	8.5	0.375	0.792	ns
0	MCF	NaCl	LTA_LPS	6	6	14.0	0.972	0.972	ns
2	MCF	NaCl	LPS	6	6	0.0	0.018	0.053	ns
2	MCF	NaCl	LTA	6	6	1.0	0.211	0.211	ns
2	MCF	NaCl	LTA_LPS	6	6	0.0	0.029	0.059	ns
3	MCF	NaCl	LPS	6	6	1.0	0.029	0.047	•
3	MCF	NaCl	LTA	6	6	0.0	0.016	0.047	•
3	MCF	NaCl	LTA_LPS	6	6	0.0	0.016	0.047	•
5	MCF	NaCl	LPS	6	6	0.0	0.018	0.047	•
5	MCF	NaCl	LTA	6	6	0.0	0.016	0.047	•
5	MCF	NaCl	LTA_LPS	6	6	0.0	0.016	0.047	•

Tabelle 65: Vergleich der Ansätze gegen die Kontrolle: MCF für den Costimulations-Versuch, gruppiert nach Ansatz. Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben. Korrektur für multiple Gruppenvergleiche nach Holm. Alternative einseitig. $p < 0,05$

Ansatz	.y.	group1	group2	n1	n2	statistic	p	p.adj	p.adj.signif
LPS	MCF	0	2	6	6	3.5	0.172	0.212	ns
LPS	MCF	0	3	6	6	1.0	0.106	0.212	ns
LPS	MCF	0	5	6	6	1.0	0.062	0.188	ns
LTA	MCF	0	2	6	6	1.0	0.423	0.846	ns
LTA	MCF	0	3	6	6	0.0	0.031	0.094	ns
LTA	MCF	0	5	6	6	8.0	0.672	0.846	ns
LTA_LPS	MCF	0	2	6	6	4.0	0.219	0.438	ns
LTA_LPS	MCF	0	3	6	6	1.0	0.059	0.176	ns
LTA_LPS	MCF	0	5	6	6	4.5	0.246	0.438	ns
NaCl	MCF	0	2	6	6	17.5	0.171	0.342	ns
NaCl	MCF	0	3	6	6	11.0	0.410	0.410	ns
NaCl	MCF	0	5	6	6	21.0	0.035	0.106	ns

Tabelle 66. Vergleich der Ansätze gegen den Ausgangswert: MCF für den Costimulations-Versuch, gruppiert nach Ansatz. Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben. Korrektur für multiple Gruppenvergleiche nach Holm. Alternative einseitig. $p < 0,05$

Ansatz	Inkubation	variable	n	min	mean	max	sd	median	q1	q3
LPS	0	alfa	6	40	48.833	62	9.663	48.0	40.25	55.00
LTA	0	alfa	6	39	49.333	70	11.343	45.5	42.50	52.25
LTA_LPS	0	alfa	6	37	51.500	62	9.935	52.5	45.25	59.75
NaCl	0	alfa	6	41	46.833	53	4.750	47.0	43.25	50.00
LPS	2	alfa	6	52	56.333	62	3.445	56.0	54.50	57.50
LTA	2	alfa	6	40	49.500	57	5.891	49.5	47.50	53.00
LTA_LPS	2	alfa	6	47	54.667	67	7.062	54.5	50.00	56.00
NaCl	2	alfa	6	36	43.667	54	6.218	43.0	40.25	45.75
LPS	3	alfa	6	56	60.667	66	3.204	60.5	60.00	61.00
LTA	3	alfa	6	50	55.500	78	11.131	50.5	50.00	53.25
LTA_LPS	3	alfa	6	56	60.333	65	3.445	60.5	57.75	62.50
NaCl	3	alfa	6	37	44.000	54	6.812	41.0	40.25	48.50
LPS	5	alfa	6	55	61.667	67	3.882	62.0	61.25	62.75
LTA	5	alfa	6	49	54.833	60	3.656	55.5	53.50	56.00
LTA_LPS	5	alfa	6	57	62.667	68	4.033	63.5	60.00	64.75
NaCl	5	alfa	6	41	44.167	49	2.994	44.5	41.75	45.00

Tabelle 67: Summierende Statistik des Alpha-Winkels für den Costimulations-Versuch, gruppiert nach Ansatz

Inkubation	.y.	group1	group2	n1	n2	statistic	df	p	p.adj	p.adj.signif
0	alfa	NaCl	LPS	6	6	-0.5518773	5	3.02e-01	0.586000	ns
0	alfa	NaCl	LTA	6	6	-0.5830796	5	2.93e-01	0.586000	ns
0	alfa	NaCl	LTA_LPS	6	6	-1.7258979	5	7.20e-02	0.217000	ns
2	alfa	NaCl	LPS	6	6	-9.6832966	5	9.97e-05	0.000299	***
2	alfa	NaCl	LTA	6	6	-6.6864063	5	5.66e-04	0.001000	**
2	alfa	NaCl	LTA_LPS	6	6	-5.0920105	5	2.00e-03	0.002000	**
3	alfa	NaCl	LPS	6	6	-9.0684531	5	1.36e-04	0.000408	***
3	alfa	NaCl	LTA	6	6	-3.9877066	5	5.00e-03	0.005000	**
3	alfa	NaCl	LTA_LPS	6	6	-8.1216709	5	2.30e-04	0.000460	***
5	alfa	NaCl	LPS	6	6	-8.5561189	5	1.80e-04	0.000360	***
5	alfa	NaCl	LTA	6	6	-7.1199066	5	4.24e-04	0.000424	***
5	alfa	NaCl	LTA_LPS	6	6	-11.0889166	5	5.20e-05	0.000156	***

Tabelle 68: Vergleich der Ansätze gegen die Kontrolle: Alpha-Winkel für den Costimulations-Versuch, gruppiert nach Ansatz. t-Test für gepaarte Stichproben. Korrektur für multiple Gruppenvergleiche nach Holm. Alternative einseitig. $p < 0,05$

Ansatz	.y.	group1	group2	n1	n2	statistic	df	p	p.adj	p.adj.signif
LPS	alfa	0	2	6	6	-2.3502620	5	0.033	0.033	•
LPS	alfa	0	3	6	6	-3.9827349	5	0.005	0.016	•
LPS	alfa	0	5	6	6	-3.9489776	5	0.005	0.016	•
LTA	alfa	0	2	6	6	-0.0519454	5	0.480	0.480	ns
LTA	alfa	0	3	6	6	-3.8041371	5	0.006	0.019	•
LTA	alfa	0	5	6	6	-1.4435414	5	0.104	0.208	ns
LTA_LPS	alfa	0	2	6	6	-0.8097212	5	0.227	0.227	ns
LTA_LPS	alfa	0	3	6	6	-2.0179680	5	0.050	0.100	ns
LTA_LPS	alfa	0	5	6	6	-2.6203080	5	0.024	0.071	ns
NaCl	alfa	0	2	6	6	1.4217161	5	0.893	1.000	ns
NaCl	alfa	0	3	6	6	0.9798637	5	0.814	1.000	ns
NaCl	alfa	0	5	6	6	1.8353259	5	0.937	1.000	ns

Tabelle 69: Vergleich der Ansätze gegen den Ausgangswert: Alpha-Winkel für den Costimulations-Versuch, gruppiert nach Ansatz. t-Test für gepaarte Stichproben. Korrektur für multiple Gruppenvergleiche nach Holm. Alternative einseitig. $p < 0,05$

Statistische Tabellen für Versuch 5

Ansatz	Inkubation	variable	n	min	mean	max	sd	median	q1	q3
NaCl	0	CT	14	227	466.000	647	108.906	488.5	398.25	539.75
LTA	0	CT	12	168	437.667	583	125.905	466.0	402.50	512.25
LPS	0	CT	12	225	482.667	600	96.540	514.5	457.25	539.00
LTA_LPS	0	CT	12	245	479.000	561	80.976	489.0	469.25	517.50
NaCl	5	CT	13	236	358.462	497	75.378	349.0	304.00	416.00
LTA	5	CT	14	143	333.071	475	96.646	348.0	300.00	377.75
LPS	5	CT	14	98	276.214	350	72.833	304.5	239.50	331.25
LTA_LPS	5	CT	14	84	260.643	394	105.122	280.5	164.00	348.25

Tabelle 70: Summierende Statistik der CT für den Versuch mit Cycloheximid, gruppiert nach Ansatz

Cycloheximid	.y.	group1	group2	n1	n2	statistic	df	p	p.adj	p.adj.signif
mit Cycloheximid	CT	NaCl	LTA	7	7	-1.4457096	6	0.901000	1.0000	ns
mit Cycloheximid	CT	NaCl	LPS	7	7	0.2116308	6	0.420000	1.0000	ns
mit Cycloheximid	CT	NaCl	LTA_LPS	7	7	-0.2861641	6	0.608000	1.0000	ns
ohne Cycloheximid	CT	NaCl	LTA	7	7	2.7014544	5	0.021000	0.0210	•
ohne Cycloheximid	CT	NaCl	LPS	7	7	8.3612353	5	0.000200	0.0006	***
ohne Cycloheximid	CT	NaCl	LTA_LPS	7	7	6.2129525	5	0.000789	0.0020	**

Tabelle 71: Vergleich der Ansätze gegen die Kontrolle: CT für den Versuch mit Cycloheximid, gruppiert nach Ansatz. t-Test für gepaarte Stichproben. Korrektur für multiple Gruppenvergleiche nach Holm. Alternative einseitig. $p < 0,05$

Ansatz	.y.	group1	group2	n1	n2	statistic	df	p	p.adj	p.adj.signif
NaCl	CT	ohne Cycloheximid	mit Cycloheximid	7	7	1.6231362	5	0.917	0.917	ns
LTA	CT	ohne Cycloheximid	mit Cycloheximid	7	7	-0.9570626	6	0.188	0.188	ns
LPS	CT	ohne Cycloheximid	mit Cycloheximid	7	7	-3.7243192	6	0.005	0.005	**
LTA_LPS	CT	ohne Cycloheximid	mit Cycloheximid	7	7	-4.5236080	6	0.002	0.002	**

Tabelle 72: Vergleich der Ansätze mit und ohne Cycloheximid: CT für den Versuch mit Cycloheximid, gruppiert nach Ansatz. t-Test für gepaarte Stichproben. Korrektur für multiple Gruppenvergleiche nach Holm. Alternative einseitig. $p < 0,05$

Ansatz	Inkubation	variable	n	min	mean	max	sd	median	q1	q3
NaCl	0	CFT	14	89	262.071	497	122.494	218.5	182.75	323.25
LTA	0	CFT	12	97	269.583	471	121.328	216.5	178.00	376.00
LPS	0	CFT	12	124	243.833	393	93.240	217.0	176.50	337.75
LTA_LPS	0	CFT	12	157	259.750	438	99.254	213.5	188.25	321.00
NaCl	5	CFT	13	110	315.462	528	122.561	332.0	235.00	369.00
LTA	5	CFT	14	149	326.214	542	136.596	374.5	174.75	428.50
LPS	5	CFT	14	128	305.857	603	143.038	308.5	175.25	378.50
LTA_LPS	5	CFT	14	118	286.357	545	130.353	283.5	176.00	357.00

Tabelle 73: Summierende Statistik der CT für den Versuch mit Cycloheximid, gruppiert nach Ansatz

Cycloheximid	.y.	group1	group2	n1	n2	statistic	p	p.adj	p.adj.signif
mit Cycloheximid	CFT	NaCl	LTA	7	7	2.5	0.115	0.345	ns
mit Cycloheximid	CFT	NaCl	LPS	7	7	6.0	0.219	0.438	ns
mit Cycloheximid	CFT	NaCl	LTA_LPS	7	7	20.0	0.375	0.438	ns
ohne Cycloheximid	CFT	NaCl	LTA	7	7	15.0	0.438	1.000	ns
ohne Cycloheximid	CFT	NaCl	LPS	7	7	13.0	0.688	1.000	ns
ohne Cycloheximid	CFT	NaCl	LTA_LPS	7	7	13.0	0.688	1.000	ns

Tabelle 74: Vergleich der Ansätze gegen die Kontrolle: CFT für den Versuch mit Cycloheximid, gruppiert nach Ansatz. Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben. Korrektur für multiple Gruppenvergleiche nach Holm. Alternative zweiseitig. $p < 0,05$

Ansatz	.y.	group1	group2	n1	n2	statistic	p
NaCl	CFT	ohne Cycloheximid	mit Cycloheximid	7	7	16	0.1560
LTA	CFT	ohne Cycloheximid	mit Cycloheximid	7	7	8	0.8520
LPS	CFT	ohne Cycloheximid	mit Cycloheximid	7	7	13	0.5940
LTA_LPS	CFT	ohne Cycloheximid	mit Cycloheximid	7	7	25	0.0391

Tabelle 75: Vergleich der Ansätze mit und ohne Cycloheximid: CFT für den Versuch mit Cycloheximid, gruppiert nach Ansatz. Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben. Korrektur für multiple Gruppenvergleiche nach Holm. Alternative zweiseitig. $p < 0,05$

Ansatz	Inkubation	variable	n	min	mean	max	sd	median	q1	q3
NaCl	0	MCF	14	26	39.000	57	8.274	38.0	32.75	43.75
LTA	0	MCF	12	28	38.833	55	8.537	40.5	30.50	44.00
LPS	0	MCF	12	28	39.417	51	8.251	39.5	32.25	46.00
LTA_LPS	0	MCF	12	25	38.833	48	8.332	39.5	31.75	47.00
NaCl	5	MCF	13	26	34.923	50	7.805	32.0	29.00	41.00
LTA	5	MCF	14	26	35.429	48	8.644	31.0	28.50	45.00
LPS	5	MCF	14	25	37.071	51	9.127	34.5	30.25	46.00
LTA_LPS	5	MCF	14	23	37.357	58	10.051	34.5	30.25	44.25

Tabelle 76: Summierende Statistik der MCF für den Versuch mit Cycloheximid, gruppiert nach Ansatz

Cycloheximid	.y.	group1	group2	n1	n2	statistic	p	p.adj	p.adj.signif
mit Cycloheximid	MCF	NaCl	LTA	7	7	21.0	0.269	0.807	ns
mit Cycloheximid	MCF	NaCl	LPS	7	7	16.0	0.799	1.000	ns
mit Cycloheximid	MCF	NaCl	LTA_LPS	7	7	13.0	0.932	1.000	ns
ohne Cycloheximid	MCF	NaCl	LTA	7	7	0.0	0.098	0.292	ns
ohne Cycloheximid	MCF	NaCl	LPS	7	7	1.5	0.134	0.292	ns
ohne Cycloheximid	MCF	NaCl	LTA_LPS	7	7	4.5	0.246	0.292	ns

Tabelle 77: Vergleich der Ansätze gegen die Kontrolle: MCF für den Versuch mit Cycloheximid, gruppiert nach Ansatz. Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben. Korrektur für multiple Gruppenvergleiche nach Holm. Alternative zweiseitig. $p < 0,05$

Ansatz	.y.	group1	group2	n1	n2	statistic	p
NaCl	MCF	ohne Cycloheximid	mit Cycloheximid	7	7	3.0	0.281
LTA	MCF	ohne Cycloheximid	mit Cycloheximid	7	7	12.5	0.752
LPS	MCF	ohne Cycloheximid	mit Cycloheximid	7	7	18.0	0.551
LTA_LPS	MCF	ohne Cycloheximid	mit Cycloheximid	7	7	10.0	1.000

Tabelle 78: Vergleich der Ansätze mit und ohne Cycloheximid: MCF für den Versuch mit Cycloheximid, gruppiert nach Ansatz. Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben. Korrektur für multiple Gruppenvergleiche nach Holm. Alternative zweiseitig. $p < 0,05$

Ansatz	Inkubation	variable	n	min	mean	max	sd	median	q1	q3
NaCl	0	alfa	14	29	49.071	74	12.003	51.0	40.25	56.75
LTA	0	alfa	12	30	49.750	74	11.971	52.5	42.25	57.00
LPS	0	alfa	12	38	51.083	69	10.077	52.0	41.00	57.00
LTA_LPS	0	alfa	12	33	49.167	60	9.408	53.0	42.00	55.25
NaCl	5	alfa	12	35	45.167	68	9.321	43.5	38.75	50.00
LTA	5	alfa	14	31	46.429	62	10.910	43.0	38.00	58.75
LPS	5	alfa	14	34	49.857	65	10.083	48.0	43.25	58.75
LTA_LPS	5	alfa	14	36	52.143	67	9.945	50.5	47.00	59.00

Tabelle 79: Summierende Statistik des Alpha-Winkels für den Versuch mit Cycloheximid, gruppiert nach Ansatz

Cycloheximid	.y.	group1	group2	n1	n2	statistic	df	p	p.adj	p.adj.signif
mit Cycloheximid	alfa	NaCl	LTA	7	7	0.9804067	6	0.365	0.365	ns
mit Cycloheximid	alfa	NaCl	LPS	7	7	-1.7821204	6	0.125	0.250	ns
mit Cycloheximid	alfa	NaCl	LTA_LPS	7	7	-2.1140359	6	0.079	0.237	ns
ohne Cycloheximid	alfa	NaCl	LTA	7	7	-0.8750000	4	0.431	0.431	ns
ohne Cycloheximid	alfa	NaCl	LPS	7	7	-1.9331907	4	0.125	0.250	ns
ohne Cycloheximid	alfa	NaCl	LTA_LPS	7	7	-3.3005480	4	0.030	0.090	ns

Tabelle 80: Vergleich der Ansätze gegen die Kontrolle: Alpha-Winkel für den Versuch mit Cycloheximid, gruppiert nach Ansatz. t-Test für gepaarte Stichproben. Korrektur für multiple Gruppenvergleiche nach Holm. Alternative einseitig. $p < 0,05$

Ansatz	.y.	group1	group2	n1	n2	statistic	df	p	p.adj	p.adj.signif
NaCl	alfa	ohne Cycloheximid	mit Cycloheximid	7	7	-1.3453832	4	0.125	0.125	ns
LTA	alfa	ohne Cycloheximid	mit Cycloheximid	7	7	1.0385816	6	0.830	0.830	ns
LPS	alfa	ohne Cycloheximid	mit Cycloheximid	7	7	0.0000000	6	0.500	0.500	ns
LTA_LPS	alfa	ohne Cycloheximid	mit Cycloheximid	7	7	-0.6910947	6	0.258	0.258	ns

Tabelle 81: Vergleich der Ansätze mit und ohne Cycloheximid: Alpha-Winkel für den Versuch mit Cycloheximid, gruppiert nach Ansatz. t-Test für gepaarte Stichproben. Korrektur für multiple Gruppenvergleiche nach Holm. Alternative einseitig. $p < 0,05$

Statistische Tabellen für Versuch 6

Ansatz	Inkubation	Temperatur	variable	n	min	mean	max	sd	median	q1	q3
NaCl	0	37 °C	CT	10	341	552.8	768	107.069	550.0	515.00	594.00
LTA	0	37 °C	CT	10	331	546.0	665	96.534	547.5	504.50	616.75
LPS	0	37 °C	CT	10	373	534.5	646	83.332	544.5	501.25	594.50
LTA_LPS	0	37 °C	CT	10	402	543.2	649	74.689	553.0	492.75	585.00
NaCl	2	37 °C	CT	5	409	476.0	549	59.380	495.0	421.00	506.00
NaCl	2	40 °C	CT	5	464	553.2	656	68.613	550.0	537.00	559.00
LTA	2	37 °C	CT	5	315	356.2	429	45.130	349.0	324.00	364.00
LTA	2	40 °C	CT	5	509	576.2	689	70.581	548.0	538.00	597.00
LPS	2	37 °C	CT	5	258	311.2	374	53.476	299.0	265.00	360.00
LPS	2	40 °C	CT	5	392	471.8	591	82.254	478.0	397.00	501.00
LTA_LPS	2	37 °C	CT	5	243	302.8	398	73.551	262.0	245.00	366.00
LTA_LPS	2	40 °C	CT	5	444	504.2	621	71.946	474.0	458.00	524.00
NaCl	5	37 °C	CT	10	91	361.8	493	126.385	410.0	329.00	438.50
NaCl	5	40 °C	CT	10	301	402.2	470	61.013	417.5	354.75	455.50
LTA	5	37 °C	CT	10	122	196.4	351	60.028	179.5	172.25	203.00
LTA	5	40 °C	CT	10	331	424.6	506	58.319	430.0	380.75	466.25
LPS	5	37 °C	CT	10	110	138.5	176	21.849	134.5	123.25	150.25
LPS	5	40 °C	CT	9	302	371.0	477	52.559	357.0	349.00	360.00
LTA_LPS	5	37 °C	CT	10	91	119.0	175	25.893	109.0	101.50	132.75
LTA_LPS	5	40 °C	CT	10	330	388.7	457	48.573	374.0	351.25	439.00

Tabelle 82: Summierende Statistik der CT für den Versuch mit erhöhter Temperatur, gruppiert nach Ansatz

Temperatur	.y.	group1	group2	n1	n2	statistic	df	p	p.adj	p.adj.signif
37 °C	CT	NaCl	LTA	10	10	5.1147464	9	3.16e-04	0.000316	***
37 °C	CT	NaCl	LPS	10	10	6.1680245	9	8.25e-05	0.000165	***
37 °C	CT	NaCl	LTA_LPS	10	10	6.6129268	9	4.89e-05	0.000147	***
40 °C	CT	NaCl	LTA	10	10	-1.6017079	9	9.28e-01	0.928000	ns
40 °C	CT	NaCl	LPS	10	10	2.2989534	8	2.50e-02	0.076000	ns
40 °C	CT	NaCl	LTA_LPS	10	10	0.6599164	9	2.63e-01	0.526000	ns

Tabelle 83: Vergleich der Ansätze gegen die Kontrolle: CT für den Versuch mit erhöhter Temperatur, gruppiert nach Ansatz. t-Test für gepaarte Stichproben. Korrektur für multiple Gruppenvergleiche nach Holm. Alternative einseitig. $p < 0,05$

Ansatz	.y.	group1	group2	n1	n2	statistic	df	p	p.adj	p.adj.signif
NaCl	CT	37 °C	40 °C	10	10	-0.9494736	9	1.84e-01	1.84e-01	ns
LTA	CT	37 °C	40 °C	10	10	-7.5389527	9	1.77e-05	1.77e-05	****
LPS	CT	37 °C	40 °C	10	10	-10.1980390	8	3.70e-06	3.70e-06	****
LTA_LPS	CT	37 °C	40 °C	10	10	-13.4110519	9	1.00e-07	1.00e-07	****

Tabelle 84: Vergleich der Ansätze physiologische und erhöhte Temperatur: CT für den Versuch mit erhöhter Temperatur, gruppiert nach Ansatz. t-Test für gepaarte Stichproben. Korrektur für multiple Gruppenvergleiche nach Holm. Alternative einseitig. $p < 0,05$

Ansatz	Inkubation	Temperatur	variable	n	min	mean	max	sd	median	q1	q3
NaCl	0	37 °C	CFT	10	89	184.200	283	62.912	178.5	146.25	234.50
LTA	0	37 °C	CFT	10	88	172.400	274	61.659	154.0	142.50	217.75
LPS	0	37 °C	CFT	10	88	173.600	281	64.724	158.5	139.00	214.00
LTA_LPS	0	37 °C	CFT	10	112	185.100	232	40.325	191.5	175.50	211.25
NaCl	2	37 °C	CFT	5	111	244.600	418	123.417	260.0	142.00	292.00
NaCl	2	40 °C	CFT	5	243	429.000	616	147.391	424.0	338.00	524.00
LTA	2	37 °C	CFT	5	147	215.000	359	86.154	200.0	151.00	218.00
LTA	2	40 °C	CFT	5	293	445.000	668	148.731	440.0	330.00	494.00
LPS	2	37 °C	CFT	5	64	231.000	485	161.417	213.0	129.00	264.00
LPS	2	40 °C	CFT	5	179	322.800	553	142.637	303.0	239.00	340.00
LTA_LPS	2	37 °C	CFT	5	173	260.000	504	137.401	203.0	201.00	219.00
LTA_LPS	2	40 °C	CFT	5	272	408.200	530	93.924	423.0	379.00	437.00
NaCl	5	37 °C	CFT	10	132	261.000	473	112.586	267.0	165.25	304.75
NaCl	5	40 °C	CFT	10	522	783.600	1455	282.898	710.0	570.25	902.50
LTA	5	37 °C	CFT	10	124	182.100	315	61.387	157.0	145.00	212.50
LTA	5	40 °C	CFT	10	510	873.100	1520	321.107	890.5	585.00	1065.25
LPS	5	37 °C	CFT	10	78	210.500	493	145.932	146.0	127.75	198.25
LPS	5	40 °C	CFT	10	258	608.800	854	185.467	637.0	510.25	730.00
LTA_LPS	5	37 °C	CFT	10	107	201.600	540	127.605	159.0	127.25	211.00
LTA_LPS	5	40 °C	CFT	9	370	761.556	1408	360.741	667.0	494.00	879.00

Tabelle 85: Summierende Statistik der CFT für den Versuch mit erhöhter Temperatur, gruppiert nach Ansatz

Temperatur	.y.	group1	group2	n1	n2	statistic	p	p.adj	p.adj.signif
37 °C	CFT	NaCl	LTA	10	10	53.0	0.006	0.018	•
37 °C	CFT	NaCl	LPS	10	10	42.0	0.160	0.310	ns
37 °C	CFT	NaCl	LTA_LPS	10	10	35.0	0.155	0.310	ns
40 °C	CFT	NaCl	LTA	10	10	10.0	0.084	0.252	ns
40 °C	CFT	NaCl	LPS	10	10	44.5	0.092	0.252	ns
40 °C	CFT	NaCl	LTA_LPS	10	10	25.5	0.767	0.767	ns

Tabelle 86: Vergleich der Ansätze gegen die Kontrolle: CFT für den Versuch mit erhöhter Temperatur, gruppiert nach Ansatz. Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben. Korrektur für multiple Gruppenvergleiche nach Holm. Alternative einseitig. $p < 0,05$

Ansatz	.y.	group1	group2	n1	n2	statistic	p
NaCl	CFT	37 °C	40 °C	10	10	0	0.000977
LTA	CFT	37 °C	40 °C	10	10	0	0.000977
LPS	CFT	37 °C	40 °C	10	10	0	0.000977
LTA_LPS	CFT	37 °C	40 °C	10	10	0	0.001950

Tabelle 87: Vergleich der Ansätze physiologische und erhöhte Temperatur: CFT für den Versuch mit erhöhter Temperatur, gruppiert nach Ansatz. Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben. Korrektur für multiple Gruppenvergleiche nach Holm. Alternative einseitig. $p < 0,05$

Ansatz	Inkubation	Temperatur	variable	n	min	mean	max	sd	median	q1	q3
NaCl	0	37 °C	MCF	10	41	50.100	61	6.855	49.5	47.25	51.75
LTA	0	37 °C	MCF	10	43	49.600	60	6.077	48.5	44.75	51.75
LPS	0	37 °C	MCF	10	43	50.600	65	6.931	49.5	45.25	52.50
LTA_LPS	0	37 °C	MCF	10	44	47.900	58	4.254	48.0	44.25	49.00
NaCl	2	37 °C	MCF	5	32	43.400	57	10.213	44.0	35.00	49.00
NaCl	2	40 °C	MCF	5	7	27.200	38	12.911	30.0	23.00	38.00
LTA	2	37 °C	MCF	5	35	46.400	57	8.820	49.0	40.00	51.00
LTA	2	40 °C	MCF	5	21	30.000	40	6.892	29.0	28.00	32.00
LPS	2	37 °C	MCF	5	31	46.000	65	12.981	42.0	40.00	52.00
LPS	2	40 °C	MCF	5	24	36.600	45	8.620	37.0	33.00	44.00
LTA_LPS	2	37 °C	MCF	5	30	42.800	51	7.918	44.0	42.00	47.00
LTA_LPS	2	40 °C	MCF	5	23	30.800	42	6.979	30.0	28.00	31.00
NaCl	5	37 °C	MCF	10	28	39.600	53	7.863	41.0	36.25	42.50
NaCl	5	40 °C	MCF	10	20	23.900	31	3.814	22.5	21.00	26.25
LTA	5	37 °C	MCF	10	36	45.700	58	7.212	43.5	40.75	49.00
LTA	5	40 °C	MCF	10	20	23.000	29	3.333	21.0	21.00	24.75
LPS	5	37 °C	MCF	10	30	46.500	67	11.578	48.5	37.75	52.00
LPS	5	40 °C	MCF	9	21	27.222	35	5.215	27.0	22.00	31.00
LTA_LPS	5	37 °C	MCF	10	29	44.700	53	7.072	46.0	42.00	47.75
LTA_LPS	5	40 °C	MCF	10	19	24.600	33	5.441	22.0	20.25	28.00

Tabelle 88: Summierende Statistik der MCF für den Versuch mit erhöhter Temperatur, gruppiert nach Ansatz

Temperatur	.y.	group1	group2	n1	n2	statistic	p	p.adj	p.adj.signif
37 °C	MCF	NaCl	LTA	10	10	1.5	0.005	0.014	*
37 °C	MCF	NaCl	LPS	10	10	9.0	0.033	0.058	ns
37 °C	MCF	NaCl	LTA_LPS	10	10	6.0	0.029	0.058	ns
40 °C	MCF	NaCl	LTA	10	10	36.0	0.953	1.000	ns
40 °C	MCF	NaCl	LPS	10	10	5.5	0.025	0.075	ns
40 °C	MCF	NaCl	LTA_LPS	10	10	23.0	0.548	1.000	ns

Tabelle 89: Vergleich der Ansätze gegen die Kontrolle: MCF für den Versuch mit erhöhter Temperatur, gruppiert nach Ansatz. Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben. Korrektur für multiple Gruppenvergleiche nach Holm. Alternative einseitig. $p < 0,05$

Ansatz	.y.	group1	group2	n1	n2	statistic	p
NaCl	MCF	37 °C	40 °C	10	10	55	0.000977
LTA	MCF	37 °C	40 °C	10	10	55	0.000977
LPS	MCF	37 °C	40 °C	10	10	45	0.004550
LTA_LPS	MCF	37 °C	40 °C	10	10	55	0.002900

Tabelle 90: Vergleich der Ansätze physiologische und erhöhte Temperatur: MCF für den Versuch mit erhöhter Temperatur, gruppiert nach Ansatz. Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben. Korrektur für multiple Gruppenvergleiche nach Holm. Alternative einseitig. $p < 0,05$

Ansatz	Inkubation	Temperatur	variable	n	min	mean	max	sd	median	q1	q3
NaCl	0	37 °C	alfa	10	44	56.900	72	9.146	57.0	49.50	62.00
LTA	0	37 °C	alfa	10	45	58.500	72	9.217	60.5	51.00	62.75
LPS	0	37 °C	alfa	10	44	58.500	73	9.372	60.0	52.00	62.75
LTA_LPS	0	37 °C	alfa	10	49	56.500	68	6.133	55.0	52.75	57.50
NaCl	2	37 °C	alfa	5	40	52.800	68	12.398	47.0	45.00	64.00
NaCl	2	40 °C	alfa	5	38	50.400	75	16.211	41.0	39.00	59.00
LTA	2	37 °C	alfa	5	42	54.400	62	8.019	54.0	53.00	61.00
LTA	2	40 °C	alfa	5	30	38.800	53	9.257	34.0	34.00	43.00
LPS	2	37 °C	alfa	5	37	56.400	77	15.291	54.0	49.00	65.00
LPS	2	40 °C	alfa	5	40	47.200	61	8.408	44.0	42.00	49.00
LTA_LPS	2	37 °C	alfa	5	37	51.400	58	8.325	55.0	52.00	55.00
LTA_LPS	2	40 °C	alfa	5	35	38.400	45	3.975	37.0	36.00	39.00
NaCl	5	37 °C	alfa	10	37	51.200	69	12.318	48.5	42.00	63.50
NaCl	5	40 °C	alfa	10	28	40.700	59	11.076	37.5	31.75	48.75
LTA	5	37 °C	alfa	10	46	59.000	66	6.815	61.0	54.50	63.75
LTA	5	40 °C	alfa	10	27	38.400	52	8.618	38.0	31.00	44.25
LPS	5	37 °C	alfa	10	44	61.500	75	9.022	62.5	60.50	66.00
LPS	5	40 °C	alfa	9	34	43.667	66	10.149	40.0	38.00	44.00
LTA_LPS	5	37 °C	alfa	10	42	61.200	72	9.090	63.5	58.25	67.00
LTA_LPS	5	40 °C	alfa	9	32	42.000	53	7.632	42.0	37.00	49.00

Tabelle 91: Summierende Statistik des Alpha-Winkels für den Versuch mit erhöhter Temperatur, gruppiert nach Ansatz

Temperatur	.y.	group1	group2	n1	n2	statistic	df	p	p.adj	p.adj.signif
37 °C	alfa	NaCl	LTA	10	10	-2.7099602	9	0.012	0.014	•
37 °C	alfa	NaCl	LPS	10	10	-3.2752095	9	0.005	0.014	•
37 °C	alfa	NaCl	LTA_LPS	10	10	-3.0714756	9	0.007	0.014	•
40 °C	alfa	NaCl	LTA	10	10	0.9660985	9	0.820	0.928	ns
40 °C	alfa	NaCl	LPS	10	10	-1.0259384	8	0.167	0.501	ns
40 °C	alfa	NaCl	LTA_LPS	10	10	-0.0929479	8	0.464	0.928	ns

Tabelle 92: Vergleich der Ansätze gegen die Kontrolle: Alpha-Winkel für den Versuch mit erhöhter Temperatur, gruppiert nach Ansatz. t-Test für gepaarte Stichproben. Korrektur für multiple Gruppenvergleiche nach Holm. Alternative einseitig. $p < 0,05$

Ansatz	.y.	group1	group2	n1	n2	statistic	df	p	p.adj	p.adj.signif
NaCl	alfa	37 °C	40 °C	10	10	3.391806	9	4.00e-03	4.00e-03	**
LTA	alfa	37 °C	40 °C	10	10	9.010623	9	4.20e-06	4.20e-06	****
LPS	alfa	37 °C	40 °C	10	10	5.945284	8	1.72e-04	1.72e-04	***
LTA_LPS	alfa	37 °C	40 °C	10	10	9.436285	8	6.50e-06	6.50e-06	****

Tabelle 93: Vergleich der Ansätze physiologische und erhöhte Temperatur: Alpha-Winkel für den Versuch mit erhöhter Temperatur, gruppiert nach Ansatz. t-Test für gepaarte Stichproben. Korrektur für multiple Gruppenvergleiche nach Holm. Alternative einseitig. $p < 0,05$

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Christoph Sucker für die hervorragende Betreuung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit und die Bereitschaft, auch nach Jahren mit wenig Fortschritt den Weg bis zur Abgabe zu begleiten.

Außerdem möchte ich mich bei den Mitarbeitern des hämostaseologischen Labors der Universitätsklinik Düsseldorf bedanken, die bei praktischen Fragen stets Rat wussten.

Meinen Eltern Barbara und PD Dr. Martin Burk danke ich für die immerwährende Geduld, den Zuspruch und die Motivation auf dem langen Weg. Ohne Euch gäbe es diese Arbeit nicht!

Besonders hervorheben möchte ich meinen Vater, der mir Licht in das Dunkel der statistischen Berechnungen brachte und mir für alle Fragen Tag und Nacht zur Seite stand.

„Last but not least“ danke ich meinem Mann Markus und meinen Kindern Jonas, Noah und Leah Paniczek für die Ablenkungen, die Liebe und den Enthusiasmus, die sie mir in den vergangenen 15 Jahren geschenkt haben.