

Aus dem Deutschen Herzzentrum der Charité  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchung der Thrombozytenfunktion bei hospitalisierten an  
COVID-19 erkrankten Patient\*innen

Investigation of platelet function in hospitalized patients  
suffering from COVID-19

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Kai Christian Jakobs

Erstbetreuung: Universitätsprofessorin Dr. med. Ursula Rauch-Kröhnert

Datum der Promotion: 30.06.2024



## Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis .....	iii
Abbildungsverzeichnis .....	iv
Abkürzungsverzeichnis .....	v
Zusammenfassung.....	1
Einleitung .....	4
1.1    Allgemeine Übersicht zu COVID-19 .....	4
1.2    COVID-19 und Thrombogenität .....	5
1.3    Thrombozytenfunktion .....	6
1.4    Messverfahren der Thrombozytenfunktion .....	8
1.5    Sekundäre Hämostase .....	10
1.6    Andere Studien unserer Arbeitsgruppe zum Thema COVID-19.....	11
1.7    Fragestellung dieser Untersuchung .....	13
2    Methodik .....	14
2.1    Studienkollektiv .....	14
2.2    Blutabnahmen.....	15
2.3    Thrombozytenimpedanzaggregometrie .....	15
2.4    Durchflusszytometrisches Leukozyten-Subtyp-Panel.....	16
2.5    Durchflusszytometrische Bead-basierte Multiplex-Zytokinbestimmung.....	21
2.6    Enzyme-linked Immunosorbent Assay .....	23
2.7    Statistik .....	24
3    Ergebnisse .....	25
3.1    Charakteristika der Patient*innen .....	25
3.2    Thrombozytenreaktivität und Krankheitsschwere .....	28
3.3    Inflammatorische Charakteristika und Outcome.....	33
3.4    Korrelationen nach SARS-CoV2-Status: SOFA Score, Marker der Thrombozytenreaktivität und Zytokine.....	34

---

4	Diskussion.....	38
4.1	Zentrale Ergebnisse dieser Studie.....	38
4.2	Interpretation der Ergebnisse .....	38
4.2.1	Thrombozytenreaktivität .....	38
4.2.2	Zytokinprofil .....	41
4.2.3	Zell-Thrombozyten-Aggregate.....	41
4.3	Einordnung der Ergebnisse in die aktuelle klinische Forschung .....	42
4.4	Stärken und Schwächen der Studie .....	44
4.5	Implikationen für Praxis und zukünftige Forschung .....	45
5	Schlussfolgerungen .....	46
	Literaturverzeichnis .....	47
	Eidesstattliche Versicherung .....	56
	Anteilerklärung an der erfolgten Publikation.....	57
	Druckexemplar der Publikation .....	58
	Lebenslauf.....	69
	Komplette Publikationsliste .....	70
	Danksagung .....	72

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Sequential Organ Failure Assessment Score .....	15
Tabelle 2: Charakteristika der Patient*innen - Demographie und Vitalparameter.....	25
Tabelle 3: Charakteristika der Patient*innen - bekannte Diagnosen .....	26
Tabelle 4: Charakteristika der Patient*innen - Medikation .....	27
Tabelle 5: Charakteristika der Patient*innen - Routinelaborwerte .....	28

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Durchflusszytometrische Gating-Strategie Leukozyten-Subtyp-Panel.....	20
Abbildung 2: Durchflusszytometrische Gating-Strategie Multiplex-Zytokinmessungen .	23
Abbildung 3: Impedanzaggregometrie .....	29
Abbildung 4: Thrombozytenreaktivitätsmarker und Krankheitsschwere .....	32
Abbildung 5: Thrombin-Antithrombin Komplexe.....	32
Abbildung 6: Zytokine und Leukozyten-Subtyp-Panel .....	34
Abbildung 7: Korrelationen Gerinnungsparameter, Entzündungsparameter und SOFA Score .....	37

## Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
ADP	Adenosindiphosphat
ASS	Acetylsalicylsäure
CCL	Chemokine (C-C motif) Ligand
CD	Cluster of differentiation
COVID-19	Coronavirus disease 2019
COV <sub>neg</sub>	Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2 negativ getestete Patient*innen
COV <sub>pos</sub>	Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2 positiv getestete Patient*innen
COV <sub>Überlebende</sub>	Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2 positiv getestete Patient*innen, die überlebten
COV <sub>Verstorbene</sub>	Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2 positiv getestete Patient*innen, die verstarben
CRP	C-reaktives Protein
CXCL	Chemokine (C-X-C Motif) Ligand
GCSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
IL	Interleukin
IL-1RA	Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist
IFN	Interferon
MCP1	Monocyte Chemotactic Protein 1
MPV	Mean Platelet Volume = mittleres Thrombozytenvolumen
PCR	Polymerase Chain Reaction = Polymerase Kettenreaktion
SARS-CoV2	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus type 2 = Schweres-akutes-Atemwegssyndrom-Coronavirus Typ 2

---

SOFA Score	Sequential Organ Failure Assessment Score
TH-Zelle	T-Helferzelle
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
TRAP	Thrombinrezeptor-Aktivator-Peptid 6





## Zusammenfassung

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) gehört zu den immuno-thrombotischen Infektions-erkrankungen. Zum besseren Verständnis der Erkrankung ist die Untersuchung der Zusammenhänge zwischen Thrombogenität, Inflammation und Krankheitsschwere notwendig.

An dieser Studie nahmen Patient\*innen teil, die aufgrund ihrer akuten, infektiologisch-respiratorischen Erkrankung hospitalisiert wurden. Inwiefern eine Infektion mit dem Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus type 2 (SARS-CoV2) bestand, wurde bei allen Teilnehmenden mittels Polymerase Chain Reaction (PCR) untersucht.

Mithilfe der Impedanzaggregometrie wurde das Ausmaß der Agonist-induzierten Thrombozytenaggregation analysiert. Dabei wurden verschiedene Agonisten, wie Thrombinrezeptor-Aktivator-Peptid 6 (TRAP), Adenosindiphosphat (ADP) oder Arachidonsäure (AA) verwendet. Eine Bestimmung der Leukozyten-Subtypen und Leukozyten-Thrombozyten-Aggregate erfolgte per Durchflusszytometrie. Durch einen Multiplex-Bead-Immunoassay fand eine Quantifizierung der im Blut zirkulierenden Zytokine statt. Thrombin-Antithrombin-Komplexe wurden mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay gemessen.

Die TRAP-, ADP- und AA-induzierte Thrombozytenaggregation war bei SARS-CoV2-positiven Patient\*innen ( $COV_{pos}$ ,  $n=50$ ) signifikant höher als bei SARS-CoV2-negativen Patient\*innen ( $COV_{neg}$ ,  $n=37$ ). Der Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) Score als Maß für die Erkrankungsschwere ergab höhere Werte bei SARS-CoV2-positiven Patient\*innen verglichen mit SARS-CoV2-negativen Patient\*innen. Verstorbene Patient\*innen mit COVID-19 ( $COV_{Verstorbene}$ ) wiesen einen höheren SOFA Score als überlebende Patient\*innen mit COVID-19 ( $COV_{Überlebende}$ ) auf. In der Gruppe  $COV_{pos}$  bestand eine positive Korrelation zwischen dem SOFA Score und dem mittleren Thrombozytenvolumen (MPV) sowie Werten der TRAP-induzierten Thrombozytenaggregation. Ferner war ein größerer Anteil von klassischen und intermediären Monozyten sowie Cluster of differentiation (CD)4<sub>pos</sub>-T-Zellen (TH-Zellen) an Thrombozyten gebunden. Die Konzentration von Interleukin (IL)-1-Rezeptor-Antagonist (RA) und IL-6 waren in der Gruppe  $COV_{pos}$  höher als in der Gruppe  $COV_{neg}$  sowie in der Gruppe  $COV_{Verstorbene}$  wiederum höher als in der Gruppe  $COV_{Überlebende}$ . Die Zytokine IL-1RA- und IL-6 korrelieren ebenfalls mit Werten des SOFA Scores in der Gruppe  $COV_{pos}$ , nicht aber in der Gruppe  $COV_{neg}$ .

Zusammenfassend bestand in der untersuchten Kohorte bei mittelschwerer bis schwerer COVID-19, nicht aber bei anderen akuten infektiologischen Atemwegserkrankungen, ein Zusammenhang zwischen Markern der Thrombozytenreaktivität, einem typischen inflammatorischen Profil und der Krankheitsschwere. Eine starke Entzündungsreaktion sowie hohe Thrombozytenreaktivität gehen hierbei mit einem schlechteren klinischen Outcome einher. Weitere Studien sind auf diesem Gebiet notwendig, um diejenigen Erkrankten zu identifizieren, die möglicherweise von einer medikamentösen Hemmung der Thrombozytenaggregation profitieren (1).

## Abstract

Patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) exhibit an inflammatory response as well as increased markers of coagulation. For a better understanding of the disease, it is necessary to investigate the relationship between thrombogenicity, inflammation and disease severity.

For this purpose, patients hospitalized due to acute respiratory diseases with or without Polymerase Chain Reaction (PCR) confirmed Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus type 2 (SARS-CoV2) infection were enrolled in this study. Platelet reactivity induced by thrombin receptor activator peptide 6 (TRAP), adenosine diphosphate (ADP), or arachidonic acid (AA) were examined by impedance aggregometry. A leukocyte subtype spectrum and platelet-leukocyte aggregates were determined by flow cytometry. Cytokines were measured by flow cytometry using a bead-based immunoassay and thrombin-antithrombin complexes were measured by an Enzyme-linked Immunosorbent Assay.

Values for TRAP-, ADP-, and AA-induced platelet reactivity were significantly higher in SARS-CoV2-positive patients (COV<sub>pos</sub>, n=50) compared to SARS-CoV2-negative patients (COV<sub>neg</sub>, n=37). The Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score as a measure of disease severity was higher in COV<sub>pos</sub> than in COV<sub>neg</sub>. The SOFA score within COV<sub>pos</sub> is higher for deceased patients (COV<sub>deceased</sub>) than for survivors (COV<sub>survivors</sub>). There was a positive correlation between SOFA score and mean platelet volume and TRAP-induced platelet aggregation in COV<sub>pos</sub>. Furthermore, a greater proportion of classical and intermediate monocytes, and Cluster of differentiation 4<sub>pos</sub> T cells were bound to platelets. Interleukin (IL)-1 receptor antagonist (RA) and IL-6 were higher in COV<sub>pos</sub> than in COV<sub>neg</sub> and again higher in COV<sub>deceased</sub> compared to COV<sub>survivors</sub>. IL-1RA and IL-6 also correlated with SOFA score values in COV<sub>pos</sub> but not in COV<sub>neg</sub>.

In conclusion, there is evidence of an association between markers of platelet reactivity, a typical inflammatory profile, and disease severity in moderate-to-severe COVID-19 but not in other acute infectious respiratory diseases. A strong inflammatory response as well as platelet reactivity seems to be associated with a poor clinical outcome. Further studies in this field are needed to identify patients who may benefit from targeted antithrombotic therapy (1).

## Einleitung

### 1.1 Allgemeine Übersicht zu COVID-19

Im Jahr 2019 begann in der Region Hubei in China eine weltweite Pandemie, die durch ein neuartiges Coronavirus - SARS-CoV2 - ausgelöst wurde (2). SARS-CoV2 ist ein behülltes, einsträngiges, positiv sense Ribonukleinsäurevirus (3). Aktuell sind 5 „Variants of Concern“ Alpha, Beta, Gamma, Delta und Omicron mit jeweiligen Untervarianten und teils unterschiedlichen klinischen Verläufen sowie „Anpassungen“ an die Wirtsimmunität und Übertragungssituation bekannt (4).

Häufige erste Symptome von COVID-19 sind Pyrexie, trockener Husten, Tachypnoe und Dyspnoe (5, 6), wobei auch asymptomatische Infektionen auftreten können (7). Ferner kann es zu weiteren Atemwegssymptomen wie Halsschmerzen, Sternutio (Niesen), Rhinorrhoe und im weiteren Verlauf zur Ausbildung eines „Acute Respiratory Distress Syndrom“ kommen (5). Weitere nicht offensichtlich atemwegassoziierte Symptome sind Anosmie, Myalgie, Arthralgie, Exanthem, Dyspepsie oder Konjunktivitis (5, 8). Laborchemisch fallen unter anderem erhöhte Werte für proinflammatorische Zytokine (wie IL-6), C-reaktives Protein (CRP), das akute Phaseproteine Ferritin, Laktatdehydrogenase und D-Dimere im Blutplasma auf (8). Wie bei einigen anderen viralen Infekten kann es zu einer Lymphopenie kommen (8), die wie auch Neutrophilie, erhöhte Konzentrationen von D-Dimeren, Laktatdehydrogenase und Transaminasen bei COVID-19 prognostisch ungünstig zu sein scheinen (9). Computertomografisch kommt es bei pulmonaler Beteiligung oft zur Darstellung von Milchglasinfiltraten (5, 10). Akute Nierenfunktionseinschränkung (11), gastrointestinale Symptome (12) sowie thromboembolische Ereignisse können ebenfalls auftreten (13, 14). Bekannt ist, dass ein erhöhtes thromboembolisches Risiko bei Personen besteht, die aufgrund anderer Erkrankungen hospitalisiert wurden (15). Bei COVID-19 scheint dieses Risiko im Rahmen einer notwendigen Hospitalisation aber über das bei anderen viralen Erkrankungen hinausgehend zu sein (16), wobei zu Beginn dieses Projektes zugrundeliegende Mechanismen wie auch beteiligte Wege weitgehend unbekannt waren.

## 1.2 COVID-19 und Thrombogenität

SARS-CoV2 besitzt über das Spikeprotein die Eigenschaft, sich an das Angiotensin-Konversionsenzym 2 binden zu können. Die Zellmembranpenetration erfolgt nach Spaltung des Spikeproteins, klassischerweise durch die transmembran Serinprotease 2, oder clathrinvermittelte Endozytose mit nachfolgender Spaltung des Spikeproteins durch Cathepsin L. Nachfolgend kommt es zur Freisetzung von Virusproteinen wie des Virusgenoms durch Membranfusion und Uncoating. Hiernach erfolgt in der Zelle zum einen die Replikation des Virus, zum anderen werden durch die infizierten Zellen sowie benachbarte Zellen proinflammatorische Zytokine freigesetzt (17). Ferner wird das Endothel aktiviert und rekrutiert über diverse Adhäsionsproteine Leukozyten und Thrombozyten. Als Folge der Inflammation und der inflammationsvermittelten Endothelschädigung wird die Gerinnungskaskade sowohl über den intrinsischen (Kontaktaktivierung) per „Neutrophil Extracellular Traps“ als auch über den extrinsischen Weg per Gewebefaktor (= Tissue factor) über Monozyten oder Endothelzellen aktiviert. Als Reaktion setzen das Endothel wie auch die adhärierenden Immunzellen und Thrombozyten weitere Chemokine/Zytokine frei (14). Neben lokal begrenzten Reaktionen kann dies auch als systemisches Inflammationssyndrom auftreten (18).

Im frühen Pandemieverlauf kamen Berichte über hohe Inzidenzen von thromboembolischen Ereignissen auf, die insbesondere bei schwer erkrankten Individuen beobachtet wurden (19, 20). Auch sind höhere D-Dimer-Werte als Marker der Aktivierung des Gerinnungssystems mit einem schweren Verlauf und geringeren Überlebenschancen der Erkrankten vergesellschaftet (21, 22). In Autopsiestudien zu Beginn der Pandemie wurden in 80-100% der Fälle Mikrothromben in der Lunge festgestellt (14).

Thrombozyten von an COVID-19 erkrankten Individuen aggregieren stärker nach Zugabe von Stimulanzen verglichen mit denen gesunder Kontrollpersonen (23). Gleichzeitig waren Plättchenfaktor 4 und Serotonin bei Personen mit COVID-19 im Vergleich zu Gesunden weniger in Blutplättchen, dafür mehr im Plasma nachweisbar, was entsprechend auf eine Aktivierung der Thrombozyten hinweist (24). Bei Viruserkrankungen interagieren Thrombozyten mit Zellen des Immunsystems über parakrine Mechanismen sowie über Oberflächenrezeptoren wie Glykoprotein Ib, IIb/IIIa, p-Selektin oder CD40L = CD154 (25-27). Thrombozyten besitzen die Fähigkeit, mit unterschiedlichen Immunzellen Aggregate bilden zu können: Die Interaktion mit neutrophilen Granulozyten ist mit schneller Ausbildung von „Neutrophil Extracellular Traps“ assoziiert. Die Bindung an Monozyten ist bei

Myokardinfarkten mit thromboembolischen Ereignissen vergesellschaftet (26). Sowohl bei myeloproliferativen Erkrankungen als auch bei COVID-19 lassen sich Zusammenhänge zwischen Leukozyten-Thrombozyten-Aggregaten und thromboembolischen Ereignissen darstellen (28, 29).

Die Schwere des Verlaufs wie auch die Überlebenswahrscheinlichkeit bei COVID-19 hängt statistisch mit den Plasmaspiegeln inflammatorischer Zytokine im Sinne eines Zytokinsturms zusammen. Relevant sind unter anderem C-reaktives Protein und Interleukin-6 (30).

### 1.3 Thrombozytenfunktion

Thrombozyten entstehen aus Megakaryozyten per Sequestrierung von 5-10 Proplättchen, welche jeweils circa 1000 Thrombozyten hervorbringen (31). Sie sind anukleär (und haben somit keine Möglichkeit der Transkription, wohl aber der Translation), haben ein Volumen von 7-11 fL und zirkulieren 5-11 Tage im menschlichen Blut (31, 32). Das endoplasmatische Retikulum dient als Speicher für Calcium, welches im Rahmen der Aktivierung ins Zytoplasma freigesetzt wird (33). Thrombozyten haben im Wesentlichen zwei Gruppen sekretorischer Granula:

- $\alpha$ -Granula machen circa 10% des Thrombozytenvolumens aus, und es sind 50-80 pro Thrombozyten vorhanden. Sie enthalten unter anderem von-Willebrand-Faktor, Plättchenfaktor 4, Fibrinogen, Faktor V, Faktor VIII, Thrombospondin, Fibronectin, „platelet derived growth factor“, Chemokine (C-X-C Motif) Ligand (CXCL)-1 und IL-8. Die Freisetzung erfolgt per Exozytose, welche per p-Selektin an der Thrombozytenoberfläche messbar ist.
- Dichte Granula auch  $\delta$ -Granula enthalten unter anderem ADP, Calcium, Serotonin und Histamin. Es sind 3-8 pro Thrombozyten vorhanden. (32, 34).

Weitere Granula sind Lysosomen, Peroxisomen und T Granula (34). Thrombozyten sind nach Aktivierung in der Lage Thromboxan A<sub>2</sub> zu synthetisieren (35).

Die Hämostase wird klassischerweise in primäre und sekundäre Hämostase unterschieden, wobei es sich bei ersteren hauptsächlich um schnell nach Verletzung ablaufende Prozesse und somit neben Vasokonstriktion unter anderem auch um die Thrombozytenaggregation handelt (36).

Es bestehen mehrere Wege der Thrombozytenaktivierung, welche ineinandergreifen.

In vivo unter Flussbedingungen binden Thrombozyten über Glykoprotein Ib-V-IX an von-Willebrand-Faktor, welcher im Falle beschädigter Gefäßwände an freigelegtes Kollagen bindet (36, 37). Hiervor kommt es zu einem Leukozyten-Rolling-ähnlichem Prozess der Thrombozyten, vermittelt über Glykoprotein Ib (38). Thrombozyten können aber auch Kollagen über Glykoprotein VI und Integrin  $\alpha 2\beta 1$  (= Glykoprotein Ia-IIa) binden (39). Des Weiteren bilden die Blutplättchen Fortsätze nach intrazellulärer Kalziumfreisetzung über die Bildung von Aktin-/Myosinfilamenten aus (39, 40). ADP (per  $P2Y_{12}$ -Rezeptor) aus den verletzten Zellen und den dichten Granula wie auch Adrenalin, Serotonin, Thromboxan A<sub>2</sub> (per Thromboxan-Rezeptor), Thrombin (per Protease-aktiviertem Rezeptor 1) und Plättchen-aktivierender Faktor (aus Leukozyten) verstärken die noch reversible Aggregation der Thrombozyten per Aktivierung von Glykoprotein IIb/IIIa (39, 41).

Anschließend können nach Präaktivierung (potenziell aber auch ohne diese als separater Aktivierungsweg) Thrombozyten über das Glykoprotein IIb/IIIa (= Integrellin  $\alpha IIB-\beta 3$ ), welches über Fibrinogen das Glykoprotein IIb/IIIa eines anderen Thrombozyten bindet, weitere Thrombozyten binden und aktivieren. Auch Fibronectin oder von-Willebrand-Faktor sind weniger affine Liganden von Glykoprotein IIb/IIIa (39, 42). Relevant ist, dass der Shear-Stress- und Fibrinogen-Weg prinzipiell beide Auslöser der Aggregation sein können, aber auch ineinander greifen (39).

Im Rahmen der intrazellulären Kalziumfreisetzung kommt es zur Aktivierung der kalzium-abhängigen Phospholipase A<sub>2</sub>, welche die Freisetzung von AA aus der Zellmembran fördert, die wiederum Edukt für die Zyklooxygenase und mittelbar der Thromboxan-Synthese ist und somit die Produktion von Thromboxan A<sub>2</sub> fördert (41, 43). Thromboxan A<sub>2</sub> wirkt stark aggregationsfördernd auf umliegende Thrombozyten (via Phospholipase C Aktivierung durch den Thromboxan-Rezeptor) (43). Im Rahmen der intrazellulären Kalzi- umerhöhung und Phosphokinase C Aktivierung kommt es zu Membrankonformationsänderung und Außenverlagerung negativ geladener Phospholipide wie vorwiegend Phosphatidylserin (auch Plättchenfaktor 3 genannt) über Hemmung der Flopase (44) sowie Aktivierung der Scramblase (45) und Anoctamin 6 (46). An die negativ geladenen Phospholipide, die nun nach außen weisen, können wiederum extrazellulär Kalziumionen ( $Ca^{2+}$ ) binden, die ihrerseits Kofaktor für Faktor V sowie Faktor VIII sind und eine lokale Aktivierung der Gerinnungskaskade fördern (47).



Hauptsächlich aus den dichten Granula stammendes Serotonin und im Wesentlichen lokal synthetisiertes Thromboxan A<sub>2</sub> führen zu einer lokalen Vasokonstriktion (48). Das alpha Granula Derivat Thrombospondin verfestigt die Glykoprotein-IIb/IIIa-Fibrinogen-Brücken und führt somit zur irreversiblen Aggregation (49).

Klassische medikamentöse Wege der Thrombozytenfunktionshemmung sind die Hemmung der Cyclooxygenase-1 (Acetylsalicylsäure (ASS), ebenfalls schwächerer Inhibitor der Cyclooxygenase-2), des P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub>-Rezeptors (Clopidogrel, Ticagrelor, Prasugrel oder Cangrelor) oder Glykoprotein IIb/IIIa (Tirofiban oder Abciximab) (50, 51). Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, den Protease-aktivierten-Rezeptor-1 über Vorapaxar zu hemmen (52) oder per Illoprost über den Prostazyklinweg die membranständige Adenylatzyklase zu aktivieren, welche per cyclisches Adenosinmonophosphat den Kalziumrückstrom ins endoplasmatische Retikulum fördert (53).

#### 1.4 Messverfahren der Thrombozytenfunktion

Die Bestimmung der Blutungszeit nach einem Lanzettenstich in die Fingerbeere kann einen ersten Hinweis auf eine veränderte Thrombozytenfunktion geben. Die Blutung sollte zwischen 3 und 6 Minuten zum Stillstand kommen (54).

Die Lichttransmissionsaggregometrie (Turbidimetrie) stellt den Goldstandard der funktionalen Thrombozytenfunktionsassays dar. Bei diesem Verfahren wird zuvor aus Vollblut erzeugtes, thrombozytenreiches Plasma in einem durchsichtigen Behälter nach Zugabe von Aggregationsaktivatoren wie AA, ADP, TRAP, Kollagen, Epinephrin, Thromboxan A<sub>2</sub> oder auch Ristocetin (Test der von-Willebrand-Faktor Funktion) per Durchleuchtung auf seine lichttransmissive Eigenschaft hin untersucht. Limitierend ist, dass zur Herstellung des plättchenreichen Plasmas viel Blut benötigt wird, wobei die Thrombozyten bezüglich ihrer Konzentration hin standardisiert werden müssen (und somit praxisnahe Funktionsdaten verloren gehen), und dass zwischen Geräten sowie Laboren nur eine geringe Standardisierung vorliegt und es sich nicht um ein einfach vor Ort umsetzbares Testverfahren handelt (55). Der Vollständigkeit halber sei noch erwähnt, dass das Verfahren um die Messung von freigesetztem Adenosintriphosphat per Luciferase ergänzt werden kann (56). Vor allem vor dem Hintergrund größerer Probenvolumina, je nach Protokoll sehr kurzer Prozessierungszeiten (Proben von unterschiedlichen Campus der Charité) und unpraktikabler klinischer Anwendung nutzten wir dieses Verfahren nicht.

Im antikoagulierten Vollblut kann die Thrombozytenfunktion per Impedanzaggregometrie, Durchflusszytometrie, Thromboelastographie/Rotationsthrombelastometrie oder verschlusszeitbasierte Verfahren wie Platelet Function Analyzer-100® oder -200® untersucht werden (57). Ferner steht mit VerifyNow® auch ein lichttransmissionsmessendes Verfahren zur Verfügung, das allerdings auf die Messung der Effektivität einer medikamentösen Thrombozytenfunktionshemmung hin optimiert ist (58) und unserem Labor nicht zur Verfügung steht. Die Funktionsweise des Multiplate® ist im Methodenteil erklärt. Der Platelet Function Analyzer drückt durch in einem Teil der Kartusche erzeugten Überdruck eine Vollblutprobe durch ein Loch in einem Kollagenpropfen, der mit Adrenalin, ADP oder Antagonisten des P2Y<sub>12</sub>-Rezeptors (Messung des Clopidogrel-Effekts) beschichtet ist. Es wird unter der somit simulierten Blutungssituation durch das Loch die Verschlusszeit gemessen (59). Dieses Verfahren erlaubt eine Messung der Funktion nicht rein unter Bedingungen der biochemischen Aktivierung, sondern auch mittels Simulation des Scherstress. Allerdings ist es aus Erfahrung unseres Labors im Einsatz nicht immer zuverlässig und wäre in Bezug auf Fragestellungen scherstresseinbeziehender Wege, wie zum Beispiel von-Willebrand-Faktor, relevanter.

Durchflusszytometrisch können Thrombozyten im Vollblut recht einfach anhand ihrer Größe und Oberflächenmarker erkannt werden. Als Erkennungsmerkmal (neben Forward Scatter und Sideward Scatter) können Glykoprotein Ib, IX oder Glykoprotein IIb/IIIa Komplex eingesetzt werden (60). Es kann im Ausgangszustand wie nach Zugabe von Thrombozytenaktivatoren die Menge an nicht aggregierten Blutplättchen bestimmt werden (61) oder aber unterschiedliche Thrombozytenoberflächenmarker semiquantifiziert werden, wie p-Selektin, Thrombospondin oder CD40L (alpha Granula Exozytose), fluoreszierendes Fibrinogen (Glykoprotein IIb/IIIa Aktivierung), Phosphatidylserin (Membranveränderung im Sinne inaktiver Flopase und aktiver Scramblase, per Annexin V oder Faktor V, X, VIII Bindung) oder auch intrazellulärer Kalziumkonzentrationsänderung (60, 62). Wir haben uns in der Vorbereitung der Studie gegen eine durchflusszytometrische Funktions- oder Aktivierbarkeitsmessung entschieden, da zu diesem Zeitpunkt keine Expertise in unserer Klinik bezüglich durchflusszytometrischen Thrombozytenfunktionsmessungen bestanden. Retrospektiv betrachtet wäre dies allerdings sehr interessant gewesen und hätte die Beobachtungen um wertvolle Einblicke ergänzt.

Die Rotationsthrombelastometrie/Thromboelastographie (klassischerweise ROTEM®/TEG®) untersuchen jeweils an einem rotierenden Objekt die Bildung eines Throm-

bus (und dessen Auflösung). Verfügbare Agonisten testen vorwiegend Kontaktaktivierungsweg und Gewebefaktoraktivierungsweg wie Teilbereiche dieser Wege und der Thrombolyse. Für TEG® ist auch ein Test verfügbar, der in heparinisiertem Blut nach Zugabe von Reptilase und Faktor XIIIa unter Ausschaltung des Thrombineffekt (per Heparin) die Auswirkung von Fibrin (umgesetzt aus Fibrinogen durch die Reptilase und querverknüpft durch Faktor XIIIa) nach zeitlich versetzter Zugabe von ADP oder AA auf die Thrombozyten und somit die Thrombusbildung untersucht. Klassischerweise ausgegebene Messwerte sind: die Zeit bis zum Erreichen von 2mm und 20mm Thrombus, der Alpha Winkel als Steigung im Zeit-Thrombusdicke-Diagramm zwischen beiden Punkten, die maximale Thrombusdicke, Messwerte für den Thrombus in der Lysephase nach unterschiedlichen Zeitpunkten (63). In Anbetracht des recht spezifischen Tests und des Fokus dieser Arbeit auf die Thrombozytenfunktion, weniger die sekundäre Hämostase, entschieden wir uns gegen dieses Verfahren.

Grundsätzlich stehen auch eine Reihe weiterer nicht direkt funktionaler Verfahren, wie zum Beispiel elektronenmikroskopische Konformationsänderungsmessung (64) oder Messung von freigesetzten Zytokinen aus zuvor aufgereinigten Thrombozyten (65) zur Verfügung.

## 1.5 Sekundäre Hämostase

Der Fokus der hier vorgestellten Arbeit liegt auf der primären Hämostase, weshalb auf eine ausführliche Darstellung der sekundären Hämostase an dieser Stelle verzichtet wird. Dennoch handelt es sich um ineinander übergreifende Prozesse. Zur orientierenden Einschätzung wurden zum einen Thrombin-Antithrombin-Komplexe als Parameter der ablaufenden sekundären Hämostase und zum anderen D-Dimere als Marker der abgelaufenen sekundären Hämostase, respektive der stattfindenden Thrombolyse erfasst. Thrombin (Faktor IIa) wird im Blut schnell an Antithrombin gebunden und der entstandene Komplex stellt somit einen indirekten, aber stabileren Marker der Thrombingeneration dar. Thrombin als direkter Messwert unterliegt großen Schwankungen und ist daher ungeeignet. D-Dimere wiederum entstehen durch den Abbau von quervernetzten Fibrinnetzen durch Spaltung per Plasmin und stellen in der klinischen Praxis den Standard zur Diagnose von Thromboembolien dar (66).

## 1.6 Andere Studien unserer Arbeitsgruppe zum Thema COVID-19

Zur Untersuchung, ob eine Antikoagulation per Rivaroxaban in nierenfunktionsadaptierter, therapeutischer Dosierung für die Dauer des Krankenhausaufenthaltes, jedoch mindestens für 7 Tage, gefolgt von einer 28-tägigen Antikoagulation in prophylaktischer Dosierung, ebenfalls per Rivaroxaban, einer prophylaktisch-dosierten Antikoagulation per niedermolekularem Heparin oder unfraktioniertem Heparin während des Krankenhausaufenthaltes, jedoch mindestens für 7 Tage, überlegen ist, initiierte unsere Arbeitsgruppe die vom Deutschen Zentrum für Herz-Kreislauf-Forschung und Bayer geförderte Studie COVID-prevent (NCT04416048). Eingeschlossen wurden in diese deutschlandweite Studie nur Patient\*innen, bei denen ähnlich der MARINER Studie (67) der D-Dimer-Wert mindestens anderthalbfach über dem altersadjustierten Cut-Off lag. Die Randomisierung erfolgte 1:1. Die primären Endpunkte waren der Surrogatparameter D-Dimer-Wertveränderung und der „7-category ordinal COVID-19 scale by World Health Organization“ an Tag 7. Der sekundäre Endpunkt war ein zusammengesetzter Endpunkt aus venösen oder arteriellen Thromboembolien, neu aufgetretenen Myokardinfarkten, nicht-hämorrhagischen Apoplexen, Tod und Notwendigkeit der invasiven Beatmung bis zu Tag 35 nach Randomisierung. Der Vergleich der therapeutischen Antikoagulation per Rivaroxaban (n=56) mit der prophylaktischen Antikoagulation per Heparin (n=55) ergab keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf die D-Dimerwerte oder die Verbesserung in zuvor erwähntem Score an Tag 7. In einer explorativen Analyse ergab sich in der Kohorte mit einem mindestens zweifach erhöhten D-Dimer Wert bei Einschluss ein signifikanter Unterschied in Bezug auf die D-Dimer Werte zu Tag 7 (0,632 [0,516; 0,748],  $p = 0,026$ ). Der sekundäre Endpunkt wurde von 6 Patient\*innen (10,9%) in der Rivaroxabangruppe und 12 Patient\*innen (21,4%) in der Kontrollgruppe erreicht (Zeit bis zum Auftreten des Endpunktes: HR 0,5; 95% CI 0,15–1,67;  $p=0,264$ ). Zusammenfassend zeigte diese Studie keinen Vorteil für eine therapeutische Antikoagulation unter diesen Bedingungen, weist aber in Richtung eines möglichen Benefits des Regimes in einer Kohorte mit über zweifach erhöhten D-Dimerwerten. Ferner wäre eine größere Anzahl an Studienteilnehmenden wünschenswert gewesen, wobei aufgrund von Rekrutierungsproblemen bedauerlicherweise eine vorzeitige Beendigung (vor Erreichen der geplanten 400 Teilnehmer\*innen) der Studie erfolgen musste (68).

In einem Folgeprojekt der dem Manteltext zugrundeliegenden Publikation untersuchten wir den Zusammenhang zwischen „Neutrophil Extracellular Traps“, Komplementsystem

und Erkrankungsschwere bei hospitalisierten Individuen mit COVID-19 verglichen mit anderen akuten-infektiologischen Lungenerkrankungen. Myeloperoxidase und Myeloperoxidase/Desoxyribonukleinsäure-Komplex als Marker für „Neutrophil Extracellular Traps“, Gewebefaktor („Tissue Factor“), Gewebefaktoraktivität wie auch „Tissue Factor Pathway Inhibitor“ als Marker für den extrinsischen Weg und Komplementkomponenten C5b-9 waren bei COVID-19 signifikant höher als bei der Vergleichskohorte. Komplementkomponenten C3 und C5b-9 waren positiv mit dem SOFA-Score in der Kohorte der SARS-CoV2-positiven Personen, aber nicht bei der Vergleichsgruppe korreliert. Beta-Defensin als oft neutrophilenstämmiges Protein war positiv mit Markern des Komplementsystems korreliert, was einen Zusammenhang zwischen Neutrophilen und Komplementaktivierung bei COVID-19 nahelegt. Allerdings konnten in dieser Studie keine Korrelationen zwischen Markern der Neutrophilenaktivierung oder dem Komplementsystem und von-Willebrand-Faktor (Thrombozytenaktivator über Glycoprotein Ib/IX/V) oder Aktivierung des extrinsischen Wegs nachgewiesen werden (69).

Ein weiteres Folgeprojekt untersuchte bei hospitalisierten Personen mit COVID-19 beziehungsweise akuten Atemwegserkrankungen die Rolle von Galektin-3 in Bezug auf Marker der Hämostase (70). Galektin-3 scheint in einer Reihe von Erkrankungen, wie zum Beispiel Karzinomen, polyzystischen Nierenerkrankungen, fibrotischen wie kardiovaskulären Krankheiten und Herzinsuffizienz, eine Rolle zu spielen. Ferner scheint es thrombozytenaggregationsfördernde Wirkung über Dectin-1 zu haben (71, 72). Wir beobachteten bei COVID-19 höhere Blutplasmawerte für: Galektin-3, von-Willebrand-Faktor, Antithrombin III, Gewebplasminogenaktivator (tissue plasminogen activator). Galektin-3 korrelierte positiv mit von-Willebrand-Faktor, mittlerem Thrombozytenvolumen, Antithrombin III und D-Dimeren bei COVID-19, aber nur mit Antithrombin III in der Kontrollgruppe. SOFA Score und Galaktin-3 korrelierten in beiden Kohorten positiv miteinander (70). Der inhalative Galectin-3 Inhibitor GB0139 zeigte in der DEFINE Studie einen reduktiven Effekt auf D-Dimer-Blutplasmawerte bei COVID-19, was die Relevanz in dieser Konstellation für das Gerinnungssystem unterstreicht (73).

Ein weiteres Projekt untersucht das Auftreten wie den Effekt von Antikörpern gegen Protease-aktivierten Rezeptor 1 auf die Thrombozytenfunktion in einer Kohorte COVID-19-erkrankter Patient\*innen. Die Ergebnisse können hier noch nicht dargelegt werden, da diese Studie noch nicht publiziert ist.

## **1.7 Fragestellung dieser Untersuchung**

Zum Start des Projektes waren die Zusammenhänge zwischen Thrombozytenaktivierung, Inflammation und Erkrankungsschwere bei COVID-19 nur wenig untersucht, wobei klinische Beobachtungen von erhöhten Raten von Thromboembolien vorlagen. Bekannt war allerdings, dass Thrombosen im Sinne von Immunthrombosen als Folge der gesteigerten Immunabwehr vorkommen (74). Ziel dieser Studie war es festzustellen, ob sich die Thrombozytenreaktivitäten bei Patient\*innen mit COVID-19 und Patient\*innen mit anderen akuten infektiologisch-respiratorischen Erkrankungen unterscheiden. Zusätzlich sollten Zusammenhänge zwischen Thrombozytenfunktion, Erkrankungsschwere und Immunreaktion untersucht werden (1).

## 2 Methodik

### 2.1 Studienkollektiv

Der Einschluss von Studienteilnehmenden erfolgte an der Charité - Universitätsmedizin Berlin im Zeitraum von Mai 2020 bis Mai 2021. Alle Erkrankten sind aufgrund akuter, respiratorischer Symptome auf eine Normalstation oder Intensivstation aufgenommen worden. Sämtliche Teilnehmenden wurden per Nasen-Rachen-Abstrich mit nachgeschalteter PCR über das Zentrallabor (Labor Berlin, Berlin, Deutschland) auf SARS-CoV2 getestet. Studienteilnehmende mussten mindestens 18 Jahre alt sowie einwilligungsfähig sein und durften nicht an bekannten hämatologischen oder hämostaseologischen Erkrankungen leiden (entsprechend auch nicht an einer disseminierten intravasalen Koagulopathie). Ferner wurden Patient\*innen mit akuten Blutungen (< 4 Wochen) nicht eingeschlossen. Die Einnahme einer dualen Thrombozytenaggregationshemmung war nicht gestattet. Routinelaborwerte wurden über das Zentrallabor bestimmt (Labor Berlin, Berlin, Deutschland). Der SOFA Score (Tabelle 1) (75) wurde für alle Teilnehmenden, für die die notwendigen Werte vorlagen ( $COV_{pos}$  n=33,  $COV_{neg}$  n=21), berechnet. Es erfolgte eine Genehmigung durch die Ethikkommission der Charité (EA2/066/20, EA4/147/15), und die Studie wurde in Einklang mit der Deklaration von Helsinki 1964 und deren Ergänzungen durchgeführt. Die Umsetzung der Studie erfolgte im Rahmen der Regeln für gute klinische Praxis des International Council for Harmonization von 1996 (1).

**Tabelle 1:** Berechnungsgrundlage SOFA Score

<b>Tabelle 1: Sequential Organ Failure Assessment Score</b>				
Parameter / Punkte	1	2	3	4
PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub>	<400 mmHg	<300 mmHg	<200 mmHg und künstliche Beatmung	<100 mmHg und künstliche Beatmung
Glasgow Coma Scale	13–14	10–12	6–9	< 6
Herz-Kreislauf-System (Dosierungen in µg/kg/min)	Mittlerer arterieller Druck <70 mmHg	Dopamin ≤ 5 oder Dobutamin (beliebige Dosis)	Dopamin > 5 oder Adrenalin ≤ 0.1 oder Noradrenalin ≤ 0.1	Dopamin > 15 oder Adrenalin > 0.1 oder Noradrenalin > 0.1
Bilirubin	1,2–1,9 mg/dL	2,0–5,9 mg/dL	6,0–11,9 mg/dL	> 12,0 mg/dL
Thrombozyten	<150.000/µL	<100.000/µL	<50.000/µL	<20.000/µL
Kreatinin	1.2–1,9 mg/dL	2.0–3,4 mg/dL	3.5–4,9 mg/dL (oder Urin < 500 mL/d)	> 5,0 mg/dL (oder Urin < 200 mL/d)

PaO<sub>2</sub> = arterieller Sauerstoff-Partialdruck, FiO<sub>2</sub> = inspiratorische Sauerstofffraktion; SOFA Score = Sequential Organ Failure Assessment Score; Quellenangabe: (75)

## 2.2 Blutabnahmen

Die Blutabnahme erfolgte ungestaut aus der Ellbogenregion. Vollblut wurde in Blutabnehmerröhrchen, die Ethylendiamintetraessigsäure (3 ml, Vacurette®, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich), Citrat (3 ml, 3.2% Natriumcitrat, Vacurette®, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) oder Hirudin (Sarstedt-Monovette®, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) enthalten, gesammelt. Es erfolgte für Messungen, die kein Frischblut erfordern, eine Plasmaseparation durch Zentrifugation bei Raumtemperatur mit 1200×g über 10 Minuten und anschließend die Lagerung bei -80° Celsius bis zur Analyse (1).

## 2.3 Thrombozytenimpedanzaggregometrie

Mit Hirudin gerinnungsgehemmtes Blut wurde innerhalb von drei Stunden nach Abnahme und erschütterungsarmem Transport per Impedanzaggregometrie (Multiplate® Analyzer; Roche, München, Deutschland) untersucht. Der Test erfolgte in einer Messzelle mit 2



Paar Elektroden und einem Magnetprüher (Roche, München, Deutschland) bei 37° Celsius. 300 µL 0,9%iges Natriumchlorid wurden mit 300 µL Vollblut über 3 Minuten unter Durchmischung per Magnetprüher inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von TRAP (32 µmol/L finale Konzentration), ADP (6.4 µmol/L finale Konzentration) beziehungsweise AA (0.5 mmol/L finale Konzentration) (alle Reagenzien von Roche, München, Deutschland). Für eine Messdauer von 6 Minuten erfolgte die Darstellung des elektrischen Widerstandes über die Zeit. Danach wurde der Mittelwert beider Flächen unter den Kurven der Parallelmessungen in Multiplate®-spezifischen Einheiten berechnet. Im Falle von mehr als 15% Abweichung des niedrigeren vom höheren Wert erfolgte eine Wiederholung der Messung. Die Testung wurde entsprechend der Herstellervorgaben durchgeführt (1).

#### **2.4 Durchflusszytometrisches Leukozyten-Subtyp-Panel**

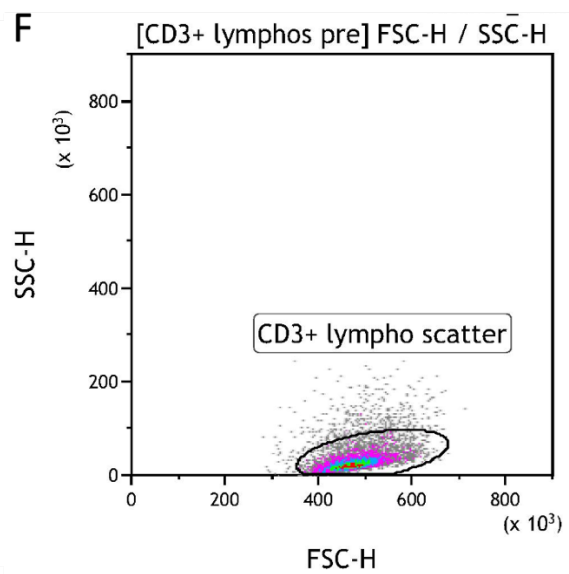
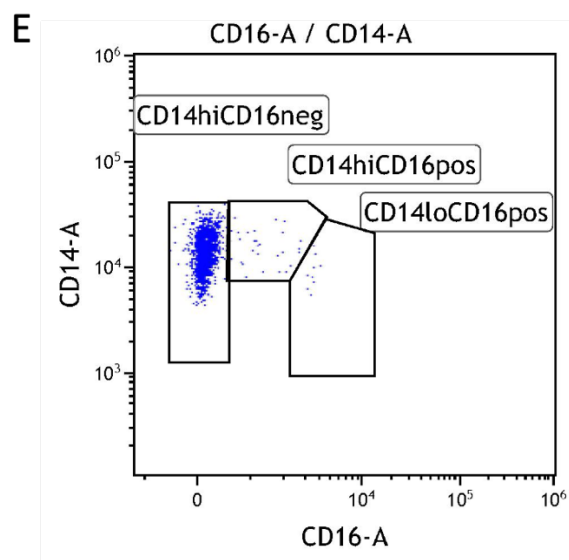
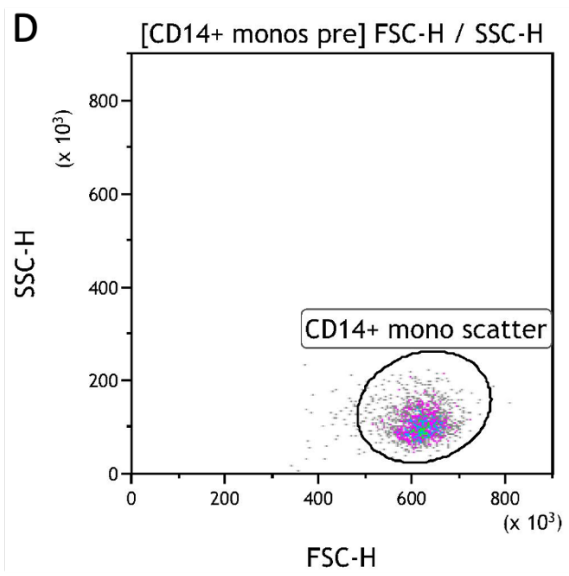
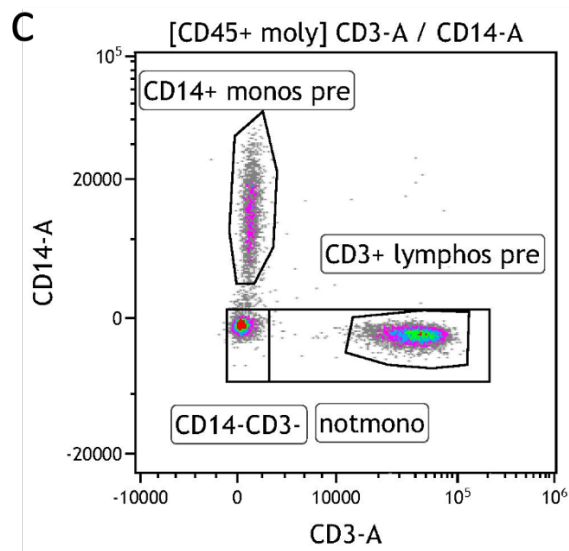
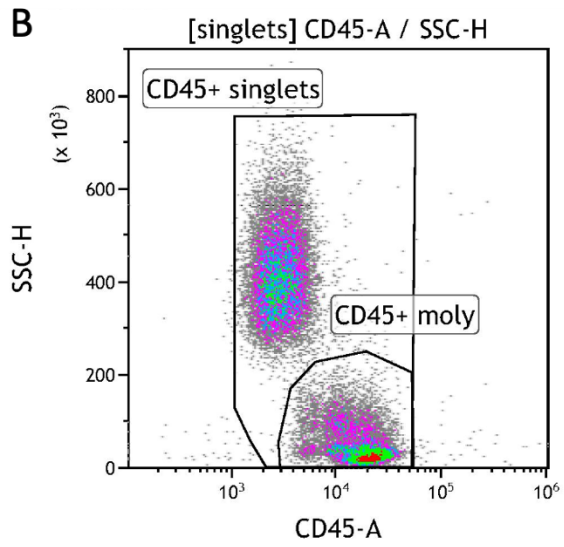
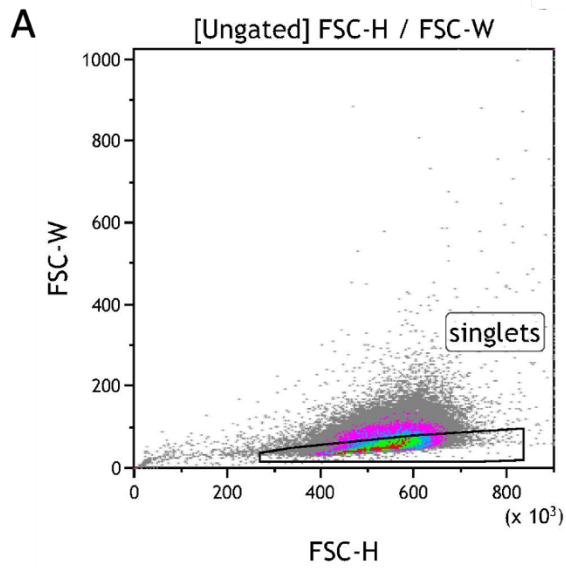
Innerhalb einer Stunde nach Abnahme aus der Vene und der zuvor beschriebenen Antikoagulation per Ethylendiamintetraessigsäure erfolgte die Mischung von 100 µL Blut mit 100 µL Mastermix. Der Mastermix wurde im Mischverhältnis 100 µL Durchflusszytometriefärbepuffer (BioLegend, San Diego, Vereinigte Staaten von Amerika) und jeweils 2 µL anti-human CD3-Alexa Fluor 488, CD4-Brilliant Violet 605, CD8-PE/Cyanine7, CD14-Pacific Blue, CD16-Brilliant Violet 510, CD19-PE/Dazzle 594, CD26-PE, CD41-Alexa Fluor 647 und CD45-Brilliant Violet 711 (alle von BioLegend, San Diego, Vereinigte Staaten von Amerika) am jeweiligen Tag angesetzt. Nach Durchmischen mittels Vortexmischer erfolgte die Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln über 30 Minuten. Anschließend wurden 800 µL 0,5%iges Paraformaldehyd in phosphatgepufferter Salzlösung (Sigma-Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika) zur Fixierung hinzugegeben und die Probe bei 4° Celsius im Dunkeln gelagert. Die Messung am Attune NxT Acoustic Focusing Cytometer (ThermoFisherScientific, Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika) erfolgte innerhalb von 3 Tagen. Zur Sicherstellung der longitudinalen Messvalidität wurden tägliche Performanztestungen mit Attune Performance tracking beads (ThermoFisherScientific, Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika) durchgeführt. Die Auswertung erfolgt per Kaluza Version 2.1 (Beckman Coulter, Brea, Vereinigte Staaten von Amerika).

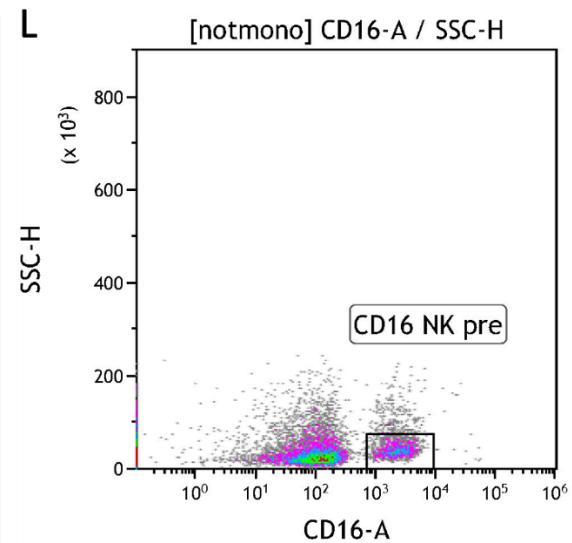
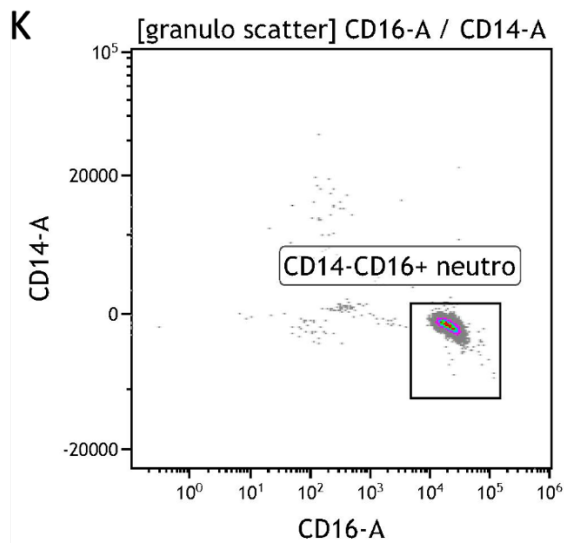
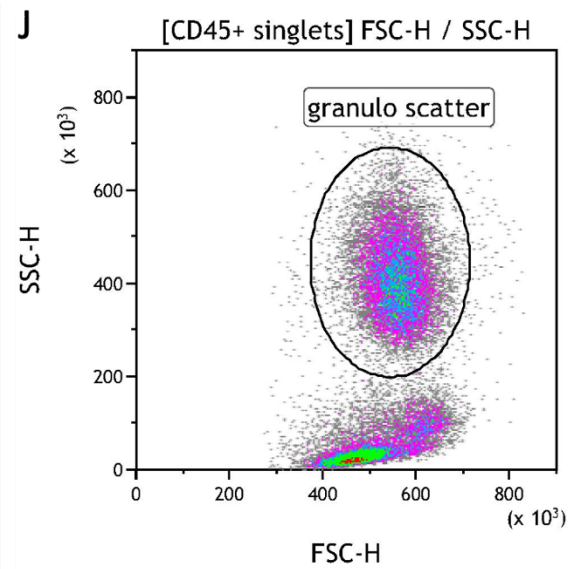
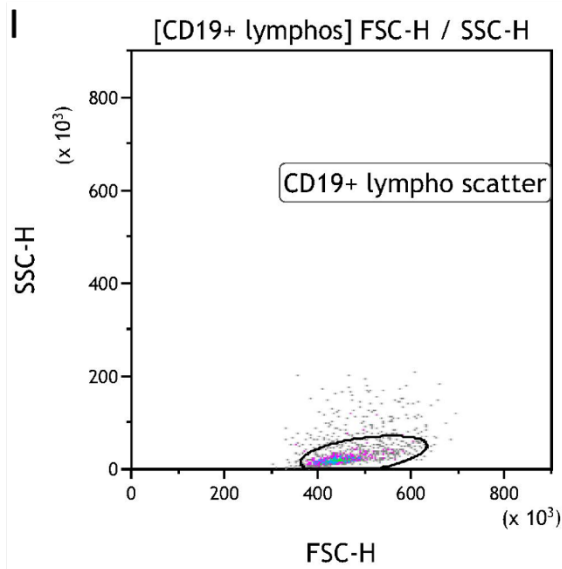
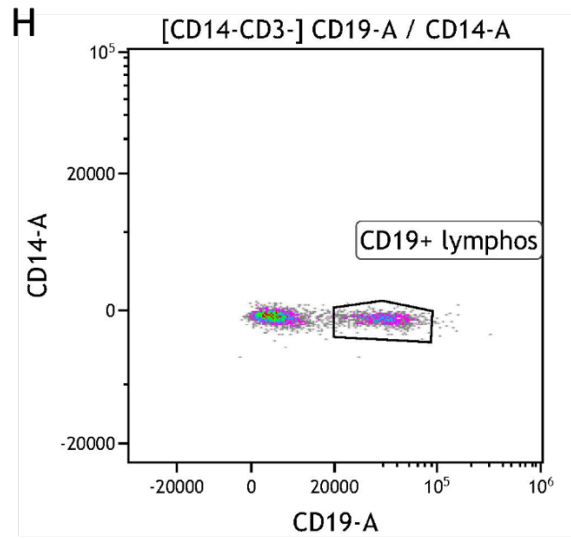
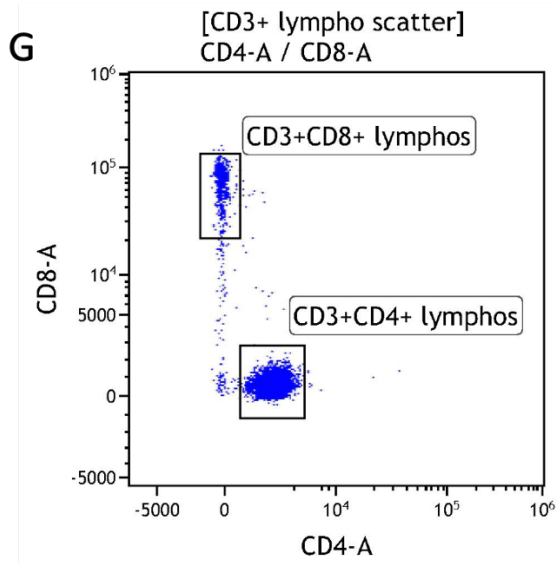
Einzelereignisse wurden zunächst über „Forward Scatter Height Forward Scatter Width Gating“ identifiziert (Abbildung 1A). Diese Population wurde durch Identifikation von

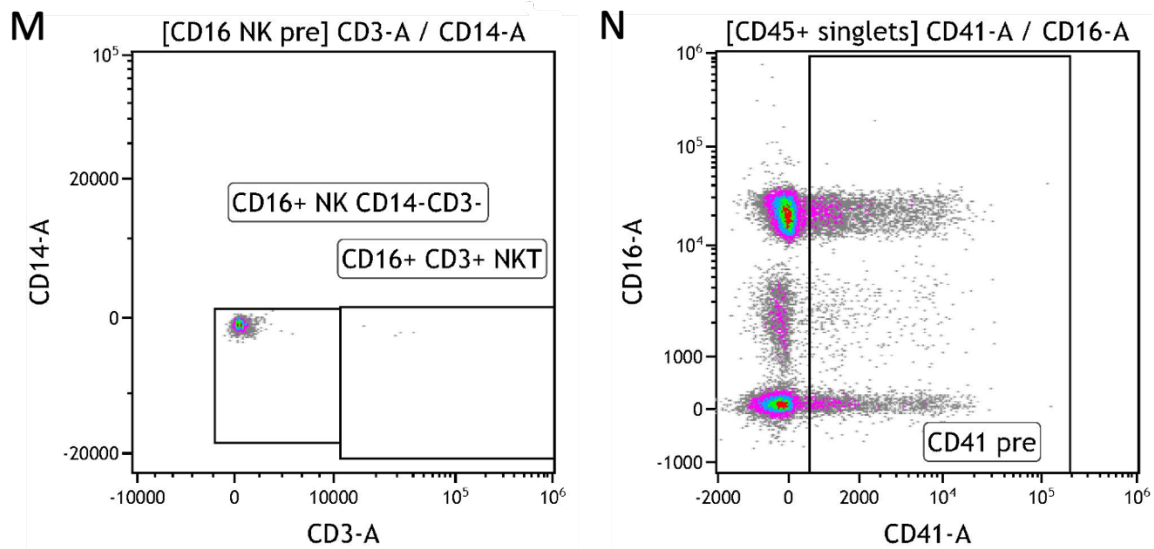
CD45 positiven Zellen aufgereinigt (Abbildung 1B). Anschließend wurden Monozyten anhand eines CD14 positiven Status und T-Zellen anhand eines CD3 positiven Status (T-Zell-Rezeptor) selektioniert. Ferner wurden CD14 und CD3 negative Zellen sowie nicht-Monozyten (CD14 negativ) identifiziert (Abbildung 1C). Präselektionierte Monozyten und Lymphozyten wurden anschließend per „Forward Scatter Height Sideward Scatter Height Gating“ aufgereinigt (Abbildung 1D/F). Anschließend wurden Monozyten-Subtypen definiert als CD14<sup>hi</sup>CD16<sup>neg</sup> = klassische Monozyten, CD14<sup>hi</sup>CD16<sup>pos</sup> = intermediäre Monozyten und CD14<sup>lo</sup>CD16<sup>neg</sup> = nicht-klassische Monozyten (Abbildung 1E). T-Zellen wurden in CD4 positive TH-Zellen und CD8 positive cytotoxische T-Zellen aufgeteilt (Abbildung 1G). CD14 und CD3 negative Zellen wurden nach CD19 Positivität (Abbildung 1H) und anschließender Aufreinigung per „Forward Scatter Height Sideward Scatter Height Gating“ als B-Zellen definiert (Abbildung 1I).

Neutrophile Granulozyten wurden durch „Forward Scatter Height Sideward Scatter Height Gating“ (Abbildung 1J) vorselektioniert und als CD16 positive Zellen definiert (Abbildung 1K). Aus den nicht-Monozyten wurden natürliche Killerzellen als CD16 positiv und CD3 negativ und natürliche Killer-T-Zellen als CD16 positiv und CD3 positiv definiert (Abbildung 1L/M).

Thrombozytenaggregate wurden als CD41 (Integrin  $\alpha$ -IIb) positive Ereignisse definiert (Abbildung 1N) (1).







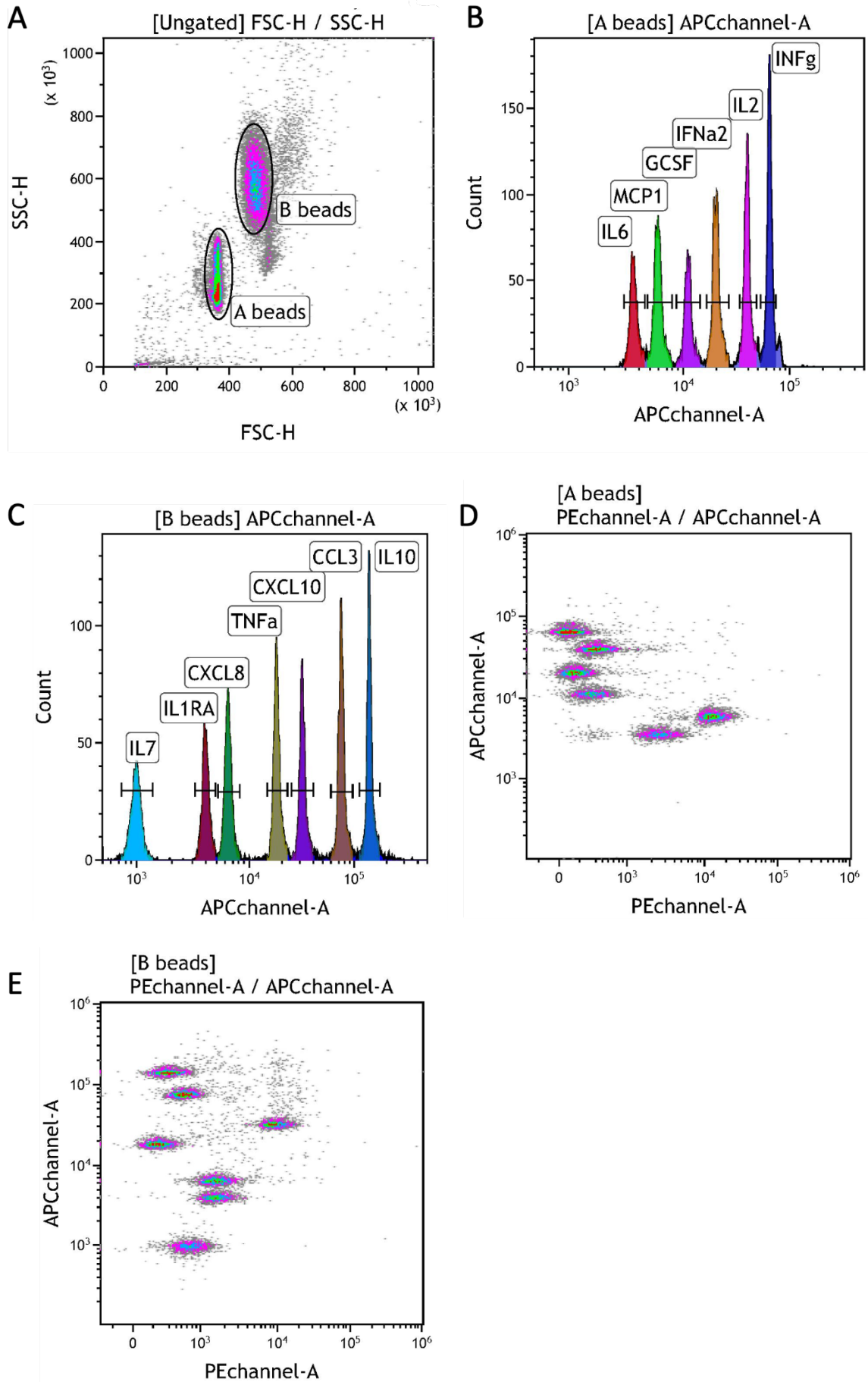
**Abbildung 1: Durchflusszytometrische Gating-Strategie Leukozyten-Subtyp-Panel, 1A)** Identifikation Einzelzellen (singlets) in FSC-H gegen FSC-W; 1B) Gating der singlets CD45 gegen SSC-H mit Präselektionierung CD45+ Einzelzellen (CD45+ singlets) und Vorselektion Monozyten/Lymphozyten (CD45+ moly); 1C) Gating CD45+ moly CD3 gegen CD14: Monozytenvorselektion CD14+CD3- (CD14+ monos pre), T-Zellen-Vorselektion CD3+CD14- (CD3+ lymphos pre), B-Zell-Vorselektion CD14-CD3- (CD14-CD3-) und Nichtmonozyten CD14-CD3+/- (notmono); 1D) Monozytenvorselektion Aufreinigung per FSC-H gegen SSC-H (CD14+ mono scatter); 1E) Identifikation Monozytensubtypen per Gating CD14+ mono scatter CD16 gegen CD14 als CD14hiCD16neg = klassische Monozyten, CD14hiCD16pos = intermediäre Monozyten und CD14loCD16neg = nicht-klassische Monozyten; 1F) T-Zellen-Vorselektion Aufreinigung per FSC-H gegen SSC-H (CD3+ lympho scatter); 1G) CD3+ lympho scatter CD4 gegen CD8 zur Identifikation T-Helferzellen (CD3+CD4+ lymphos) und cytotoxische T-Zellen (CD3+CD8+ lymphos); 1H) weitere Vorselektion B-Zellen als CD19+ aus CD14-CD3- (CD19+ lymphos); 1I) Aufreinigung B-Zellen per FSC-H gegen SSC-H; 1J) Vorselektion neutrophiler Granulozyten aus CD45+ singlets (granulo scatter); 1K) Identifikation neutrophiler Granulozyten als CD14-CD16+ (CD14-CD16 neutro); 1L) Vorselektion natürliche Killerzellen / natürliche Killer-T-Zellen aus notmono per CD16+ (CD16 NK pre); 1M) Aufteilung CD16 NK pre in natürliche Killerzellen als CD3- (CD16+ NK CD14-CD3-) und natürliche Killer-T-Zellen als CD3+ (CD16+CD3+ NKT); 1N) Definition Thrombozyten-Zell-Aggregate per CD41+ (CD41 pre); CD = Cluster of Differentiation, CDxx-A = Fläche unter der Kurve (Zeit gegen Fluoreszenzintensität), FSC-H = Forward Scatter Height, FSC-W= Forward Scatter Width, SSC-H = Sideward Scatter Height; Quellenangabe: eigene Abbildung als Auszug aus Kaluza Version 2.1 (Beckman Coulter, Brea, Vereinigte Staaten von Amerika)

## 2.5 Durchflusszytometrische Bead-basierte Multiplex-Zytokinbestimmung

Zur Bestimmung der Zytokinsignatur wurde ein durchflusszytometrisches Multiplex-Verfahren verwendet. Ähnlich dem Enzyme-linked Immunosorbent Assay bindet dabei ein Antikörper, der an einen per Größe und Fluoreszenz für den jeweiligen capture-Antikörper spezifischen Bead gekoppelt ist, das nachzuweisende Protein. Im Folgeschritt bindet ein weiterer fluoreszenzmarkierter Detektionsantikörper das jeweilige Protein, sodass im nachfolgenden Schritt durch die Messung der Fluoreszenzintensität die Menge der an den Bead gebundenen Proteine und damit über eine durch bekannte Konzentrationen generierte Eichkurve deren Konzentration in der Probe bestimmt werden kann.

Auf diese Weise wurden Plasmakonzentrationen von IL-1RA, IL-2, IL-6, IL-7, IL-10, Monocyte Chemotactic Protein 1 (MCP1), Chemokine (C-C motif) Ligand (CCL) 3, CXCL 8, CXCL10, Interferon (IFN)- $\alpha$ 2, IFN- $\gamma$ , Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (GCSF) und Tumornekrosefaktor (TNF)  $\alpha$  aus per Ethylendiamintetraessigsäure antikoaguliertem Blut bestimmt. Hierzu wurde das „COVID-19 Cytokine Storm Panel 1“ (BioLegend, San Diego, Vereinigte Staaten von Amerika) entsprechend der Herstellerangaben angewendet. Messung und Auswertung wurden am Attune NxT Acoustic Focusing Cytometer (ThermoFisherScientific, Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika) mithilfe von Kaluza 2.1 (Beckman Coulter, Brea, Vereinigte Staaten von Amerika) vorgenommen (1).

Bei genanntem Assay liegen zwei größendifferente Bead-Populationen vor, welche zunächst per „Forward Scatter Height Sideward Scatter Hight Gating“ identifiziert werden (Abbildung 2A). Anschließend werden über die unterschiedliche Beadfluoreszenz (Allophycocyanin Kanal) die jeweiligen Beadsubpopulationen unterteilt (Abbildung 2B/C). Die Detektionsantikörper sind an Phycoerythrin gebunden, dessen gebundene Antikörpermenge sich in Fluoreszenzintensität übersetzt. Somit entsteht für jedes zuvor spezifizierte Bead ein Messwert. Die entstandenen Populationen werden anschließend in ihrem Median betrachtet, um den Effekt von Ausreißern zu mindern (Abbildung 2D/E).



**Abbildung 2: Durchflusszytometrische Gating-Strategie Multiplex-Zytokinmessungen, 1A)**

Vorselektion der Beads in A beads und B beads anhand von FSC-H und SSC-H; 1B) Identifikation der Beadsubpopulationen in A beads anhand Fluoreszenz in APCchannel-A (Allophycocyanin Kanal); 1C) Identifikation der Beadsubpopulationen in B beads anhand Fluoreszenz in APCchannel-A; 1D/E) Fluoreszenz PEchannel-A (Phycoerythrin Kanal) gegen APCchannel-A der jeweiligen Beadsubpopulationen wobei der Median von PEchannel-A dem jeweiligen Messwert des Zytokins entspricht; CCL = Chemokine (C-C motif) Ligand, CXCL = Chemokine (C-X-C Motif) Ligand, FSC-H = Forward Scatter Height, GCSF = Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor, IL = Interleukin, MCP1 = monocyte chemotactic protein 1, IL1RA = Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist, INF $\alpha$ 2 = Interferon  $\alpha$ 2, INF $\gamma$  = Interferon  $\gamma$ , SSC-H = Sideward Scatter Height, TNF $\alpha$  = Tumornekrosefaktor  $\alpha$ , Quellenangabe: eigene Abbildung als Auszug aus Kaluza Version 2.1 (Beckman Coulter, Brea, Vereinigte Staaten von Amerika)

Entstandene Messwerte wurden anhand von Messwerten bekannter Konzentrationen extrapoliert durch Einsatz einer Eichkurve („Sigmoidal, 4PL, X is concentration“, eine per 4 Punkte definierten, nicht-linearen Regression) und unter Zuhilfenahme von GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Boston, Vereinigte Staaten von Amerika).

**2.6 Enzyme-linked Immunosorbent Assay**

Die Konzentration von Thrombin-Antithrombin Komplexen in per Citrat antikoaguliertem Blutplasma wurde per Enzyme-linked Immunosorbent Assay (AssayPro, St. Charles, Vereinigte Staaten von Amerika) entsprechend der Herstellerangaben an einem Tecan Infinite 200Pro Plattenleser (Tecan Group, Maennedorf, Switzerland) gemessen (1). Hierbei handelt es sich um einen Sandwich-Enzyme-linked Immunosorbent Assay mit „precoated Wells“. Im ersten Schritt bindet das nachzuweisende Antigen an den im Well fixierten Antikörper (Capture Antikörper), wobei nach erfolgtem Waschen der Biotin-gebundene Detektionsantikörper das Protein an anderer Stelle bindet. Anschließend wird nach abermaligem Waschen Streptavidin-Peroxidase hinzugegeben, wobei das Streptavidin Biotin bindet und die Peroxidase den nachfolgenden Schritt katalysieren kann. Nach erneutem Waschen (und somit Entfernen nicht gebundener Streptavidin-Peroxidase) wird 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin hinzugegeben, das unter Abgabe von Protonen durch das per Peroxidase erzeugte Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) zu 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine-Diimine (bläuliche Farbe) oxidiert wird. Nach einer definierten Zeit (hier 10 Minuten) wird die Reaktion per in diesem Fall 0,5 molarer Salzsäure (klassischerweise aber eher Schwefelsäure) abgestoppt (gelblicher Farbumschlag). Anschließend kann die Extinktion an einem



Plattenlesegerät bei einer bestimmten Wellenlänge, in diesem Fall 450nm mit einer Bandbreite von 9nm bei 25 Blitzen, gemessen werden (Durchschnittswert). Entstandene Messwerte wurden anhand von Messwerten bekannter Konzentrationen extrapoliert wie unter 2.5 beschrieben (1, 76).

## 2.7 Statistik

Allen hier präsentierten statistischen Tests liegen zweiseitiges Testen und eine Signifikanzschwelle von  $p < 0,05$  zu Grunde. Der Mann-Whitney U Test oder exakter Chi-Quadrat Test wurden zum Gruppenvergleich genutzt. Spearman Korrelationen als nicht-parametrisches Verfahren wurden berechnet. Im Netzwerk wurden nur Korrelationen mit  $p < 0,05$  und  $r > 0,3$  oder  $r < -0,3$  dargestellt. Die Berechnung der Statistiken erfolgte in SPSS Statistics Version 27 (IBM, Armonk, NY, USA) und per R Version 4.1.0 (R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich) auf Windows und macOS als Betriebssystem. Graphen und Netzwerke wurden per R in R Studio Version 1.3.1093 (RStudio PBC, Boston, Vereinigte Staaten von Amerika) erstellt (1).

### 3 Ergebnisse

Die Ergebnisse der Studie wurden in der Fachzeitschrift „Frontiers in Immunology“ im Jahr 2022 publiziert (1).

#### 3.1 Charakteristika der Patient\*innen

Tabelle 2, 3, 4 und 5 stellen wesentliche klinische Charakteristika der Studienteilnehmenden dar.

**Tabelle 2:** Demografie und Vitalparameter bei Einschluss für die Gruppe SARS-CoV2 negativer und positiver Patient\*innen; Angaben als Median und Quartilen beziehungsweise als absolute Zahl und prozentualer Anteil der Gruppe; statistischer Gruppenvergleich mittels Mann-Whitney U oder Chi-Quadrat-Test

**Tabelle 2: Charakteristika der Patient\*innen - Demographie und Vitalparameter**

	SARS-CoV2 negativ (n=37)	SARS-CoV2 positiv (n=50)	Mann-Whitney U oder Chi-Quadrat-Test
Alter [vollendete Lebensjahre]	73 [58; 81]	69 [54,8; 76,5]	0,078
Männliches Geschlecht [absolut und Prozent der Gruppe]	21 (56,8%)	35 (70%)	0,259
Body Mass Index [kg/m <sup>2</sup> ]	25.1 [23,2; 29,3]	28.7 [24,7; 76,5]	0,103
Fälle auf Intensivstation [absolut und Prozent der Gruppe]	8 (21,6%)	20 (40%)	0,104
Atemfrequenz [pro Minute]	18 [16,25; 19]	18.7 [18; 21,3]	0,078
Herzfrequenz [pro Minute]	77 [70; 88,5]	81.5 [72,8; 94,8]	0,259
Systolischer Blutdruck [mmHg]	131 [116; 149,5]	123.5 [110; 140]	0,103
Diastolischer Blutdruck [mmHg]	75 [66; 85,5]	70 [60; 80]	0,141

SARS-CoV2 = severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2; Quellenangabe: (1)

Ein größerer Anteil der Patient\*innen in der Gruppe COV<sub>neg</sub> verglichen mit der Gruppe COV<sub>pos</sub> war an einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung erkrankt (Tabelle 3) (1).

**Tabelle 3:** Bekannte Diagnosen bei Einschluss in der Gruppe SARS-CoV2 negativer und positiver Patient\*innen; Angaben als absolute Zahl und prozentualer Anteil der Gruppe; statistischer Gruppenvergleich mittels Chi-Quadrat-Test

**Tabelle 3: Charakteristika der Patient\*innen - bekannte Diagnosen**

	SARS-CoV2 negativ (n=37)	SARS-CoV2 positiv (n=50)	Chi-Quadrat-Test
Koronare Herzkrankheit [absolut und Prozent der Gruppe]	12 (32,4%)	28 (14%)	0,065
Arterielle Hypertonie [absolut und Prozent der Gruppe]	25 (67,6%)	31 (62%)	0,655
Diabetes mellitus [absolut und Prozent der Gruppe]	18 (48,6%)	29 (58%)	0,632
Dyslipidämie [absolut und Prozent der Gruppe]	11 (29,7%)	14 (28%)	1
Chronisch obstruktive Lungenerkrankung [absolut und Prozent der Gruppe]	13 (35,1%)	3 (6%)	0,001

SARS-CoV2 = severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2; Quellenangabe: modifiziert nach Jakobs et al., 2022 (1)

Mit Blick auf die Antikoagulation fällt auf, dass mehr Erkrankte in der Gruppe COV<sub>pos</sub> verglichen mit denen der Gruppe COV<sub>neg</sub> eine intermediäre Antikoagulationsdosis erhielten. Andererseits erhielten weniger Patient\*innen der Gruppe COV<sub>pos</sub> eine prophylaktische Dosis. Definiert wurde eine prophylaktische beziehungsweise therapeutische Dosierung gemäß der Fachinformation sowie eine intermediäre Dosierung als dazwischenliegend. In der Gruppe COV<sub>pos</sub> erhielten mehr Erkrankte Glukokortikoide, wobei andere COVID-19-spezifischen Therapien vor dem Hintergrund des Rekrutierungszeitraums selten waren. Der Anteil der Fälle, die inhalative Bronchodilatoren einnahmen, war höher in der Gruppe COV<sub>pos</sub> (Tabelle 4). Kein\*e Patient\*in erhielt Rekonvaleszenzplasma, monoklonale Antikörper oder war gegen SARS-CoV2 geimpft (1).

**Tabelle 4:** Medikation bei Einschluss der Gruppe SARS-CoV2 negativer und positiver Patient\*innen; Angaben als prozentualer Anteil der Gruppe; statistischer Gruppenvergleich mittels Chi-Quadrat-Test

**Tabelle 4: Charakteristika der Patient\*innen - Medikation**

	SARS-CoV2 negativ (n=37)	SARS-CoV2 positiv (n=50)	Chi-Quadrat-Test
Acetylsalicylsäure [absolut und Prozent der Gruppe]	12 (32,4%)	18 (36%)	0,821
Clopidogrel [absolut und Prozent der Gruppe]	0 (0%)	2 (4%)	0,505
Prophylaktische Antikoagulation [absolut und Prozent der Gruppe]	21 (56,8%)	12 (24%)	0,003
Intermediäre Antikoagulation [absolut und Prozent der Gruppe]	3 (8,1%)	16 (32%)	0,009
Therapeutische Antikoagulation [absolut und Prozent der Gruppe]	13 (35,1%)	22 (44%)	0,51
Statine [absolut und Prozent der Gruppe]	9 (24,3%)	12 (24%)	1
Angiotensinkonversionsenzym-Hemmer [absolut und Prozent der Gruppe]	13 (35,1%)	12 (24%)	0,339
Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1-Antagonisten [absolut und Prozent der Gruppe]	6 (16,2%)	11 (22%)	0,591
Betablocker [absolut und Prozent der Gruppe]	17 (45,9%)	14 (28%)	0,113
Mineralkortikoid-Rezeptorantagonist [absolut und Prozent der Gruppe]	5 (13,5%)	3 (6%)	0,277
Diuretika [absolut und Prozent der Gruppe]	18 (48,6%)	19 (38%)	0,383
Oral Glukokortikoide [absolut und Prozent der Gruppe]	7 (18,9%)	28 (56%)	0,001
Remdesivir [absolut und Prozent der Gruppe]	0 (0%)	1 (2%)	1
Tocilizumab [absolut und Prozent der Gruppe]	0 (0%)	1 (2%)	1
Inhalative Bronchodilatoren [absolut und Prozent der Gruppe]	22 (59,5%)	42 (84%)	0,014

SARS-CoV2 = severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2; Quellenangabe: modifiziert nach Jakobs et al., 2022 (1)

Es verstarben 10 der 50 an COVID-19 erkrankten Patient\*innen, aber kein\*e Patient\*in in der SARS-CoV2-negativen Gruppe ( $p=0,004$ ).

Relevante klinische Laborwerte sind in Tabelle 5 dargestellt. Diese unterschieden sich nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen. Weniger als 150 Thrombozyten/nL wiesen vier Patient\*innen in der Gruppe COV<sub>pos</sub> und zwei Patient\*innen in der Gruppe COV<sub>neg</sub> auf (p=0,223) (1).

**Tabelle 5:** Routinelaborwerte bei Einschluss der Gruppe SARS-CoV2 positiver und negativer Patient\*innen; Angaben als Median und Quartilen; statistischer Gruppenvergleich mittels Mann-Whitney U Test

**Tabelle 5: Charakteristika der Patient\*innen - Routinelaborwerte**

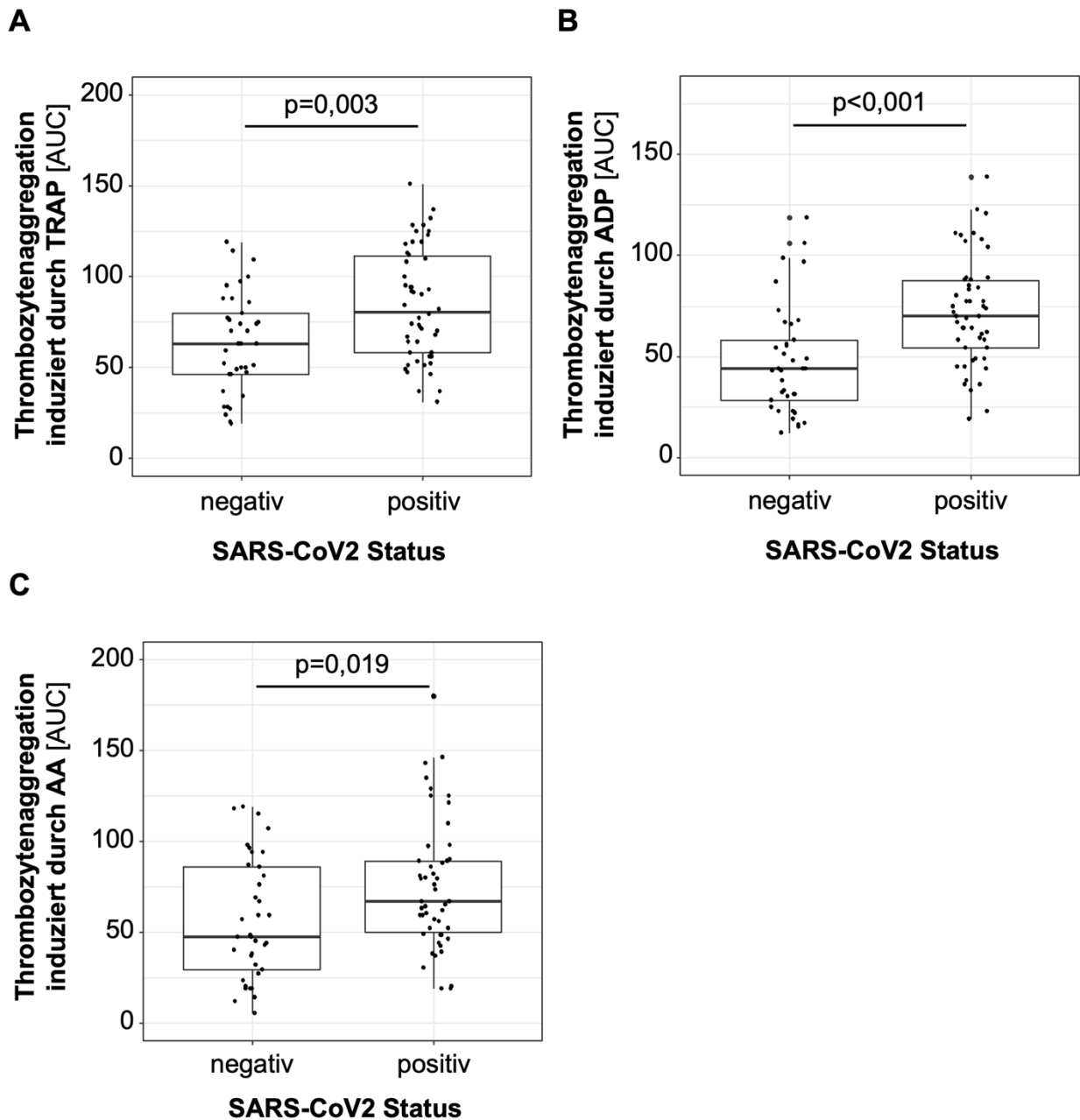
	SARS-CoV2 negativ (n=37)	SARS-CoV2 positiv (n=50)	Mann-Whitney U Test
Kreatinin [mg/dL]	0,94 [0,79; 1,3]	0,90 [0,66; 1,16]	0,354
Harnstoff [mg/dL]	34 [24,5; 52,5]	48 [27,3; 64,5]	0,164
N-terminales pro-B-type natriuretic peptide [ng/L]	468 [251; 2318]	498 [125; 1834]	0,499
C-reaktives Protein [mg/dL]	62,1 [37,7; 103,5]	69,8 [18,9; 126,9]	0,880
Hämoglobin [g/dL]	11,7 [10,1; 13,4]	10,9 [9,3; 12,4]	0,140
Leukozyten [n/nL]	9,3 [6,7; 11,8]	8,5 [6,8; 12,6]	0,837
Lymphozyten [n/nL]	1,22 [0,87; 1,96]	1,06 [0,74; 1,50]	0,214
Lymphozyten [Prozent der Leukozyten]	12 [9,7; 23,2]	13,2 [8; 18,1]	0,508
Thrombozyten [n/pL]	279 [209; 321]	300,5 [247; 397]	0,057
Mittleres Thrombozytenvolumen [fL]	10,3 [9,7; 10,9]	10,4 [9,8; 11,6]	0,269
International Normalized Ratio	1,07 [1,00; 1,25]	1,12 [1,05; 1,21]	0,307
Partielle Thromboplastinzeit [s]	36,4 [31,4; 43,3]	38,8 [32,8; 47,5]	0,435

SARS-CoV2 = severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2; Quellenangabe: modifiziert nach Jakobs et al., 2022 (1)

### 3.2 Thrombozytenreaktivität und Krankheitsschwere

Die per Impedanzaggregometrie (Multiplate®) erfasste TRAP- ADP- und AA-induzierte Thrombozytenaggregation war jeweils in der Gruppe COV<sub>pos</sub> größer als in der Gruppe COV<sub>neg</sub> (Abbildung 3). Die Anteile der Teilnehmenden, die ASS und Clopidogrel einnahmen, unterschieden sich nicht signifikant zwischen beiden Gruppen (Tabelle 4). Auch waren die Thrombozytenzahl pro pL Vollblut und das mittlere Thrombozytenvolumen nicht signifikant unterschiedlich (Tabelle 5). Beim Vergleich der Gruppe COV<sub>Überlebende</sub> mit der Gruppe COV<sub>Verstorbene</sub> (innerhalb der Gruppe COV<sub>pos</sub>) ergaben sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Agonisten-induzierte Thrombozytenaggregation: TRAP (75,5U [58; 107,5] versus 99U [54,75; 121,25], p=0,369), ADP (70U [54;

83,75] versus 76,5U [42,75; 108],  $p=0,645$ ), AA (67U [49,75; 87,5] versus 76,5U [45,5; 133,25],  $p=0,489$ ) (1).

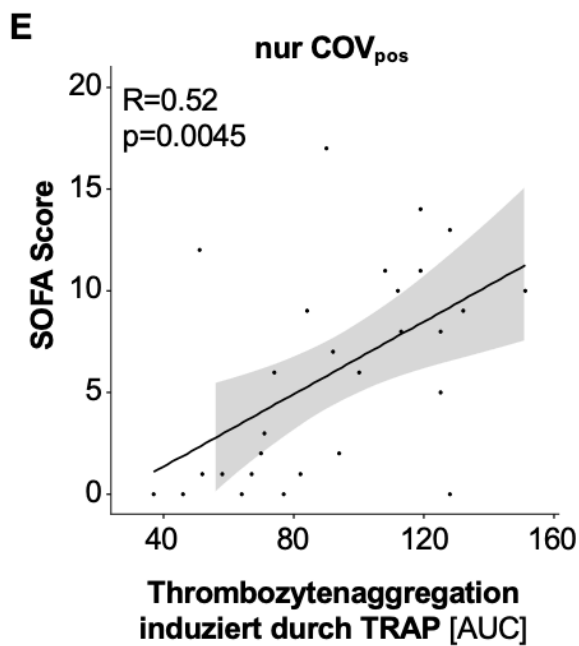
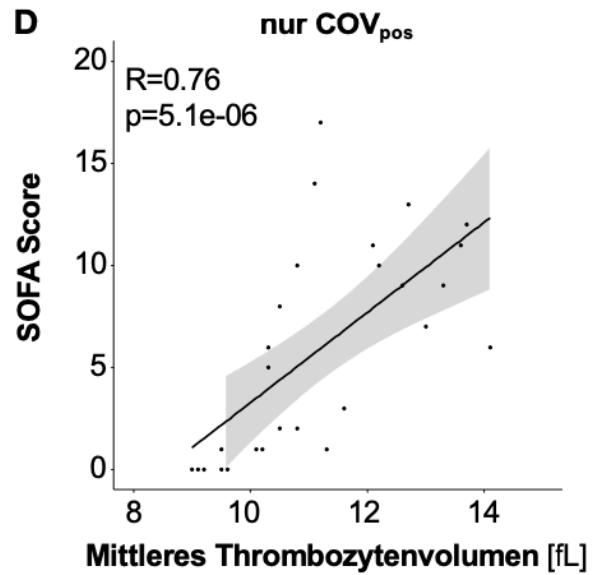
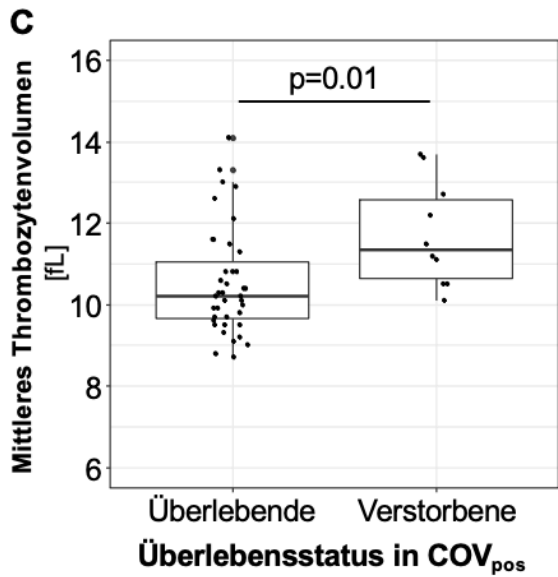
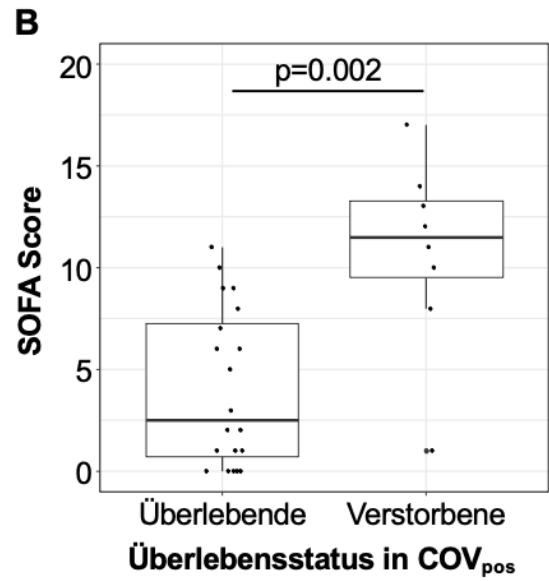
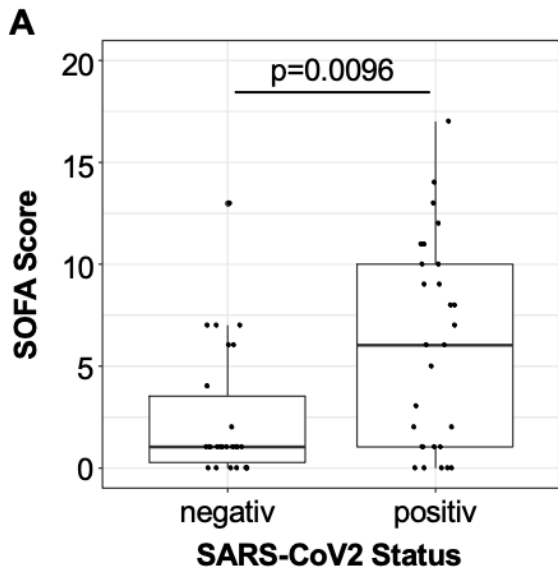


**Abbildung 3: Impedanzaggregometrie:** Thrombozytenaggregation induziert durch A) Thrombinrezeptor-aktivierendes Peptid 6 (TRAP), B) Adenosindiphosphat (ADP) und C) Arachidonsäure (AA) im Vergleich SARS-CoV2-positiver ( $n=50$ ) mit SARS-CoV2-negativen ( $n=37$ ) Patient\*innen. Gruppenvergleich per Mann-Whitney U Test, AUC = Fläche unter der Kurve in Multiplate®-spezifischen Einheiten, SARS-CoV2 = severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2, Quellenangabe: modifiziert nach Jakobs et al., 2022 (1)

Der SOFA Score ergab höhere Werte für SARS-CoV2 positive Patient\*innen verglichen mit SARS-CoV2 negativen Patient\*innen und wiederum höhere innerhalb der Gruppe COV<sub>pos</sub>, bei verstorbenen gegenüber überlebenden Patient\*innen (Abbildung 4A/B). In der Gruppe COV<sub>Überlebende</sub> und der Gruppe COV<sub>Verstorbene</sub> waren Thrombozytenzahlen vergleichbar (300,5/nL [253,75; 396,5] versus 306,5/nL [211,75; 470,5], p=0,884). In der Kohorte COV<sub>Verstorbene</sub> war das mittlere Thrombozytenvolumen als indirekter Aktivierbarkeitsmarker größer als in der Kohorte COV<sub>Überlebende</sub> (10,2fL [9,6; 11,3] versus 11,35fL [10,5; 12,9], p=0,009) (Abbildung 4C).

Die TRAP-induzierte Thrombozytenaggregation sowie MPV korrelierten positiv mit den Werten des SOFA Scores innerhalb der Gruppe COV<sub>pos</sub> (Abbildung 4D/E).

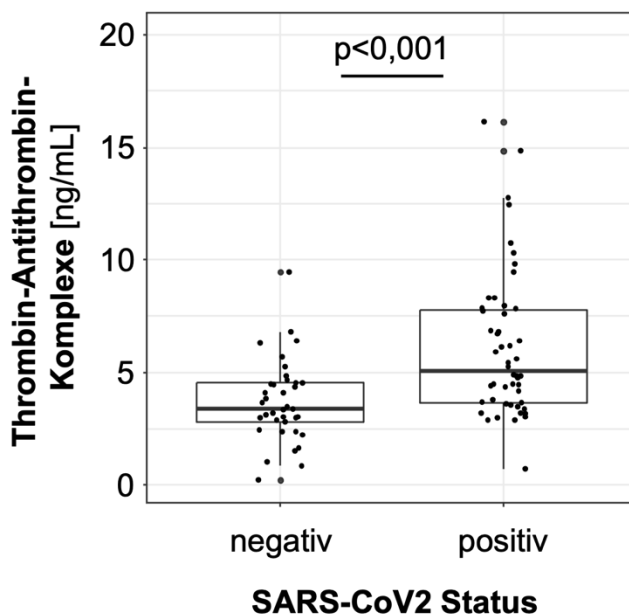
In der Gruppe COV<sub>neg</sub> hingegen fand sich keine signifikante Korrelation zwischen SOFA Score und Agonist-induzierter Thrombozytenaggregation (TRAP: r=0,142, p=0,490; ADP r=-0,167, p=0,414; AA r=-0,002, p=0,993) (1).





**Abbildung 4: Thrombozytenreaktivitätsmarker und Krankheitsschwere:** A) SOFA Score für SARS-CoV2 positive (n=33) verglichen mit negativen (n=21) Patient\*innen; B) SOFA Score innerhalb der SARS-CoV2 positiven Patient\*innen Verstorbene (n=10) gegenüber Überlebenden (n=23); C) mittleres Thrombozytenvolumen innerhalb der Gruppe COV<sub>pos</sub> Verstorbene (n=10) gegenüber Überlebenden (n=40); D) innerhalb der Gruppe COV<sub>pos</sub> Korrelation zwischen SOFA Score und mittlerem Thrombozytenvolumen; E) innerhalb der Gruppe COV<sub>pos</sub> Korrelation zwischen SOFA Score und TRAP-induzierter Thrombozytenaggregation; statistischer Gruppenvergleich mittels Mann-Whitney U Test, Korrelationen mittels Spearman; AUC = Fläche unter der Kurve in Multiplate®-spezifischen Einheiten, COV<sub>pos</sub> = Kohorte der SARS-CoV2 positiven Patienten, SARS-CoV2 = severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2, SOFA Score = Sequential Organ Failure Assessment Score, TRAP = Thrombinrezeptor-Aktivator-Peptid 6; Quellenangabe: modifiziert nach Jakobs et al., 2022 (1)

Thrombin-Antithrombin-Komplexe stellen einen Marker für die Aktivierung des Gerinnungssystems, genauer gesagt der Endstrecke der Gerinnungskaskade, dar (77). Die Werte der Gruppe COV<sub>pos</sub> waren höher als in der Gruppe COV<sub>neg</sub> (Abbildung 5) (1).



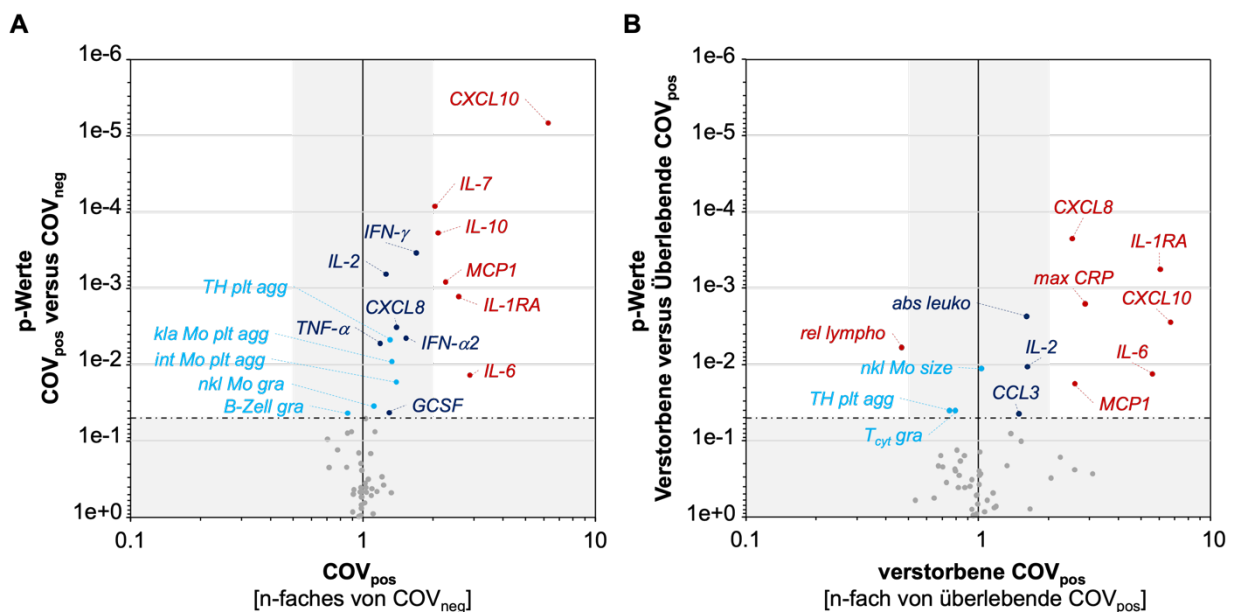
**Abbildung 5: Thrombin-Antithrombin Komplexe:** Thrombin-Antithrombin Komplexe bei SARS-CoV2-positiven (n=50) verglichen mit der Kontrollgruppe SARS-CoV2-negativer (n=37) Patient\*innen. Gruppenvergleich mittels Mann-Whitney U Test, SARS-CoV2 = severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2, Quellenangabe: modifiziert nach Jakobs et al., 2022 (1)

### 3.3 Inflammatorische Charakteristika und Outcome

In der Kohorte  $COV_{pos}$  waren im Vergleich zu der Kohorte  $COV_{neg}$  die Zytokine IL-6, IL-7, IL-10, IL-1RA, MCP1 und CXCL10 signifikant und mindestens zweifach erhöht. Weniger als zweifach, aber ebenfalls signifikant erhöht waren in diesem Gruppenvergleich die inflammatorischen Marker IL-2, CXCL8, IFN- $\alpha$ 2, IFN- $\gamma$ , GCSF1 und TNF- $\alpha$  (Abbildung 6A). Innerhalb der Gruppe  $COV_{pos}$  wies die Gruppe der Verstorbenen gegenüber der der Überlebenden mindestens zweifach erhöhte IL-6, IL-1-RA, MCP1, CXCL8 und CXCL10 Zytokinwerte auf. Der maximale CRP-Wert im jeweiligen Krankenhausaufenthalt war in diesem Gruppenvergleich ebenfalls um das Zweifache gesteigert. Ferner konnten höhere Konzentrationen für die Marker IL-2 und CCL-2 nachgewiesen werden (Abbildung 6B).

In der Gruppe  $COV_{pos}$  verglichen mit der Gruppe  $COV_{neg}$  waren ein größerer prozentualer Anteil der TH-Zellen, der klassischen Monozyten und der intermediären Monozyten an Thrombozyten gebunden. Die Granularität der nicht-klassischen Monozyten der SARS-CoV2-positiven Patient\*innen war höher, die Granularität der B-Zellen dagegen niedriger als bei SARS-CoV2-negativen Patient\*innen (Abbildung 6A).

In der Subgruppe  $COV_{Verstorbene}$  wurden absolut mehr Leukozyten und anteilig an den Leukozyten weniger Lymphozyten verglichen mit COVID-19 Überlebenden nachgewiesen. Ferner waren im gleichen Gruppenvergleich bei Verstorbenen größere nicht-klassische Monozyten und weniger TH-Zell-Thrombozytenaggregate nachgewiesen worden (Abbildung 6B) (1).



**Abbildung 6: Zytokine und Leukozyten-Subtyp-Panel:** Zytokine und Messwerte des Leukozyten-Subtyp-Panels als Vulcano-Plots im Vergleich der Gruppe COV<sub>pos</sub> gegenüber der Gruppe COV<sub>neg</sub> (A) sowie innerhalb der Gruppe COV<sub>pos</sub> Überlebende gegenüber Verstorbenen (B); Zell-Aggregate als prozentualer Anteil des jeweiligen Zelltyps; in rot sind mindestens zweifach veränderte Messwerte, in hellblau durchflusszytometrische Parameter und in dunkelblau alle restlichen signifikant veränderten Werte dargestellt; Cut-off für  $p=0,05$  als horizontale, gepunktete Linie und kleiner als zweifache Veränderung als mittlerer grauer Bereich; Gruppenvergleich mittels Mann-Whitney U Test; abs leuko = absolute Leukozytenzahl, B cell gra = B-Zell Granularität, CCL = Chemokine (C-C motif) Ligand, COV<sub>pos</sub> = SARS-CoV2 positive Kohorte, COV<sub>neg</sub> = SARS-CoV2 negative Kohorte, CXCL = Chemokine (C-X-C Motif) Ligand, GCSF = Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor, IL = Interleukin, IL-1RA = Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist, IFN = Interferon, int Mo plt agg = intermediäre Monozyten-Thrombozyten-Aggregate, kla Mo plt agg = klassische Monozyten-Thrombozyten-Aggregate, max CRP = maximales C-reaktives Protein im Aufenthalt, MCP1 = monocyte chemotactic protein 1, nkl Mo gra = nicht-klassische Monozyten Granularität, nkl Mo Größe = nicht-klassische Monozyten Größe, rel lympho = relativer Anteil der Lymphozyten an den Leukozyten, SARS-CoV2 = severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2, Tcyt gra = cytotoxische T-Zell Granularität, TNF = Tumornekrosefaktor, TH plt agg = T-Helferzell-Thrombozyten-Aggregate, Quellenangabe: modifiziert nach Jakobs et al., 2022 (1)

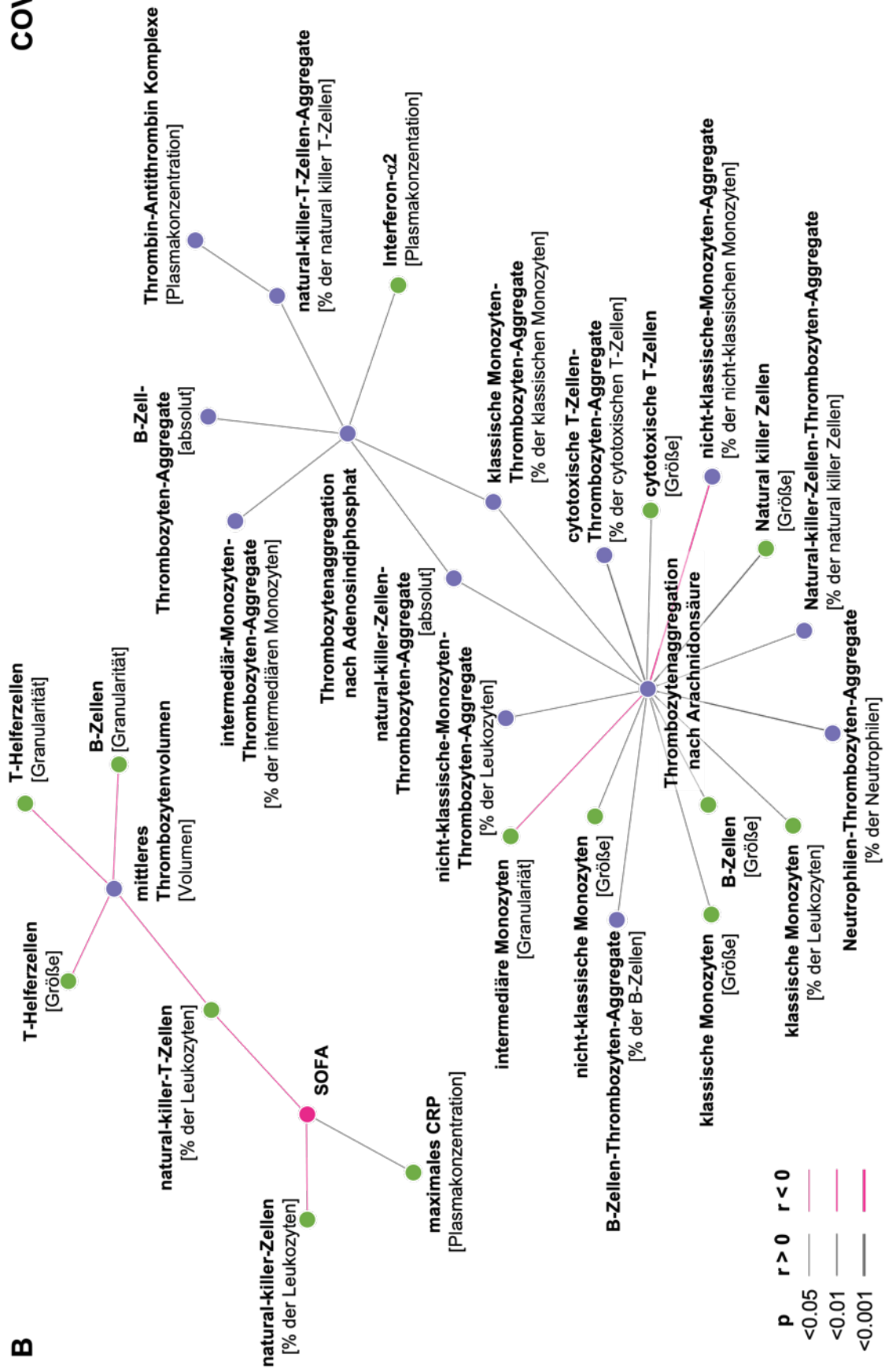
### 3.4 Korrelationen nach SARS-CoV2-Status: SOFA Score, Marker der Thrombozytenreaktivität und Zytokine

Abhängig vom SARS-CoV2-Status wurden die Korrelationen in Netzwerken dargestellt für alle erfassten Marker der Thrombozytenreaktivität und Inflammation sowie den SOFA Score (Cut-Offs:  $p<0,05$ ,  $r>0,3$ ,  $r<-0,3$ ). In der Kohorte COV<sub>pos</sub> korrelierten SOFA Score Werte mit dem CRP, dem maximalen CRP während des Krankenhausaufenthalts, der Leukozytenzahl, dem MPV und der TRAP-induzierten Thrombozytenaggregation. Das maximale CRP während des jeweiligen Krankenhausaufenthalts war positiv mit der AA- und TRAP-induzierten Plättchenaggregation korreliert. Auch IL-6 korrelierte mit dem MPV sowie mit der AA- beziehungsweise TRAP-induzierten Thrombozytenaggregation. Hervorzuheben ist, dass Werte des SOFA Scores mit keinem der Thrombozytenreaktivitätsmarker in der Gruppe COV<sub>neg</sub> korrelierten. In beiden Kohorten bestanden ferner positive Korrelationen zwischen B-Zell-Thrombozyten-Aggregaten beziehungsweise natürlichen-Killerzell-Thrombozyten-Aggregaten und der ADP- beziehungsweise AA-induzierten Thrombozytenaggregation (Abbildung 7) (1).



COV<sub>neg</sub>

B



**Abbildung 7: Korrelationen Gerinnungsparameter, Entzündungsparameter und SOFA Score** Korrelationen (Cut-Offs:  $p < 0,05$ ,  $r > 0,3$ ,  $r < -0,3$ ), dargestellt in der Kohorte SARS-CoV2 positiver Patient\*innen (COV<sub>pos</sub>; A) sowie in der Kohorte SARS-CoV2 negativer Patient\*innen (COV<sub>neg</sub>; B); CRP = C-reaktives Protein, CXCL = Chemokine (C-X-C Motif) Ligand, IL = Interleukin, IL-1RA = Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist, MCP1 = monocyte chemotactic protein 1, SARS-CoV2 = severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2, SOFA Score = Sequential Organ Failure Assessment Score, Quellenangabe: modifiziert nach Jakobs et al., 2022 (1)

Das Ausmaß der Korrelationen zwischen Markern der Thrombozytenreaktivität und Inflammation war bei Patient\*innen mit COVID-19 ausgeprägter als bei SARS-CoV2-negativen Patient\*innen. Gleiches gilt für die Korrelationen zwischen dem SOFA Score als Marker für die Krankheitsschwere und den Markern der Inflammation sowie Thrombozytenreaktivität (1).

## 4 Diskussion

### 4.1 Zentrale Ergebnisse dieser Studie

Zusammenfassend hat diese Studie folgende Hauptergebnisse erbracht:

1. An COVID-19 erkrankte Patient\*innen wiesen eine signifikant stärkere Agonisten-induzierte Thrombozytenaggregation als infektiologisch-pulmonal erkrankte Patient\*innen ohne SARS-CoV2-Nachweis auf.
2. Das MPV als ein Marker für eine gesteigerte Thrombozytenreaktivität sowie die TRAP-induzierte Thrombozytenaggregation waren mit der Krankheitsschwere assoziiert.
3. Die Thrombozyten von Patient\*innen mit COVID-19 formten mehr Aggregate mit TH-Lymphozyten sowie klassischen und intermediären Monozyten als die Thrombozyten von infektiologisch-pulmonal erkrankten Patient\*innen ohne SARS-CoV2-Nachweis.
4. Nur bei Patient\*innen mit COVID-19, nicht aber mit anderen akuten infektiologischen Lungenerkrankungen, korrelierten Marker der Thrombozytenreaktivität und Zytokine mit dem Schweregrad der pulmonalen Erkrankung, gemessen am SOFA Score.

### 4.2 Interpretation der Ergebnisse

#### 4.2.1 Thrombozytenreaktivität

Die in der vorliegenden Studie erhobenen Messwerte der Agonisten-induzierten Thrombozytenaggregation waren bei COVID-19 Erkrankten signifikant höher als bei ebenfalls akut infektiologisch-pulmonal erkrankten Patient\*innen ohne SARS-CoV2-Beteiligung. Ebenfalls per Impedanzaggregometrie untersuchten Bertolin et al. die Plättchenreaktivität an jeweils 60 hospitalisierten COVID-19 Erkrankten und gematchten Kontrollen. Es wurden Cut-offs für niedrige Aggregationswerte festgelegt und signifikant mehr als niedrig deklarierte Messwerte in der Kohorte der COVID-19 Erkrankten nach Zugabe von AA und TRAP festgestellt. Hervorzuheben ist, dass es sich bei der Kontrollgruppe um Gesunde handelte und nicht – wie in der hier vorliegenden Studie – um pulmonal erkrankte Patient\*innen. Außerdem wurde eine Hyperkoagulabilität per Rotationsthrombelastometrie

bei COVID-19 festgestellt (78). Heinz et al. untersuchten ein intensivmedizinisch behandeltes Kollektiv (n=27) ebenfalls per Multiplate® und verglichen dieses mit gesunden Kontrollpersonen. Dabei konnten eine geringere ADP-induzierte Thrombozytenreaktivität und eine höhere Fibrinolyseresistenz bei COVID-19 Erkrankten im Vergleich zu Gesunden festgestellt werden (79). Herrmann et al. untersuchten per Impedanzaggregometrie Blut von 18 Patient\*innen, die aufgrund von SARS-CoV2-induziertem Acute Respiratory Distress Syndrome intensivmedizinisch behandelt wurden. Im Verlauf (Tag 1, 4, 7, 14) waren keine signifikanten Veränderungen feststellbar, jedoch wurden insgesamt niedrige Werte gemessen. Untersucht wurden in dieser kleinen Kohorte schwer erkrankte Patient\*innen. Daher ist das Ergebnis vor dem Hintergrund der bei fortgeschrittenem Krankheitsverlauf beschriebenen Erschöpfung der Thrombozytenfunktion zu interpretieren (80). Manne et al. beobachteten bei COVID-19 Erkrankten (normalstationär sowie intensivstationär behandelten Patient\*innen) im Vergleich zu Gesunden sowohl durchflusszytometrisch als auch unter Anwendung von Fibrinogen/Kollagenspreading-Assays eine leichtere Agonist-induzierte Aktivierbarkeit der Thrombozyten (27). In der ATTAC-Co-Studie wurden 11 ebenfalls pulmonal erkrankte Patient\*innen mit 54 COVID-19 Fällen (37 davon intensivstationär behandelt) verglichen. Mithilfe der Lichttransmissionsaggregometrie wurde nach TRAP- sowie nach ADP-Zugabe eine stärkere Thrombozytenaggregation bei intensivmedizinisch behandelten Patient\*innen verglichen mit anderen COVID-19-Patient\*innen gemessen. Jedoch war kein signifikanter Unterschied zur relativ kleinen Kontrollgruppe nachweisbar. Des Weiteren waren p-Selektin bei intensivmedizinisch gegenüber normalstationär behandelten COVID-19 Erkrankten und lösliches CD40L zusätzlich auch im Vergleich mit der Kontrollgruppe erhöht. Über eine 14 Tage andauernde Messreihe konnte keine signifikante Dynamik der genannten Werte festgestellt werden (81). Interessanterweise scheint nach durchgemachter SARS-CoV2-Infektion das lösliche p-Selektin im Blutplasma längerfristig erhöht nachweisbar zu sein, wobei sich im Vergleich zu gesunden Kontrollen die per Lichttransmissionsaggregometrie quantifizierte Thrombozytenaggregation normalisiert darstellt (82).

In den meisten Studien dienten gesunde Kontrollpersonen als Vergleichsgruppe, wohingegen in der vorliegenden Studie ein Vergleich mit anderen infektiologischen Lungenerkrankungen (hauptsächlich Pneumonien und infektexacerbierte chronisch obstruktive Lungenerkrankungen) erfolgte, um COVID-spezifische und nicht allgemein infektassoziierte Effekte besser herauszuarbeiten. Wir beobachteten höhere Konzentrationen von Thrombin-Antithrombin-Komplex in der Gruppe COV<sub>pos</sub> verglichen mit der Gruppe



COV<sub>neg</sub>, was auf ein bei COVID-19 aktiviertes Gerinnungssystem hinweist (1, 77). Thrombin seinerseits ist über den Protease-aktivierten Rezeptor 1 ein starker Aktivator der Thrombozytenaggregation (83) und stellt mutmaßlich auch im Falle von COVID-19 einen (Prä)aktivierungsweg der Thrombozyten dar.

Die Zytokine IL-6 und CRP beeinflussen die Megakaryopoese. Thrombozyten weisen eine Halbwertszeit von 8-10 Tagen auf und sind aufgrund des Fehlens eines Zellkerns nur translational in der Lage, Proteinmengen zu regulieren. Das Volumen der Plättchen wird hauptsächlich durch den Inhalt ihrer Granula beeinflusst. Zu Orten der Inflammation werden vorzugsweise volumenreichere Thrombozyten rekrutiert (84). Barret et al. wiesen retrospektiv an einer Kohorte von 3915 hospitalisierten COVID-19-Erkrankten einen Zusammenhang von MPV und Mortalität wie einem kombinierten Endpunkt aus invasiver Beatmung und intensivstationärer Behandlung nach (23). In der vorliegenden Studie waren sowohl das MPV als auch Werte des SOFA Scores als Marker der Erkrankungsschwere (85) signifikant höher in der Gruppe COV<sub>Verstorbene</sub> gegenüber der Gruppe COV<sub>Überlebende</sub>. Ferner korrelierten Werte des SOFA Scores mit dem MPV wie auch mit der TRAP-induzierten Thrombozytenreaktivität. Dies deutet auf einen potentiellen Zusammenhang zwischen Markern der gesteigerten Thrombozytenreaktivität und der Erkrankungsschwere hin. Das maximale CRP im Krankenhausaufenthalt korrelierte mit der AA- und TRAP-induzierten Thrombozytenaggregation und IL-6 mit dem MPV. Dies verdeutlicht nochmals den Zusammenhang zwischen Thrombozytenreaktivität und Inflammation (1).

Ein weiterer Einflussfaktor auf die durch Impedanzaggregometrie ermittelte Thrombozytenaggregation ist die Thrombozytenzahl (86), wobei in unserer Kohorte in der Gruppe COV<sub>pos</sub> vier und in der Gruppe COV<sub>neg</sub> zwei Erkrankte thrombozytopen (<150/nL) waren. Die Thrombozytenzahlen waren nicht signifikant unterschiedlich. Eine Thrombozytopenie geht bekanntermaßen mit einem schlechteren Outcome bei COVID-19 einher (23). Diese Konstellation unterstreicht nochmals die Erkrankungsschwere unseres Kollektivs bei guter Vergleichbarkeit der beiden untersuchten Gruppen. Somit dokumentiert diese Arbeit, dass die von anderen Autoren vielfach beschriebene gesteigerte Thrombozytenreaktivität bei COVID-19 nicht nur im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen besteht, sondern auch im Vergleich zu aus anderen Gründen akut pulmonal-infektiologisch Erkrankten zu beobachten ist (1).

#### 4.2.2 Zytokinprofil

Bei COVID-19 erfolgt die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen/Chemokinen im Sinne eines Zytokinsturms, dessen Intensität schon früh im Verlauf der Pandemie mit der Erkrankungsschwere in Verbindung gebracht wurde und sich von anderen Erkrankungen des unteren Respirationstraktes unterscheidet (2, 87, 88). In der vorliegenden Studie konnten höhere Konzentrationen von IL-6, IL-1RA, MCP1, CXCL8 und CXCL10 mit dem Versterben der Patient\*innen in Verbindung gebracht werden. Sowohl auf Monozyten wirkende Zytokine wie MCP1 und CXCL10, als auch aus Monozyten stammende Zytokine wie CXCL8 und CXCL10 weisen auf die zentrale Rolle von eben diesen Zellen im untersuchten Kollektiv und bei COVID-19 im Allgemeinen hin (1, 89). IL-6, das als Zytokinamplifikator wirkt, ist sowohl prognostisch relevant, als auch als Ziel therapeutischer Ansätze bei COVID-19 (90). Erhöhte Werte antiinflammatorischer Proteine wie IL-1RA und IL-10 werden ebenfalls mit schweren COVID-19-Verläufen in Verbindung gebracht, wobei IL-1RA auch durch Monozyten/Makrophagen produziert werden kann (91). Taus et al. stimulierten Thrombozyten von COVID-19-Patient\*innen mit Thrombin (0.1 U/mL) und beobachteten mehr Freisetzung von IL-1RA, IL-10, MCP1 und CXCL10 verglichen mit Thrombozyten von gesunden Kontrollpersonen (92). Dies ist ein weiterer Hinweis auf die Relevanz von Thrombozyten in dieser Konstellation auch als Mediatoren der Inflammation bei COVID-19. Niedrige Lymphozytenzahlen im Blut sind, wie auch in der hier diskutierten Studie, mit einem schlechteren Outcome bei COVID-19 assoziiert (1, 93).

#### 4.2.3 Zell-Thrombozyten-Aggregate

Hottz et al. stellten einen Zusammenhang zwischen Tissue factor Expression von Monozyten, Thrombozyten-Monozyten-Aggregaten und der Schwere von COVID-19 her (94). In der Kohorte der vorliegenden Studie waren in der Gruppe COV<sub>pos</sub> verglichen mit der Gruppe COV<sub>neg</sub> prozentual mehr klassische und intermediäre Monozyten an Thrombozyten gebunden. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen COVID-19 überlebenden und verstorbenen Patient\*innen (1). Ähnliche Beobachtungen in Bezug auf Monozyten-Thrombozyten-Aggregate wurden im Vergleich zu gesunden Kontrollen beschrieben (27, 92, 94, 95). Andere Studien wiesen mehr Neutrophilen-Thrombozyten-Aggregate (92, 95, 96) beziehungsweise TH-Zell-Aggregate (97) nach. Manne et al. beschrieben für alle drei Zellarten mehr Thrombozytenaggregate bei COVID-19 Erkrankten

verglichen mit gesunden Kontrollen. Beim Vergleich intensivstationär gegenüber nicht intensivstationär Behandelte wiederum wurden weniger TH-Zell-Thrombozyten-Aggregate, aber mehr Neutrophilen-Thrombozyten-Aggregate nachgewiesen (27). In unserer Kohorte bestand kein signifikanter Unterschied bezüglich der Neutrophilen-Thrombozyten-Aggregate, was vermutlich auf die Auswahl der Kontrollgruppe zurückzuführen ist und somit eher auf eine Rolle der Monozyten in dieser Konstellation hinweist (1).

Die B-Zellen wiesen in der vorliegenden Studie in der Gruppe COV<sub>pos</sub> verglichen mit der Gruppe COV<sub>neg</sub> eine geringere Granularität auf, was möglicherweise auf einen Unterschied in der Proteinbiosynthese und der Immunglobulinbildung hinweisen könnte. Die Größe der nicht-klassischen Monozyten war zwar signifikant höher in der Kohorte COV<sub>Verstorbene</sub> als in der Kohorte COV<sub>Überlebende</sub>, allerdings kann dies bei geringen Eventzahlen (100 µL Vollblut, ohne vorherige Isolation kernhaltiger Zellen aus dem Blut) auch als ein Zufallsbefund gewertet werden. Die geringere Granularität cytotoxischer T-Zellen bei der Kohorte der COV<sub>Verstorbene</sub> verglichen mit der Kohorte der COV<sub>Überlebende</sub> deutet möglicherweise auf eine Erschöpfung der cytotoxischen T-Zellen hin (1, 98).

### 4.3 Einordnung der Ergebnisse in die aktuelle klinische Forschung

Früh im Pandemieverlauf deuteten retrospektive Studien auf eine positive Auswirkung der Einnahme von ASS oder auch Antikoagulanzen auf den Verlauf der Erkrankung hin (99, 100). RECOVERY als open-label Plattformstudie untersuchte an hospitalisierten Patient\*innen in einem Studienarm die Gabe von täglich 150 mg ASS (n=7351) gegenüber keiner Gabe von ASS (n= 7541). Die Studie verfehlte ihren primären Endpunkt (28-Tage-Mortalität), zeigte aber, dass in der ASS-Kohorte die Dauer des Krankenhausaufenthalts kürzer war und mehr Patient\*innen innerhalb von 28 Tagen aus dem Krankenhaus entlassen werden konnten. Die Reduktion von thrombotischen Ereignissen ging mit einem Anstieg an schweren Blutungen im ASS-Studienarm einher (101). Die ACT-Studie untersuchte an symptomatischen, nicht-hospitalisierten Patient\*innen in einem 2x2 faktoriellen Design die Auswirkung der Gabe von täglich 100 mg ASS für 28 Tage und zweimal täglich 0,6 mg Colchicin für drei, gefolgt von täglich 0,6 mg für weitere 25 Tage auf einen zusammengesetzten Endpunkt aus „majoren Thrombosen“, Hospitalisierung und Tod für den ASS-Studienarm, ohne einen signifikanten Effekt hierauf nachweisen zu können (102). Die Studie ACTIV-4b verglich die Gabe von ASS 81 mg täglich, Apixaban 2 x 2,5 mg

täglich, Apixaban 2 x 5 mg täglich gegenüber Placebo bei symptomatischen, nicht-hospitalisierten Patient\*innen. Diese Studie wurde aufgrund geringer Eventraten vorzeitig beendet (103).

Auch eine antikoagulatorische Therapie wurde im Rahmen von klinischen Studien bei COVID-19 untersucht. Die zusammengefassten Ergebnisse aus den Studien REMAP-CAP, ACTIV-4a und ATTACC für kritisch Kranke ergaben für die Endpunkte organersatzfreie Tage (in einer Ordinalskala) und Zahl der Tage ohne kardiovaskuläre oder respiratorische Organunterstützung bis zum Tag 21 keinen Vorteil einer therapeutischen gegenüber einer prophylaktischen Antikoagulation mit tendenziell mehr schweren Blutungen (104). Bei gleichen Endpunkten wurden nicht-kritisch Kranke betrachtet, wobei hier ein Vorteil für die therapeutisch Antikoagulierten in Bezug auf organersatzfreie Tage nachgewiesen wurde. Für die Subgruppe der Patient\*innen mit einem unter zweifach erhöhten D-Dimer bei Einschluss waren genannte primäre Endpunkte nicht signifikant unterschiedlich im Therapiearmvergleich. Insgesamt traten allerdings signifikant mehr schwere Blutungen in der therapeutisch antikoagulierten Kohorte auf (105). Die Studie COVID-PACT untersuchte 2x2 faktorielle bei kritisch erkrankten COVID-19 Patient\*innen den hierarchischen, zusammengesetzten Endpunkt aus Tod durch venöses oder arterielles thromboembolisches Ereignis, Lungenarterienembolie, klinisch evidente venöse Thrombose, Typ-I-Myokardinfarkt, ischämischen Schlaganfall, systemisch-embolisches Ereignis/akute Ischämie und klinisch inapparente tiefe Venenthrombose. Dabei zeigte die Gabe von Clopidogrel keinen Vorteil gegenüber keiner Gabe von Clopidogrel, wobei eine therapeutische gegenüber einer prophylaktischen Antikoagulation mit Heparinen eine Reduktion des hierarchischen Endpunkts auf Kosten von mehr Blutungsereignissen ergab (106).

Zusammenfassend scheint die Datenlage nicht generell eine thrombozytenfunktionshemmende oder antikoagulatorische Therapie naheulegen, wobei sicherlich die Identifikation der Subgruppen, die von diesen Maßnahmen profitieren würden, weiterer Erforschung bedarf. Aufgrund unterschiedlicher Einschlusskriterien, aber auch der Wahl der Endpunkte ergaben klinische Studien differente Ergebnisse. Hinzu kommt, dass genannte Studien alle früh im Verlauf der Pandemie rekrutierten und somit wahrscheinlich Patient\*innen ohne vorherigen SARS-CoV2-Kontakt beziehungsweise Impfung untersuchten. Die generell anders ablaufende Reaktion des Immunsystems auf einen bereits bekannten Erreger wird wahrscheinlich einige der thrombogenen Mechanismen beziehungsweise eine schwere inflammatorische Reaktion nivellieren. Ob und wie sich dies

auswirkt, bleibt offen und bedarf weiterer klinischer sowie translationaler Forschung, auch um zugrundeliegende Mechanismen und dezidierte Patient\*innenkollektive besser zu verstehen.

#### **4.4 Stärken und Schwächen der Studie**

In dieser Studie wurden keine gesunden Kontrollpersonen untersucht, da bezüglich der Thrombozytenfunktion ein klinisch relevanter Vergleich mit einem ebenfalls infektiologisch-pulmonal erkrankten Kollektiv angestrebt wurde. Akute inflammatorische Erkrankungen haben bekanntermaßen einen Einfluss auf die Hämostase (15). Eine vergleichende Untersuchung an Patient\*innen mit Influenza-Pneumonien wäre erstrebenswert gewesen, war aber im Rahmen der vorliegenden Studie aufgrund geringer Fallzahlen im Rekrutierungszeitraum nicht praktikabel. Kein Studienteilnehmer war gegen SARS-CoV2 vakziniert oder reinfiziert, sodass zu diesen Kollektiven keine Aussagen im Rahmen dieser Studie getroffen werden können. Potenziell könnten bei anderer inflammatorischer Reaktion im Rahmen eines Rekontakts mit SARS-CoV2 differente hämostaseologische Störungen resultieren. Eine potenzielle Thrombozytendysfunktion durch eine Therapie per extrakorporaler Membranoxygenierung oder Hämodialyse kann für diese Studie ausgeschlossen werden, da kein\*e Patient\*in eine entsprechende Therapie erhielt. Auch bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kohorten SARS-CoV2-positiver und -negativer Patient\*innen in Bezug auf die Einnahme von ASS (irreversible Hemmung der Cyclooxygenase 1) oder Clopidogrel (Hemmung P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor), was die AA-beziehungsweise ADP-induzierte Plättchenaggregation hätte verfälschen können. Das Gleiche gilt auch für die Thrombozytenzahl. Einen limitierenden Faktor für die Aussagekraft stellt allerdings die Gruppengröße dieser Studie dar. Auch handelt es sich bei den an COVID-19 erkrankten Patient\*innen verglichen mit den Kontrollen um ein schwerer erkranktes Kollektiv (auf Basis des SOFA Scores sowie des Anteils verstorbener Patient\*innen). Ansonsten waren beide Kohorten gut vergleichbar. Die gewonnenen Erkenntnisse fügen sich in die beschriebenen Ergebnisse translationaler Forschung ein und ergänzen diese um einige Aspekte, insbesondere in Bezug auf den Vergleich akut pulmonal-infektiologisch erkrankter Patient\*innen mit und ohne SARS-CoV2 Infektion (1).

#### **4.5 Implikationen für Praxis und zukünftige Forschung**

Von weiterem Interesse wäre zum einen die detaillierte Untersuchung der zugrundeliegenden Mechanismen der beobachteten gesteigerten Thrombozytenaktivierbarkeit an größeren Kollektiven sowie auch die Untersuchung der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf gegen SARS-CoV2 Geimpfte oder auf erneut infizierte Patient\*innen. Wie bereits dargelegt, besteht keine klare Empfehlung zur Thrombozytenaggregationshemmung oder therapeutischen Antikoagulation für Patient\*innen mit COVID-19, wohl aber zur prophylaktischen Antikoagulation hospitalisierter Erkrankter (107). Dementsprechend wird weitere Forschung in den genannten Feldern notwendig sein, um diejenigen Patient\*innen zu identifizieren, die ein besonders hohes thromboembolisches Risiko aufweisen und entsprechend von einer spezifischen Therapie profitieren könnten.

## 5 Schlussfolgerungen

Ziel der vorliegenden Studie war es, zu untersuchen, ob sich die Agonisten-induzierte Thrombozytenaggregation ex vivo bei COVID-19 von anderen akuten infektiologischen Lungenerkrankungen unterscheidet und welche Zusammenhänge zwischen Thrombozytenreaktivität, Inflammation und Krankheitsschwere bei COVID-19 im Vergleich zu anderen akuten, infektiösen Lungenerkrankungen bestehen.

Zum einen waren für alle drei angewendeten Agonisten (TRAP, ADP und AA) die Messwerte höher in der Gruppe COV<sub>pos</sub> gegenüber der Gruppe COV<sub>neg</sub>. Zum anderen waren auch Marker der Thrombozytenreaktivität mit Markern der Inflammation sowie mit der Krankheitsschwere assoziiert. Eine stärkere inflammatorische Antwort steht mit einem schlechten Outcome im Zusammenhang. Die präsentierten Daten weisen auch auf die Rolle von Monozyten- und TH-Zellen-Thrombozyten-Aggregaten bei COVID-19 als potentieller Link zwischen Immunsystem und Gerinnung hin. Im Rahmen dieser deskriptiven Betrachtung lassen sich Hinweise auf Zusammenhänge darstellen, allerdings stellen zugrundeliegenden Mechanismen ein Ziel für weitere Forschung und potenziell maßgeschneiderte Therapien dar (1).

## Literaturverzeichnis

1. Jakobs K, Reinshagen L, Puccini M, Friebel J, Wilde AB, Alsheik A, Rroku A, Landmesser U, Haghikia A, Krankel N, Rauch-Krohnert U. Disease Severity in Moderate-to-Severe COVID-19 Is Associated With Platelet Hyperreactivity and Innate Immune Activation. *Front Immunol.* 2022;13:844701.
2. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, Zhang L, Fan G, Xu J, Gu X, Cheng Z, Yu T, Xia J, Wei Y, Wu W, Xie X, Yin W, Li H, Liu M, Xiao Y, Gao H, Guo L, Xie J, Wang G, Jiang R, Gao Z, Jin Q, Wang J, Cao B. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 2020;395(10223):497-506.
3. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG, Hu Y, Tao ZW, Tian JH, Pei YY, Yuan ML, Zhang YL, Dai FH, Liu Y, Wang QM, Zheng JJ, Xu L, Holmes EC, Zhang YZ. Author Correction: A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature.* 2020;580(7803):E7.
4. Gong W, Parkkila S, Wu X, Aspatwar A. SARS-CoV-2 variants and COVID-19 vaccines: Current challenges and future strategies. *Int Rev Immunol.* 2022:1-22.
5. Lotfi M, Hamblin MR, Rezaei N. COVID-19: Transmission, prevention, and potential therapeutic opportunities. *Clin Chim Acta.* 2020;508:254-66.
6. Hui DS, E IA, Madani TA, Ntoumi F, Kock R, Dar O, Ippolito G, McHugh TD, Memish ZA, Drosten C, Zumla A, Petersen E. The continuing 2019-nCoV epidemic threat of novel coronaviruses to global health - The latest 2019 novel coronavirus outbreak in Wuhan, China. *Int J Infect Dis.* 2020;91:264-6.
7. Al-Sadeq DW, Nasrallah GK. The incidence of the novel coronavirus SARS-CoV-2 among asymptomatic patients: A systematic review. *Int J Infect Dis.* 2020;98:372-80.
8. Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, Qiu Y, Wang J, Liu Y, Wei Y, Xia J, Yu T, Zhang X, Zhang L. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet.* 2020;395(10223):507-13.
9. Pourbagheri-Sigaroodi A, Bashash D, Fateh F, Abolghasemi H. Laboratory findings in COVID-19 diagnosis and prognosis. *Clin Chim Acta.* 2020;510:475-82.
10. Jiang F, Deng L, Zhang L, Cai Y, Cheung CW, Xia Z. Review of the Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *J Gen Intern Med.* 2020;35(5):1545-9.
11. Gackler A, Rohn H, Witzke O. [Acute renal failure in COVID-19]. *Nephrologe.* 2021;16(2):66-70.
12. Silva F, Brito BB, Santos MLC, Marques HS, Silva Junior RTD, Carvalho LS, Vieira ES, Oliveira MV, Melo FF. COVID-19 gastrointestinal manifestations: a systematic review. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2020;53:e20200714.
13. Zhang L, Feng X, Zhang D, Jiang C, Mei H, Wang J, Zhang C, Li H, Xia X, Kong S, Liao J, Jia H, Pang X, Song Y, Tian Y, Wang B, Wu C, Yuan H, Zhang Y, Li Y, Sun W, Zhang Y, Zhu S, Wang S, Xie Y, Ge S, Zhang L, Hu Y, Xie M. Deep Vein Thrombosis in Hospitalized Patients With COVID-19 in Wuhan, China: Prevalence, Risk Factors, and Outcome. *Circulation.* 2020;142(2):114-28.
14. McFadyen JD, Stevens H, Peter K. The Emerging Threat of (Micro)Thrombosis in COVID-19 and Its Therapeutic Implications. *Circ Res.* 2020;127(4):571-87.
15. Cohen AT, Alikhan R, Arcelus JI, Bergmann JF, Haas S, Merli GJ, Spyropoulos AC, Tapson VF, Turpie AG. Assessment of venous thromboembolism risk and the benefits of thromboprophylaxis in medical patients. *Thromb Haemost.* 2005;94(4):750-9.



16. Smilowitz NR, Subashchandran V, Yuriditsky E, Horowitz JM, Reynolds HR, Hochman JS, Berger JS. Thrombosis in hospitalized patients with viral respiratory infections versus COVID-19. *Am Heart J.* 2021;231:93-5.
17. Jackson CB, Farzan M, Chen B, Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2022;23(1):3-20.
18. Masi P, Hekimian G, Lejeune M, Chommeloux J, Desnos C, Pineton De Chambrun M, Martin-Toutain I, Nieszkowska A, Lebreton G, Brechot N, Schmidt M, Edouard Luyt C, Combes A, Frere C. Systemic Inflammatory Response Syndrome Is a Major Contributor to COVID-19-Associated Coagulopathy: Insights From a Prospective, Single-Center Cohort Study. *Circulation.* 2020;142(6):611-4.
19. Middeldorp S, Coppens M, van Haaps TF, Foppen M, Vlaar AP, Muller MCA, Bouman CCS, Beenen LFM, Kootte RS, Heijmans J, Smits LP, Bonta PI, van Es N. Incidence of venous thromboembolism in hospitalized patients with COVID-19. *J Thromb Haemost.* 2020;18(8):1995-2002.
20. Helms J, Tacquard C, Severac F, Leonard-Lorant I, Ohana M, Delabranche X, Merdji H, Clere-Jehl R, Schenck M, Fagot Gandet F, Fafi-Kremer S, Castelain V, Schneider F, Grunebaum L, Angles-Cano E, Sattler L, Mertes PM, Meziani F, Group CT. High risk of thrombosis in patients with severe SARS-CoV-2 infection: a multicenter prospective cohort study. *Intensive Care Med.* 2020;46(6):1089-98.
21. Tang N, Li D, Wang X, Sun Z. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost.* 2020;18(4):844-7.
22. Berger JS, Kunichoff D, Adhikari S, Ahuja T, Amoroso N, Aphinyanaphongs Y, Cao M, Goldenberg R, Hindenburg A, Horowitz J, Parnia S, Petrilli C, Reynolds H, Simon E, Slater J, Yaghi S, Yuriditsky E, Hochman J, Horwitz LI. Prevalence and Outcomes of D-Dimer Elevation in Hospitalized Patients With COVID-19. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2020;40(10):2539-47.
23. Barrett TJ, Bilaloglu S, Cornwell M, Burgess HM, Virginio VW, Drenkova K, Ibrahim H, Yuriditsky E, Aphinyanaphongs Y, Lifshitz M, Xia Liang F, Alejo J, Smith G, Pittaluga S, Rapkiewicz AV, Wang J, Iancu-Rubin C, Mohr I, Ruggles K, Stapleford KA, Hochman J, Berger JS. Platelets contribute to disease severity in COVID-19. *J Thromb Haemost.* 2021;19(12):3139-53.
24. Zaid Y, Puhm F, Allaeyes I, Naya A, Oudghiri M, Khalki L, Limami Y, Zaid N, Sadki K, Ben El Haj R, Mahir W, Belayachi L, Belefquih B, Benouda A, Cheikh A, Langlois MA, Cherrah Y, Flamand L, Guessous F, Boillard E. Platelets Can Associate with SARS-Cov-2 RNA and Are Hyperactivated in COVID-19. *Circ Res.* 2020;127(11):1404-18.
25. Hottz ED, Quirino-Teixeira AC, Merij LB, Pinheiro MBM, Rozini SV, Bozza FA, Bozza PT. Platelet-leukocyte interactions in the pathogenesis of viral infections. *Platelets.* 2022;33(2):200-7.
26. Koupenova M, Clancy L, Corkrey HA, Freedman JE. Circulating Platelets as Mediators of Immunity, Inflammation, and Thrombosis. *Circ Res.* 2018;122(2):337-51.
27. Manne BK, Denorme F, Middleton EA, Portier I, Rowley JW, Stubben C, Petrey AC, Tolley ND, Guo L, Cody M, Weyrich AS, Yost CC, Rondina MT, Campbell RA. Platelet gene expression and function in patients with COVID-19. *Blood.* 2020;136(11):1317-29.
28. Sefer D, Miljic P, Kraguljac-Kurtovic N, Bizic-Radulovic S, Bogdanovic A, Knezevic V, Markovic D, Beleslin-Cokic B, Novakovic I, Marinkovic J, Lekovic D, Gotic M, Cokic V. Correlation between leukocyte-platelet aggregates and thrombosis in myeloproliferative neoplasms. *Int J Lab Hematol.* 2022;44(2):302-12.
29. Canzano P, Brambilla M, Porro B, Cosentino N, Tortorici E, Vicini S, Poggio P, Cascella A, Pengo MF, Veglia F, Fiorelli S, Bonomi A, Cavalca V, Trabattoni D, Andreini

- D, Omodeo Sale E, Parati G, Tremoli E, Camera M. Platelet and Endothelial Activation as Potential Mechanisms Behind the Thrombotic Complications of COVID-19 Patients. *JACC Basic Transl Sci.* 2021;6(3):202-18.
30. Santa Cruz A, Mendes-Frias A, Oliveira AI, Dias L, Matos AR, Carvalho A, Capela C, Pedrosa J, Castro AG, Silvestre R. Interleukin-6 Is a Biomarker for the Development of Fatal Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Pneumonia. *Front Immunol.* 2021;12:613422.
  31. Patel SR, Hartwig JH, Italiano JE, Jr. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J Clin Invest.* 2005;115(12):3348-54.
  32. George JN. Platelets. *Lancet.* 2000;355(9214):1531-9.
  33. Varga-Szabo D, Braun A, Nieswandt B. Calcium signaling in platelets. *J Thromb Haemost.* 2009;7(7):1057-66.
  34. Sharda A, Flaumenhaft R. The life cycle of platelet granules. *F1000Res.* 2018;7:236.
  35. Patrignani P, Filabozzi P, Patrono C. Selective cumulative inhibition of platelet thromboxane production by low-dose aspirin in healthy subjects. *J Clin Invest.* 1982;69(6):1366-72.
  36. Bonar RA, Lippi G, Favalaro EJ. Overview of Hemostasis and Thrombosis and Contribution of Laboratory Testing to Diagnosis and Management of Hemostasis and Thrombosis Disorders. *Methods Mol Biol.* 2017;1646:3-27.
  37. Shattil SJ, Kashiwagi H, Pampori N. Integrin signaling: the platelet paradigm. *Blood.* 1998;91(8):2645-57.
  38. Ruggeri ZM. von Willebrand factor. *J Clin Invest.* 1997;99(4):559-64.
  39. Jackson SP. The growing complexity of platelet aggregation. *Blood.* 2007;109(12):5087-95.
  40. Bearer EL, Prakash JM, Li Z. Actin dynamics in platelets. *Int Rev Cytol.* 2002;217:137-82.
  41. Davi G, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med.* 2007;357(24):2482-94.
  42. Fullard JF. The role of the platelet glycoprotein IIb/IIIa in thrombosis and haemostasis. *Curr Pharm Des.* 2004;10(14):1567-76.
  43. FitzGerald GA. Mechanisms of platelet activation: thromboxane A<sub>2</sub> as an amplifying signal for other agonists. *Am J Cardiol.* 1991;68(7):11B-5B.
  44. Bitbol M, Fellmann P, Zachowski A, Devaux PF. Ion regulation of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine outside-inside translocation in human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta.* 1987;904(2):268-82.
  45. Zwaal RF, Schroit AJ. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood.* 1997;89(4):1121-32.
  46. Suzuki J, Umeda M, Sims PJ, Nagata S. Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. *Nature.* 2010;468(7325):834-8.
  47. Lentz BR. Exposure of platelet membrane phosphatidylserine regulates blood coagulation. *Prog Lipid Res.* 2003;42(5):423-38.
  48. Golino P, Ashton JH, Buja LM, Rosolowsky M, Taylor AL, McNatt J, Campbell WB, Willerson JT. Local platelet activation causes vasoconstriction of large epicardial canine coronary arteries in vivo. Thromboxane A<sub>2</sub> and serotonin are possible mediators. *Circulation.* 1989;79(1):154-66.
  49. Leung LL. Role of thrombospondin in platelet aggregation. *J Clin Invest.* 1984;74(5):1764-72.
  50. Fintel DJ. Oral antiplatelet therapy for atherothrombotic disease: overview of current and emerging treatment options. *Vasc Health Risk Manag.* 2012;8:77-89.

51. Kristensen SD, Wurtz M, Grove EL, De Caterina R, Huber K, Moliterno DJ, Neumann FJ. Contemporary use of glycoprotein IIb/IIIa inhibitors. *Thromb Haemost.* 2012;107(2):215-24.
52. Abdulsattar Y, Ternas T, Garcia D. Vorapaxar: targeting a novel antiplatelet pathway. *P T.* 2011;36(9):564-8.
53. Grant SM, Goa KL. Iloprost. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in peripheral vascular disease, myocardial ischaemia and extracorporeal circulation procedures. *Drugs.* 1992;43(6):889-924.
54. Harker LA, Slichter SJ. The bleeding time as a screening test for evaluation of platelet function. *N Engl J Med.* 1972;287(4):155-9.
55. Le Blanc J, Mullier F, Vayne C, Lordkipanidze M. Advances in Platelet Function Testing-Light Transmission Aggregometry and Beyond. *J Clin Med.* 2020;9(8).
56. Feinman RD, Lubowsky J, Charo I, Zabinski MP. The lumi-aggregometer: a new instrument for simultaneous measurement of secretion and aggregation by platelets. *J Lab Clin Med.* 1977;90(1):125-9.
57. Paniccia R, Priora R, Liotta AA, Abbate R. Platelet function tests: a comparative review. *Vasc Health Risk Manag.* 2015;11:133-48.
58. van Werkum JW, Harmsze AM, Elsenberg EH, Bouman HJ, ten Berg JM, Hackeng CM. The use of the VerifyNow system to monitor antiplatelet therapy: a review of the current evidence. *Platelets.* 2008;19(7):479-88.
59. Kundu SK, Heilmann EJ, Sio R, Garcia C, Davidson RM, Ostgaard RA. Description of an in vitro platelet function analyzer--PFA-100. *Semin Thromb Hemost.* 1995;21 Suppl 2:106-12.
60. Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, Frelinger AL, 3rd, Furman MI. Evaluation of platelet function by flow cytometry. *Methods.* 2000;21(3):259-70.
61. Fox SC, Burgess-Wilson M, Heptinstall S, Mitchell JR. Platelet aggregation in whole blood determined using the Ultra-Flo 100 Platelet Counter. *Thromb Haemost.* 1982;48(3):327-9.
62. Ramstrom S, Sodergren AL, Tynngard N, Lindahl TL. Platelet Function Determined by Flow Cytometry: New Perspectives? *Semin Thromb Hemost.* 2016;42(3):268-81.
63. Whiting D, DiNardo JA. TEG and ROTEM: technology and clinical applications. *Am J Hematol.* 2014;89(2):228-32.
64. Choi ES, Nichol JL, Hokom MM, Hornkohl AC, Hunt P. Platelets generated in vitro from proplatelet-displaying human megakaryocytes are functional. *Blood.* 1995;85(2):402-13.
65. Bakogiannis C, Sachse M, Stamatelopoulos K, Stellos K. Platelet-derived chemokines in inflammation and atherosclerosis. *Cytokine.* 2019;122:154157.
66. Lippi G, Cervellin G, Franchini M, Favaloro EJ. Biochemical markers for the diagnosis of venous thromboembolism: the past, present and future. *J Thromb Thrombolysis.* 2010;30(4):459-71.
67. Spyropoulos AC, Ageno W, Albers GW, Elliott CG, Halperin JL, Hiatt WR, Maynard GA, Steg PG, Weitz JI, Suh E, Spiro TE, Barnathan ES, Raskob GE, Investigators M. Rivaroxaban for Thromboprophylaxis after Hospitalization for Medical Illness. *N Engl J Med.* 2018;379(12):1118-27.
68. Rauch-Krohnert U, Puccini M, Placzek M, Beyer-Westendorf J, Jakobs K, Friebel J, Hein S, Seidel M, Pieske B, Massberg S, Witzenrath M, Zeiher A, Friede T, Anker SD, Landmesser U. Initial therapeutic anticoagulation with rivaroxaban compared to

- prophylactic therapy with heparins in moderate to severe COVID-19: results of the COVID-PREVENT randomized controlled trial. *Clin Res Cardiol*. 2023.
69. Ghanbari EP, Jakobs K, Puccini M, Reinshagen L, Friebel J, Haghikia A, Krankel N, Landmesser U, Rauch-Krohnert U. The Role of NETosis and Complement Activation in COVID-19-Associated Coagulopathies. *Biomedicines*. 2023;11(5).
70. Puccini M, Jakobs K, Reinshagen L, Friebel J, Schencke PA, Ghanbari E, Landmesser U, Haghikia A, Krankel N, Rauch U. Galectin-3 as a Marker for Increased Thrombogenicity in COVID-19. *Int J Mol Sci*. 2023;24(9).
71. Jakobs K, Rauch U. Galectin-3 inhibitors as novel antithrombotic drugs with almost no bleeding risk: wishful thinking or a realistic vision? *Eur Heart J*. 2022;43(37):3575-7.
72. Chen Y, Fu W, Zheng Y, Yang J, Liu Y, Qi Z, Wu M, Fan Z, Yin K, Chen Y, Gao W, Ding Z, Dong J, Li Q, Zhang S, Hu L. Galectin 3 enhances platelet aggregation and thrombosis via Dectin-1 activation: a translational study. *Eur Heart J*. 2022;43(37):3556-74.
73. Gaughan EE, Quinn TM, Mills A, Bruce AM, Antonelli J, MacKinnon AC, Aslanis V, Li F, O'Connor R, Boz C, Mills R, Emanuel P, Burgess M, Rinaldi G, Valanciute A, Mills B, Scholefield E, Hardisty G, Findlay EG, Parker RA, Norrie J, Dear JW, Akram AR, Koch O, Templeton K, Dockrell DH, Walsh TS, Partridge S, Humphries D, Wang-Jairaj J, Slack RJ, Schambye H, Phung D, Gravelle L, Lindmark B, Shankar-Hari M, Hirani N, Sethi T, Dhaliwal K. An Inhaled Galectin-3 Inhibitor in COVID-19 Pneumonitis: A Phase Ib/Ia Randomized Controlled Clinical Trial (DEFINE). *Am J Respir Crit Care Med*. 2023;207(2):138-49.
74. Engelmann B, Massberg S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(1):34-45.
75. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonca A, Bruining H, Reinhart CK, Suter PM, Thijs LG. 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 Med*. 1996;22(7):707-10.
76. Gaastra W. Enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA). *Methods Mol Biol*. 1984;1:349-55.
77. Jorgensen LN, Lind B, Hauch O, Leffers A, Albrecht-Beste E, Konradsen LA. Thrombin-antithrombin III-complex & fibrin degradation products in plasma: surgery and postoperative deep venous thrombosis. *Thromb Res*. 1990;59(1):69-76.
78. Bertolin AJ, Dalcoquio TF, Salsoso R, de MFRH, Kalil-Filho R, Hajjar LA, Siciliano RF, Kallas EG, Baracioli LM, Lima FG, Giraldez RR, Cavalheiro-Filho C, Vieira A, Strunz CMC, Giugliano RP, Tantry US, Gurbel PA, Nicolau JC. Platelet Reactivity and Coagulation Markers in Patients with COVID-19. *Adv Ther*. 2021;38(7):3911-23.
79. Heinz C, Miesbach W, Herrmann E, Sonntagbauer M, Raimann FJ, Zacharowski K, Weber CF, Adam EH. Greater Fibrinolysis Resistance but No Greater Platelet Aggregation in Critically Ill COVID-19 Patients. *Anesthesiology*. 2021;134(3):457-67.
80. Herrmann J, Notz Q, Schlesinger T, Stumpner J, Kredel M, Sitter M, Schmid B, Kranke P, Schulze H, Meybohm P, Lotz C. Point of care diagnostic of hypercoagulability and platelet function in COVID-19 induced acute respiratory distress syndrome: a retrospective observational study. *Thromb J*. 2021;19(1):39.
81. Campo G, Contoli M, Fogagnolo A, Vieceli Dalla Sega F, Zucchetti O, Ronzoni L, Verri M, Fortini F, Pavasini R, Morandi L, Biscaglia S, Di Ienno L, D'Aniello E, Manfrini M, Zoppellari R, Rizzo P, Ferrari R, Volta CA, Papi A, Spadaro S. Over time relationship between platelet reactivity, myocardial injury and mortality in patients with SARS-CoV-2-associated respiratory failure. *Platelets*. 2021;32(4):560-7.

82. Muller R, Rink G, Uzun G, Bakchoul T, Wuchter P, Kluter H, Bugert P. Increased plasma level of soluble P-selectin in non-hospitalized COVID-19 convalescent donors. *Thromb Res.* 2022;216:120-4.
83. Andersen H, Greenberg DL, Fujikawa K, Xu W, Chung DW, Davie EW. Protease-activated receptor 1 is the primary mediator of thrombin-stimulated platelet procoagulant activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(20):11189-93.
84. Gasparyan AY, Ayyvazyan L, Mikhailidis DP, Kitas GD. Mean platelet volume: a link between thrombosis and inflammation? *Curr Pharm Des.* 2011;17(1):47-58.
85. Yang Z, Hu Q, Huang F, Xiong S, Sun Y. The prognostic value of the SOFA score in patients with COVID-19: A retrospective, observational study. *Medicine (Baltimore).* 2021;100(32):e26900.
86. Soliman M, Hartmann M. Multiplate® Platelet Aggregation Findings Are Dependent on Platelet Count but Can Be Corrected by Use of a Ratio. *Applied Sciences.* 2020;10(22):7971.
87. de la Rica R, Borges M, Gonzalez-Freire M. COVID-19: In the Eye of the Cytokine Storm. *Front Immunol.* 2020;11:558898.
88. Laing AG, Lorenc A, Del Molino Del Barrio I, Das A, Fish M, Monin L, Munoz-Ruiz M, McKenzie DR, Hayday TS, Francos-Quijorna I, Kamdar S, Joseph M, Davies D, Davis R, Jennings A, Zlatareva I, Vantourout P, Wu Y, Sofra V, Cano F, Greco M, Theodoridis E, Freedman JD, Gee S, Chan JNE, Ryan S, Bugallo-Blanco E, Peterson P, Kisand K, Haljasmagi L, Chadli L, Moingeon P, Martinez L, Merrick B, Bisnauthsing K, Brooks K, Ibrahim MAA, Mason J, Lopez Gomez F, Babalola K, Abdul-Jawad S, Cason J, Mant C, Seow J, Graham C, Doores KJ, Di Rosa F, Edgeworth J, Shankar-Hari M, Hayday AC. A dynamic COVID-19 immune signature includes associations with poor prognosis. *Nat Med.* 2020;26(10):1623-35.
89. Knoll R, Schultze JL, Schulte-Schrepping J. Monocytes and Macrophages in COVID-19. *Front Immunol.* 2021;12:720109.
90. Hojyo S, Uchida M, Tanaka K, Hasebe R, Tanaka Y, Murakami M, Hirano T. How COVID-19 induces cytokine storm with high mortality. *Inflamm Regen.* 2020;40:37.
91. Zhao Y, Qin L, Zhang P, Li K, Liang L, Sun J, Xu B, Dai Y, Li X, Zhang C, Peng Y, Feng Y, Li A, Hu Z, Xiang H, Ogg G, Ho LP, McMichael A, Jin R, Knight JC, Dong T, Zhang Y. Longitudinal COVID-19 profiling associates IL-1RA and IL-10 with disease severity and RANTES with mild disease. *JCI Insight.* 2020;5(13).
92. Taus F, Salvagno G, Cane S, Fava C, Mazzaferri F, Carrara E, Petrova V, Barouni RM, Dima F, Dalbeni A, Romano S, Poli G, Benati M, De Nitto S, Mansueto G, Iezzi M, Tacconelli E, Lippi G, Bronte V, Minuz P. Platelets Promote Thromboinflammation in SARS-CoV-2 Pneumonia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2020;40(12):2975-89.
93. Tan L, Wang Q, Zhang D, Ding J, Huang Q, Tang YQ, Wang Q, Miao H. Lymphopenia predicts disease severity of COVID-19: a descriptive and predictive study. *Signal Transduct Target Ther.* 2020;5(1):33.
94. Hottz ED, Azevedo-Quintanilha IG, Palhinha L, Teixeira L, Barreto EA, Pao CRR, Righy C, Franco S, Souza TML, Kurtz P, Bozza FA, Bozza PT. Platelet activation and platelet-monocyte aggregate formation trigger tissue factor expression in patients with severe COVID-19. *Blood.* 2020;136(11):1330-41.
95. Le Joncour A, Biard L, Vautier M, Bugaut H, Mekinian A, Maalouf G, Vieira M, Marcelin AG, Rosenzweig M, Klatzmann D, Corvol JC, Paccoud O, Carillion A, Salem JE, Cacoub P, Boulaftali Y, Saadoun D. Neutrophil-Platelet and Monocyte-Platelet Aggregates in COVID-19 Patients. *Thromb Haemost.* 2020;120(12):1733-5.
96. Leopold V, Pereverzeva L, Schuurman AR, Reijnders TDY, Saris A, de Brabander J, van Linge CCA, Douma RA, Chouchane O, Nieuwland R, Wiersinga WJ, van 't Veer

- C, van der Poll T. Platelets are Hyperactivated but Show Reduced Glycoprotein VI Reactivity in COVID-19 Patients. *Thromb Haemost.* 2021;121(9):1258-62.
97. Paletta A, Di Diego Garcia F, Varese A, Erra Diaz F, Garcia J, Cisneros JC, Luduena G, Mazzitelli I, Pisarevsky A, Cabrerizo G, Lopez Malizia A, Rodriguez AG, Lista N, Longueira Y, Sabatte J, Geffner J, Remes Lenicov F, Ceballos A. Platelets modulate CD4(+) T-cell function in COVID-19 through a PD-L1 dependent mechanism. *Br J Haematol.* 2022;197(3):283-92.
98. Rha MS, Shin EC. Activation or exhaustion of CD8(+) T cells in patients with COVID-19. *Cell Mol Immunol.* 2021;18(10):2325-33.
99. Chow JH, Khanna AK, Kethireddy S, Yamane D, Levine A, Jackson AM, McCurdy MT, Tabatabai A, Kumar G, Park P, Benjenk I, Menaker J, Ahmed N, Glidewell E, Presutto E, Cain S, Haridasa N, Field W, Fowler JG, Trinh D, Johnson KN, Kaur A, Lee A, Sebastian K, Ulrich A, Pena S, Carpenter R, Sudhakar S, Uppal P, Fedeles BT, Sachs A, Dahbour L, Teeter W, Tanaka K, Galvagno SM, Herr DL, Scalea TM, Mazzeffi MA. Aspirin Use Is Associated With Decreased Mechanical Ventilation, Intensive Care Unit Admission, and In-Hospital Mortality in Hospitalized Patients With Coronavirus Disease 2019. *Anesth Analg.* 2021;132(4):930-41.
100. Meizlish ML, Goshua G, Liu Y, Fine R, Amin K, Chang E, DeFilippo N, Keating C, Liu Y, Mankbadi M, McManus D, Wang SY, Price C, Bona RD, Ochoa Chara CI, Chun HJ, Pine AB, Rinder HM, Siner JM, Neuberg DS, Owusu KA, Lee AI. Intermediate-dose anticoagulation, aspirin, and in-hospital mortality in COVID-19: A propensity score-matched analysis. *Am J Hematol.* 2021;96(4):471-9.
101. Group RC. Aspirin in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised, controlled, open-label, platform trial. *Lancet.* 2022;399(10320):143-51.
102. Eikelboom JW, Jolly SS, Belley-Cote EP, Whitlock RP, Rangarajan S, Xu L, Heenan L, Bangdiwala SI, Tarhuni WM, Hassany M, Kontsevaya A, Harper W, Sharma SK, Lopez-Jaramillo P, Dans AL, Palileo-Villanueva LM, Avezum A, Pais P, Xavier D, Felix C, Yusufali A, Lopes RD, Berwanger O, Ali Z, Wasserman S, Anand SS, Bosch J, Choudhri S, Farkouh ME, Loeb M, Yusuf S. Colchicine and aspirin in community patients with COVID-19 (ACT): an open-label, factorial, randomised, controlled trial. *Lancet Respir Med.* 2022;10(12):1160-8.
103. Connors JM, Brooks MM, Sciruba FC, Krishnan JA, Bledsoe JR, Kindzelski A, Baucom AL, Kirwan BA, Eng H, Martin D, Zaharris E, Everett B, Castro L, Shapiro NL, Lin JY, Hou PC, Pepine CJ, Handberg E, Haight DO, Wilson JW, Majercik S, Fu Z, Zhong Y, Venugopal V, Beach S, Wisniewski S, Ridker PM, Investigators A-B. Effect of Antithrombotic Therapy on Clinical Outcomes in Outpatients With Clinically Stable Symptomatic COVID-19: The ACTIV-4B Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 2021;326(17):1703-12.
104. Investigators R-C, Investigators AC-a, Investigators A, Goligher EC, Bradbury CA, McVerry BJ, Lawler PR, Berger JS, Gong MN, Carrier M, Reynolds HR, Kumar A, Turgeon AF, Kornblith LZ, Kahn SR, Marshall JC, Kim KS, Houston BL, Derde LPG, Cushman M, Tritschler T, Angus DC, Godoy LC, McQuilten Z, Kirwan BA, Farkouh ME, Brooks MM, Lewis RJ, Berry LR, Lorenzi E, Gordon AC, Ahuja T, Al-Beidh F, Annane D, Arabi YM, Aryal D, Baumann Kreuziger L, Beane A, Bhimani Z, Bihari S, Billett HH, Bond L, Bonten M, Brunkhorst F, Buxton M, Buzgau A, Castellucci LA, Chekuri S, Chen JT, Cheng AC, Chkhikvadze T, Coiffard B, Contreras A, Costantini TW, de Brouwer S, Detry MA, Duggal A, Dzavik V, Effron MB, Eng HF, Escobedo J, Estcourt LJ, Everett BM, Fergusson DA, Fitzgerald M, Fowler RA, Froess JD, Fu Z, Galanaud JP, Galen BT, Gandotra S, Girard TD, Goodman AL, Goossens H, Green C, Greenstein YY, Gross PL, Haniffa R, Hegde SM, Hendrickson CM, Higgins AM, Hindenburg AA, Hope AA, Horowitz

JM, Horvat CM, Huang DT, Hudock K, Hunt BJ, Husain M, Hyzy RC, Jacobson JR, Jayakumar D, Keller NM, Khan A, Kim Y, Kindzelski A, King AJ, Knudson MM, Kornblith AE, Kutcher ME, Laffan MA, Lamontagne F, Le Gal G, Leeper CM, Leifer ES, Lim G, Gallego Lima F, Linstrum K, Litton E, Lopez-Sendon J, Lother SA, Marten N, Saud Marinez A, Martinez M, Mateos Garcia E, Mavromichalis S, McAuley DF, McDonald EG, McGlothlin A, McGuinness SP, Middeldorp S, Montgomery SK, Mouncey PR, Murthy S, Nair GB, Nair R, Nichol AD, Nicolau JC, Nunez-Garcia B, Park JJ, Park PK, Parke RL, Parker JC, Parnia S, Paul JD, Pompilio M, Quigley JG, Rosenson RS, Rost NS, Rowan K, Santos FO, Santos M, Santos MO, Satterwhite L, Saunders CT, Schreiber J, Schutgens REG, Seymour CW, Siegal DM, Silva DG, Jr., Singhal AB, Slutsky AS, Solvason D, Stanworth SJ, Turner AM, van Bentum-Puijk W, van de Veerdonk FL, van Diepen S, Vazquez-Grande G, Wahid L, Wareham V, Widmer RJ, Wilson JG, Yuriditsky E, Zhong Y, Berry SM, McArthur CJ, Neal MD, Hochman JS, Webb SA, Zarychanski R. Therapeutic Anticoagulation with Heparin in Critically Ill Patients with Covid-19. *N Engl J Med.* 2021;385(9):777-89.

105. Investigators A, Investigators AC-a, Investigators R-C, Lawler PR, Goligher EC, Berger JS, Neal MD, McVerry BJ, Nicolau JC, Gong MN, Carrier M, Rosenson RS, Reynolds HR, Turgeon AF, Escobedo J, Huang DT, Bradbury CA, Houston BL, Kornblith LZ, Kumar A, Kahn SR, Cushman M, McQuilten Z, Slutsky AS, Kim KS, Gordon AC, Kirwan BA, Brooks MM, Higgins AM, Lewis RJ, Lorenzi E, Berry SM, Berry LR, Aday AW, Al-Beidh F, Annane D, Arabi YM, Aryal D, Baumann Kreuziger L, Beane A, Bhimani Z, Bihari S, Billett HH, Bond L, Bonten M, Brunkhorst F, Buxton M, Buzgau A, Castellucci LA, Chekuri S, Chen JT, Cheng AC, Chkhikvadze T, Coiffard B, Costantini TW, de Brouwer S, Derde LPG, Detry MA, Duggal A, Dzavik V, Efron MB, Estcourt LJ, Everett BM, Fergusson DA, Fitzgerald M, Fowler RA, Galanaud JP, Galen BT, Gandotra S, Garcia-Madrona S, Girard TD, Godoy LC, Goodman AL, Goossens H, Green C, Greenstein YY, Gross PL, Hamburg NM, Haniffa R, Hanna G, Hanna N, Hegde SM, Hendrickson CM, Hite RD, Hindenburg AA, Hope AA, Horowitz JM, Horvat CM, Hudock K, Hunt BJ, Husain M, Hyzy RC, Iyer VN, Jacobson JR, Jayakumar D, Keller NM, Khan A, Kim Y, Kindzelski AL, King AJ, Knudson MM, Kornblith AE, Krishnan V, Kutcher ME, Laffan MA, Lamontagne F, Le Gal G, Leeper CM, Leifer ES, Lim G, Lima FG, Linstrum K, Litton E, Lopez-Sendon J, Lopez-Sendon Moreno JL, Lother SA, Malhotra S, Marcos M, Saud Marinez A, Marshall JC, Marten N, Matthay MA, McAuley DF, McDonald EG, McGlothlin A, McGuinness SP, Middeldorp S, Montgomery SK, Moore SC, Morillo Guerrero R, Mouncey PR, Murthy S, Nair GB, Nair R, Nichol AD, Nunez-Garcia B, Pandey A, Park PK, Parke RL, Parker JC, Parnia S, Paul JD, Perez Gonzalez YS, Pompilio M, Prekker ME, Quigley JG, Rost NS, Rowan K, Santos FO, Santos M, Olombrada Santos M, Satterwhite L, Saunders CT, Schutgens REG, Seymour CW, Siegal DM, Silva DG, Jr., Shankar-Hari M, Sheehan JP, Singhal AB, Solvason D, Stanworth SJ, Tritschler T, Turner AM, van Bentum-Puijk W, van de Veerdonk FL, van Diepen S, Vazquez-Grande G, Wahid L, Wareham V, Wells BJ, Widmer RJ, Wilson JG, Yuriditsky E, Zampieri FG, Angus DC, McArthur CJ, Webb SA, Farkouh ME, Hochman JS, Zarychanski R. Therapeutic Anticoagulation with Heparin in Noncritically Ill Patients with Covid-19. *N Engl J Med.* 2021;385(9):790-802.

106. Bohula EA, Berg DD, Lopes MS, Connors JM, Babar I, Barnett CF, Chaudhry SP, Chopra A, Ginete W, Jeong MH, Katz JN, Kim EY, Kuder JF, Mazza E, McLean D, Mosier JM, Moskowitz A, Murphy SA, O'Donoghue ML, Park JG, Prasad R, Ruff CT, Shahrour MN, Sinha SS, Wiviott SD, Van Diepen S, Zainea M, Baird-Zars V, Sabatine MS, Morrow DA, Investigators C-P. Anticoagulation and Antiplatelet Therapy for Prevention of Venous

and Arterial Thrombotic Events in Critically Ill Patients With COVID-19: COVID-PACT. *Circulation*. 2022;146(18):1344-56.

107. Schulman S, Sholzberg M, Spyropoulos AC, Zarychanski R, Resnick HE, Bradbury CA, Broxmeyer L, Connors JM, Falanga A, Iba T, Kaatz S, Levy JH, Middeldorp S, Minichiello T, Ramacciotti E, Samama CM, Thachil J, International Society on Thrombosis and Haemostasis. ISTH guidelines for antithrombotic treatment in COVID-19. *J Thromb Haemost*. 2022;20(10):2214-25.



## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Kai Christian Jakobs, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Untersuchung der Thrombozytenfunktion bei hospitalisierten an COVID-19 erkrankten Patient\*innen; Investigation of platelet function in hospitalized patients suffering from COVID-19 selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Die Idee sowie wie Planung der Umsetzung der aktuellen Studie entstanden zusammen mit Prof. Dr. med. Ursula Rauch-Kröhnert, PD Dr. rer. nat. Nicolle Kränkel, PD Dr. med. Arash Haghikia und Leander Reinshagen. Wobei der Fokus der ersten beiden Genannten und mir auf der Untersuchung der Thrombozytenfunktion lag, der der letzten beiden auf der Interaktion/Veränderung des Darmmikrobioms, wie deren Effekte auf den Gesamtorganismus. Die der Publikation zugrundeliegenden Methoden wurden durch mich unter Rücksprache mit den ersten beiden genannten Beteiligten entworfen. Die Sammlung der Patient\*innenprobe erfolgte durch Leander Reinshagen, Dr. med. Anne-Christin Wilde-Haghikia, PD Dr. med. Arash Haghikia und Dr. med. Andi Rroku. An der Datenerhebung waren neben mir (Multiplate® (80%), Durchflusszytometrie Zellpanel/Multiplex, ELISA, Datenerhebung aus dem klinischen Informationssystem (100%)) auch Leander Reinshagen (Multiplate®), Marianna Puccini (Multiplate®), Dr. med. Andi Rroku (Multiplate®), Ayman Alsheik (Multiplate®), Kerstin Kamprath (Multiplate®) und Sabine Knüppel (Unterstützung bei Bedienung des Durchflusszytometers) beteiligt. Die Etablierung der Methodik wie Optimierung der Messungen sowie Umgang mit Fehlmessungen/Fehlerbehebung erfolgte - unter Anleitung von Prof. Dr. Ursula Rauch-Kröhnert und PD Dr. rer. nat. Nicolle Kränkel - durch mich. Die Erhebung von aus den Fallakten entnommenen Informationen (demografische Informationen, Vitalparameter, Vorerkrankungen, Medikation, Routinelaborwerte) erfolgte durch mich. Die Analyse der Daten erfolgte durch mich, abermals unter Supervision und Anleitung durch Prof. Dr. Ursula Rauch-Kröhnert (Charakteristika der Patient\*innen, Multiplate®/ELISA, SPSS) und PD Dr. rer. nat. Nicolle Kränkel (Durchflusszytometrie, R Studio). Die Anfertigung des Manuskripts für das Journal „Frontiers in Immunology“ sowie dieses Schriftstücks erfolgten durch mich, ersteres wurde durch alle beteiligten Autoren redigiert. Sämtliche Abbildungen (bis auf Figure 5 der Publikation in „Frontiers in Immunology“ und hieran angelehnte Abbildung 7 des Manteltextes) und Tabellen des Manteltextes sowie der zugrundeliegenden Publikation wurden durch mich erstellt. Genannte Figure 5 beziehungsweise Abbildung 7 wurde durch PD Dr. rer. nat. Nicolle Kränkel erstellt, nachdem die zugrundeliegende Korrelationsmatrix durch mich berechnet wurde. Der Manteltext wurde durch Prof. Dr. med. Ursula Rauch-Kröhnert und PD Dr. med. Julian Friebel redigiert.



# Disease Severity in Moderate-to-Severe COVID-19 Is Associated With Platelet Hyperreactivity and Innate Immune Activation

Kai Jakobs<sup>1,2</sup>, Leander Reinshagen<sup>1,2</sup>, Marianna Puccini<sup>1,2</sup>, Julian Friebel<sup>1,2,3</sup>, Anne-Christin Beatrice Wilde<sup>4</sup>, Ayman Alsheik<sup>1</sup>, Andi Rroku<sup>1,2</sup>, Ulf Landmesser<sup>1,2,3</sup>, Arash Haghikia<sup>1,2,3</sup>, Nicolle Kränkel<sup>1,2\*†</sup> and Ursula Rauch-Kröhnert<sup>1,2\*†</sup>

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Fabrice Cognasse,  
Santé Ingénierie Biologie (INSERM),  
France

### Reviewed by:

Sanjay B. Maggirwar,  
George Washington University,  
United States  
Wared Nour-Eldine,  
Qatar Biomedical Research Institute,  
Qatar

### \*Correspondence:

Ursula Rauch-Kröhnert  
ursula.rauch@charite.de  
Nicolle Kränkel  
nicolle.kraenkel@charite.de

<sup>†</sup>These authors have contributed  
equally to this work and share  
senior authorship

### Specialty section:

This article was submitted to  
Inflammation,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

**Received:** 28 December 2021

**Accepted:** 11 February 2022

**Published:** 11 March 2022

### Citation:

Jakobs K, Reinshagen L, Puccini M,  
Friebel J, Wilde A-CB, Alsheik A,  
Rroku A, Landmesser U, Haghikia A,  
Kränkel N and Rauch-Kröhnert U  
(2022) Disease Severity in Moderate-  
to-Severe COVID-19 Is Associated  
With Platelet Hyperreactivity and  
Innate Immune Activation.  
*Front. Immunol.* 13:844701.  
doi: 10.3389/fimmu.2022.844701

<sup>1</sup> Department of Cardiology, Charité University Medicine Berlin, Campus Benjamin Franklin, Berlin, Germany, <sup>2</sup> German Centre for Cardiovascular Research (DZHK), Partner Site Berlin, Berlin, Germany, <sup>3</sup> Berlin Institute of Health (BIH), Berlin, Germany, <sup>4</sup> Department of Hepatology and Gastroenterology, Charité University Medicine Berlin, Campus Virchow, Berlin, Germany

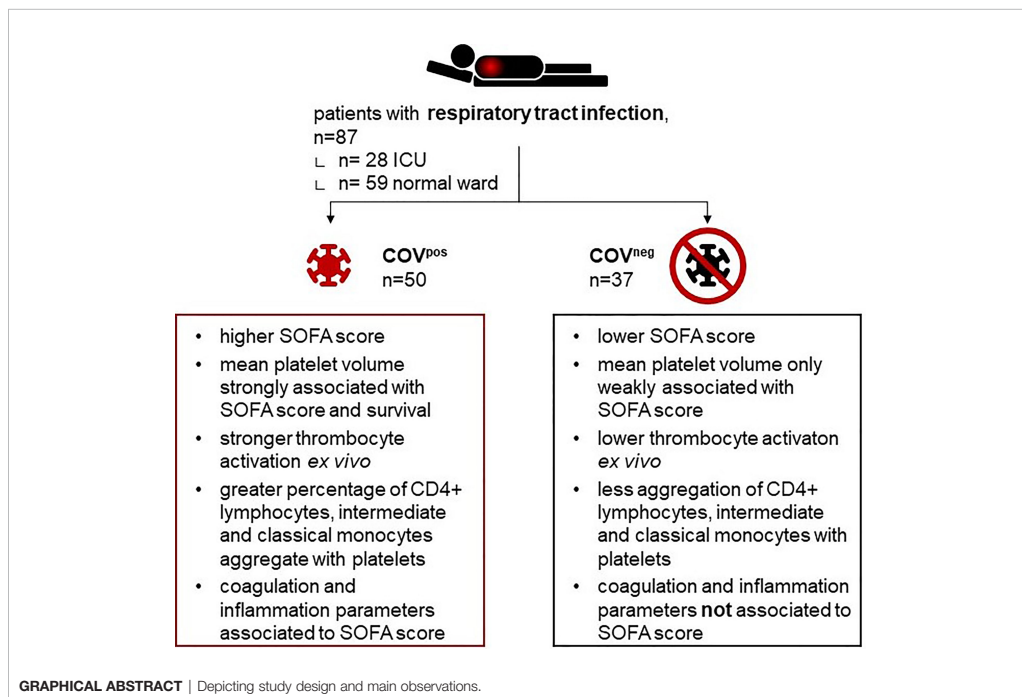
**Background:** Hemostasis and inflammation are both dysregulated in patients with moderate-to-severe coronavirus disease 2019 (COVID-19). Yet, both processes can also be disturbed in patients with other respiratory diseases, and the interactions between coagulation, inflammation, and disease severity specific to COVID-19 are still vague.

**Methods:** Hospitalized patients with acute respiratory symptoms and with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV2)-positive (COV<sup>POS</sup>) and SARS-CoV2-negative (COV<sup>NEG</sup>) status were included. We assessed adenosine diphosphate (ADP)-, thrombin receptor activator peptide 6 (TRAP)-, and arachidonic acid (AA)-induced platelet reactivity by impedance aggregometry, as well as leukocyte subtype spectrum and platelet-leukocyte aggregates by flow cytometry and inflammatory cytokines by cytometric bead array.

**Results:** ADP-, TRAP-, and AA-induced platelet reactivity was significantly higher in COV<sup>POS</sup> than in COV<sup>NEG</sup> patients. Disease severity, assessed by sequential organ failure assessment (SOFA) score, was higher in COV<sup>POS</sup> than in COV<sup>NEG</sup> patients and again higher in deceased COV<sup>POS</sup> patients than in surviving COV<sup>POS</sup>. The SOFA score correlated significantly with the mean platelet volume and TRAP-induced platelet aggregability. A larger percentage of classical and intermediate monocytes, and of CD4<sup>POS</sup> T cells (T<sub>H</sub>) aggregated with platelets in COV<sup>POS</sup> than in COV<sup>NEG</sup> patients. Interleukin (IL)-1 receptor antagonist (RA) and IL-6 levels were higher in COV<sup>POS</sup> than in COV<sup>NEG</sup> patients and again higher in deceased COV<sup>POS</sup> patients than in surviving COV<sup>POS</sup>. IL-1RA and IL-6 levels correlated with the SOFA score in COV<sup>POS</sup> but not in COV<sup>NEG</sup> patients. In both respiratory disease groups, absolute levels of B-cell-platelet aggregates and NK-cell-platelet aggregates were correlated with *ex vivo* platelet aggregation upon stimulation with AA and ADP, respectively, indicating a universal, but not a COVID-19-specific mechanism.

**Conclusion:** In moderate-to-severe COVID-19, but not in other respiratory diseases, disease severity was associated with platelet hyperreactivity and a typical inflammatory signature. In addition to a severe inflammatory response, platelet hyperreactivity associated to a worse clinical outcome in patients with COVID-19, pointing to the importance of antithrombotic therapy for reducing disease severity.

**Keywords:** COVID-19, platelet hyperactivity, immunothrombosis, inflammation, platelet-leucocyte aggregates, disease severity, survival



## INTRODUCTION

The coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic, caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV2), continues to affect humans all around the world (1). While vaccinations have greatly helped to lower the number of patients admitted to intensive care with severe COVID-19, newly emerging SARS-CoV-2 variants and refusal to receive vaccination in some countries still heavily fill ICU wards (2).

Acute dysregulations in hemostasis and inflammation are prominent features of patients with moderate-to-severe COVID-19 (3). Thrombi have been detected in the lung, heart, brain, and liver of COVID-19 patients, and the prevalence of deep vein thrombosis in hospitalized patients with an infection is

significantly increased (4–6). Microthrombosis, also extensively documented by autopsy reports, reflects the increased platelet activation and subsequent fibrin clot formation in the pulmonary microvasculature in 80%–100% of lungs examined (7). The increased risk of thromboembolic events observed during moderate-to-severe COVID-19 is associated with the increased morbidity and mortality of these patients (8, 9).

Upon stimulation with thrombin, platelets from patients with COVID-19 released more interleukin (IL)-1 $\beta$  and soluble cluster of differentiation 40 ligand (sCD40L) than platelets of healthy controls (4). Moreover, lower amounts of thrombin were required for platelets from COVID-19 patients to achieve aggregation than for platelets from healthy controls, further suggesting that these platelets have an increased hyperactive

potential, contributing to the overall inflammation often observed during the infection with SARS-CoV2 (10). Platelet-specific granule content, including platelet factor 4 (PF4) and serotonin was significantly elevated in the plasma of patients with COVID-19 (11, 12).

Crosstalk between platelets and the immune system involves a variety of mechanisms (13, 14). Beyond paracrine mechanisms, platelets can also form aggregates with various leukocyte subtypes, such as neutrophils, monocytes, and T cells (11, 14, 15). Platelet-leukocyte aggregates have been suggested to drive vascular disease and may potentially represent a biomarker for thrombotic events (9, 16).

Increased levels of IL-6 and C-reactive protein (CRP) are associated with a worse outcome from COVID-19, suggesting that inflammation contributes as a critical mediator to the heightened mortality of those patients (17, 18).

The actual processes governing interactions between platelets, coagulation, and inflammation in COVID-19 are still not well known. In particular, knowledge about distinct immunothrombotic pathways in COVID-19 which may differ from other infectious respiratory diseases is limited. Importantly, subjects without acute respiratory symptoms, such as healthy persons or patients without any respiratory symptoms have been chosen as control groups in many clinical studies (15, 19–21). While these comparisons give valuable first insight, similar mechanisms might be active in COVID-19 and in other respiratory diseases (22). Thus, there is still a lack of knowledge about the typical features that characterize the patients with acute respiratory syndromes caused by COVID-19 as compared with those with non-COVID-19-associated acute respiratory infections.

## MATERIAL AND METHODS

### Study Design and Subjects

All patients that were included into this study were admitted to our clinic due to acute respiratory infectious disease. COV<sup>POS</sup> had to be SARS-CoV2 positive confirmed by polymerase chain reaction (PCR) testing. COV<sup>NEG</sup> suffered from pneumonia or infect-triggered acute exacerbation of COPD and had to be SARS-CoV2 negative confirmed by PCR. Individuals had to be at least 18 years old and did not suffer from a known hematological or hemostatic disease, coagulopathy, or acute bleeding event. Patients from ICU or normal floor were eligible. Dual antiplatelet therapy was prohibited. Patients were recruited between May 2020 and May 2021. Routinely clinically assessed blood values were determined by the hospital laboratory (Labor Berlin, Berlin, Germany). Mean platelet volume is assessed by the routine diagnostics lab by impedance-based particle counting. Within the same measurement, counts and size of platelets, as well as erythrocytes and leukocytes, are assessed in diluted samples and without lysis. Leukocyte counts are assessed in a separate measurement after erythrocyte lysis. The study was approved by the local ethics committee (EA2/066/20, EA4/147/15). The study was conducted in compliance with the 1964 Declaration of Helsinki and its amendments and the

Principles of Good Clinical Practice by the International Council for Harmonization 1996.

### Blood Sampling

Blood was drawn from the cubital veins using ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (3 ml, Vacurette<sup>®</sup>, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria), citrate (3 ml, 3.2% sodium citrate, Vacurette<sup>®</sup>, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria), and hirudin tubes (Sarstedt-Monovette<sup>®</sup>, Sarstedt, Nümbrecht, Germany). Whole blood was separated for the experiments requiring plasma by centrifugation (1,200×g, 10 min, room temperature) and stored at  $-80^{\circ}$  for further analysis.

### Multiple Electrode Aggregometry

In hirudinized whole blood which was previously diluted with 0.9% sodium chloride, platelet's reactivity to TRAP (32  $\mu$ mol/l), ADP (6.4  $\mu$ mol/l), and AA (0.5 mmol/l) was measured by multiple electrode aggregometry (MEA; Multiplate<sup>®</sup> Analyzer; Roche, Germany; reagents also by Roche) not later than 3 h after sampling. According to the manufacturers' instructions, a measurement time of 6 min was set, and the area under the curve was calculated and translated to Multiplate<sup>®</sup>-specific units. The exact method was reported previously (23, 24).

### Flow Cytometric Quantification of Leukocytes and Platelet-Leukocyte Aggregates

Flow cytometric characterization of leukocytes was performed as previously established (25). Within 1 h of collection, 100  $\mu$ l of EDTA-anticoagulated whole blood was added to a master mix consisting of 100  $\mu$ l fluorescence-activated cell scanning (FACS) staining buffer (BioLegend, San Diego, CA, USA) and 2  $\mu$ l of each of the following antibodies: anti-human CD14-Pacific Blue<sup>™</sup>, CD16-Brilliant Violet 510<sup>™</sup>, CD4-Brilliant Violet 605<sup>™</sup>, CD45-Brilliant Violet 711<sup>™</sup>, CD3-Alexa Fluor 488<sup>™</sup>, CD26-PE, CD19-PE/Dazzle 594<sup>™</sup>, CD8-PE/Cyanine7, and CD41-Alexa Fluor 647<sup>™</sup> (all BioLegend, San Diego, CA, USA). The mixture was incubated in the dark at room temperature for 30 min. Stained samples were fixed by adding 800  $\mu$ l of 0.5% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and kept at  $+4^{\circ}$ C in the dark. Samples were acquired on an Attune NxT Acoustic Focusing Cytometer (ThermoFisherScientific, Waltham, MA, USA) within 3 days. Stability of signal detection was verified and documented by daily measurements of Attune Performance tracking beads. Kaluza version 2.1 software (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) was used for gating. Scatter parameters were interpreted as measures of morphological features, i.e., side scatter as a measure of granularity and forward scatter as a measure of cell size.

### Cytokine Measurements

The cytokines IL-1RA, IL-2, IL-6, IL-7, IL-10, monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), chemokine (C-C motif) ligand (CCL) 3, chemokine (C-X-C Motif) ligand (CXCL) 8, CXCL10, interferon (IFN)- $\alpha$ 2, IFN- $\gamma$ , granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), and tumor necrosis factor alpha

(TNF- $\alpha$ ) were determined in platelet-depleted plasma samples using the “COVID-19 Cytokine Storm Panel 1” 13-plex bead array (BioLegend, San Diego, CA, USA) according to the manufacturer’s instructions. Data were acquired on the flow cytometer mentioned above and analyzed using Kaluza version 2.1 software.

## ELISA

Thrombin-antithrombin complex (TAT) ELISA (AssayPro, St. Charles, MO, USA) was performed according to manufacturer’s instructions and measured using the plate reader Tecan Infinite 200Pro (Tecan Group, Maennedorf, Switzerland).

## Statistics

All reported probability values are two sided, and a value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant. Median values and quartiles are reported, and nonparametric tests were used if not stated otherwise. If not stated differently, Mann–Whitney  $U$  test or Chi-squared test were used to evaluate differences between two groups. Correlations were calculated with Spearman’s test. For network building  $p < 0.01$  and  $r > 0.3$  or  $r < -0.3$  were used as cutoffs for showing connections. Statistics were calculated using SPSS Statistics, version 27 for Windows and macOS (IBM, Armonk, NY, USA) and R version 4.1.0 (2021-05-18). Graphs and networks were plotted using R within R Studio version 1.3.1093 (RStudio PBC, Boston, MA, USA).

## RESULTS

### Patients’ Characteristics

More patients in the COV<sup>neg</sup> group had chronic obstructive lung disease (Table 1). More patients had received prophylactic and less received intermediate-dose anticoagulation in the COV<sup>neg</sup> than COV<sup>pos</sup> cohort (Table 2). There was no difference in the frequency of patients receiving therapeutic dose anticoagulation (Table 2). Administration of oral glucocorticoids and inhalative bronchodilators was more common in COV<sup>pos</sup> (Table 2). In

COV<sup>pos</sup>, 10 out of 50 individuals died compared with none in COV<sup>neg</sup> patients. The sequential organ failure assessment (SOFA) score was calculated for all patients with sufficient data (COV<sup>pos</sup>  $n = 33$ , COV<sup>neg</sup>  $n = 21$ ). Laboratory parameters did not differ significantly between COV<sup>neg</sup> and COV<sup>pos</sup> patients (Table 3). Four COV<sup>pos</sup> patients and two COV<sup>neg</sup> patients had thrombocytopenia as defined by  $<150$  thrombocytes/nL. No patient participating on our study had received vaccination against SARS-CoV2 prior to study participation.

### Higher Platelet Reactivity in Patients With COVID-19 Is Associated With Disease Severity and Death

Platelets from COV<sup>pos</sup> patients exhibited higher TRAP-induced aggregability than platelets from COV<sup>neg</sup> patients (Figure 1A). As TRAP is a strong coagulation stimulus, this observation points to the hyperaggregability of platelets under stimulation with a thrombin-substitute in COVID-19. ADP-induced platelet aggregability was also increased COV<sup>pos</sup> as compared with COV<sup>neg</sup> patients (Figure 1B), although ADP is a much weaker platelet agonist than TRAP. Additionally, also AA-induced platelet aggregation was higher in COV<sup>pos</sup> than COV<sup>neg</sup> patients (Figure 1C). No significant differences between COV<sup>pos</sup> and COV<sup>neg</sup> patients were observed for platelet counts or MPV (Supplemental Figure 1).

Since TAT is a surrogate parameter for thrombin generation and thrombin is the strongest known platelet activator (26), TAT was quantified in both patient groups. Higher TAT levels were measured in COV<sup>pos</sup> than COV<sup>neg</sup> patients, reflecting the linkage between higher platelet reactivity and activated coagulation system (Figure 2).

In our study, SOFA score values differed significantly between COV<sup>pos</sup> and COV<sup>neg</sup> (Figure 3A) and between COV<sup>surv</sup> and COV<sup>non-surv</sup> patients (Figure 3B). MPV was higher in COV<sup>non-surv</sup> compared with COV<sup>surv</sup> patients (Figure 3C). MPV- (Figure 3D) and TRAP-6-induced platelet aggregation (Figure 3E) correlated positively with the SOFA score values only in COV<sup>pos</sup> but not in COV<sup>neg</sup> patients. These findings point

TABLE 1 | Patient characteristics—demographics and preexisting conditions.

	COV <sup>neg</sup> (n = 37)	COV <sup>pos</sup> (n = 50)	Mann–Whitney U or Chi-squared test
<b>Demographics</b>			
Age (years)	73 (58; 81)	69 (54.8; 76.5)	0.078
Men (% per group)	57%	70%	0.259
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25.1 (23.2; 29.3)	28.7 (24.7; 76.5)	0.1030
Patients on ICU (% per group)	22%	40%	0.104
Respiratory rate (breaths per minute)	18 (16.25; 19)	18.7 (18; 21.3)	0.078
Heart rate (beats per minute)	77 (70; 88.5)	81.5 (72.8; 94.8)	0.259
Systolic blood pressure (mmHg)	131 (116; 149.5)	123.5 (110; 140)	0.103
Diastolic blood pressure (mmHg)	75 (66; 85.5)	70 (60; 80)	0.141
<b>Preexisting conditions</b>			
Coronary artery disease (% per group)	32.4%	14%	0.065
Arterial hypertension (% per group)	67.6%	62%	0.655
Diabetes (% per group)	48.6%	58%	0.632
Dyslipidemia (% per group)	29.7%	28%	1
COPD (% per group)	35.1%	6%	0.001

Data about demographics and preexisting conditions of COV<sup>pos</sup> and COV<sup>neg</sup> absolute numbers or median values with quartiles are shown.

**TABLE 2** | Patient characteristics—concomitant medication.

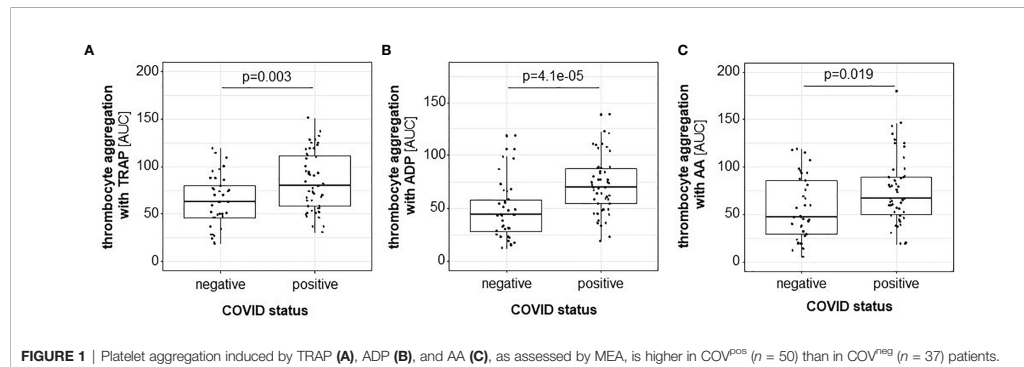
	COV <sup>neg</sup> (n = 37)	COV <sup>pos</sup> (n = 50)	Mann-Whitney U or Chi-squared test
Acetylsalicylic acid (% per group)	32.4%	36%	0.821
Clopidogrel (% per group)	0%	4%	0.505
Prophylactic anticoagulation (% per group)	56.8%	24%	0.003
Intermediate dose anticoagulation (% per group)	8.1%	32%	0.009
Therapeutic dose anticoagulation (% per group)	35.1%	44%	0.51
Statins (% per group)	24.3%	24%	1
ACE blocker (% per group)	35.1%	24%	0.339
Angiotensin II receptor blocker (% per group)	16.2%	22%	0.591
Beta blocker (% per group)	46%	28%	0.113
Aldosterone antagonist (% per group)	13.5%	6%	0.277
Diuretics (% per group)	50%	38%	0.383
Oral glucocorticoids (% per group)	19%	56%	0.001
Remdesivir (% per group)	0%	2%	1
Tocilizumab (% per group)	0%	2%	1
Inhalative bronchodilators (% per group)	59.5%	84%	0.014

Data about concomitant medication of COV<sup>pos</sup> and COV<sup>neg</sup> in absolute numbers are shown.

**TABLE 3** | Patient characteristics—laboratory values.

	COV <sup>neg</sup> (n = 37)	COV <sup>pos</sup> (n = 50)	Mann-Whitney U or Chi-squared test
Creatinine (mg/dl)	0.94 (0.79; 1.3)	0.90 (0.66; 1.16)	0.354
Urea (mg/dl)	34 (24.5; 52.5)	48 (27.3; 64.5)	0.164
NT-proBNP (ng/l)	468 (251; 2318)	498 (125; 1834)	0.499
CRP (mg/dl)	62.1 (37.7; 103.5)	69.8 (18.9; 126.9)	0.880
Hemoglobin (g/dl)	11.7 (10.1; 13.4)	10.9 (9.3; 21.4)	0.140
Leukocytes (n/nl)	9.3 (6.7; 11.8)	8.5 (6.8; 12.6)	0.837
Lymphocytes (n/nl)	1.22 (0.87; 1.96)	1.06 (0.74; 1.50)	0.214
Lymphocytes (% of leukocytes)	12 (9.7; 23.2)	13.2 (8; 18.1)	0.508
Thrombocytes (n/pl)	279 (209; 321)	300.5 (247; 397)	0.057
Mean platelet volume (fl)	10.3 (9.7; 10.9)	10.4 (9.8; 11.6)	0.269
INR	1.07 (1.00; 1.25)	1.12 (1.05; 1.21)	0.307
aPPT (s)	36.4 (31.4; 43.3)	38.8 (32.8; 47.5)	0.435

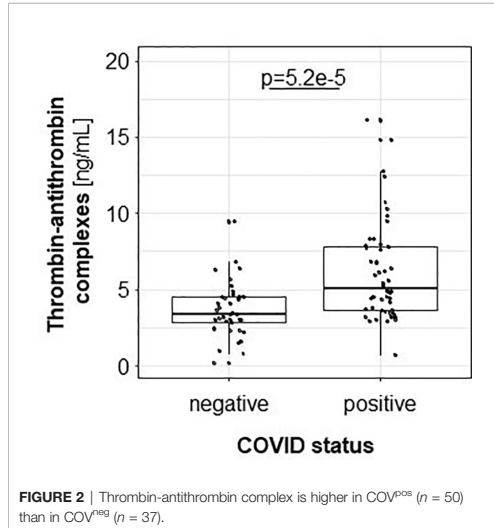
Data about laboratory values of COV<sup>pos</sup> and COV<sup>neg</sup> in median values with quartiles are shown.



to an important role of platelet function for the clinical prognosis of patients suffering from COVID-19. Instead, levels of individual leukocyte subtype aggregates with platelets did not correlate with SOFA score in COV<sup>pos</sup> or in COV<sup>neg</sup> patients.

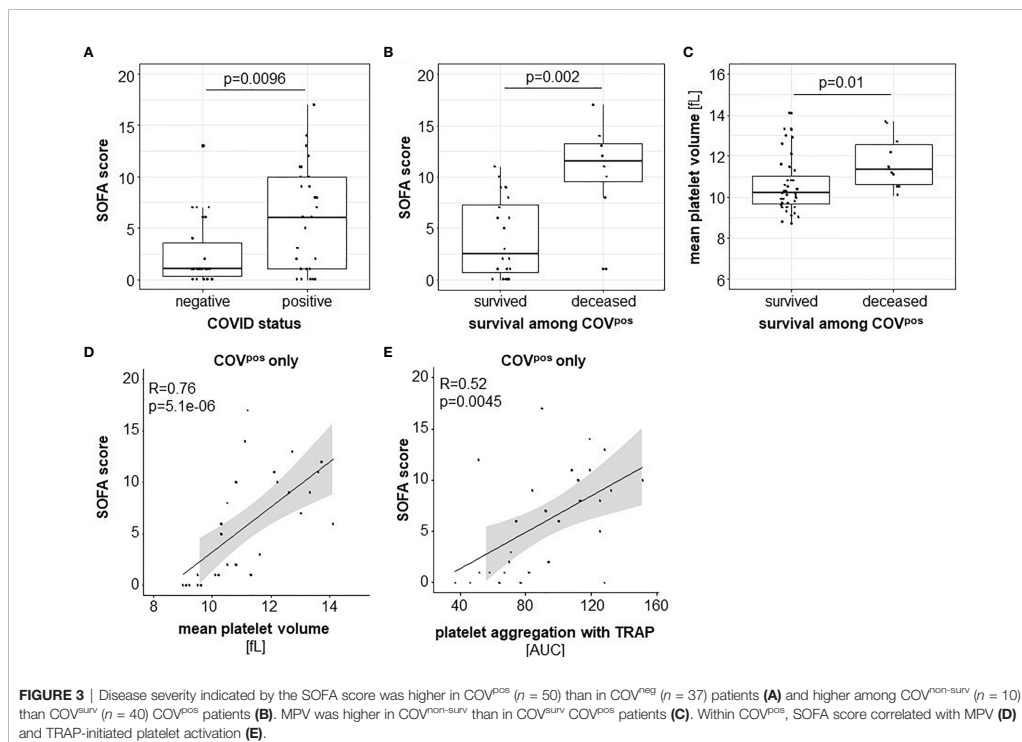
### Inflammation Characteristics Related to COVID-19 and Clinical Outcome

We observed more than 2-fold higher plasma levels of IL-6, IL-7, IL-10, IL-1RA, MCP1, and CXCL10 in COV<sup>pos</sup> as compared with

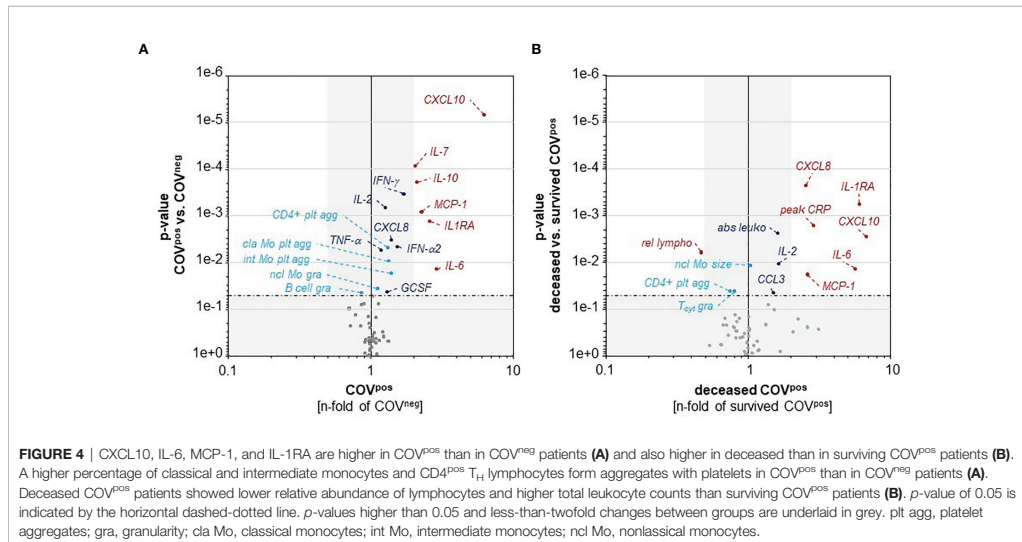


COV<sup>NEG</sup> patients, pointing to the severe cytokine burst (**Figure 4A**). The cytokines IL-2, CXCL8, IFN- $\alpha$ 2, IFN- $\gamma$ , GCSF, and TNF- $\alpha$  were less than 2-fold higher in COV<sup>POS</sup> in comparison with COV<sup>NEG</sup> patients (**Figure 4A**). Moreover, a higher percentage of CD4<sup>POS</sup> T<sub>H</sub> lymphocytes, CD14<sup>HI</sup>CD16<sup>NEG</sup> classical monocytes, and CD14<sup>HI</sup>CD16<sup>POS</sup> intermediate monocytes formed aggregates with platelets in COV<sup>POS</sup> as compared with COV<sup>NEG</sup> patients (**Figure 4A** and **Supplemental Figure 2**). The granularity of CD14<sup>LO</sup>CD16<sup>POS</sup> nonclassical monocytes was higher and the granularity of CD19<sup>POS</sup> B lymphocytes was lower in COV<sup>POS</sup> in comparison with COV<sup>NEG</sup> (**Figure 4A** and **Supplemental Figure 2**), potentially indicating a differential activation state of these cell types.

Within the COV<sup>POS</sup> group, we also compared our panel of inflammatory parameters between COV<sup>SURV</sup> and COV<sup>NON-SURV</sup> patients (**Figure 4B**). Values of IL-6, IL-1RA, CXCL8, MCP1, and CXCL10 were over 2-fold higher in COV<sup>NON-SURV</sup> than in COV<sup>SURV</sup>. Moreover, lower relative lymphocyte abundance and higher absolute leukocyte count, IL-2, and CCL3 levels were observed in the COV<sup>NON-SURV</sup> versus COV<sup>SURV</sup> patients. In COV<sup>NON-SURV</sup> patients, the granularity of CD8<sup>POS</sup> cytotoxic T cells as well as the percentage of T<sub>H</sub> cells forming aggregates with platelets were lower than in COV<sup>SURV</sup> patients.







### SOFA Score Correlated With Typical Markers of Platelet Reactivity and Inflammation in COVID-19 Only

Correlations between the SOFA score, parameters of platelet function, and inflammation are visualized by networks for patients with COVID-19 (Figure 5A), with other respiratory disease (Figure 5B), and for parameters correlated in both cohorts to elucidate common effects (Supplemental Figure 3).

In COV<sup>pos</sup> patients, the SOFA score correlated with CRP at the time of blood sampling, peak CRP level during hospital stay, leukocyte count, and MPV- and TRAP-induced platelet aggregation. Peak CRP level during hospital stay was strongly correlated with platelet aggregation after stimulation with TRAP-6 and AA (Figure 5A). Moreover, IL-6 was correlated with MPV, platelet aggregation after stimulation with TRAP-6 and AA in COV<sup>pos</sup> but not in COV<sup>neg</sup> patients (Figures 5A, B). In contrast to COV<sup>pos</sup>, only peak CRP but no platelet function marker correlated with the SOFA score in COV<sup>neg</sup> patients (Figure 5B). Correlation between SOFA and peak CRP was much stronger in COV<sup>pos</sup> than in the COV<sup>neg</sup> group (Supplemental Figure 3). These findings support a link between characteristic markers of inflammation and platelet reactivity and SOFA score for patients with COVID-19 but not for those with other acute respiratory diseases. This panel of characteristic markers is associated with the clinical outcome in COVID-19.

In both patient groups with respiratory symptoms, platelet aggregation upon stimulation with ADP or with AA correlates with the absolute number of platelet aggregates formed with B lymphocytes and with NK cells, respectively (Supplemental Figure 3).

### DISCUSSION

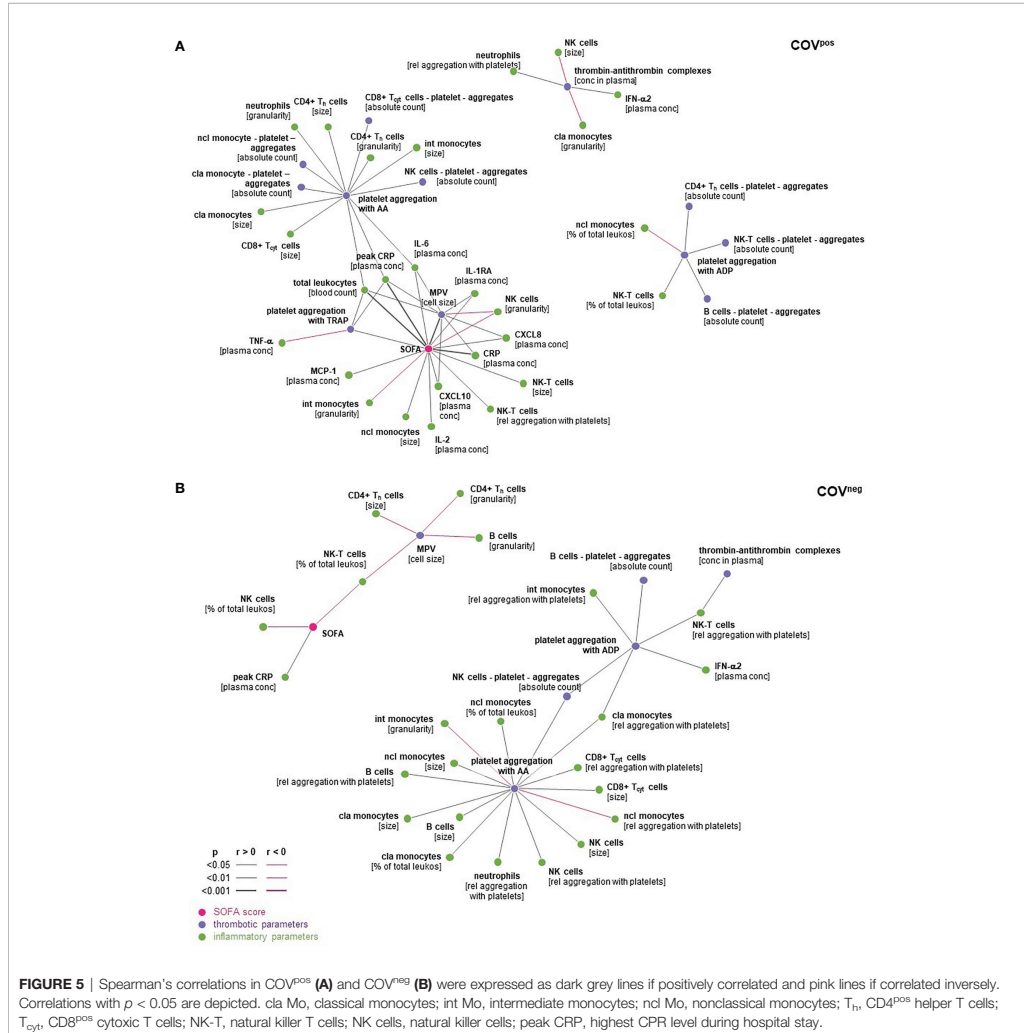
The central findings of our study are as follows:

- The platelet reactivity is higher in COV<sup>pos</sup> than in COV<sup>neg</sup> patients with an acute respiratory disease and is associated with higher mortality in COV<sup>pos</sup> patients.
- A higher percentage of T<sub>H</sub> lymphocytes and classical and intermediate monocytes form aggregates with platelets in COV<sup>pos</sup> than in COV<sup>neg</sup> patients.
- The SOFA score as a measure for the clinical outcome strongly correlates with markers of platelet hyperreactivity, CRP, and leukocyte count in COV<sup>pos</sup> but not in COV<sup>neg</sup> patients.

These findings suggest a relation between increased markers of platelet reactivity, inflammation, and the clinical outcome for patients with COVID-19 but not for those with other acute respiratory diseases.

### Higher Platelet Reactivity Relates to Survival in Patients With COVID-19

We demonstrated higher platelet reactivity measured by MEA in COVID-19 compared with patients with other acute respiratory disease. Less ADP- and TRAP-induced aggregation (20) and no significant differences for TRAP- and AA-induced aggregation compared with healthy volunteers or reference ranges (19) have previously been reported in patients hospitalized or receiving ICU-level care. Another study demonstrated a predictive value of ADP- and TRAP-induced platelet activation for the duration of the hospital stay (20). However, in these studies, COVID-19 patients were compared only with healthy controls but not with



diseased individuals. In our study, platelets of patients with COVID-19 reacted stronger to TRAP, ADP, and AA compared with those patients suffering from other pulmonary infections. In linkage between coagulation system and platelet hyperreactivity, we found TAT to be higher in COV<sup>POS</sup> than in COV<sup>NEG</sup> patients. Elevated thrombin level may explain the increased platelet reactivity as well as the higher numbers of platelet-leukocyte complexes despite antiplatelet therapy in patients with COVID-19.

Comparing COV<sup>surv</sup> and COV<sup>non-surv</sup> groups, we observed a higher MPV in COV<sup>non-surv</sup>, pointing to a hyperreactivity of

platelets *in vivo* (27). A retrospective analysis including patients hospitalized for COVID-19 also suggested that MPV relates to the clinical outcome (28). The SOFA score values predict disease severity and mortality in patients with COVID-19 (29, 30). Our data additionally link TRAP-induced platelet aggregation and MPV as markers of platelet reactivity with SOFA score. This once again stresses the important relation between hyperreactive platelets and disease severity.

In patients with COVID-19, thrombocytopenia has been shown to be associated with a worse clinical outcome (31). In our patients, we found four COV<sup>POS</sup> and two COV<sup>NEG</sup> individuals

presenting thrombocytopenia at the time point of platelet function measurement, reflecting the disease severity of our patient cohort.

### Cytokine Signature in COV<sup>pos</sup> Compared with COV<sup>neg</sup>

Cytokines typically associated with COVID-19-induced “cytokine storm” were mostly higher in COV<sup>pos</sup> compared with COV<sup>neg</sup>, verifying earlier reports and also in comparison with patients with non-COVID-19 respiratory diseases (32–34). Regarding disease severity, we observed higher levels of IL-6, IL-1RA, MCP1, CXCL8, and CXCL10 comparing COVID survivors and nonsurvivors. MCP1 and CXCL10 as chemotactic agents for monocytes and CXCL8 and CXCL10 as monocyte-derived cytokines point to the central role of monocytes in this setting (35). IL-6 as cytokine amplifier is known to play a prognostic role in COVID-19 (35). IL-1RA antagonizes IL-1 and can also be derived from monocytes (36). Plasma values of IL-1RA correlate with a worse clinical prognosis in COVID-19 (36). Within our COVID cohort, nonsurvivors were characterized by higher cytokine levels, especially IL-1RA, IL-6, MCP-1, CXCL8, and CXCL10 than patients who survived COVID-19.

### Differential Leukocyte-Platelet Aggregate Formation in COV<sup>pos</sup> Compared With COV<sup>neg</sup>

In COVID-19, monocytes have been shown to release procoagulant proteins in a platelet-dependent manner (22). In line with other studies, we here demonstrate differences in monocyte-platelet conjugates in comparison with patients with acute respiratory diseases other than COVID-19. We found a higher proportion of classical and intermediate monocyte-platelet aggregates in COV<sup>pos</sup> compared with COV<sup>neg</sup>. These findings are in line with data of other studies, which also demonstrated more platelet aggregates with monocytes in patients with COVID-19 compared with healthy individuals (15, 37) or not further specified patients as controls (22). This points to the importance of the innate immune system interacting with platelets in COVID-19.

In this study, more T<sub>H</sub> lymphocytes formed aggregates with platelets in COV<sup>pos</sup> than in COV<sup>neg</sup> patients. These conjugates seem to have proinflammatory effects in autoimmune neuroinflammation (38). Further research is needed to elucidate the interplay between T<sub>H</sub> cells and platelets, explaining its relevance for COVID-19.

Granularity of B cells was lower in COV<sup>pos</sup> than COV<sup>neg</sup>, potentially indicating release of synthesized proteins—presumably immunoglobulins—from B cells surpasses synthesis within the cell. Similarly, granularity of CD8<sup>pos</sup> T<sub>cyt</sub> lymphocytes was lower in COV<sup>non-surv</sup> than COV<sup>surv</sup>, also potentially reflecting a predominant degranulation in these patients, who died from COVID-19 (39). The lower relative lymphocyte abundance and higher leukocyte count in those patients who died confirm previous findings (40).

### The SOFA Score Correlates With Platelet Hyperreactivity and Inflammatory Markers in COV<sup>pos</sup> But Not in COV<sup>neg</sup> Patients—Clinical Implications

A positive correlation was observed between the SOFA score as marker for disease severity and CRP, leukocytes, and markers of platelet hyperreactivity in patients with COVID-19 only but not in those with acute respiratory disease of other reason. The peak CRP level correlated with AA- and TRAP-induced platelet aggregation and IL-6 with MPV, reflecting an interplay between platelet hyperreactivity and inflammation. Importantly, none of these relations could be demonstrated in COV<sup>neg</sup> patients.

Since platelet hyperreactivity contributes to worse clinical outcome in COVID-19, it is tempting to speculate that antiplatelet-directed therapies would improve the clinical prognosis. In a pandemic retrospective analysis, aspirin administration in patients with COVID-19 reduced the risk for mechanical ventilation, ICU admission, and in-hospital mortality (41). Within the RECOVERY trial, the aspirin group did show a significant reduction in hospital stay duration, thromboembolic events, and percentage of patients who had been discharged alive compared with best medical care in COVID-19 (42). These clinical data are in line with our experimental findings and highlight the clinical impact of platelet hyperreactivity on the clinical outcome, pointing to the importance of antithrombotic therapy in COVID-19.

## CONCLUSION

In moderate-to-severe COVID-19, but not in other respiratory diseases, we found features of platelet hyperreactivity to be relevant for the disease severity of the patients. Our data suggest that platelet hyperreactivity together with a heightened inflammation contributes to a worse clinical outcome in patients with COVID-19, thereby pointing to the importance of antithrombotic therapy for reducing disease severity. Further clinical investigations are warranted to make use of the above-described targets.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

## ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Ethikkommission der Charité - Universitätsmedizin Berlin. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception and design: KJ, UR-K, AH, and NK. Development of methodology: KJ, UR-K, and NK. Sample collection: A-CW, LR, AR, and AH. Acquisition of data: KJ, LR, MP, AR, and AA. Analysis and interpretation of data: KJ, UR-K, and NK. Writing: KJ. Review of the manuscript: UR-K, NK, MP, JF, A-CW, AR, AH, and UL. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## FUNDING

AH is participant in the BIH-Charité Advanced Clinician Scientist Pilotprogram, and JF is participant in the BIH-Charité Clinician Scientist both funded by the Charité -

## REFERENCES

- World Health Organization. *Weekly Epidemiological Update on COVID-19 - 21 December 2021* (2021). Available at: <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19-21-december-2021>.
- European Centre for Disease Prevention and Control. *Data on Hospital and ICU Admission Rates and Current Occupancy for COVID-19* (2021). Available at: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/download-data-hospital-and-icu-admission-rates-and-current-occupancy-covid-19>.
- Bonaventura A, Vecchie A, Dagna L, Martinod K, Dixon DL, Van Tassel BW, et al. Endothelial Dysfunction and Immunothrombosis as Key Pathogenic Mechanisms in COVID-19. *Nat Rev Immunol* (2021) 21(5):319–29. doi: 10.1038/s41577-021-00536-9
- Zhang L, Feng X, Zhang H, Jiang C, Mei H, Wang J, et al. Deep Vein Thrombosis in Hospitalized Patients With COVID-19 in Wuhan, China: Prevalence, Risk Factors, and Outcome. *Circulation* (2020) 142(2):114–28. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.046702
- McConnell MJ, Kondo R, Kawaguchi N, Iwakiri Y. Covid-19 and Liver Injury: Role of Inflammatory Endotheliopathy, Platelet Dysfunction, and Thrombosis. *Hepatol Commun* (2021) 6(2):255–69. doi: 10.1002/hep4.1843
- Qureshi AI, Baskett WI, Huang W, Shyu D, Myers D, Raju M, et al. Acute Ischemic Stroke and COVID-19: An Analysis of 27 676 Patients. *Stroke* (2021) 52(3):905–12. doi: 10.1161/STROKEAHA.120.031786
- McFadyen JD, Stevens H, Peter K. The Emerging Threat of (Micro) Thrombosis in COVID-19 and Its Therapeutic Implications. *Circ Res* (2020) 127(4):571–87. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.120.317447
- Guo T, Fan Y, Chen M, Wu X, Zhang L, He T, et al. Cardiovascular Implications of Fatal Outcomes of Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *JAMA Cardiol* (2020) 5(7):811–8. doi: 10.1001/jamacardio.2020.1017
- Canzano P, Brambilla M, Porro B, Cosentino N, Tortorici E, Vicini S, et al. Platelet and Endothelial Activation as Potential Mechanisms Behind the Thrombotic Complications of COVID-19 Patients. *JACC Basic Transl Sci* (2021) 6(3):202–18. doi: 10.1016/j.jacbs.2020.12.009
- Zaid Y, Puhm F, Allaey I, Naya A, Oudghiri M, Khalki L, et al. Platelets Can Associate With SARS-Cov-2 RNA and Are Hyperactivated in COVID-19. *Circ Res* (2020) 127(11):1404–18. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.120.317703
- Koupenova M, Clancy L, Corkrey HA, Freedman JE. Circulating Platelets as Mediators of Immunity, Inflammation, and Thrombosis. *Circ Res* (2018) 122(2):337–51. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.310795
- Cloutier N, Pare A, Farndale RW, Schumacher HR, Nigrovic PA, Lacroix S, et al. Platelets can Enhance Vascular Permeability. *Blood* (2012) 120(6):1334–43. doi: 10.1182/blood-2012-02-413047
- Hottz ED, Quirino-Teixeira AC, Merij LB, Pinheiro MBM, Rozini SV, Bozza FA, et al. Platelet-Leukocyte Interactions in the Pathogenesis of Viral Infections. *Platelets* (2021) 33(2):1–8. doi: 10.1080/09537104.2021.1952179
- Tschoepe D, Rauch U, Schwippert B. Platelet-Leukocyte-Cross-Talk in Diabetes Mellitus. *Horm Metab Res* (1997) 29(12):631–5. doi: 10.1055/s-2007-979115
- Manne BK, Denorme F, Middleton EA, Portier I, Rowley JW, Stubben C, et al. Platelet Gene Expression and Function in Patients With COVID-19. *Blood* (2020) 136(11):1317–29. doi: 10.1182/blood.2020007214
- Sefer D, Miljic P, Kraguljac-Kurtovic N, Bizic-Radulovic S, Bogdanovic A, Knezevic V, et al. Correlation Between Leukocyte-Platelet Aggregates and Thrombosis in Myeloproliferative Neoplasms. *Int J Lab Hematol* (2021). doi: 10.1111/ijlh.13754
- Santa Cruz A, Mendes-Frias A, Oliveira AI, Dias L, Matos AR, Carvalho A, et al. Interleukin-6 Is a Biomarker for the Development of Fatal Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Pneumonia. *Front Immunol* (2021) 12:613422. doi: 10.3389/fimmu.2021.613422
- Luan YY, Yin CH, Yao YM. Update Advances on C-Reactive Protein in COVID-19 and Other Viral Infections. *Front Immunol* (2021) 12:720363. doi: 10.3389/fimmu.2021.720363
- Heinz C, Miesbach W, Herrmann E, Sonntagbauer M, Raimann FJ, Zacharowski K, et al. Greater Fibrinolysis Resistance But No Greater Platelet Aggregation in Critically Ill COVID-19 Patients. *Anesthesiology* (2021) 134(3):457–67. doi: 10.1097/ALN.0000000000003685
- Bertolin AJ, Dalcoquio TF, Salsoso R, de MFRH, Kalil-Filho R, Hajjar LA, et al. Platelet Reactivity and Coagulation Markers in Patients With COVID-19. *Adv Ther* (2021) 38(7):3911–23. doi: 10.1007/s12325-021-01803-w
- Herrmann J, Notz Q, Schlesinger T, Stumpner J, Kredel M, Sitter M, et al. Point of Care Diagnostic of Hypercoagulability and Platelet Function in COVID-19 Induced Acute Respiratory Distress Syndrome: A Retrospective Observational Study. *Thromb J* (2021) 19(1):39. doi: 10.1186/s12959-021-00293-8
- Hottz ED, Azevedo-Quintanilha IG, Palhinha L, Teixeira L, Barreto EA, Pao CRR, et al. Platelet Activation and Platelet-Monocyte Aggregate Formation Trigger Tissue Factor Expression in Patients With Severe COVID-19. *Blood* (2020) 136(11):1330–41. doi: 10.1182/blood.2020007252
- Schuette C, Steffens D, Witkowski M, Stellbaum C, Bobbert P, Schultheiss HP, et al. The Effect of Clopidogrel on Platelet Activity in Patients With and Without Type-2 Diabetes Mellitus: A Comparative Study. *Cardiovasc Diabetol* (2015) 14:15. doi: 10.1186/s12933-015-0182-7
- Stellbaum C, Ayril Y, Morguet A, Schultheiss HP, Rauch U. Doubling the Clopidogrel Dose in Patients With Reduced Responsiveness to the Standard Dose Is Associated With a Limited Effectiveness as Evaluated by Impedance Aggregometry. *Cardiovasc Res* (2012) 13(3):159–66. doi: 10.1016/j.carrev.2012.02.009
- Leistner DM, Krankel N, Meteva D, Abdelwahed YS, Seppelt C, Stahl BE, et al. Differential Immunological Signature at the Culprit Site Distinguishes Acute Coronary Syndrome With Intact From Acute Coronary Syndrome With Ruptured Fibrous Cap: Results From the Prospective Translational OPTICO-ACS Study. *Eur Heart J* (2020) 41(37):3549–60. doi: 10.1093/eurheartj/ehaa703

26. Diquelou A, Lemozy S, Dupouy D, Boneu B, Sakariassen K, Cadroy Y. Effect of Blood Flow on Thrombin Generation Is Dependent on the Nature of the Thrombogenic Surface. *Blood* (1994) 84(7):2206–13. doi: 10.1182/blood.V84.7.2206.2206
27. Gasparyan AY, Ayvazyan L, Mikhailidis DP, Kitas GD. Mean Platelet Volume: A Link Between Thrombosis and Inflammation? *Curr Pharm Des* (2011) 17(1):47–58. doi: 10.2174/138161211795049804
28. Barrett TJ, Bilaloglu S, Cornwell M, Burgess HM, Virginio VW, Drenkova K, et al. Platelets Contribute to Disease Severity in COVID-19. *J Thromb Haemost* (2021) 19(12):3139–53. doi: 10.1111/jth.15534
29. Yang Z, Hu Q, Huang F, Xiong S, Sun Y. The Prognostic Value of the SOFA Score in Patients With COVID-19: A Retrospective, Observational Study. *Med (Baltimore)* (2021) 100(32):e26900. doi: 10.1097/MD.00000000000026900
30. Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, et al. Clinical Course and Risk Factors for Mortality of Adult Inpatients With COVID-19 in Wuhan, China: A Retrospective Cohort Study. *Lancet* (2020) 395(10229):1054–62. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30566-3
31. Zong X, Gu Y, Yu H, Li Z, Wang Y. Thrombocytopenia Is Associated With COVID-19 Severity and Outcome: An Updated Meta-Analysis of 5637 Patients With Multiple Outcomes. *Lab Med* (2021) 52(1):10–5. doi: 10.1093/labmed/lmaa067
32. Laing AG, Lorenc A, Del Molino Del Barrio I, Das A, Fish M, Monin L, et al. A Dynamic COVID-19 Immune Signature Includes Associations With Poor Prognosis. *Nat Med* (2020) 26(10):1623–35. doi: 10.1038/s41591-020-1038-6
33. de la Rica R, Borges M, Gonzalez-Freire M. COVID-19: In the Eye of the Cytokine Storm. *Front Immunol* (2020) 11:558898. doi: 10.3389/fimmu.2020.558898
34. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical Features of Patients Infected With 2019 Novel Coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* (2020) 395(10223):497–506. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5
35. Hojyo S, Uchida M, Tanaka K, Hasebe R, Tanaka Y, Murakami M, et al. How COVID-19 Induces Cytokine Storm With High Mortality. *Inflammation Regener* (2020) 40:37. doi: 10.1186/s41232-020-00146-3
36. Zhao Y, Qin L, Zhang P, Li K, Liang L, Sun J, et al. Longitudinal COVID-19 Profiling Associates IL-1RA and IL-10 With Disease Severity and RANTES With Mild Disease. *JCI Insight* (2020) 5(13):e139834. doi: 10.1172/jci.insight.139834
37. Le Joncour A, Biard L, Vautier M, Bugaut H, Mekinian A, Maalouf G, et al. Neutrophil-Platelet and Monocyte-Platelet Aggregates in COVID-19 Patients. *Thromb Haemost* (2020) 120(12):1733–5. doi: 10.1055/s-0040-1718732
38. Starosom SC, Veremeyko T, Yung AW, Dukhinova M, Au C, Lau AY, et al. Platelets Play Differential Role During the Initiation and Progression of Autoimmune Neuroinflammation. *Circ Res* (2015) 117(9):779–92. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306847
39. Rha MS, Shin EC. Activation or Exhaustion of CD8(+) T Cells in Patients With COVID-19. *Cell Mol Immunol* (2021) 18(10):2325–33. doi: 10.1038/s41423-021-00750-4
40. Huang G, Kovalic AJ, Graber CJ. Prognostic Value of Leukocytosis and Lymphopenia for Coronavirus Disease Severity. *Emerg Infect Dis* (2020) 26(8):1839–41. doi: 10.3201/eid2608.201160
41. Chow JH, Khanna AK, Kethireddy S, Yamane D, Levine A, Jackson AM, et al. Aspirin Use Is Associated With Decreased Mechanical Ventilation, Intensive Care Unit Admission, and In-Hospital Mortality in Hospitalized Patients With Coronavirus Disease 2019. *Anesth Analg* (2021) 132(4):930–41. doi: 10.1213/ANE.0000000000005292
42. Group RC. Aspirin in Patients Admitted to Hospital With COVID-19 (RECOVERY): A Randomised, Controlled, Open-Label, Platform Trial. *Lancet* (2021) 399(10320):143–51. doi: 10.1016/S0140-6736(21)01825-0

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

**Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Jakobs, Reinshagen, Puccini, Friebe, Wilde, Alsheik, Rroku, Landmesser, Haghikia, Kränkel and Rauch-Kröhmert. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## Komplette Publikationsliste

1. Rauch-Krohnert U, Puccini M, Placzek M, Beyer-Westendorf J, Jakobs K, Friebel J, Hein S, Seidel M, Pieske B, Massberg S, Witzernath M, Zeiher A, Friede T, Anker SD, Landmesser U. Initial therapeutic anticoagulation with rivaroxaban compared to prophylactic therapy with heparins in moderate to severe COVID-19: results of the COVID-PREVENT randomized controlled trial. *Clin Res Cardiol.* 2023.

**Impact Factor: 6.138**

2. Blöbaum L, Witkowski M, Wegner M, Lammel S, Schencke P-A, Jakobs K, Puccini M, Reißner D, Steffens D, Landmesser U, Rauch U, Friebel J. Intestinal Barrier Dysfunction and Microbial Translocation in Patients with First-Diagnosed Atrial Fibrillation. *Biomedicines.* 2023;11(1):176.

**Impact Factor: 4.757**

3. Friebel J, Witkowski M, Wegner M, Blöbaum L, Lammel S, Schencke P-A, Jakobs K, Puccini M, Reißner D, Steffens D, Moos V, Schutheiss H-P, Landmesser U, Rauch U. Cytotoxic CD8+ T Cells Are Involved in the Thrombo-Inflammatory Response during First-Diagnosed Atrial Fibrillation. *Cells.* 2023;12(1):141.

**Impact Factor: 7.666**

4. Jakobs K, Rauch U. Galectin-3 inhibitors as novel antithrombotic drugs with almost no bleeding risk: wishful thinking or a realistic vision? *Eur Heart J.* 2022 Oct 7;43(37):3575-3577.

**Impact Factor: 29.983**

5. Jakobs K, Reinshagen L, Puccini M, Friebel J, Wilde AB, Alsheik A, Rroku A, Landmesser U, Haghikia A, Kränkel N, Rauch-Kröhnert U. Disease Severity in Moderate-to-Severe COVID-19 Is Associated With Platelet Hyperreactivity and Innate Immune Activation. *Front Immunol.* 2022 Mar 11;13:844701.

**Impact Factor: 7.561**

6. Puccini M, Rauch C, Jakobs K, Friebel J, Hassanein A, Landmesser U, Rauch U. Being Overweight or Obese Is Associated with an Increased Platelet Reactivity Despite Dual Antiplatelet Therapy with Aspirin and Clopidogrel. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2022 Feb 25.

**Impact Factor: 3.727**

7. Friebel J, Moritz E, Witkowski M, Jakobs K, Strässler E, Dörner A, Steffens D,

Puccini M, Lammel S, Glauben R, Nowak F, Kränkel N, Haghikia A, Moos V, Schutheiss HP, Felix SB, Landmesser U, Rauch BH, Rauch U. Pleiotropic Effects of the Protease-Activated Receptor 1 (PAR1) Inhibitor, Vorapaxar, on Atherosclerosis and Vascular Inflammation. *Cells*. 2021 Dec 13;10(12):3517.

**Impact Factor: 4,366**

8. Witkowski M, Friebel J, Tabaraie T, Grabitz S, Dörner A, Taghipour L, Jakobs K, Stratmann B, Tschöepe D, Landmesser U, Rauch U. Metformin Is Associated with Reduced Tissue Factor Procoagulant Activity in Patients with Poorly Controlled Diabetes. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2021 Aug;35(4):809-813.

**Impact Factor: 4.063**



## Danksagung

Allen bereits in der Anteilserklärung genannten Kolleg\*innen danke ich für die freundliche, kollegiale und stets konstruktive Zusammenarbeit. Ohne Teamarbeit wäre dieses Projekt nicht möglich gewesen! Ganz besonders danke ich Frau Prof. Dr. med. Ursula Rauch-Kröhnert. Sie hat meine Forschungstätigkeit weit über die exzellente fachliche Betreuung hinaus unterstützt. Frau PD Dr. rer. nat. Nicolle Kränkel danke ich für ihren großen zeitlichen Einsatz sowie ihre hilfreichen Hinweise, die das Projekt bereichert haben. Herrn PD Dr. med. Julian Friebel danke ich für seine Unterstützung bei organisatorischen Aspekten des Projekts. Ohne unsere medizintechnischen Assistentinnen als Rückgrat unserer Laborarbeit wäre das Projekt nicht durchführbar gewesen. Dafür danke ich Frau Kerstin Kamprath und Frau Sabine Knüppel sehr. Herzlichen Dank auch Marianna Puccini für ihre stetige Unterstützung. Bedanken möchte ich mich auch beim gesamten Team der Klinik für Kardiologie und Angiologie des Campus Benjamin Franklin der Charité unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Ulf Landmesser; es war mir menschlich wie wissenschaftlich eine große Unterstützung.

Herzlich danken möchte ich meiner Familie, die mich in jeder Hinsicht unterstützt und motiviert hat. Meine Eltern, mein Bruder Mark und meine Freundin Hannah hatten immer ein offenes Ohr für mich.