

*AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR HERZ-, THORAX- UND HERZNAHE GEFÄSSCHIRURGIE
PROF. DR. MED. CHRISTOF SCHMID
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG*

*CHARAKTERISIERUNG ZELLULÄRER ABLAGERGUNGEN AUF
POLYMETHYL-PENTEN-GASKAPILLAREN NACH EXTRAKORPORALER
MEMBRANOXYGENIERUNG BEI AKUTEM LUNGEN- ODER HERZVERSEGGEN*

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Julius Günther Wilm

2016

*AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR HERZ-, THORAX- UND HERZNAHE GEFÄSSCHIRURGIE
PROF. DR. MED. CHRISTOF SCHMID
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG*

*CHARAKTERISIERUNG ZELLULÄRER ABLAGERGUNGEN AUF
POLYMETHYL-PENTEN-GASKAPILLAREN NACH EXTRAKORPORALER
MEMBRANOXYGENIERUNG BEI AKUTEM LUNGEN- ODER HERZVERSAGEN*

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Julius Günther Wilm

2016

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten Reichert
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Karla Lehle
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Otto Gleich
Tag der mündlichen Prüfung: 3. Mai 2016

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	3
1.1 Extrakorporale Membranoxygenierung	3
1.2 Risikoabschätzung und Komplikationen der ECMO-Unterstützung	9
1.3 Eigenschaften von Membranoxygenatoren	11
1.4 Endotheliale Progenitorzellen	13
1.5 Fragestellungen der vorliegenden Arbeit	15
2 Methoden	16
2.1 Untersuchungsmaterialien	16
2.2 Blutzellen und Endothelzellen	19
2.3 Durchflusszytometrie	24
2.4 Immunfluoreszenzfärbungen	26
2.5 Mikroskopie	39
2.6 Auswertung	46
2.7 Testung der Methodik anhand von HUVEC- / PBMC- Mischkulturen	52
2.8 Anwendung der Methodik auf Proben aus Membranoxygenatoren	56
2.9 Klinische Parameter	60
2.10 Statistische Methoden	61
3 Patienten und Oxygenatoren	62
4 Ergebnisse	65
4.1 Mikroskopischer Befund der Präparate	65
4.2 Bezug zu den klinischen Charakteristika	76
4.3 Auffällige Präparate aus den Bildpunktinformationen	103
5 Diskussion	110
5.1 Methodik	110
5.2 Klinik	116
6 Zusammenfassung	122
7 Anhang	123
7.1 Antigen-Antikörper-Reaktionen	123
7.2 Fluoreszenz	125
7.3 Image Processing Systems	127
7.4 Einstellung des Mikroskopes und der Software	130
7.5 Materialien	132
7.6 Präparierung der am Patienten eingesetzten Membranoxygenatoren	138
8 Literaturverzeichnis	141

Abkürzungsverzeichnis

ALI - *acute lung injury*

ARDS - *acute respiratory distress syndrome*

BMI – *body mass index*

CABG - koronare Bypassoperation (*coronary artery bypass grafting*)

CD - *cluster of differentiation*

CEC - zirkulierende Endothelzellen (*circulating endothelial cell*)

DAPI - 4',6-Diamidin-2-phenylindol

ECLS - *extracorporeal life support*

ECMO - extrakorporale Membranoxygenierung

EPC – endotheliale Progenitorzelle (*endothelial progenitor cell*)

FITC – Fluoresceinisothicyanat

HUVEC – *Endothelzelle aus der humanen Narbelschnurvene (human umbilical vein endothelial cell)*

ILA – *interventional lung assist*

MECC - *minimized extracorporeal circulation* -System

MO - Membranoxygenator

PBMC – Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood monocytic cell*)

PECLA - *pumpless extracorporeal lung assist*

PMP - Polymethylpenten

SGW - Schwellgrauwert

va-ECMO - venoarterielle extrakorporale Membranoxygenierung

vv-ECMO - venovenöse extrakorporale Membranoxygenierung

1 Einleitung

1.1 Extrakorporale Membranoxygenierung

Die extrakorporale Membranoxygenation stellt ein etabliertes intensivmedizinisches Verfahren des extrakorporalen Organersatzes dar, bei der, je nach Kanülierung, die pulmonale Funktion (ECMO) und / oder die kardiale Funktion (ECLS, *extracorporeal life support*) teilweise oder auch komplett übernommen wird. Die Therapie wird zur Versorgung von Patienten mit schwerstem Lungen- (ARDS, *acute respiratory distress syndrome*) und / oder Herz-Kreislauf-Versagen eingesetzt. Ein ARDS stellt ein schweres Krankheitsbild mit einer bilateralen Lungenschädigung dar und kann als Folge verschiedener Grunderkrankungen (z. B. Pneumonie, Aspiration, fulminante Sepsis, nekrotisierende Pankreatitis, Polytrauma) auftreten. Dabei ist ein effektiver Gasaustausch oft nur mit einer aggressiven, nicht lungen-protectiven mechanischen Beatmung, die selbst die Lungen schädigen kann, zu erreichen. Die extrakorporale Lungenunterstützung wird eingesetzt, um bei einer schweren Hypoxämie die Oxygenierung zu verbessern und bei einer respiratorischen Azidose eine Kohlendioxid (CO₂)-Abgabe wieder zu ermöglichen (Müller et al. 2013).

Es gibt pumpengetriebene (venovenöse (vv)- und venoarterielle (va)-ECMO) und pumpenlose Systeme (iLA, *interventional lung assist*). Der Standardaufbau der modernen vv-ECMO besteht aus einer Zentrifugal- oder Axialpumpe, einem Polymethylpenten (PMP)-Membranoxygenator (MO), und einer antithrombogenen Beschichtung (in der Regel Heparine). Die vv-ECMO wird bei einer schweren Hypoxämie mit der Notwendigkeit hoher Blutflüsse zum Erreichen einer ausreichenden Oxygenierung eingesetzt (Müller et al. 2013). Es erfolgt in der Regel die Kanülierung einer Femoralvene und die Rückführung in eine Jugularvene (Abbildung 1). Bei der va-ECMO wird Blut durch Kanülierung einer peripheren Vene entnommen, durch einen MO mit Sauerstoff (O₂) angereichert und durch eine Pumpe angetrieben einer Arterie wieder zugeführt. Diese Methode eignet sich besonders für Patienten mit einem kombinierten Herz-Lungen-Versagen, wird aber auch bei Patienten mit niedrigem kardialen Auswurf bei erhaltener Lungenfunktion angewandt, bei denen auch ein Links-Herz-Unterstützungssystem ohne MO eingesetzt werden könnte (Schmid et al. 2009). Beim pumpenlosen, kleineren iLA System ist die treibende Kraft für die Perfusion der arterielle Blutdruck. Das iLA-System wird in den Shunt zwischen einer Femoralarterie und einer kontralateralen Femoralvene eingefügt (Müller et al. 2013). Hierbei ist die Effektivität der CO₂-Elimination sehr viel höher als die Möglichkeit zur Oxygenierung, sodass diese

Variante bei Patienten mit schwerer respiratorischer Azidose, Hyperkapnie und normaler Auswurfleistung des Herzens angewandt wird (Schmid et al. 2009).

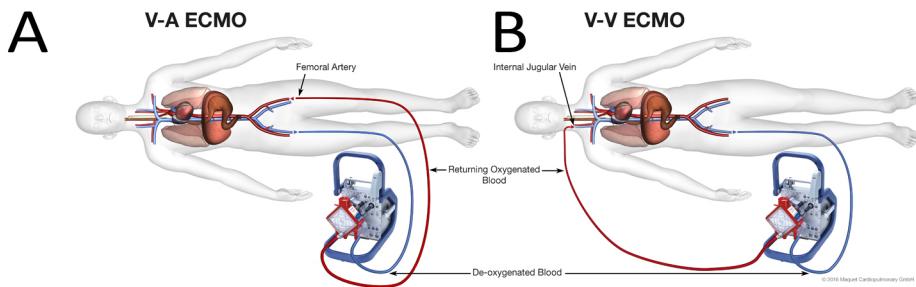


Abbildung 1 Venoarterielle und venovenöse ECMO-Systeme

(A) Aufbau einer venoarteriellen ECMO-Unterstützung: Blut wird angetrieben durch eine Pumpe der rechtsseitigen Femoralvene entnommen und nach Perfusion des Membranoxygenators dem Körper über eine linksseitige Femoralarterie wieder zugeführt (B) Aufbau eines venovenösen Unterstützungssystems: Blut wird der rechtsseitigen Femoralvene entnommen und nach Perfusion des Membranoxygenators über eine rechte Jugularvene wieder zurückgeführt. (Mit freundlicher Genehmigung von Maquet Cardiopulmonary GmbH).

1.1.1 Historische Entwicklung von Membranoxygenatoren

Ursprünglich wurden MOs für den Einsatz in der offenen Herz-Chirurgie entwickelt und erst später für die Langzeitbehandlung im Rahmen einer ECMO-Therapie eingesetzt. Bei den ersten MOs (Mayo-Gibbon-Pump-Oxygenator, Kay-Cross-Disc-Oxygenator, DeWall-Bubble-Oxygenator) verursachte der direkte Kontakt von Gas und Blut jedoch eine Schädigung der Erythrozyten und Thrombozyten (Bluttrauma), eine Gerinnungsstörung und eine Denaturierung von Proteinen, was den Langzeiteinsatz verhinderte (Lim 2006). Bei der zweiten Generation von MOs, bei denen der Blutstrom vom Gasstrom durch ein biokompatibles Material getrennt wurde, kamen Materialien wie Ethylcellulose, Polyethylen oder Teflon ® (Polytetrafluoroethylen) zum Einsatz. Während Ethylcellulose und Polyethylen das Problem der Leckage von Plasma hatten, wies Teflon® eine schlechte Permeabilität für CO₂ auf. Mit der Einführung von Silikon als Membranmaterial mit einer sehr viel besseren Permeabilität sowohl für O₂ als auch für CO₂ konnten die Eigenschaften des Membranoxygenators entscheidend verbessert werden. Für Oxygenatoren wurden Gaskapillaren entwickelt, die ausreichend dünn waren, um einen effektiver Gasaustausch zu ermöglichen, und es wurde der eigentlich laminare Blutstrom entlang der Membranen durch die Induktion von sekundären Strömen gestört, sodass eine größere Vermischung des Blutes erreicht wurde (Lim 2006). Um die Gaspermeabilität der Membranen weiter zu steigern, wurden Membranen mit kleinsten Poren entwickelt, welche aus Polypropylene bestanden (Peinemann 2008). Im Kurzzeiteinsatz waren diese *microporous membran oxygenators* bei koronaren Bypassoperationen (CABG, *coronary artery bypass grafting*) gut einsetzbar,

jedoch kam es im Gebrauch bei der Langzeitunterstützung mit ECMO zum Problem der Plasma-Leckage, die einen häufigen Wechsel der Oxygenatoren nötig machte (Ko et al. 2006). Diesem Problem wurde mit der Entwicklung von Oxygenatoren mit Membrankapillaren aus Polymethylpenten (PMP) entgegengesteuert. Mit diesem Material ist es trotz des Fehlens von Poren und dem Einsatz einer kontinuierlichen Membran möglich, einen guten Gasaustausch herzustellen. Dies wird durch die gute Löslichkeit der Gase im PMP und der Möglichkeit zur Herstellung sehr dünner Membranen erreicht. Die Herstellung einer solchen PMP-Membran erfolgt durch die Firma Membrana, Wuppertal, in einem sogenannten ACCUREL®-Verfahren, einer Form eines temperaturinduzierten Phasen-Separierungsprozesses. Mit dieser Methode wird eine Membran mit einem schwammartigen inneren Kern und einer kontinuierlichen, porenlösen „Haut“ erzeugt (Peinemann 2008). Mit dieser so konfigurierten Membran ist es möglich, eine ECMO-Unterstützung auch über längere Zeit ohne das Auftreten einer Plasma-Leckage fortzuführen (Horton et al. 2004; Toomasian et al. 2005). Etwa 80% der weltweit in Oxygenatoren eingesetzten Membranen werden durch die Firma Membrana produziert, wobei die Membran aus PMP unter dem Namen Oxyplus® vertrieben (Membrana GmbH 2007) und u. a. in Oxygenatoren der Firmen Maquet, MEDOS und Novalung verwendet wird (Pesenti et al. 2009). Erweitert wird das Sortiment durch PMP-MOs von Sorin.

1.1.2 Aufbau von Oxygenatoren

Bei den PMP-MOs wird das Gas ins Innere der Kapillaren geleitet und das Blut von außen an die Kapillaren herangeführt (Peinemann 2008). Im Herstellungsprozess werden die Gaskapillaren zu quervernetzten Matten verbunden. Dabei werden die Kapillaren parallel geführt und von einer Maschine mit einem Kettfaden aus Polyethylenenterephthalate querverwebt (Schmidt 2013). Bei manchen Fabrikaten (z. B. der Firma Medos) werden zwei Matten in einem festgelegten Winkel zueinander aufgerollt, sodass die Kapillaren umeinander gewunden angeordnet sind (Abbildung 2). Für jedes Oxygenator-Design kann die Konfiguration der Quervernetzungen angepasst werden, sodass die Leistung optimiert wird (Peinemann 2008). Die Kapillarmatten werden entweder um einen Gehäusekern gewickelt, sodass der Oxygenator als Ganzes rund ist (Medos, Sorin), oder in Lagen übereinander gelegt, sodass der Oxygenator Quaderform hat (Maquet, Novalung, Sorin). Zwischen die Lagen von Gasaustauscherkapillaren werden bei vielen Oxygenatoren Wärmeaustauscherkapillaren

eingebbracht (Tabelle 1). Die Kapillarmatten werden so vorbereitet in die Gehäuse der Oxygenatoren platziert.

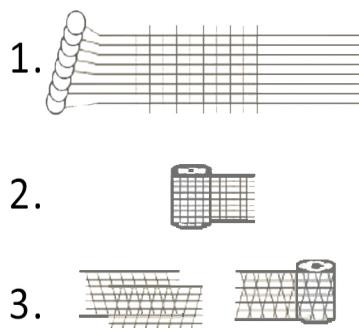


Abbildung 2 Beispiel für den Aufbau der Gaskapillarmatten in Membranoxygenatoren

1. Gaskapillaren aus PMP werden mit Kettfäden aus Polyethylenenterephthalate gequervernetzt und 2. in Form von Matten aufgerollt. 3. Gaskapillarmatten werden in einem für das Oxygenatorfabrikat festgelegten Winkel zu einander übereinander angelegt (Abbildung modifiziert nach Membrana GmbH).

Tabelle 1 Eigenschaften von Membranoxygenatoren

System	PLS, Cardiohelp	iLA®	Hilite® LT	ECO.O5
Hersteller	Maquet®	Novalung®	Medos®	Sorin
Gasaustauschmembran	Polymethylpenten	Polymethylpenten	Polymethylpenten	Polymethylpenten
Gasaustauschfläche (m²)	1,8	1,3	1,9	1,2
Wärmeaustauscher	Polyurethan	nicht vorhanden	Polyurethan	Stahl
Wärmeaustauschfläche (m²)	0,6	-	0,45	0,14
Beschichtung¹	Bioline	Bioline®	Rheoparin®	Physio

¹ Bioline und Rheoparin® sind Heparinbeschichtungen, Physio dagegen besteht aus Phosphorylcholin

1.1.3 Moderne ECMO-Verfahren

In der modernen ECMO-Therapie gehen die Entwicklungen hin zur Miniaturisierung der verwandten Systeme. Ein solches MECC (*minimized extracorporeal circulation*)-System wurde bereits in der extrakorporalen Zirkulation bei koronaren Bypassoperationen angewandt (Wiesenack et al. 2004). Mit einem Aufbau aus zwei venösen Kanülen, einer Zentrifugalpumpe und einem MO kann ein solches kleineres, transportables System eine Langzeitbehandlung von Patienten mit einem ARDS ermöglichen. Es bringt die Vorteile einer reduzierten Fremdoberfläche und einer verbesserten Pumpentechnology mit sich. Es wird eine plasma-resistente PMP-Membran verwendet und das ganze System mit Heparin beschichtet, sodass eine verminderte Antikoagulation notwendig ist. Mit dieser miniaturisierten vv-ECMO ist ein effizienter Gastransfer bei ARDS-Patienten möglich (Müller et al. 2009). Eine weitere Reduzierung der Systeme erfuhr die ECMO-Therapie mit den oben beschriebenen pumpenlosen Systemen (PECLA, *pumpless extracorporeal lung assist*) des iLA® (Reng et al. 2000). Diese Verfahren können in einer ausgewählten Patientengruppe mit erhaltener Hämodynamik und einem ARDS angewandt werden. Durch den Entfall der Pumpe und der Reduzierung der Länge der Schläuche kann das Blutrauma weiter vermindert werden. Durch die Simplifizierung ist das PECLA-Verfahren darüber hinaus weniger anfällig für technische Komplikationen (Liebold et al. 2000). Mit dem System ist ein Gasaustausch auch über längere Perioden möglich und eignet sich für Patienten mit einer schweren Hyperkapnie und moderater Hypoxämie (Flörchinger et al. 2008). Das iLA®-System kommt zur extrakorporalen Unterstützung unter einer konventionellen mechanischen Beatmung zum Einsatz und ermöglicht niedrigere Tidalvolumina und einen niedrigen Beatmungsdruck (Zimmermann et al. 2009). In 2006 konnten Bein et. al von dem erfolgreichen klinischen Einsatz bei 90 Patienten mit schwerem ARDS und persistierender Hypoxie und Hyperkapnie berichten (Bein et al. 2006). Mittlerweile sind für das iLA-Verfahren eine Reihe verschiedener Indikationen, darunter schwerstes Asthma bronchiale (Elliot et al. 2007), Transport von Patienten mit ARDS (Zimmermann et al. 2007), Trauma (McKinlay et al. 2008) und *Bridge to Transplantation* vor Lungentransplantation (Fischer et al. 2008), berichtet worden.

1.1.4 Aktuelle Zahlen zur Verbreitung der ECMO-Therapie

Bis Juli 2015 wurden 69.114 Patienten, die weltweit mit ECMO behandelt wurden, an die *Extracorporeal Life Support Organization* (ECLS) gemeldet (neonatale, pädiatrische, adulte

Patienten). Von den 16.429 adulten Patienten wurden 48% aufgrund einer respiratorischen Indikation, 40% aufgrund einer kardialen Indikation und 12% im Rahmen einer kardiopulmonalen Reanimation mit einem ECMO-Verfahren unterstützt (Extracorporeal Life Support Organization 2015). Die Zahlen der mit ECMO behandelten Patienten sind in den letzten Jahren stark angestiegen. In den USA wurde eine Zunahme der Fälle von 2007 bis 2011 um 433% dokumentiert (Sauer et al. 2015). In der CESAR-Studie (*Conventional Ventilatory Support vs. Extracorporeal Membrane Oxygenation for Severe Adult Respiratory Failure Study*) konnte erstmals in einer randomisierten kontrollierten multizentrischen Studie ein Vorteil der ECMO-Therapie bezüglich des Überlebens und des Auftretens schwerer Beeinträchtigung (Bettlägerigkeit, Unvermögen selbstständiger Körperwäsche und Ankleidens), sechs Monate nach Therapieende, gezeigt werden. Darüberhinaus erwies sich die ECMO-Behandlung im Vergleich zur konventionellen Beatmungstherapie als kosteneffizienter (Peek et al. 2009). Die CESAR-Studie hat die Rolle der ECMO-Therapie in einem multimodalen Therapiespektrum gefestigt (Sidebotham 2011). Eine Bewährungsprobe war die Influenza A-(H1N1)-Pandemie in Australien und Neuseeland im Jahr 2009 (Davies et al. 2009) und anschließend weltweit, in der die ECMO-Unterstützung erfolgreich eingesetzt wurde. Ein Teil der zunehmenden Zahl von Fällen ist auf die Behandlung der Influenzafälle zurückzuführen (Sauer et al. 2015).

1.2 Risikoabschätzung und Komplikationen der ECMO-Unterstützung

Die Auswahl der geeigneten Patienten für eine ECMO-Therapie ist immer noch schwierig (Combes et al. 2012). Eine Einschätzung des Mortalitätsrisikos vor Initiierung der ECMO-Behandlung ist bislang nicht möglich. Unter Anwendung von intensivmedizinischen Scores ist einen Tag nach Beginn der Unterstützung eine Einteilung in Patienten mit niedrigem und hohem Risiko möglich. Für eine erfolgreiche Therapie spielen chronische Erkrankungen, Komorbiditäten und funktionelle Reserven des Patienten eine große Rolle (Enger et al. 2014). Im Vergleich zu früheren Jahren wurden in letzter Zeit immer kränkere Patienten mit einem hohen Mortalitätsrisiko behandelt (Sauer et al. 2015). In einer Meta-Analyse zur Sterblichkeit und zu Komplikationen unter ECMO-Therapie wurden 1763 Fälle untersucht. Bei einer medianen Nachbeobachtungszeit von 30 Tagen lag die Gesamtsterblichkeit bei 54%; es verstarben 45% der Patienten am System und 13% nach der ECMO-Unterstützung. Führende Probleme unter der Behandlung betrafen die Nieren (dialysepflichtiges Nierenversagen in 52%) und Infektionen (Pneumonie in 33%, Sepsis in 26%). Blutungen traten in 33% der Fälle auf und Hämolyse in 18%. In 33% der Fälle war ein Wechsel des Oxygenators aufgrund einer Dysfunktion notwendig (Zangrillo et al. 2013). Die hohe Zahl an Systemwechseln wurde auch in Regensburg (Regensburger ECMO Registry) beobachtet. Im Zeitraum von 2009 bis 2013 benötigten 83 von 265 Patienten (32%) einen oder mehrere Wechsel. Bei der Ursachenforschung zeigte sich, dass 10% der Wechsel aufgrund von mechanischen Problemen der Pumpen (n=5), der MOs (n=2) oder der Kanülen (n=1) notwendig waren. In 16% der Fälle wurden Thromben in der Pumpe und in 19% der Fälle im MO festgestellt, sodass ein notfallmäßiger Austausch des Systems erfolgen musste. Weitere Wechsel wurden aufgrund einer Verschlechterung des Gastransfers (12%) und gerätebedingter Gerinnungsstörungen (39%) vorgenommen. Diese Gerinnungsstörungen machten sich entweder mit einer Fibrinolyse im Rahmen von lokalen Thrombenbildungen im System (erhöhte D-Dimere, erniedrigte Thrombozytenzahl) oder mit einer geräteinduzierten generellen Hyperfibrinolyse (erhöhte D-Dimere, erniedrigtes Fibrinogen, erniedrigte Thrombozytenzahl, Blutungsneigung) bemerkbar und waren nach dem Wechsel reversibel. Vier weitere Oxygenatoren wurden aufgrund eines Infektionsverdachts ausgetauscht (Lubnow et al. 2014).

Während der ECMO-Behandlung ist ein ausgewogenes Management der Antikoagulation notwendig. Auf der einen Seite drohen Blutungskomplikationen und auf der anderen Seite besteht die Gefahr der Thrombenbildung (Oliver 2009). Zum einen kann der Kontakt mit den

Fremdmaterialien eine Koagulopathie mit Blutungserscheinungen induzieren (Stammers et al. 1997). Zum anderen aktivieren die Kunststoffoberflächen des ECMO-Systems die Thrombozyten und das Gerinnungssystem. Es ist daher die Anwendung von Antikoagulantien und ein engmaschiges Labormonitoring wichtig (Muntean 1999). In der extrakorporalen Zirkulation stellt die Oxygenatorthrombose eine schwerwiegende Komplikation dar. Die Thrombusbildung äußert sich durch die Entwicklung eines abnormen Druckgradienten über den MO (dpMO) und stellt eine Indikation zum Austausch des Systems dar (Schaadt 1999; Wendel et al. 2001). Die Exposition des Blutes mit dem ECMO System führt auch zu einer Aktivierung des Abwehrsystems gegenüber den Fremdmaterialien (Peek und Firmin 1999).

1.3 Eigenschaften von Membranoxygenatoren

Kenntnisse der Eigenschaften der verschiedenen ECMO-Systeme sind wichtig um technische Komplikationen frühzeitig zu erkennen. Die Hämodynamik im System wird durch die verwendeten Pumpen, Kanülen und den Blutfluss durch den MO bestimmt (Lehle et al. 2014). Die Eigenschaften der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Oxygenatoren sind in Tabelle 1 aufgeführt. Das Medos System unterscheidet sich bezüglich der hämodynamischen Parameter von den übrigen Systemen, da für den gleichen Blutfluss und den gleichen Widerstand über den MO eine höhere Pumpengeschwindigkeit notwendig ist. Das Sorin ECC.05-System ist das System mit der geringsten Gasaustauschfläche ($1,2\text{m}^2$) und dem geringsten O_2 -Transfer, ist jedoch bezogen auf die Fläche der effektivsten MO. Er kann deshalb bei Patienten mit einer moderaten Hypoxämie und/ oder Hyperkapnie eingesetzt werden (Lehle et al. 2014). Mit dem Cardiohelp System wurde ein kompaktes, transportables Gerät entwickelt, welches die ortsunabhängige Implantation ermöglicht (Haneya et al. 2012).

1.3.1 Langzeitfunktion von Oxygenatoren

Wie oben beschrieben ist die Langzeitfunktion der Oxygenatoren bei extrakorporaler Lungenunterstützung abhängig vom Material der Gasaustauschfläche. Es kommt zum einen zu Komplikationen durch Leckage von Plasma (heute eher selten). Zum anderen treten Probleme durch Anlagerung von fibrinösem und zellreichem Material auf, welches eine Oxygenatorthrombose bilden kann. Diese Auflagerungen auf der gasaustauschenden Fläche erhöhen den Strömungswiderstand über den Oxygenator (dpMO) und reduzieren die Gastransferleistung (Philipp et al. 2009). Ein Ansatz zur Verbesserung der Langzeitfunktion besteht in der Modifikation des Gerinnungssystems während der ECMO-Behandlung. Zur Antikoagulation während des Einsatzes des Systems stehen Heparine zur Gerinnungshemmung und Acetylsalicylsäure zur thrombozytären Hemmung zur Verfügung (Philipp et al. 2007). Des Weiteren wurden Heparin-Beschichtungen der Membranen entwickelt. Diese werden heute unter den Namen „Bioline“ oder „Rheoparin®“ vertrieben (Tabelle 1). Durch solche Veränderungen der Membranoberflächen ist die Adhäsion von Thrombozyten ebenso wie deren Aktivierung reduziert. Die Adsorption von Plasmaproteinen wie Fibrinogen und von-Willebrand-Faktor an die Oberfläche ist durch diese Beschichtungen nicht verändert, die Adsorption von Fibronectin jedoch erhöht. Die Bildung von Heparin-Fibronectin-Komplexen kann die Adhäsion von Thrombozyten hemmen (Niimi et al. 1999). Khoshbin et al. demonstrierten in ihrer Untersuchung von 20 Rheoparin®-beschichteten

PMP-Oxygenatoren im Vergleich zu 20 nicht-beschichteten Silikon-MOs, dass die Heparinisierung zu einer signifikanten Reduktion des Widerstandes über den Oxygentor führt und dabei nicht mit einem erhöhten Verlust von Gerinnungsfaktoren und Thrombozyten einhergeht (Khoshbin et al. 2005). Wendel et al. untersuchten 5617 Behandlungen mit einem extrakorporalen Zirkulationsverfahren. Ein abnorm erhöhter Strömungswiderstand über den Oxygentor trat in 4,3% der Fälle mit einem unbeschichteten und in 0,03% der Fälle unter Verwendung eines beschichteten Oxygentors auf (Wendel et al. 2001).

1.3.2 Weiterentwicklungen zur Verbesserung der Langzeitfunktion von Oxygenatoren

Experimentelle Ansätze sind sehr vielversprechend um die Fremdkörperreaktion weiter zu reduzieren. Eine Möglichkeit wäre eine Endothelialisierung der Kunststoffoberflächen. In einem ersten in-vitro-Ansatz konnten Hess et al. eine Zellularisierung von PMP-Gasaustauschmembranen mit *endothelial forming-forming cells* (ECFCs), die aus humanem Nabelschnurblut gewonnen wurden, nachweisen. Diese Zellen bildeten einen Monolayer und zeigten endothiale Eigenschaften (CD31- und von-Willebrand-Faktor-Expression). Dieser Monolayer blieb auch über drei Wochen bestehen. Jedoch gelang die stabile Endothelialisierung nur auf albumin- und heparinbeschichteten Membranen. Durch die Endothelialisierung wurde u. a. die Thrombozytenadhäsion und –aktivierung reduziert. Der Gasaustausch wurde durch die Endothelialisierung nicht beeinflusst (Hess et al. 2010). Diese Ergebnisse wurden auch durch die Arbeiten von Polk et al. bestätigt, die bovine endothiale Zellen der Aorta auf PMP-Gaskapillaren kultivierten (Polk et al. 2010). Da auch die heute verwendeten Oxygenatoren eine solche Beschichtung aufweisen, wäre eine Endothelialisierung diese Fabrikate denkbar. Jedoch muss berücksichtigt werden, dass es sich bei der ECMO-Therapie um eine Akuttherapie handelt bei der man im Vorfeld keine Zeit hat unter in-vitro-Bedingungen die ECMO-Systeme zu zellularisieren. Nichtsdestotrotz wäre auch eine in-vivo-Endothelialisierung mit endothelialen Progenitorzellen vorstellbar. Dabei handelt es sich um eine Anlagerung von Stammzellen, die über das Blut zu den Kunststoffoberflächen transportiert werden und dort anhaften können. Erste Hinweise für eine Zellularisierung der Gasaustauschmembranen wurden 2008 von Lehle et al. gezeigt. Es handelte sich dabei um kernhaltige Zellen. Weitere Aussagen zum Zelltyp gibt es bislang nicht.

1.4 Endothiale Progenitorzellen

Endothiale Progenitorzellen (EPCs, *endothelial progenitor cells*) wurden erstmals von Asahara et al. (Asahara et al. 1997) als Zellen, die sowohl Oberflächenmarker von hämatopoetischen Stammzellen (*cluster of differentiation*, CD133) als auch von Endothelzellen (z. B. CD34, fetal liver kinase-1 (Flk-1), tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains-2 (TIE-2)) besitzen, beschrieben. Den EPCs wird nach Mobilisation aus dem Knochenmark in das periphere Blut eine Rolle bei der Reendothelialisierung und Neovaskularisation nach Gefäßschäden zugesprochen. Im Verlauf ihrer Migration verlieren die Zellen ihre Vorläufereigenschaften und zeigen eine endothelzelltypische Expression (z. B. von VE-Cadherin und von-Willebrand-Faktor) (Hristov und Weber 2004).

Unter physiologischen Bedingungen zirkulieren im Blut von gesunden Erwachsenen nur wenige EPCs. Verschiedene endogene und exogene Substanzen sind in der Lage die Anzahl der zirkulierenden EPCs durch verstärkte Mobilisierung aus dem Knochenmark zu steigern (Aicher et al. 2005). So induzieren z. B. inflammatorische Stimuli eine schnelle Freisetzung von EPCs bei Patienten mit einer bakteriellen Pneumonie (Yamada et al. 2005). Patienten mit einer geringen EPC-Zahl im Blut neigen sogar zu persistierenden fibrotischen Änderungen in ihren Lungen (Yamada et al. 2005). Weiterhin ist die Zahl der EPCs im Blut von Patienten mit einem akuten Lungenschaden (ALI, *acute lung injury*) im Vergleich zum Blut gesunder Probanden signifikant erhöht und korreliert positiv mit einem verbesserten Überleben (Burnham et al. 2005). Eine weiterführende Studie spekuliert sogar darüber, dass die zunehmende Zahl von EPCs vom Lungenschaden herrührt und gleichzeitig unabhängig von Sepsis und mechanischer Beatmung ist (Burnham et al. 2010).

Es gibt auch Hinweise, dass bei Patienten, die aufgrund eines ARDS, eines Herzinfarktes oder einer Herzinsuffizienz eine ECMO-Behandlung benötigten, Progenitorzellen verstärkt mobilisiert werden (Hoesli et al. 2010; Bui et al. 2010). In der Arbeit von Hoesli et al. konnten ECFCs (*endothelial colony-forming cells*) bei Blutproben von zwölf neonatalen ECMO-Patienten gefunden werden. In sieben Proben wurden sogar mesenchymale Stammzellen isoliert (Hoesli et al. 2010). In einer weiteren Arbeit wurden im Blut von 41 pädiatrischen Patienten und vier Erwachsenen, die eine ECMO-Therapie benötigten, ebenfalls erhöhte Konzentrationen hämatopoetischer, mesenchymaler und epithelialer Progenitorzellen nachgewiesen. Dabei entsprach die Anzahl *colony forming units/ml* hämatopoetischer Zellen in etwa der Anzahl im parallel untersuchten Narbelschnurblut (Bui et al. 2010). Es wird

darüber spekuliert, ob diese Stammzellen als Antwort auf die kritische Erkrankung oder in Folge der ECMO-Therapie mobilisiert werden. Korrelationen mit klinischen Daten (z. B. Überleben) fehlen bislang.

1.5 Fragestellungen der vorliegenden Arbeit

In der vorliegenden experimentellen Arbeit sollen folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Kann die Methode der indirekten Immunfluoreszenz genutzt werden, um die kernhaltigen Zellen in den Ablagerungen auf den Gasaustauschmembranen zu identifizieren?
2. Erlaubt die Methodik auch eine direkte Quantifizierung dieser Zelltypen oder kann man das Ausmaß der zellulären Ablagerung indirekt quantifizieren?
3. Kann man über das Ausmaß der zellulären Ablagerungen oder über die Identifizierung spezifischer Zelltypen Rückschlüsse auf den Verlauf der ECMO-Behandlung ziehen?
4. Kann man über das Ausmaß der zellulären Ablagerungen oder über die Identifizierung spezifischer Zelltypen Rückschlüsse auf die Patienten ziehen?
5. Welche Bedeutung haben die zellulären Auflagerungen auf den Gasaustauschmembranen aus der klinischen Problematik heraus – z. B. der Thrombenbildung im Oxygenator - während einer ECMO-Therapie?

2 Methoden

Alle verwendeten Materialien, Lösungen, Antikörper, Reagenzien und Puffer sind im Anhang 6.5 beschrieben.

2.1 Untersuchungsmaterialien

2.1.1 Präparierung eines nativen Membranoxygenators

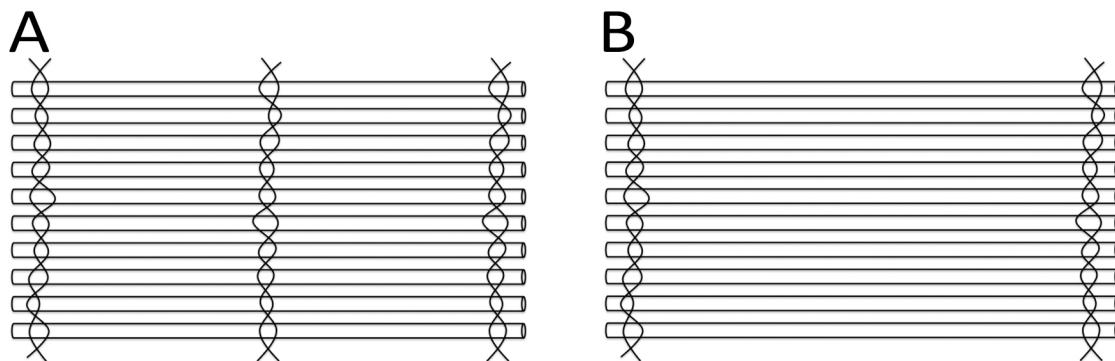


Abbildung 3 Zuschnitte der Gaskapillarmatten

Bei der Präparation eines Gaskapillarmattenstückchens eines Oxygenators der Firmen Maquet® und Novalung® umfasste das Präparat zwei quervernetzte Abschnitte (A), während es bei Proben von Geräten der Hersteller Medos® und Sorin ein quervernetzter Abschnitt war (B).

Die Gaskapillarmatten eines nativen, nicht-gebrauchten Oxygenators wurden verwendet, um Endothelzellen (HUVECs, *human umbilical vein endothelial cells*) und mononukleäre Blutzellen (PBMCs, *peripheral blood monocytic cells*,) darauf zu kultivieren. Ziel dieser Maßnahme war die Präparation einer entsprechenden Positivkontrolle für Zellen mit endothelialen Epitopen bzw. mit Blutzellantigenen. Für diese Arbeit wurden ausschließlich die PMP-Gaskapillarmatten verwendet. Diese wurden aus ihrem Verbund im Block herausgeschnitten. Mithilfe einer feinen Schere und eines Skalpells wurden Stückchen von ca. 10 x 5 mm (Breite x Höhe) Größe präpariert. Hierbei wurde die Schnittführung so gewählt, dass die Proben in der Höhe immer zehn Gaskapillaren umfassten und diese an den horizontalen Enden erst mit etwas Abstand zu den Quervernetzungen durchtrennt wurden. So wurden die empfindlichen Quervernetzungen geschont und es gab an den Seiten des Präparates einen Punkt zum Greifen mit der Pinzette, der außerhalb des später untersuchten Bereiches lag. Bei Oxygenatoren der Firmen Maquet und Novalung wurden immer zwei

durch Quervernetzungen getrennte Felder erhalten, während bei Geräten der Firmen Medos und Sorin ein quervernetzter Abschnitt in der Horizontalen das Präparat bildete (Abbildung 3).

2.1.2 Präparierung eines am Patienten eingesetzten Membranoxygenators

Oxygenatoren nach Einsatz am Patienten wurden gespült, mit Fixierungslösung behandelt und schließlich mit Saccharose- Lösung als Gefrierschutz aufgefüllt und eingefroren. Das genaue Vorgehen wird im Folgenden beschrieben. Die einzelnen Schritte und die Zusammensetzungen der Lösungen sind im Anhang 7.6 aufgeführt.

In das von der Intensivstation übernommene ECMO-System (inklusive einer Zentrifugalpumpe) wurde ein neues Autotransfusionsreservoir eingefügt, das zur Befüllung des Systems mit den einzelnen Lösungen diente. Die zum Patienten führende Leitung wurde zum einen zum Ablassen der Lösungen aus dem System genutzt, zum anderen wurde sie während der Zirkulation der Lösungen an das Reservoir angeschlossen und der Kreislauf hiermit geschlossen.

Zunächst wurde das ECMO-System mit 10 Litern physiologischer Natriumchloridlösung (NaCl, 0,9%) mit einem Fluss von 1 Litern/min. durchspült (10 min.) und die Lösung sogleich verworfen. Anschließend wurden die den Oxygenatormaterialien anhaftende Zellen mit einem Liter einer 4%igen Paraform- Lösung fixiert. Dazu wurde die Hälfte der Gesamtmenge dieser Lösung in das Reservoir gefüllt, durchlief das Schlauchsystem und den Oxygenator und wurde direkt verworfen. Die zweite Hälfte der Paraform-Lösung zirkulierte bei, wie oben beschrieben, kurzgeschlossenem Kreislauf für eine halbe Stunde. Anschließend wurde der Oxygenator mit PB-Lösung erneut gespült (30 min.). Danach wurden mit aufsteigend konzentrierten Saccharose- Lösungen (10%, 20% und 30%) der Reihe nach perfundiert (jeweils Perfusion über 30 min.). Zuletzt wurde der mit der 30%igen Saccharose-Lösung gefüllte Oxygenator verschlossen und bei -80°C eingefroren.

Ein Gaskapillarmatten-Präparat eines am Patienten genutzten Oxygenators wurde erhalten, indem das bei -80°C eingefrorene Gerät in Stücke geschnitten wurden. In dieser Arbeit wurde zum Schneiden eine Tisch- Knochensäge („Robusta SO 23 CE“, Firma ADE) mit einem vertikal rotierenden Stahlsägeblatt verwendet. Die Schneidearbeiten wurden mit einem festen Kittel, einer Haube, Handschuhen und einem Mund- und Gesichtsschutz durchgeführt. Zunächst wurde das Gehäuse des Oxygenators samt aller Zu- und Abflüsse entfernt, sodass

nur noch der innere Block mit den Lagen der vernetzten Gaskapillaren erhalten blieb. Dieser innere Block wurde nach einem festen Schema (Abbildung 4) in neun Stücke geschnitten, die jeweils sowohl Gaskapillarmattenlagen der Einfluss- als auch der Ausflussseite aufwiesen. Die Stücke wurden in Aluminiumfolie eingewickelt (Austrocknungsschutz) und anschließend wieder bei -80°C eingefroren und bis zur weiteren Verwendung gelagert. In der vorliegenden Arbeit wurde jeweils das mittige Stück Nummer 5 untersucht.

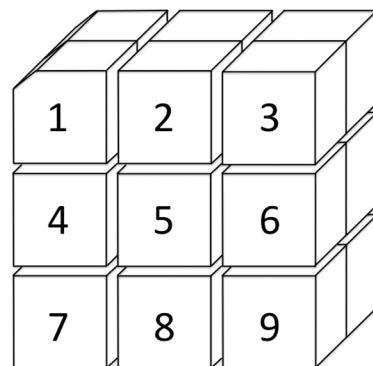


Abbildung 4 Zuschnitt des inneren Blocks des MOs und Nummerierung der Stücke

Der Block im Inneren des Oxygenators wurde in neun Stücke zerschnitten und diese durchnummieriert. Das Stück Nummer 1 war das in Richtung Halterung zeigende Stück und wurde zur Orientierung angeschrägt. In der vorliegenden Arbeit wurden sämtliche Präparate dem Stück Nummer 5 entnommen.

2.2 Blutzellen und Endothelzellen

HUVECs und PBMCs wurden als Positivkontrolle zum Nachweis von endothelialen und Blutzellmarkern verwendet. Im Folgenden wird die Probenvorbereitung (Gaskapillarmatten, Kulturgefäße) und die Kultivierung und Isolierung der Zellen beschrieben.

2.2.1 Vorbereitung der Gaskapillarmattenstückchen und Kulturgefäße

2.2.1.1 Vorbereitung der Gaskapillarmattenstückchen

Die Stückchen einer nativen Gaskapillarmatte, die wie oben beschrieben aus einem Oxygenator herauspräpariert wurden, wurden vorbereitet, um in einer *well*-Platte mit Zellen kultiviert zu werden. Zunächst wurden die Kapillarmatten ein halbe Stunde lang in 70%igen Alkohol desinfiziert.

Die folgenden Schritte wurden unter der Sterilbank durchgeführt:

Die Kapillarmatten wurden in 24-*well*-Platten gelegt und mit Metallringen beschwert, um ein Aufschwimmen des Stückchens zu vermeiden. Es wurde gewartet bis der restliche, der Membran anhaftende Alkohol verdampft war, um dann 500 µl Medium pro *well* vorzulegen und dieses über Nacht im Brutschrank einwirken zu lassen. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt und die Zellsuspension hinzugegeben (siehe unten).

2.2.1.2 Vorbereitung der Kulturflaschen, Objektträger und *well*-Platten

Die Kulturflaschen, Objektträger und *well*-Platten wurden zunächst mit entsprechenden Mengen Gelatine beschichtet. Diese verblieb 20 Minuten bei 37°C im Brutschrank im Gefäß. Anschließend wurde die überschüssige Gelatine abgesaugt und das Medium vorgelegt (Tabelle 2).

Tabelle 2 Volumenangaben für Lösungen in der Zellkultur

Gefäß	Fläche	Gelatine	PBS Spülen	Medium	Trypsin
T 25	25 cm ²	3 ml	5 ml	5 ml	3 ml
T 75	75 cm ²	6 ml	12 ml	15 ml	5 ml
6 well	9,6 cm ²	1,5 ml	1 ml	3 ml	2 ml
12 well	3,5 cm ²	0,5 ml	1 ml	1 ml	0,5 ml
24 well	1,9cm ²		1ml	1ml	
OT	9 cm ²	1,5 ml	2 ml	4,5ml	

2.2.2 Gewinnung von PBMCs aus Vollblutproben

Für die Herstellung von Blutzellpräparaten wurde gesunden Spendern Blut entnommen. Die Blutentnahme erfolgte aus einer peripheren Vene des Armes in ein EDTA - Röhrchen. Zur Vermischung des Blutes mit dem Antikoagulanz wurde das Röhrchen nach der Entnahme ein paar Mal geschwenkt.

2.2.2.1 Ficoll-Separation

Zur Isolierung der PMBCs aus dem entnommenen Vollblut wurde eine Ficoll-Separation durchgeführt. Dieses Verfahren beruht auf Anwendung einer Dichtegradientenzentrifugation. Dem Aufbau des Dichtegradienten dient die *Ficoll- PaqueTM*- Lösung. Sie besteht zum einen aus dem Ficoll PM400, einem synthetischen, neutralen, hoch verzweigten und hydrophilen Polysaccharid, das durch Epichlorhydrin kreuzvernetzt ist. Ergänzt wird sie zum anderen durch Natriumdiatrizoat (Hypaque), das die Dichte der Lösung erhöht. Um die Gerinnung des Blutes zu verhindern wird EDTA hinzugesetzt (GE Healthcare 2011).

Die *Ficoll- PaqueTM*- Lösung hat eine Dichte von 1,077g/ml und ist demnach dichter als Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten, sodass diese sich bei der Zentrifugation über dem Trennmedium ansammeln. Erythrozyten und die Mehrzahl der Granulozyten sind hingegen dichter als die *Ficoll- PaqueTM*- Lösung und wandern deshalb durch die Lösung hindurch (Tabelle 3). Zudem fördert Ficoll die Agglutination von Erythrozyten, sodass diese schneller sedimentieren (Bratke et al. 2008).

2.2.2.2 Die Schritte der Separation im Einzelnen

- Lösungen auf Raumtemperatur anwärmen

- Vollblut mit PBS-Lösung 1:2 verdünnen
- Ficoll- Lösung (15 ml) in ein 50ml-Falcon mit Filterscheibe geben
- das Falcon kurz anzentrifugieren, damit sich die Ficoll- Lösung unter die Filterscheibe bewegt
- vorsichtig die Ficoll-Lösung und die Filterscheibe mit dem in PBS-Lösung verdünnten Blut überschichten
- Zentrifugieren: 650g, 15 min., ohne Bremse
- den weißen Überstand oberhalb der Filterscheibe (*buffy coat*) vorsichtig mit einer 1000 µl-Pipette abpippieren und in ein neues Falcon überführen; dabei nicht die Ficoll-Lösung mit aufnehmen
- 2 x Waschen mit ca. 40 ml PBS-Lösung
- Zentrifugieren mit 289 g, 10 min., mit Bremse
- Pellet in 5 ml RPMI-Medium resuspendieren, Zellzahlbestimmung (2.2.4) und aussäen (2.2.5)

Die hier verwendete PBS-Lösung wurde mit 2%igem fetalen Kälberserum aufgestockt; das RPMI-Medium wurde mit 10%igem fetalen Kälberserum versetzt.

Tabelle 3 Dichtebereiche und mittlere Dichten humaner Blutkomponenten nach Bratke et. al 2008

Zellen und weitere Blutbestandteile	Dichtebereich [g/cm ³]	Mittlere Dichte [g/cm ³]
Plasma / Serum	-	1,026
Thrombozyten	1,040 – 1,060	1,058
Monozyten	1,059 – 1,068	1,065
Lymphozyten	1,066 – 1,077	1,070
<i>Ficoll- PaqueTM</i> - Lösung		1,077
Basophile	1,075 – 1,081	1,079
Neutrophile	1,080 – 1,099	1,082
Eosinophile	1,088 – 1,096	1,092
Erythrozyten	1,090 – 1,110	1,100

2.2.3 Kultivierung der HUVECs

Es wurden kryokonservierte HUVECs, die aus Nabelschnüren gewonnen wurden, für alle Endothelzellkulturen dieser Arbeit verwandt. Die Präparation der Zellen erfolgte im Rahmen

eines Drittmittelprojektes (STEMMAT) unter Leitung von Herrn PD Dr. M. Hönika. Das entsprechende Ethikvotum lag vor. Die eingefrorenen Endothelzellen wurden aufgetaut und nach der ersten Passage in dieser Arbeit verwandt.

2.2.3.1 Die Schritte der Gewinnung einer HUVEC-Suspension für die Besiedelung eines Stückchens einer Gaskapillarmatte

- Absaugen/ Ausgießen von Medium aus der Kulturflasche
- Ablösen der Zellen mit Trypsin, 5 min., bei Bedarf im Brutschrank (37°C)
- lichtmikroskopische Kontrolle der sich ablösenden Zellen
- Stoppen des Trypsins durch Hinzugabe von Endothelzellmedium
- Suspendieren der Zell-Lösung in der Kulturflasche
- Aufnehmen der Zellsuspension in Falcons
- Zentrifugieren: 298g, 4 min., mit Bremse
- Überstand des Pellets absaugen
- Pellet in Endothelzellmedium resuspendieren, Zellzahlbestimmung (2.2.4) und aussäen (2.2.5)

2.2.4 Bestimmung der Zellzahl mit dem Cell Counter and Analyser System CASY®

Das *Cell Counter and Analyser System* CASY® (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg) quantifiziert die Zell-Konzentration in einer Probe, gibt einen Wert für das Volumen und die Viabilität (Überlebensfähigkeit) der Zellen an, ermittelt das Ausmaß der Aggregation von Zellen und misst den in der Probe enthaltenen Zell-Debris. Zur Messung wird die Probe mit einer isotonen, partikelfreien Elektrolyt- Lösung (CASY®- Ton, Roche Diagnostics GmbH, Penzberg) verdünnt und in eine Kapillare aufgesaugt. In einer Messpore wird eine Widerstandsmessung mit einer Frequenz von 1MHz durchgeführt. So werden für jede Zelle mehrere hundert Messungen durchgeführt und aus dem Integral mithilfe einer Pulsflächenanalyse eine Zellgrößen-Verteilung errechnet. Die Zell-Viabilität wird mit der *electric current exclusion* ermittelt: eine Zelle mit intakter Zellmembran bildet als Ganzes einen elektrischen Isolator und führt zu einer Widerstandserhöhung in der Messpore; die Zellmembran einer toten Zelle kann jedoch von elektrischen Strömen überwunden werden und die tote Zelle wird somit nur anhand der Widerstandserhöhung durch ihren Zellkern

gemessen. Dies erlaubt die Unterscheidung zwischen toten und lebenden Zellen (Roche Diagnostics 2010).

2.2.4.1 Die Bestimmung der Zellzahl mit dem CASY® im Einzelnen

- Probe der Zellsuspension mit CASY®-Ton in einem CASY®-Cup verdünnen und gut mischen
- Cup in das CASY® einsetzen und den Messvorgang starten
- Verdünnung der Probe, Spreizung der y-Achse und Messgrenzen auf der x-Achse eingeben
- Ablesen der Zellzahl pro ml

2.2.5 Kultivierung von HUVECs und PBMCs

Die nach Ablösung von der Kulturflasche erhaltenen HUVECs (2.2.3) und die nach Ficoll-Isolation gesammelten PBMCs (2.2.2) wurden in Einzel- oder in Mischkultur auf Kulturgefäße ausgesät. Die Zellkonzentration im Medium wurde anhand der Fläche und des Volumens des Kulturgefäßes berechnet (Tabelle 4). In die 24-well-Platten wurden zuvor die Stückchen einer nativen Gaskapillarmatte eingebracht (2.2.1.1).

Tabelle 4 Konzentrationen von HUVECs und PBMCs in den verschiedenen Kulturgefäßen

Objekträger	12-well	24-well
Fläche	9cm ²	3,5cm ²
Endvolumen	4,5ml	1ml
HUVECs- Konzentration		5 x 10 ⁴ Zellen / ml
HUVECs- Menge	2,5 x 10 ⁵ Zellen	5 x 10 ⁴ Zellen
PBMCs- Konzentration		1 x 10 ⁶ PBMCs / ml
PBMCs- Menge	4,5 x 10 ⁶ PBMCs / ml	1 x 10 ⁶ PBMCs

Die Zellen wurden in entsprechenden Konzentrationen in die erforderliche Menge Medium überführt und auf die Kulturgefäße verteilt.

Die Zellen wurden 48 Stunden im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) kultiviert.

2.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur Zählung und Charakterisierung von Zellen und ermöglicht dabei die sehr schnelle und gleichzeitige Erfassung mehrerer Parameter für jede Einzelzelle. Dies ist möglich durch die Kombination eines flüssigen und eines optischen Systems mit einer elektronischen Datenverarbeitung. Im flüssigen System strömen die Zellen einer Probe in einer Trägerflüssigkeit einzeln an einem Laser vorbei (GE Healthcare 2011). Das Licht des Lasers wird beim Auftreffen auf eine Zelle gestreut, von einem System von Linsen, Spiegeln und Filtern aufgefangen, von der Elektronik detektiert und in numerische Werte umgewandelt. Die Zellen streuen das Licht zum einen in der Richtung des Laserstrahls (Vorwärtsstreuung- Forwardscatter- FSC); diese Streuung gibt Aufschluss über die relative Größe der Zelle. Zum anderen wird das Licht des Lasers zur Seite gestreut (Seitwärtsstreuung- Sidescatter- SSC), woraus Informationen über die Granularität der Zelle zu ziehen sind (Bratke et al. 2008) (Seite 33, Abbildung 8, Bild A).

Neben diesen beiden Kriterien sind mit der Durchflusszytometrie Aussagen über das Vorhandensein bestimmter Antigene möglich. Werden diese mit Fluoreszenzstoff-gekoppelten Antikörper markiert und wird das Licht des Laser vom Fluorochrom absorbiert, so wird ein Licht höherer Wellenlänge emittiert. Filter sorgen dafür, dass dieses Licht mit möglichst hoher Spezifität von der Elektronik detektiert wird und so zwischen den Fluoreszenzspektren verschiedener Farbstoffe unterschieden werden kann. So können mehrere Antigene gleichzeitig an der Einzelzelle untersucht werden (Bratke et al. 2008).

Diese Mehrfarbendurchflusszytometrie wurde in dieser Arbeit mit dem FACSCaliburTM der Firma BD Bioscience durchgeführt. Das Gerät verfügt über einen luftgekühlten Argon-Ionen-Laser, der Licht einer Wellenlänge von 488nm emittiert, und einem roten Diodenlaser mit einer Emissionswellenlänge von 635nm. Die Signale der Fluoreszenzfarbstoffe werden durch vier Photomultiplier detektiert (Tabelle 5).

Tabelle 5 Photomultiplier im FACSCaliburTM

Fluoreszenzfarbstoff- Beispiel	Anregungswellenlänge	Emissionsmaximum	Kanal
FITC	488 nm	519 nm	FL1
PE	488 nm	578 nm	FL2
PerCP	488 nm	678 nm	FL3
APC	635 nm	660 nm	FL4

In dieser Arbeit wurde die Methodik der Durchflusszytometrie genutzt, um die Immunfluoreszenzfärbung des endothelialen Markers UEA-1 genauer zu untersuchen.

2.3.1.1 *Vorbereitung der Proben auf die Durchflusszytometrie*

- 200µl Vollblut in ein FACS- Röhrchen pipettieren
- primären Antikörper in erforderlicher Konzentration hinzugeben und Probe eine halbe Stunde lang im Brutschrank (37°C) inkubieren
- Röhrchen mit 3ml PBS-Lösung auffüllen
- Zentrifugieren bei 298g, 4 Minuten, mit Bremse; anschließend den Überstand bis auf 200 µl absaugen und das Pellet in der restlichen Lösung resuspendieren
- sekundären Antikörper in erforderlicher Konzentration hinzugeben und Probe eine halbe Stunde lang im Brutschrank (37°C) inkubieren
- Röhrchen mit 3ml BD FACSTM Lyse-Lösung (1:10 verdünnt) auffüllen, die Probe vortexen und 10 Minuten im Dunkeln stehen lassen (Raumtemperatur)
- Zentrifugieren bei 298g, 4 Minuten, mit Bremse; anschließend Absaugen des Überstandes
- Röhrchen mit 3ml PBS-Lösung auffüllen und das Pellet resuspendieren
- Zentrifugieren bei 298g, 4 Minuten; anschließend Absaugen des Überstandes bis auf 200µl und Resuspendieren des Pellets

Die auf diese Art und Weise vorbereiteten Proben wurden zur Messung im FACS-Röhrchen im FACSCaliburTM-Gerät untersucht. Das Gerät wird über einen Computer der Firma Apple Inc., USA, gesteuert. Es wurden pro Probe etwa 10.000 Zellen gezählt.

2.4 Immunfluoreszenzfärbungen

Die Methode der direkten und indirekten Immunfluoreszenz wurde zur Identifizierung von bestimmten Zelltypen (endothiale Zellen und Blutzellen) eingesetzt.

2.4.1 Vorbereitung der Positivkontrollen

Nach Kultivierung mit HUVECs und PBMCs auf Gaskapillarmattenstückchen und Objektträgern wurden die Proben auf die Antikörperapplikation vorbereitet. Zunächst wurden die Zellen mit Paraform fixiert:

2.4.1.1 Die Schritte der Fixierung im Einzelnen

- Vorsichtiges Absaugen des Mediums, Waschen mit PBS-Lösung
 - Fixieren mit 4%igem Paraform, 5 min., Raumtemperatur
- Gaskapillarmattenstückchen:
- 2x Waschen mit PBS-Lösung, beim zweiten Mal die Lösung im *well* belassen
 - Proben im Kühlschrank (4°C) lagern
- Objektträger:
- PBS-Lösung vom Objektträger absaugen und das Objektträger-*flask* einmal mit vollentsalztem Wasser befüllen und leeren
 - Den Behälter (*flask*) vom Objektträger abbrechen und den Objektträger trocknen lassen

Die Gaskapillarmattenstückchen wurden nun in 500µl fassende Eppendorf-*cups* überführt und dreimalig mit PBST-Lösung mit 0,1% Triton gewaschen. Triton ist ein nicht-ionisches Detergenz, welches Membranproteine aus ihrer nativen Konformation herauslöst ohne diese zu denaturieren.

Die Objektträger wurden in einen Färbekasten nach Coplin gestellt und ebenso dreimalig mit PBST-Lösung gewaschen. Anschließend wurden sie in eine feucht-ausgelegt Färbe-Schale überführt und bis zur Applikation der Antikörper-Lösungen feucht gehalten.

2.4.2 Präparierung der Gaskapillarmattenstückchen der am Patienten eingesetzten Membranoxygenatoren

Die tiefgefrorenen Blöcke (2.1.2) wurden angetaut, sodass die jeweils oberflächlichen Gaskapillarmatten einfach abzulösen waren. Mit einem vorsichtigen Vorgehen sollten die den Gaskapillaren anhaftenden Strukturen geschont werden. Für die Untersuchung wurde jeweils die dritte Gaskapillarlage von außen ausgewählt und wie oben beim nativen Oxygenator beschrieben in ca. 10 x 5 mm (Breite x Höhe) große Stückchen geschnitten. Die Stückchen wurden nun in 500µl fassende Eppendorf-cups überführt und dreimalig mit PBST- Lösung gewaschen.

2.4.3 Direkte und indirekter Methode der Immunfluoreszenzfärbungen

Die folgenden Schritte unterschieden sich, je nachdem ob ein direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugierter Antikörper gewählt wurde oder ein sekundärer Antikörper (indirekte Methode) erforderlich war. In beiden Fällen wurde zusätzlich zur Antikörperfärbung eine Zellkernfärbung mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) vorgenommen. Die untersuchten Antikörper und die verwendeten Konzentrationen sind im Anhang 7.5.2 aufgeführt.

2.4.3.1 Direkte Methode (UEA-I-Lektin-FITC)

- die konzentrierte Antikörperlösung mit PBST-Lösung verdünnen
- 200µl der verdünnten Antikörperlösung auf das Präparat im Eppendorf-cup pipettieren und über Nacht im Kühlschrank (4°C) einwirken lassen
- 3 x Waschen mit jeweils 500µl PBST-Lösung
- 200µl DAPI-Lösung (1:66 verdünnt mit PBST-Lösung, ergibt 0,75µg/ml), 30 min., Raumtemperatur

2.4.3.2 Indirekte Methode (vWF, VE-Cadherin, CD146, CD45, CD68)

Bei Anwendung der indirekten Methode war als Erstes das Absättigen potentieller Bindungsstellen auf dem Präparat mittels Serum der Spezies (z. B. Esel), aus welcher der sekundäre Antikörper gewonnen wurde, notwendig. So wurde das unspezifische Binden des sekundären Antikörpers an Proteine des Präparates reduziert. Es wurden zwei verschiedene sekundäre Antikörper (Esel-anti-Maus-FITC und Esel-anti-Kaninchen-Texas Red) genutzt.

- Blocken mit Esel-Serum, 10%ig in PBST-Lösung verdünnt, 30 min., Raumtemperatur
- die konzentrierte Antikörperlösung in PBST-Lösung mit 10%igem Esel-Serum verdünnen
- 200µl der verdünnten Antikörperlösung auf das Präparat im Eppendorf-*cup* pipettieren und über Nacht im Kühlschrank (4°C) einwirken lassen
- 3 x Waschen mit jeweils 500µl PBST-Lösung
- die konzentrierte Lösung der sekundären Antikörpers in PBST-Lösung mit 10%igem Esel-Serum verdünnen
- 200µl der verdünnten Lösung des Sekundärantikörpers wird auf das Präparat gegeben, 90 min., Raumtemperatur
- 3 x Waschen mit 500µl PBST-Lösung
- 200µl DAPI- Lösung (1:66 verdünnt mit PBST-Lösung ergibt 0,75µg/ml), 30 min., Raumtemperatur

Beim Wechseln der einzelnen Lösungen wurde darauf geachtet, die Zeit, in der das Gaskapillarmattenstückchen trocken lag, möglichst kurz zu halten, da sich ansonsten eine höhere Hintergrundfluoreszenz bei der Mikroskopie gezeigt hatte. Die Präparate wurden von dem Eppendorf-*cup* auf einen Objektträger überführt, mit Fluoromount-G betropft und eingedeckelt.

2.4.4 Auswahl der Antikörper

Es wurden zunächst Antikörperkonzentrationen unter Verwendung von HUVECs und PBMCs aus der Zellkultur als Positivkontrolle auf Objektträger-*flasks* und Gaskapillarmattenstückchen eines nativen Oxygenators ausgetestet (Anhang 7.5.2).

2.4.4.1 vWF

Der polyklonale Kaninchen-anti-human-vWF-Antikörper wurde in Konzentrationen von 1:100 bis 1:10000 austriert. Als sekundärer Antikörper kam der Esel-anti-Kaninchen-Texas Red in einer Verdünnung von 1:400 zum Einsatz. Die optimale Verdünnung für auf Objektträger ausgesäte HUVECs lag bei 1:500 mit der vWF-typischen Markierung der Zellen mit einem granulären Muster im Zytoplasma der Zellen (Abbildung 5). Auf Gaskapillarmattenstückchen war die Färbung in einer Verdünnung von 1:500 zu kräftig (Abbildung 6 B), sodass weitere Verdünnungen notwendig waren. Die Färbung in einer Verdünnung von 1:10000 war zu schwach, sodass für die weiteren Arbeiten die Verdünnung

von 1:5000 gewählt wurde. Die Belichtung der Präparate erfolgte über 800 msec.. Bei längerer Belichtungszeit war die Hintergrundfluoreszenz der PMP-Membranen zu stark.

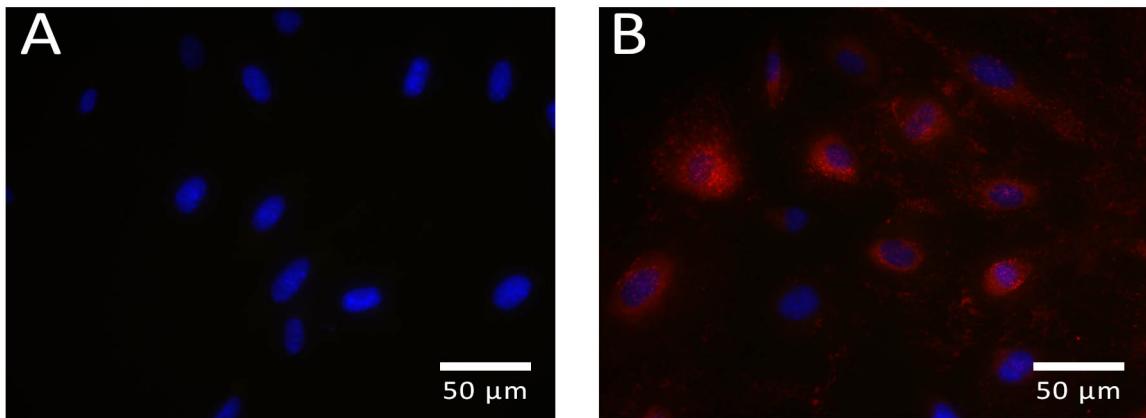


Abbildung 5 Anti-vWF-Texas Red-Färbung von HUVECs auf Objektträger

HUVECs auf die nur der sekundäre Antikörper und kein primärer Antikörper gegen vWF appliziert wurde stellten sich erwartungsgemäß nur mit der blauen DAPI-Fluoreszenz der Zellkerne dar (A). Bei Einsatz des primären Antikörpers gegen vWF erkannte man die granuläre rote Fluoreszenz des Texas Red-gekoppelten sekundären Antikörpers im Bereich der Zellen (B). (40x Objektiv, Auflösung 0,187 μm/Pixel)

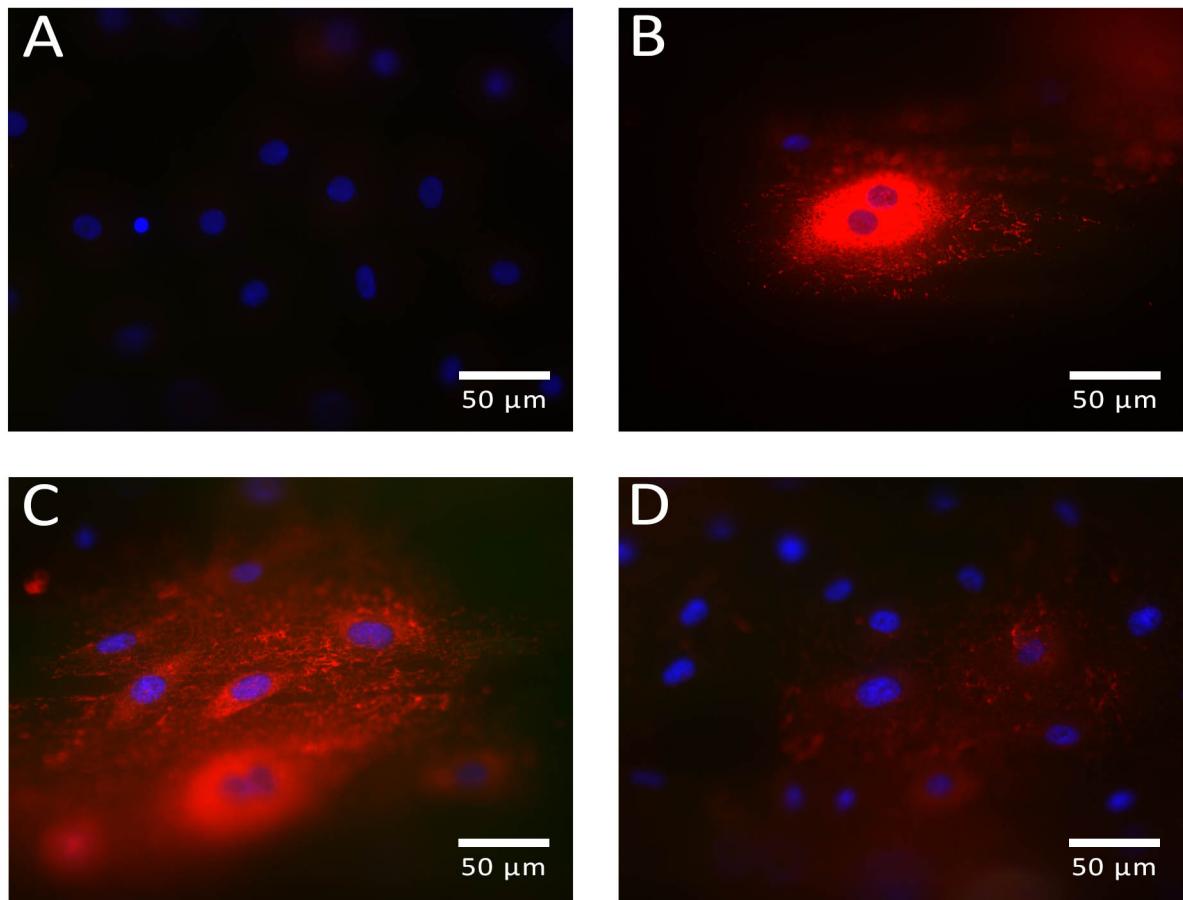


Abbildung 6 Anti-vWF-Texas Red-Färbung von PMBCs und HUVECs auf Gaskapillarmattenstückchen
 PMBCs stellten sich erwartungsgemäß negativ dar (A). Der primäre Antikörper, angewendet in einer 1:500 Verdünnung, resultierte in einer zu kräftigen Fluoreszenz (B), während die Verdünnung von 1:10.000 zu schwach erschien (D). Es wurde eine Verdünnung von 1:5000 des Kaninchen-anti-human-vWF gewählt. Esel-anti-Kaninchen-Texas Red in einer Verdünnung von 1:400. (40x Objektiv, Auflösung 0,187 μm/Pixel)

2.4.4.2 UEA-1-Lektin-FITC

Es wurde das Lektin-FITC in einer Verdünnung von 1:50 bis 1:1000 der Stammlösung von Beginn an auf Stückchen von Gaskapillarmatten, die entweder mit HUVECs oder mit PBMCs kultiviert wurden, angewendet (keine Untersuchung auf Objektträgern). Dabei gaben die Endothelzellen eine Fluoreszenz mit einem granulären Muster, besonders perinukleär und entlang der Zellmembran, ab (Abbildung 7 A), während die PBMCs negativ blieben (Abbildung 7 C). Ebenso wiesen HUVECs, die nur mit DAPI und nicht mit dem Lektin-FITC inkubiert wurden, keine Grün-Fluoreszenz auf (Abbildung 7 B). In allen Konzentrationen zeigte sich eine hohe Hintergrundfluoreszenz. In der Verdünnung von 1:1000 konnte diese minimiert werden, sodass diese Konzentration gewählt wurde, um sie auf die Patientenproben anzuwenden (Abbildung 7 D). Auf diesen zeigte sich keines der oben beschriebenen Endothelzell- typischen Färbemuster. Es wurden jedoch Zellen angefärbt, die eine stab- oder segmentkernige Morphologie aufwiesen und somit am ehesten granulozytäre Zellen waren.

Um die Färbung der Granulozyten durch das UEA-1-Lektin-FITC näher zu untersuchen, wurde mittels Durchflusszytometrie die Lektinbindung in Vollblutproben gesunder Probanden analysiert (Abbildung 8). Das Vollblut wurde sowohl mit dem UEA-1-Lektin-FITC als auch mit einem CD45-APC-Antikörper der Firma BD Bioscience inkubiert (Verfahren 2.3.1.1). Hierbei konnte festgestellt werden, dass Blutzellen, die das UEA-1-Lektin-FITC binden, insbesondere der Gruppe der Granulozyten angehörten. Zudem wurde ein kleinerer Anteil der Lymphozyten mit dem Lektin-FITC markiert. Etwa 99% der im FSC gegen SSC- Plot den Granulozyten zugeordneten Zellen waren UEA-1-FITC positiv und banden das Lektin. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass diese UEA-1-FITC-positiven Zellen zum weitaus größten Teil CD45-APC positiv waren. Diese Erkenntnis entsprach vorangegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe (Dissertation Eva Hagemeister). Es konnte somit gefolgert werden, dass das UEA-1-Lektin ungeeignet ist, Endothelzellen von peripheren mononukleären Zellen zu unterscheiden.

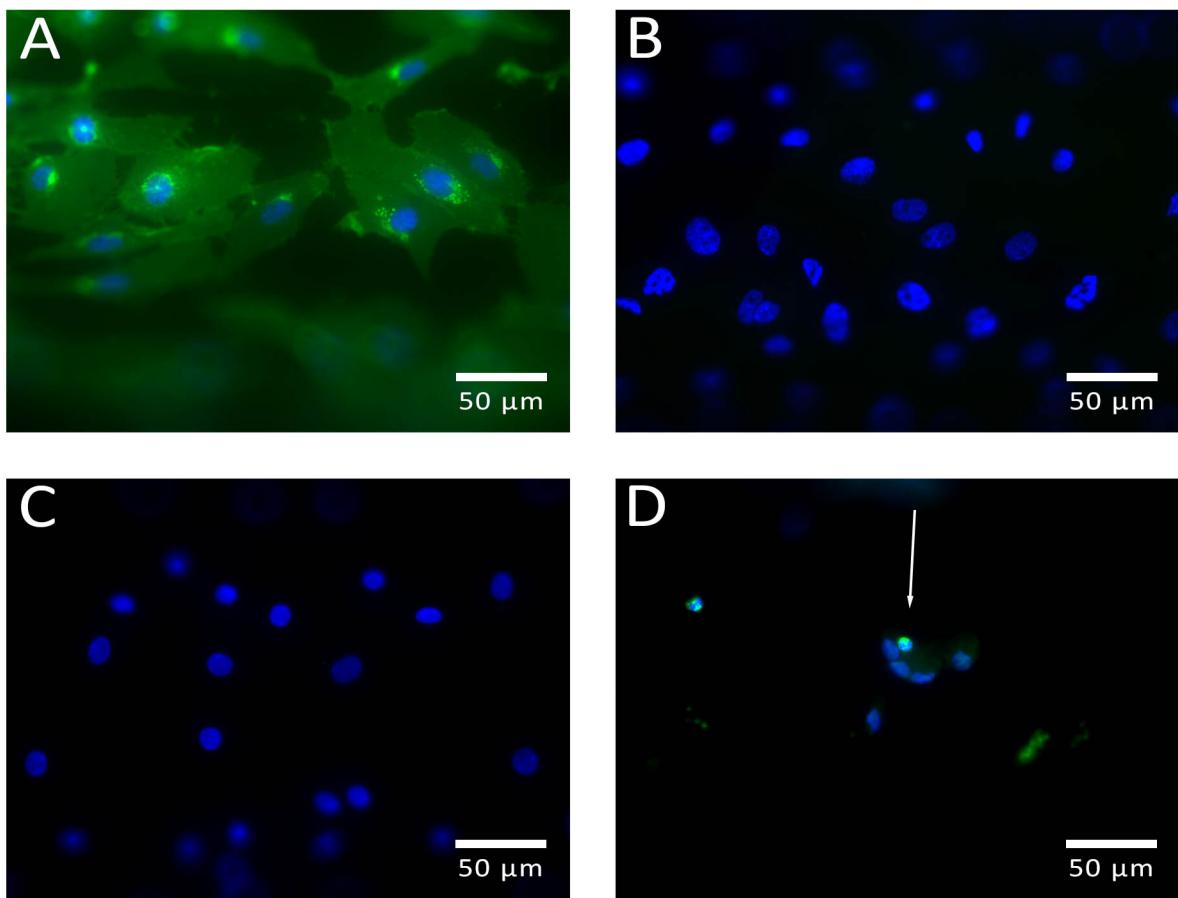


Abbildung 7 Färbung mit UEA-1-Lektin-FITC auf Gaskapillarmattenstückchen

A) HUVECs markiert mit UEA-1-Lektin-FITC erschienen mit einer Fluoreszenz, perinuklear und entlang der Zellmembranen; (B) HUVECs ohne UEA-1-Lektin-FITC waren negativ; (C) ebenso waren PBMCs mit dem UEA-1-Lektin-FITC ungefärbt; (D) auf Oxygenatorproben nach Einsatz am Patienten wurden auch Zellen markiert, die stab- oder segmentkernig waren (Pfeil); alle Präparat mit UEA-1-Lektin-FITC in 1:1000 Verdünnung. (40x Objektiv, Auflösung 0,187μm/Pixel)

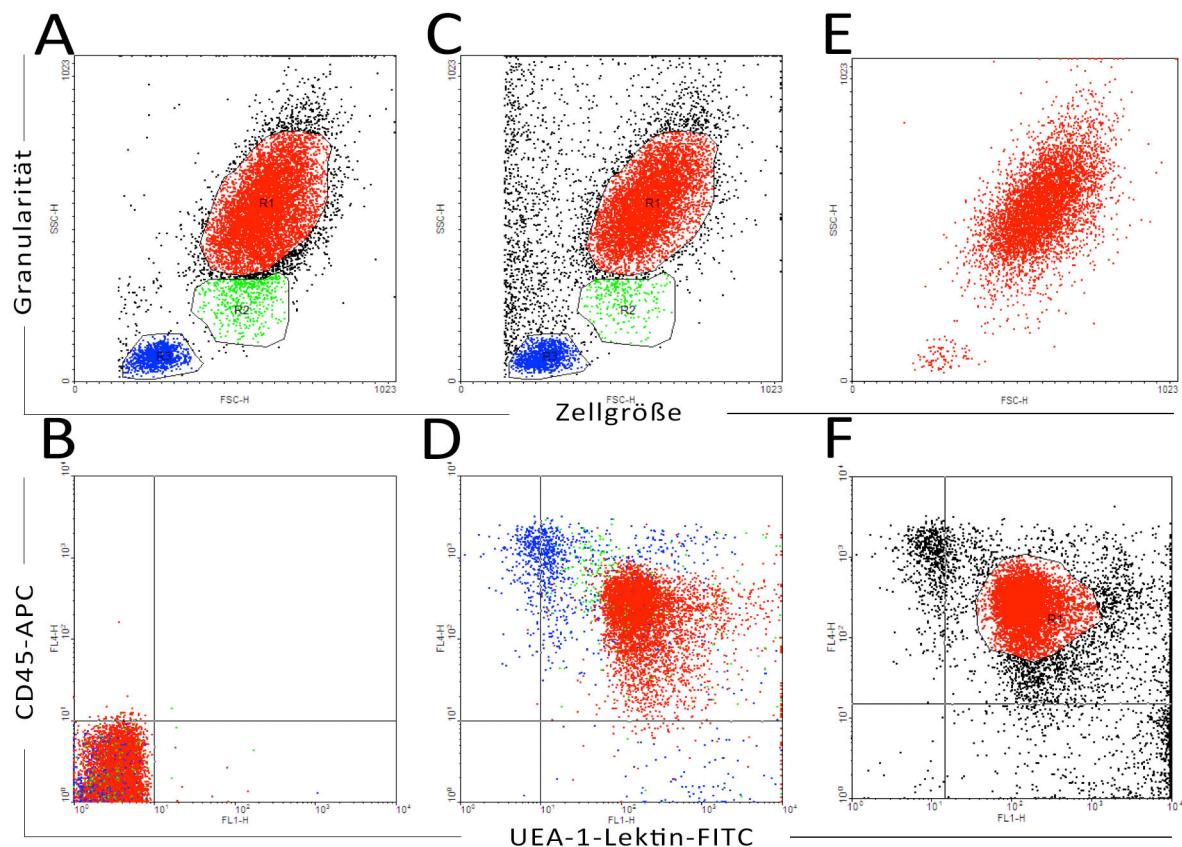


Abbildung 8 Durchflusszytometrie nach Anwendung von UEA-1-Lektin-FITC und Anti-CD45-APC auf Blutzellen

Vollblutproben ohne Antikörper zeigten im Forward (FSH-H) vs. Side (SSC-H)-Scatter die typische Aufspreizung der Granulozyten (Region R1), Monozyten (Region R2) und Lymphozyten (Region R3) (A). Die Einstellungen am Gerät wurden so gewählt, dass alle Zellen negativ im FL1-Kanal (UEA-1-FITC) bzw. FL4-Kanal (CD45-APC) waren (B). Die Doppelfärbung mit UEA-1-FITC und CD45-APC hatte keine Einfluss auf die Verteilung der Zellen im FSC vs. SSC-Plot (C). Die Zellen waren zu 70,48% CD45-APC positiv und zu 67,75% zusätzlich UEA-1-Lektin-FITC markiert (D); die in Region 1 in (C) umzeichneten Granulozyten waren zu 99% UEA-1-Lektin-FITC positiv; Zellen die UEA-1-Lektin-FITC (FL1) und CD45-APC (FL4) positiv waren (F), ließen sich im Forward-Side-Scatter als Granulozyten identifizieren (E).

2.4.4.3 VE-Cadherin

Die Färbungen gegen VE-Cadherin mit dem polyklonalen Kaninchen-anti-human-vE-Cadherin-Antikörper wiesen eine schwache aber spezifische Fluoreszenz der Endothelzellen auf, die auf Gaskapillaren kultiviert wurden (Abbildung 9). Die Markierung im austrierten Bereich zwischen 1:100 und 1:500 erschien entlang der Zellmembranen, wobei Zellgrenzen, die eine Nachbarzelle berührten, betont wurden. Bei einer Verdünnung von 1:200 war eine Belichtung über 1,5 Sekunden ausreichend. PBMCS, die als Kontrollprobe mit dem Antikörper inkubiert wurden, zeigten eine unspezifische, leichte Fluoreszenz (Abbildung 9 B), während Proben, die nur mit dem sekundären Antikörper inkubiert wurden, negativ waren. Eine weitere Verdünnung des Antikörpers über 1:200 führt zu einer zu schwachen Färbung. Der sekundäre Esel-anti-Kaninchen-Texas Red-Antikörper wurde bei allen Färbungen in einer Konzentration von 1:400 eingesetzt. Der VE-Cadherin-Antikörper erschien geeignet zur Markierung eines endothelialen Markers, jedoch sollte vor der Anwendung an Patientenproben die Methodik in Richtung einer kräftigeren Fluoreszenz weiterentwickelt werden. Diese könnte mit weiteren Titrationsreihen und Aufnahmen mit verschiedenen Belichtungszeiten erreicht werden.

2.4.4.4 CD146

Der CD146- Antikörper wurde in Verdünnung von 1:5 bis 1:40 auf Zellen auf Objektträgern ausgetestet. Dabei zeigten sich alle Färbungen sehr schwach und es waren hohe Belichtungszeiten (bis zu 8 Sekunden) nötig, um ein Bild zu produzieren (Abbildung 10, B). Die Zellen mit ihren Begrenzungen waren auf den Bildern gut zu erkennen, wobei dies weniger auf eine spezifische Markierung als auf eine Autofluoreszenz der Zellen zurückzuführen war (Negativkontrolle, Abbildung 10 A). Lediglich an umschriebenen Abschnitten der Zellmembranen und im Zytoplasma einiger Zellen fand sich eine stärkere Fluoreszenz granulären Musters, die auf eine Lokalisation des Antigens hinweisen könnte. Aufgrund der Schwierigkeiten geeignete Bilder zu erstellen, wurde der Antikörper in dieser Arbeit nicht weiter verwendet.

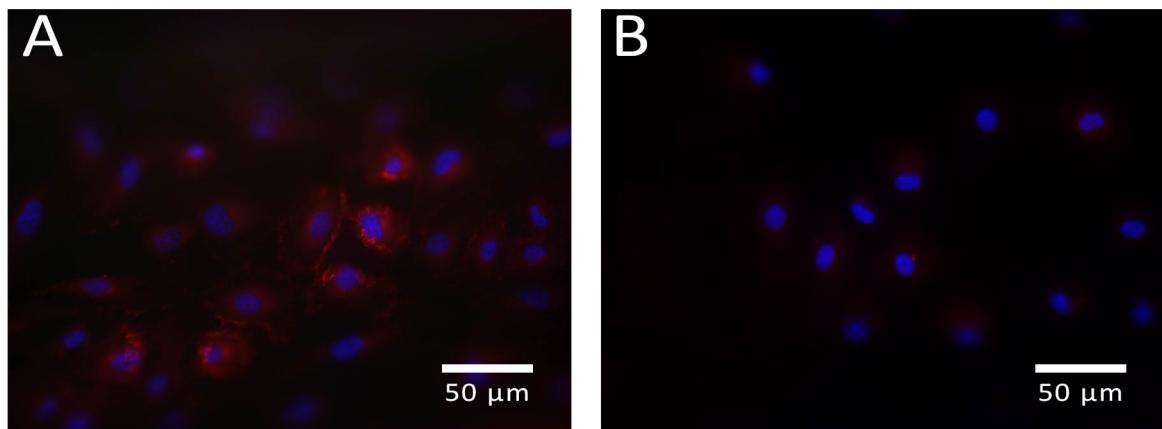


Abbildung 9 Färbung mit Anti-VE-Cadherin-Texas Red auf Gaskapillarmattenstückchen

Teils deutliche Markierung entlang der Zellmembran von HUVECs (A), während PBMCs keine Fluoreszenz zeigten (B); Kaninchen-anti-human-VE-Cadherin in einer Verdünnung von 1:200 und Anti-Kaninchen-Texas Red in einer Verdünnung von 1:600. (40x Objektiv, Auflösung 0,187μm/Pixel)

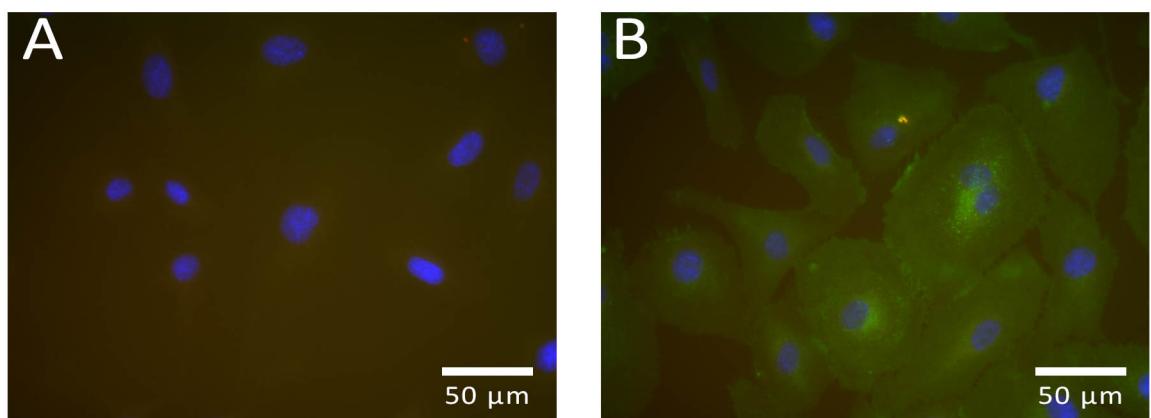


Abbildung 10 Färbung mit Anti-CD146-FITC auf Objektträgern

Die Anwendung des Anti-CD146 auf HUVECs führte nur zu einer sehr schwachen Fluoreszenz bei hoher Autofluoreszenz der Zellen während der langen Belichtungszeit von 8sec. Nur stellenweise waren intrazelluläre Granula und Abschnitte der Zellmembran kräftiger markiert (B). Ohne Zugaben des primären Antikörpers gegen CD146 zeigte sich eine Autofluoreszenz (A); Maus-anti-human-CD146 in einer Verdünnung von 1:5 und Anti-Maus-FITC in einer Verdünnung von 1:500. (40x Objektiv, Auflösung 0,187μm/Pixel)

2.4.4.5 CD45

Als ein Antikörper gegen das *leucocyte-common-antigene* (LCA, CD45) kam ein monoklonaler Antikörper aus der Maus zum Einsatz. Es wurden Verdünnung zwischen 1:50 und 1:200 anhand von Positivkontrollen auf Gaskapillarmattenstückchen austitriert. Die Applikation in 1:100 war geeignet, da hier leukozytäre Zellen kräftige Fluoreszenz zeigten und keine störende Hintergrundfluoreszenz auftrat. Der sekundäre Antikörper aus dem Esel wurde in einer Verdünnung von 1:250 angewandt. Als Belichtungszeit wurden 2 sec. eingestellt. Die Zellen zeigten insbesondere eine Markierung an der Oberfläche. Diese war bei Zellen, die sich mit einem nur dünnen Zytoplasmasaum darstellten und vermutlich Lymphozyten waren, besonders ausgeprägt. HUVECs wurden bei Anwendung des CD45-Antikörpers nicht markiert (Abbildung 11).

2.4.4.6 CD68

Der Antikörper gegen CD68 wurde in Konzentrationen von 1:100 bis 1:600 auf Gaskapillarmattenstückchen angewandt. Eine Verdünnung von 1:600 stellte sich als ausreichend dar. Die Zellen zeigten eine zytoplasmatische Färbung und nur eine geringe Markierung an der Zelloberfläche entsprechend den Angaben aus der Literatur (Mason et al. 2002). Von den kultivierten Blutzellen waren nahezu alle Zellen positiv (Abbildung 12). Für den verwendeten Antikörper des Klons KP1 ist eine Reaktivität mit sowohl mononuklären Phagen als auch mit Vorläufer der myeloiden Reihe sowie mit neutrophilen und basophilen Granulozyten und großen Lymphozyten beschrieben (Pulford et al. 1990). Der Antikörper eignet sich somit für die Markierung von leukozytären Zellen auf Oxygenatormembranen. Um das Antigen CD68 für eine weitere Subklassifikation (z. B. der mononukleäre Phagen) nutzen zu können, wäre die Auswahl eines spezifischeren Antikörperklons notwendig.

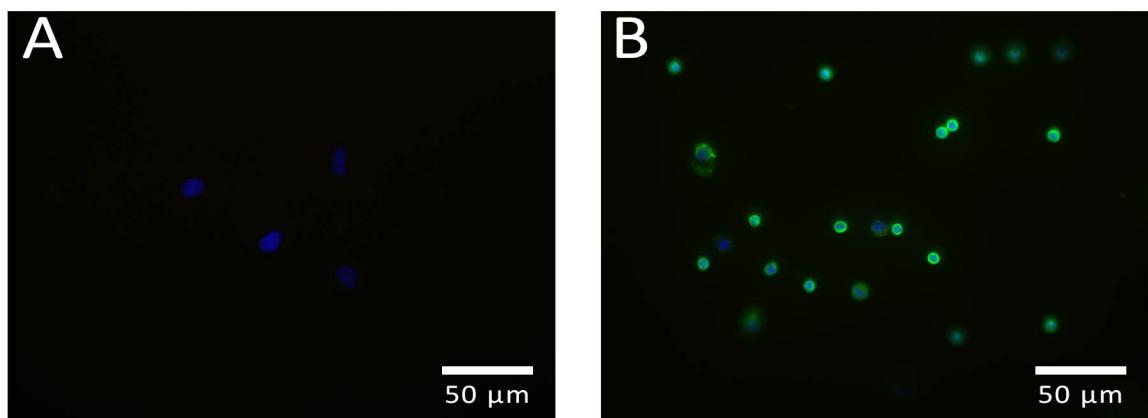


Abbildung 11 Färbung mit Anti-CD45-FITC auf Gaskapillarmattenstückchen

PBMCs nach Anwendung nur der sekundären FITC-gekoppelten Esel-anti-Maus zeigten sich ungefärbt (A), während nach Anwendung des primären Antikörpers gegen CD45 eine deutlich grüne Fluoreszenz der Zellen auftrat (B). Maus-anti-human-CD45 in einer Verdünnung von 1:100 und Esel-anti-Maus-FITC in einer Applikation von 1:250. (40x Objektiv, Auflösung 0,187 μm/Pixel)

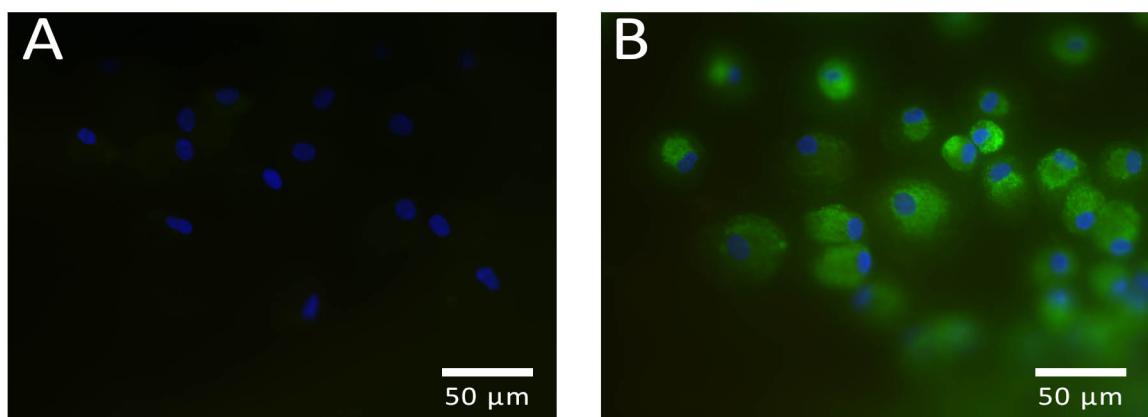


Abbildung 12 Färbung mit Anti-CD68-FITC auf Gaskapillarmattenstückchen

PBMCs stellten sich nach Färbung mit der Antikörper-Kombination des Maus-anti-human-CD68 in einer Verdünnung von 1:600 und des FITC-gekoppelten Esel-anti-Maus in einer Verdünnung von 1:250 mit einer deutlichen grünen, zytoplasmatischen Fluoreszenz dar (B). Ohne Anwendung des primären Antikörpers zeigten sich die PMBCs negativ (A). (40x Objektiv, Auflösung 0,187 μm/Pixel)

Nach Austestung der genannten Antikörper anhand von HUVECs und PBMCs wurden zwei Antikörper für eine Doppelfärbung unter Hinzunahme des Esel-anti-Maus-FITC und des Esel-anti-Kaninchen-Texas Red als Sekundärantikörper gewählt. Für den Nachweis von endothelialen Zellen wurde der Anti-vWF in den weiteren Arbeiten verwendet. In niedriger Konzentration und mit kurzer Belichtungszeit konnten Aufnahmen von Endothelzellen erstellt werden. vWF war für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit auch deshalb interessant, weil dieses Antigen auch in zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen nachgewiesen wurde (Hristov und Weber 2004). Die gleichzeitige Kernfärbung mit DAPI konnte die Identifizierung von Thrombozyten ausschließen. Zudem wurde für die Markierung von leukozytären Zellen der Anti-CD45 ausgewählt, da die Expression dieses *leucocyte-common-antigene* auf allen hämatopoetischen Zellen wie oben beschrieben hoch ist und sich somit zur Abgrenzung der Leukozyten von Endothelzellen eignet.

2.5 Mikroskopie

Die physikalischen und chemischen Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie sind im Anhang 6.2 beschrieben. Ebenso sind im Anhang die Prinzipien der Erstellung von digitalen Bildern mithilfe von *image processing systems* dargestellt (7.3).

2.5.1 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie hat sich zu einer wichtigen Methode in den Naturwissenschaften entwickelt und ermöglicht die Untersuchung von Strukturen bis hin zum Einzelmolekül. Die Herausforderung an den Aufbau des Fluoreszenzmikroskops ist die saubere Trennung des Anregungs- und Emissionslichtes. Dabei ist die eigentliche Lichtquelle des Aufbaus der Fluoreszenzfarbstoff, das Fluorochrom, selber (Romeis et al. 2010).

Die meisten Fluoreszenzmikroskope werden mit Auflichtillumination (oder auch Epi-Illumination genannt) betrieben. Das Objektiv hat dabei sowohl die Aufgabe, wie auch in der Durchlichtmikroskopie, das Präparat darzustellen und zu vergrößern, aber darüberhinaus auch als Kondensor für das Anregungslicht zu dienen. Dieser Aufbau hat den Vorteil, dass nur der geringe Anteil des vom Präparat reflektierten Anregungslichts vom Emissionslicht durch Filter getrennt werden muss (Lichtman und Conchello 2005). Als Kernstück ist das Fluoreszenzmikroskop mit einem Filterblock ausgestattet, der einen Exzitationsfilter, einen dichroitischen Spiegel (ein Strahlenteiler) und einen Emissionsfilter umfasst. Das von der Lichtquelle kommende Licht wird durch den Exzitationsfilter auf ein umschriebenes Wellenlängenspektrum eingeschränkt. Es wird anschließend durch den in einem Winkel von 45° zum einfallenden Licht angeordneten dichroitischen Spiegel in eine Richtung von 90° reflektiert und durch das Objektiv auf das Präparat geleitet. Das von diesem emittierte Licht weist ein längerwelliges Spektrum auf und kann deshalb den dichroitischen Spiegel passieren. Ein Emissionsfilter ist anschließend eine Barriere für alle ungewünschten Wellenlängen in Richtung des Okulars oder des Detektionssystems. Moderne Mikroskope sind mit mehreren Filterblocks auf einem Drehtisch ausgerüstet. Jede Kombination von Filtern weist eine bestimmte Wellenlängenspezifität auf (Spring und Davidson 2013).

Als Lichtquellen werden zumeist kompakte Quecksilber- oder Xenon-Hochdrucklampen genutzt, die hohe Lichtintensitäten liefern können. Sie werden von externen Gleichstromnetzgeräten versorgt, die kräftig genug sind, um die Lampen zu zünden und eine möglichst flimmerfreie Beleuchtung sicherzustellen. Nach einem Betrieb von 200 - 300

Stunden leuchten Hochdrucklampen nicht mehr effektiv und müssen ausgetauscht werden (Spring und Davidson 2013).

2.5.1.1 Aufbau des Mikroskops

Die Mikroskopie in dieser Arbeit erfolgte mit dem Leica Fluoreszenzmikroskop *DM RBE* (Bensheim, Deutschland).

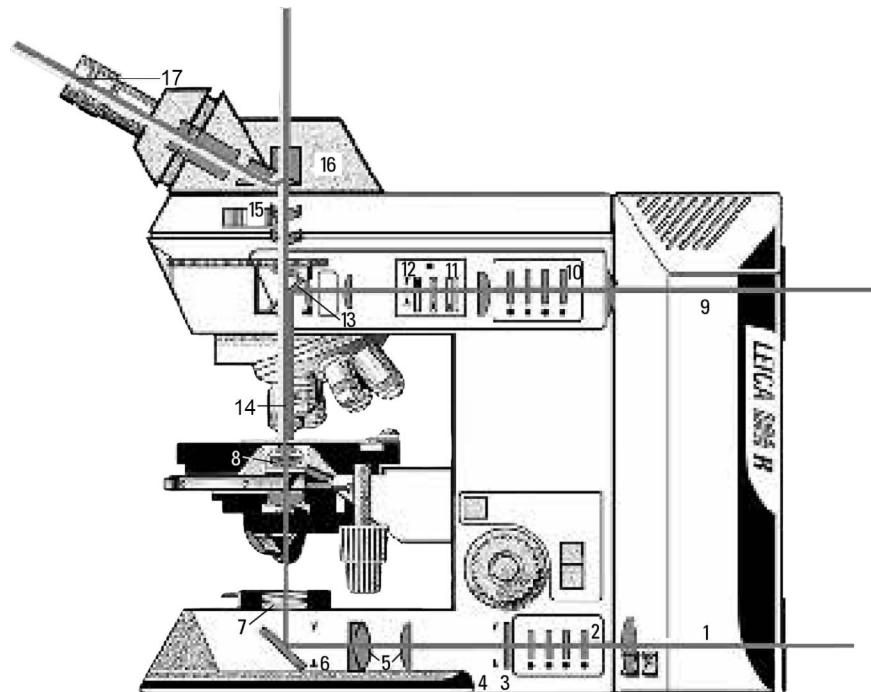


Abbildung 13 Leica Mikroskop DM RBE

Strahlengang in der Durchlichtmikroskopie: 1-Lichtquelle, 2-Filtermagazin, 3-Streuscheibe, 4-Aperturbblende mit 5-Abbildungssystem, 6-Leuchtfeldblende, 7-Polarisator, 8-Kondensor; Strahlengang in der Fluoreszenzmikroskopie: 9-Fluoreszenzlampe (Lampenhaus nicht gezeigt), 10-Filtermagazin, 11-Aperturbblende, 12-Leuchtfeldblende, 13-Filterblock; 14-Objektiv, 15- Tubusoptik, 16-Tubus, 17-Okular; aus Leica DM R Benutzerhandbuch (Leica Microsystems 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe für Immunfluoreszenztechniken eingesetzt (DAPI, FITC, Texas Red).

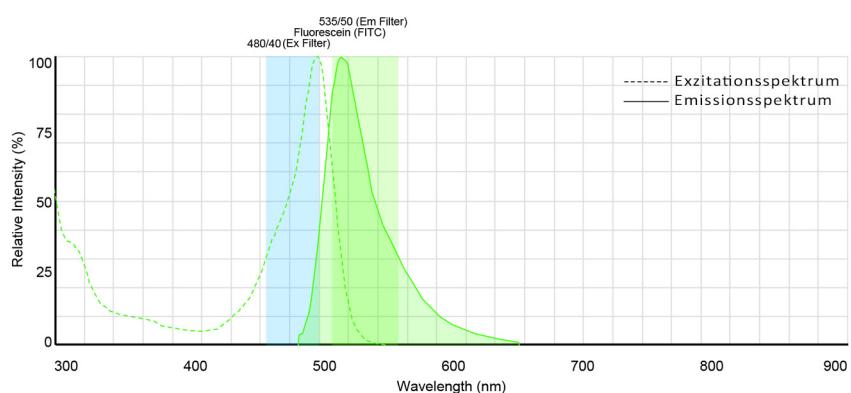
Im Mikroskop kommen folgende Filterblöcke zum Einsatz:

Tabelle 6 Filterblöcke im Leica DM RBE

Kanal	Hersteller	Exzitationsfilter	Strahlenteiler	Emissionsfilter
DAPI	AHF Analysetechnik AG			
FITC	AHF Analysetechnik AG	HQ 480 / 40	Q 505 LP	HQ 535 / 50
Texas Red	AHF Analysetechnik AG	HQ 535 / 50	Q 565 LP	HQ 620 / 20

Die Anregungs- und Emissionsspektren der verwendeten Fluorochrome FITC und Texas Red in Bezug auf die Exitations- und Emissionsfilter der in Tabelle 6 aufgeführten Filterblöcke sind in der Abbildung 14 dargestellt.

A



B

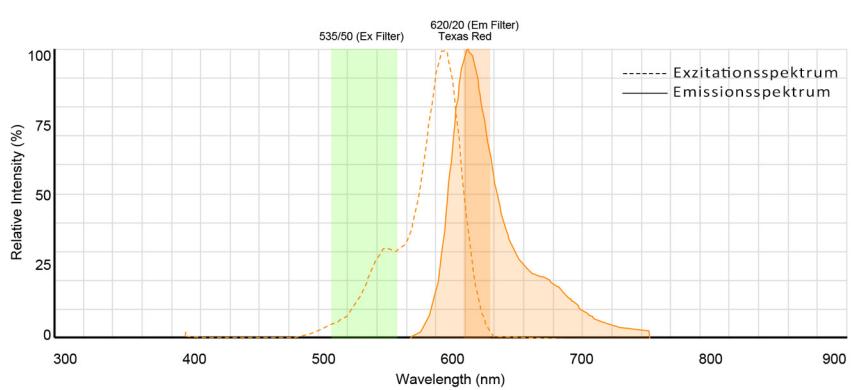


Abbildung 14 Eingesetzte Filter und Fluorophore

Dargestellt sind die in dieser Arbeit eingesetzten Filter und Fluorophore mit ihren Filterbandbreiten bzw. Exitations- und Emissionsspektren; FITC (A), Texas Red (B) Quellen: SpectraViewer ("Fluorescence SpectraViewer," aufgerufen April, 2013).

2.5.1.2 Objektive des Mikroskops

Am Mikroskop sind folgende Objektive eingerichtet:

Tabelle 7 Objektive und Bildaufnahmen des Mikroskops

Objektiv	Numerische	Auflösung	Breite x Höhe	Fläche
	Apertur	der Bilder	der Bilder	der Bilder
5x Objektiv	0,12	1,499µm/Pixel	2398,32µm x 1798,74µm	4,314mm ²
20x Objektiv	0,5	0,375µm/Pixel	599,58µm x 449,69µm	0,269mm ²
40x Objektiv	0,7	0,187µm/Pixel	299,79µm x 224,84µm	0,067mm ²

2.5.1.3 Einstellung des Mikroskops und der Software

Das Leica Mikroskop wurde zu Beginn jeder Untersuchung mit den immer gleichen Einstellungen eingerichtet (Anhang 7.4).

2.5.2 Aufnahmen der Bilder

Am Mikroskop ist eine Spot 2000 Kamera des Herstellers Diagnostic Instruments Inc., Sterling Heights, USA, mit 2 Megapixel und der Fähigkeit zur Aufnahme von Farbbildern in der Durchlichtmikroskopie und von monochromen Bildern (14-bit) in der Fluoreszenzmikroskopie installiert. In der vorliegenden Arbeit wurden nur monochrome Bilder fotografiert.

Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit der Software VisiView® der Firma Visitron Systems. VisiView® ist eine Software für Bioimaging und Mikroskopie mit den Möglichkeiten zur automatischen Bildaufnahme und zur Bildanalyse (Visitron Systems GmbH 2013). Zudem wird die Kamera mithilfe dieser Software gesteuert, sodass hier die Belichtungszeiten angepasst und weitere Einstellungen vorgenommen werden (Anhang 7.4).

2.5.2.1 Aufnahme einer Serie von Bildern

Um einen repräsentativen Ausschnitt jedes Präparates zu bekommen, wurde bei jeder Probe die jeweils fünfte Kapillare von oben ausgewählt. Entlang dieser Kapillare wurde eine Sequenz von zwölf Bildern in Vergrößerung mit dem 20x Objektiv aufgenommen (Abbildung 15).

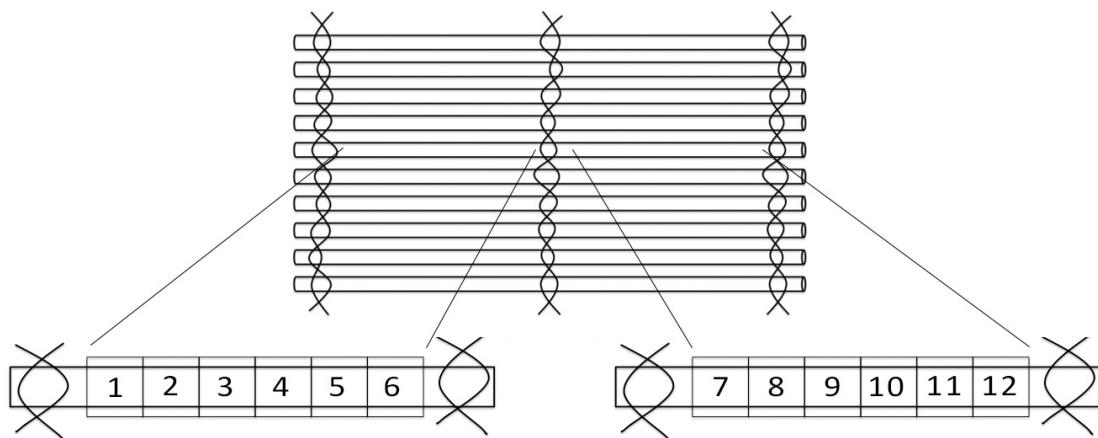


Abbildung 15 Gesichtsfelder und Nummerierung der Bilder

Es erfolgte die Auswahl der jeweils fünften Kapillare von oben und die Aufnahme von 12 Bildern entlang dieses Röhrchens unter Aussparung der Bereiche der Quervernetzungen.

Bei der Aufnahme der zwölf Bilder orientierte man sich an den Strukturen im Gesichtsfeld. Die Bilder wurden von angrenzenden Abschnitten der Gaskapillare und nicht überlappend aufgenommen. Der Fokus wurde mithilfe des Objekttisches manuell so eingestellt, dass jeweils die Zellen im Zentrum des Bildes scharf erschienen. Jede Einstellung wurde einmal im DAPI-, einmal im FITC- und einmal im Texas Red-Kanal mit den jeweils vorher definierten Belichtungszeiten fotografiert. Die Bilder wurden entsprechend der Bezeichnungen in der Abbildung 15 benannt und gespeichert. Es war somit eine Zuordnung des einzelnen Bildes zu einer Lokalisation auf der Kapillare und einem Fluoreszenz-Kanal möglich. Diese Sequenz von Bildern wurde als erstes von jedem Präparat aufgenommen, da vorherige Belichtungen während der Aufnahmen der weiteren Bilder die Fluoreszenz-Messungen in der Auswertung verfälscht hätten.

2.5.2.2 Aufnahme von Bildern zur qualitativen Auswertung

Es wurden von jedem Präparat vier Bilder in der Vergrößerung mit dem 40x Objektiv für die qualitative Auswertung aufgenommen. Dabei wurden vom Untersucher vier repräsentative Ausschnitte ausgewählt. Auch diese Bilder wurden einmal im DAPI-, einmal im FITC- und einmal im Texas Red-Kanal fotografiert.

2.5.2.3 Aufnahme von Übersichtsbildern

Zum Abschluss der Mikroskopie des einzelnen Präparates wurde ein Übersichtsbild im DAPI-Kanal erstellt. Dieses wurde mit dem 5x Objektiv aufgenommen und bestand aus drei Bildern, die jeweils im Gegensatz zu der oben beschriebenen Sequenz von 12 Bildern mit dem 20x Objektiv überlappend angeordnet waren, um eine spätere Rekonstruktion zu einem gemeinsamen Bild in Adobe Photoshop ® zu ermöglichen.

2.5.3 Bildbearbeitung

2.5.3.1 Bildoptimierung

Um die am Mikroskop aufgenommenen Bilder für die Darstellung am Computer-Bildschirm oder für den Druck zu optimieren, wurde mittels der Tonwertkorrektur in Adobe Photoshop® CS6 das Graustufenspektrum eingestellt. Vor der eigentlichen Bildoptimierung wurde eine Lichtereinstellung in der Tonwertkorrektur auf einen Wert von 64 vorgenommen. Diese Anpassung war nötig, da die 14-bit Bilder der Kamera des verwendeten Mikroskopes in Adobe Photoshop ® mit einem Umfang an Bildpunkten wie sie einem 16-bit Bild entsprechen

angezeigt wurden (siehe Abbildung 16). Nach dieser Einstellung wurde der volle Umfang der Graustufen [0...255] genutzt und im Histogramm angezeigt ($64=256/(2^{16}/2^{14})$).

Mit dem Tonwerte-Dialogfeld wurden die Tiefen (der Schwarzpunkt) und die Lichter (der Weißpunkt) neu gesetzt. Dabei wurden alle Bildpunktswerte zwischen diesen beiden Werten neu über den Graustufenbereich [0...255] verteilt. Alle Bildpunktswerte unter den Tiefen wurden reinem Schwarz und alle Bildpunktswerte über den Lichtern reinem Weiß zugeordnet. Zudem wurde mit dem Tonwerte-Dialogfeld der Gamma-Wert neu festgesetzt. Er wurde mit einem Wert von 0,7 dem Empfinden des menschlichen Auges angepasst. Durch diese beschriebenen Einstellungen war es möglich, in den Rohdaten unbemerkte Details zum Vorschein zu bringen (Murphy und Davidson 2013; Photoshop-Hilfe 2013). Bei der Tiefen- und Lichterbestimmung wurde mit der Schwellenwertanzeige vorgegangen. Dazu wurde bei Verschieben der Regler die [alt]- Taste gedrückt gehalten, sodass man die dunkelsten Tiefen bzw. die hellsten Lichter erkannte (Evening 2006). Diese Werte wurden als Schwarzpunkt und Weißpunkt übernommen. Die Parameter wurden separat für jeden Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörper eingestellt. Es wurden für alle Bilder einer Färbung die gleichen Einstellungen vorgenommen. Dabei wurde möglichst konservativ vorgegangen, um den Bildeindruck nicht zu verfälschen. Darüberhinaus wurden Techniken in dieser Arbeit immer über das gesamte Bild angewandt (Belichtungs- und Tonwerteinstellungen im Anhang 7.4 und 7.5.2).

2.5.3.2 *Overlay der monochromen DAPI-, FITC- und Texas Red-Bilder*

Die Bilder aus den drei Fluoreszenzkanälen wurden zur qualitativen Auswertung zu einem *Overlay*-Bild in Adobe Photoshop® kombiniert. Dazu wurden aus den optimierten 14bit-Graustufen-Bildern zunächst 8bit-Bilder erzeugt. Diese wurden in einem neuen RGB-Bild in den jeweilig blauen, grünen- oder roten Kanal eingefügt (Abbildung 17).

2.5.3.3 *Erstellung der Übersichtsbilder*

Die Übersichtsbilder wurden aus den drei mit dem 5x-Objektiv überlappend aufgenommenen DAPI-Bildern mithilfe der *Photomerge*-Automatisierung in Adobe Photoshop® erstellt. Die Software erkennt hierbei die sich entsprechenden Bereiche auf dem Präparat und fügt die drei Bilder zu einem Panorama-Bild zusammen.

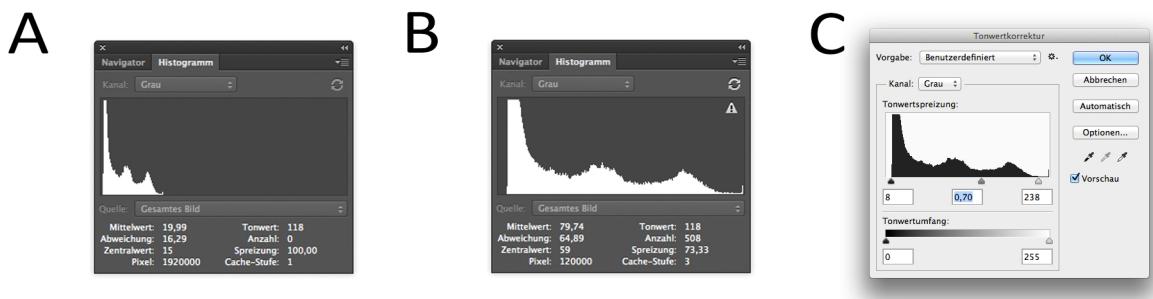


Abbildung 16 Histogramme und Tonwertkorrektur in Adobe Photoshop®

Histogramm eines Beispielbildes nativ (A) und nach Korrektur der Anzeige zur Darstellung des vollen Umfangs der Graustufen (B). Anschließend erfolgte die Tonwertkorrektur mit Einstellung der Tiefen und Lichter und des Gamma-Wertes auf 0,7 (C).

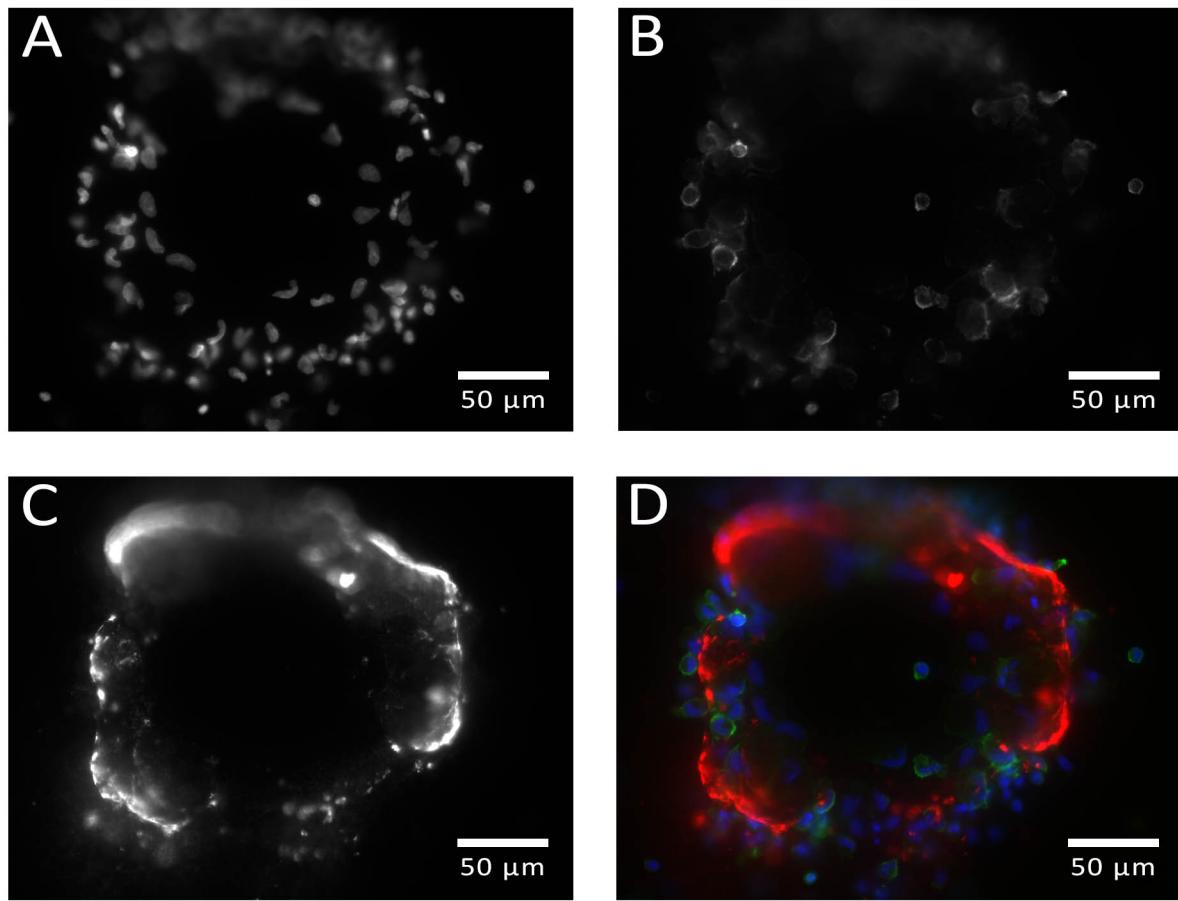


Abbildung 17 Overlay der Bilder

Monochrome Bilder aus dem DAPI- (A), FITC- (B) und Texas Red- (C) Kanal wurden zu RGB-Bildern umgewandelt und zu einem RGB-*Overlay*-Bild (D) zusammengefügt. (40x Objektiv, Auflösung 0,187 µm/Pixel)

2.6 Auswertung

2.6.1 Beurteilung der Übersichtsbilder

Auf den Übersichtsbildern (5x Objektiv) aus dem DAPI-Kanal wurden das Ausmaß und die Konfiguration der zellulären Ablagerungen auf den Präparaten der Oxygenatoren nach Einsatz am Patienten beschrieben. Dazu wurden drei Kriterien herangezogen, die bei der ersten Betrachtung der Präparate für auffällig gehalten worden waren und dann systematisch an allen Präparaten untersucht wurden.

1. Das Ausmaß zellulärer Ablagerungen wurde in den Abstufungen „wenig Zellen“, „viele Zellen“ und „massenhaft Zellen“ beurteilt. Auf Präparaten mit „wenig Zellen“ war die Dichte der DAPI-Fluoreszenz gering, die Zellen waren locker über die Kapillaren verteilt oder es waren nur einzelne stärkere Ansammlungen von Zellen zu erkennen (Abbildung 18 A). Waren die Zellen in großer Dichte über das gesamte Präparat verteilt, wurde diese Probe in die Kategorie „viele Zellen“ eingeteilt (Abbildung 18 C). War das Präparat in mehreren Schichten von Zellen besetzt, sodass die darunter liegenden Gaskapillaren nur noch schwerlich erkennbar waren, wurde die Probe mit „massenhaft Zellen“ eingestuft (Abbildung 18 B).
2. Es fanden sich, auf einem Teil der Präparate, zell- und fibrinhaltige Schichten, die mehrere Gaskapillaren überzogen. Diese Konfiguration der zellulären Ablagerungen wurde bereits in vorangegangenen Arbeiten dieser Arbeitsgruppe beschrieben und „Pseudomembranen“ genannt (Lehle et al. 2008) (Abbildung 18 B). Auf dieses Kriterium hin wurde nun auch das vorliegende Kollektiv von Oxygenatoren untersucht. Die Proben wurden in zwei Gruppen „mit“ und „ohne Pseudomembranen“ eingeteilt.
3. An den Kreuzungspunkten übereinander gelegener Gaskapillaren zeigten sich die zellulären Ablagerungen zum Teil mit einer Konzentration um diese Berührungs punkte herum. Es wurde eine „schwache“ (die Zellen sind locker um diese Punkte herum angeordnet), oder „starke“ (starke Konzentration der Zellen an den Kreuzungspunkten) beschrieben (Abbildung 18 D). Auf den übrigen Präparaten war „keine“ Konzentration der Zellen an den Kreuzungspunkten zu erkennen. Hier fand sich eine diffuse Verteilung der Zellen über die Gaskapillaren.

Tabelle 8 Kriterien zur Beurteilung der Übersichtsbilder

Kriterium	Abstufungen
1. Ausmaß zellulärer Ablagerungen	wenige Zellen
	viele Zellen
	massenhaft Zellen
2. Zell- und Fibrinhaltige Schichten	Pseudomembranen nicht vorhanden
	Pseudomembranen vorhanden
3. Konzentration um Kreuzungspunkte übereinanderliegenden Gaskapillaren	keine Konzentration
	schwache Konzentration
	starke Konzentration

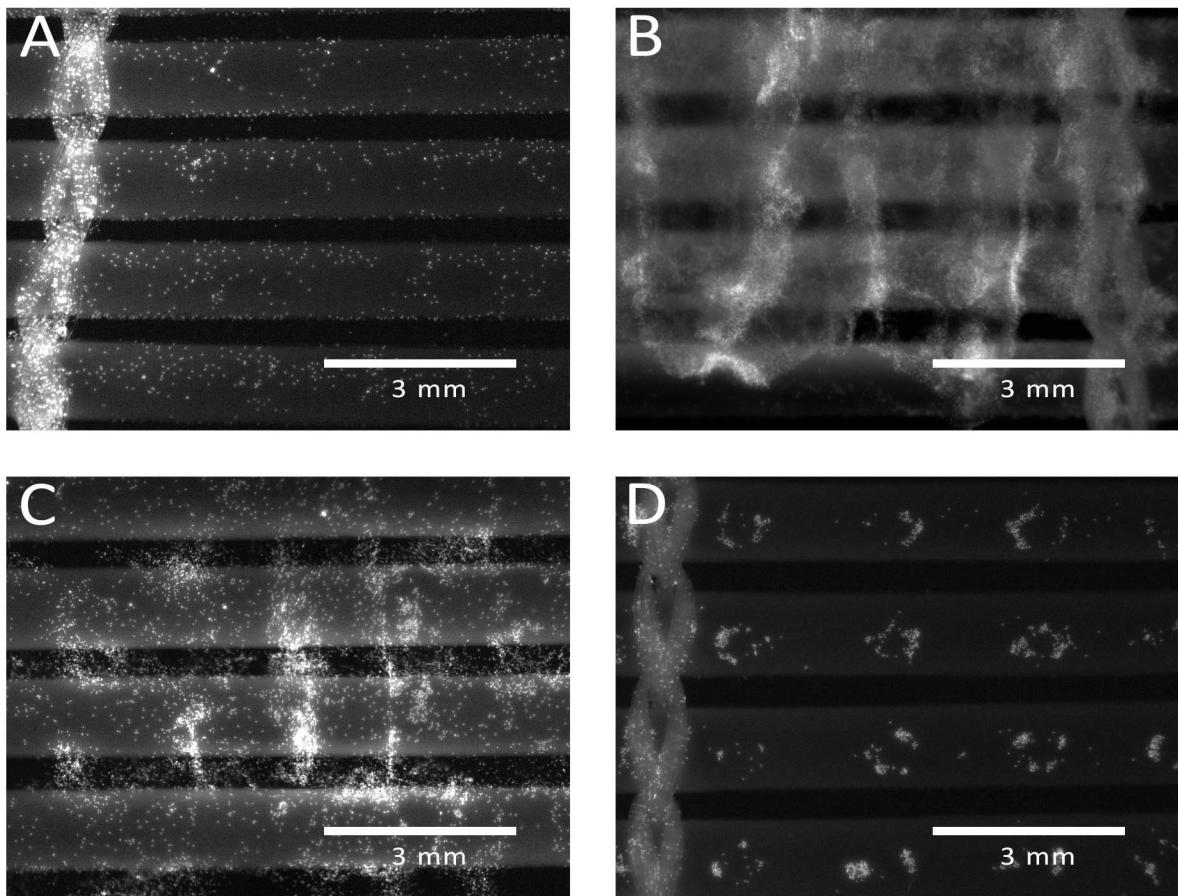


Abbildung 18 Kriterien zur Beurteilung der Übersichtsbilder

Auf Bild (A) wurden wenige Zellen ohne Bezug zu den Kreuzungspunkten gefunden. Bild (B) zeigte Pseudomembranen und massenhaft Zellen. Auf Präparat (C) waren zwar viele Zellen zu erkennen, es fanden sich jedoch keine Fibrin- und Zellhaltigen Schichten, die über die Gaskapillare ziehen. Bild (D) wies einen starken Bezug der Zellen zu den Kreuzungspunkten auf. (5x Objektiv, Auflösung 1,499µm/Pixel, Vergrößerung eines Teilbereiches des Bildes)

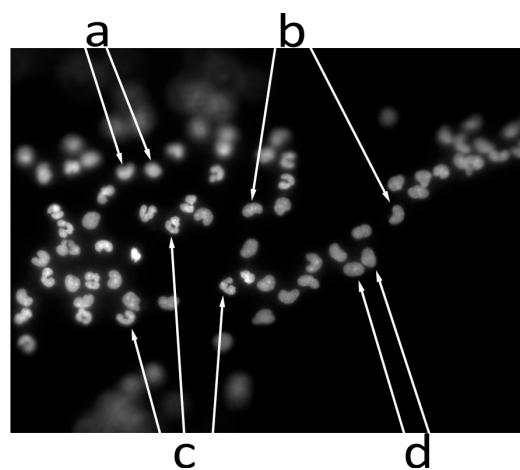


Abbildung 19 Zellkernmorphologie

Die Zellkerne (a) waren als Kerne zu erkennen, jedoch aufgrund der unscharfen Abbildung nicht klar morphologisch zu differenzieren. Die Kerne (b) wurden als nierenförmig, die Kerne (C) als stab- oder segmentkernig und die Kerne (d) als rundkernig klassifiziert.

2.6.2 Auszählung von Zellen

Die Quantifizierung von Zellen auf Gaskapillaren erfolgte mittels der Bildersequenz, die mit dem 20x Objektiv entlang der Gaskapillare aufgenommen wurde. Es wurden Zellkerne bis zu einem Mittel von 200 Zellen pro Bild ausgezählt und morphologisch eingeteilt. Bei darüberhinausgehenden Zellzahlen war eine Differenzierung der Zellgrenzen nur schlecht möglich, sodass auf diesen Präparaten die Zellzahlen nicht weiter erfasst wurden. Versuchsweise wurden zwei exemplarische Aufnahmen mit höheren Zellzahlen ausgezählt. Es wurden nur die 27 Oxygenatoren der Firma Maquet ® auf die Möglichkeit einer Quantifizierung der Zellen hin untersucht.

Die Zellzählung erfolgte mit dem Zählwerkzeug in Adobe Photoshop ®. Es wurden zunächst a) alle Zellkerne im Bild, anhand der DAPI-Fluoreszenz, gezählt und so die Gesamtzellzahl ermittelt. Dabei war es auch möglich Zellkerne in die Zählung aufzunehmen, die zwar unscharf zur Darstellung kamen, jedoch als Zellkern imponierten. Diese Zellkerne waren jedoch nicht morphologisch einzuordnen, sodass anschließend zunächst b) alle klar erkennbaren Zellkerne gezählt und markiert wurden. Diese Kerne wurden dann nach ihrem Erscheinungsbild drei Morphologiegruppen zugeordnet. Rundlich erscheinende Kerne wurden als c) „rundkernig“ klassifiziert, Kerne mit einer nierenförmigen Struktur als d) „nierenförmig“, und stäbchenartig konfigurierte oder gelappte Zellkerne wurden der Gruppe der e) „stab-und segmentkernige“ Zellen zugewiesen (Abbildung 19). Diese Einteilung erfolgte nach dem zu erwartenden Bild von Blutzellen gemäß der typischen Morphologie von Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen, bzw. der Granulozyten (Benninghoff und Drenckhahn 2004).

Die Zellen wurden zudem dahingehend untersucht, ob sie im FITC-Kanal eine Fluoreszenz zeigten. So konnte der Anteil Anti-CD45-FITC-positiver Zellen erfasst werden. Es wurden dazu die, wie oben beschrieben, beurteilbaren Zellen im DAPI-Kanal gezählt und markiert. Anschließend wurde das Bild im FITC-Kanal angezeigt und eine um den Zellkern lokalisierte FITC-Fluoreszenz registriert. Eine Quantifizierung der vWF-positiven Zellen erschien nach Betrachtung mehrerer Präparate nicht möglich, da wie unten beschrieben, vWF-positive Zellen Einzelfälle darstellten. Die gewonnenen Daten wurden in einer Tabelle in Microsoft Excel zusammengestellt und die mittlere Anzahl der Zellen pro Bild aus den 12 Aufnahmen pro Präparat berechnet. Zudem wurde die Anzahl der Zellen in den jeweiligen Morphologiegruppen festgehalten und ein Mittelwert pro Präparat gebildet.

2.6.3 Berechnungen aus den Bildpunktinformationen

Wie in 2.6.2 dargestellt erfolgte eine direkte Erfassung der Zellzahl anhand der Bilder des DAPI-Kanals für das Kollektiv der Maquet- Oxygenatoren. Um das Ausmaß der zellulären Ablagerungen und das Vorkommen Anti-CD45-FITC-positiver Strukturen auch ohne Zellzählung in semiquantitativer Form auf den weiteren in dieser Arbeit untersuchten Oxygenatoren erfassen zu können, sollten Parameter der Fluoreszenz aus den aufgenommenen Bildern gefunden werden, die indirekt Rückschlüsse auf das Ausmaß der Markierung von Strukturen mittels Fluorochromen erlaubten.

Es erfolgten Berechnungen anhand der Bildpunktinformationen mithilfe des Programmes imageJ64 (U.S. National Institutes of Health, Bethesda). Ein Macro für die Analyse wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Gleich, Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum Regensburg, zur Verfügung gestellt (Anhang 7.4.1). Das Macro ermöglichte die automatische Berechnung der Bildpunktinformationen einer Sequenz von Bildern in einem Dateiordner. Es wurden die durch die Anzahl der Bildpunkte ausgedrückte Fläche, der mittlere Grauwert mit Standardabweichung für das gesamte Bild und die Anzahl von Bildpunkten in 32 festgelegten Schwellenwertbereichen ausgegeben.

Es sollte ein Schwellengrauwert (SGW) gefunden werden, der „negative“ von „positiven“ Pixeln trennt. Im Anschluss sollte es dann möglich sein, anhand der Anzahl von Bildpunkten in den 32 Schwellenwertbereichen die Anzahl „überschwelliger“ Pixel zu ermitteln. Zur Festlegung des Schwellengrauwert, der dunklere von helleren Pixel unterscheidet, erfolgte die qualitative Beurteilung mehrere Bilder in der oben beschriebenen Tiefen- und Lichterkorrektur (Abbildung 16). So ließen sich die Pixel, die aufgrund der Fluoreszenz der Farbstoffe helle Grauwerte haben, im Vergleich zu Pixeln, die Hintergrundfluoreszenz darstellen, anzeigen. Der Schwellengrauwert wurde für alle drei Fluoreszenzkanäle (DAPI, FITC und Texas Red) mit 1536 festgelegt.

Die anschließende Weiterverarbeitung der Daten wurde im Programm Microsoft Excel vorgenommen. Hier wurden sowohl Werte für jedes einzelne Bild als auch Werte pro Präparat berechnet.

Für jedes einzelne Bild wurden folgende Werte ermittelt:

- der mittlere Grauwert aller Bildpunkte des Bildes
- die Anzahl der Bildpunkte über dem Schwellengrauwert

Aus diesen Werten wurden folgende Werte für das Präparat (mit n=12 Bildern) berechnet:

- der mittlere Grauwert aller Bildpunkte aller Bilder eines Präparates, im Folgenden der „Mittlere Grauwert“ genannt
- die Anzahl der Bildpunkte mit Grauwerten über dem Schwellengrauwert von 1536 kumulativ über alle 12 Bilder eines Präparates, im Folgenden die „Summe der Pixel über dem Schwellengrauwert“ genannt. Aus diesem Wert kann der Flächenanteil der Pixel im Bezug auf die Gesamtpixelzahl berechnet werden, im Folgenden „Anteil der Pixel über dem Schwellengrauwert“ genannt

2.7 Testung der Methodik anhand von HUVEC- / PBMC- Mischkulturen

Bevor die beschriebene Methodik zur Auswertung der Bildpunktinformationen auf die Proben der am Patienten eingesetzten Oxygenatoren angewandt wurde, sollte getestet werden, ob sich der festgelegte Schwellengrauwert eignet, Fluoreszenzfarbstoff- markierte von unmarkierten Zellen zu unterscheiden. Die Testung wurde anhand von bekannten Zellen (HUVECs und PBMCs), die mit und ohne den primären Antikörper gegen CD45 und vWF behandelt worden waren, durchgeführt. Auf alle Präparate wurden die sekundären Fluorochrom-gekoppelten Antikörper (Esel-anti-Maus-FITC und Esel-anti-Kaninchen-Texas Red) appliziert. In der Zellkultur wurden Präparate mit HUVECs und PBMCs auf nativen Gaskapillarmattenstückchen hergestellt. Es wurden Präparate mit Zellen, die aus dem Blut von sechs gesunden Spendern isoliert wurden, jeweils in Mischkultur mit HUVECs angefertigt. In drei gleichen Versuchsdurchgängen wurden jeweils eine Sequenz von 12 Bildern des Präparates mit Primärantikörper und eine Sequenz von 12 Bildern des Präparates ohne Primärantikörper erstellt (Abbildung 20). Die fotografierten Bilder wurden wie oben beschrieben mit imagej und Microsoft Excel analysiert, sodass man den mittleren Grauwert und die Summe der Pixel über dem Schwellengrauwert pro Bild, pro Präparat und im Mittel pro Spender erhielt.

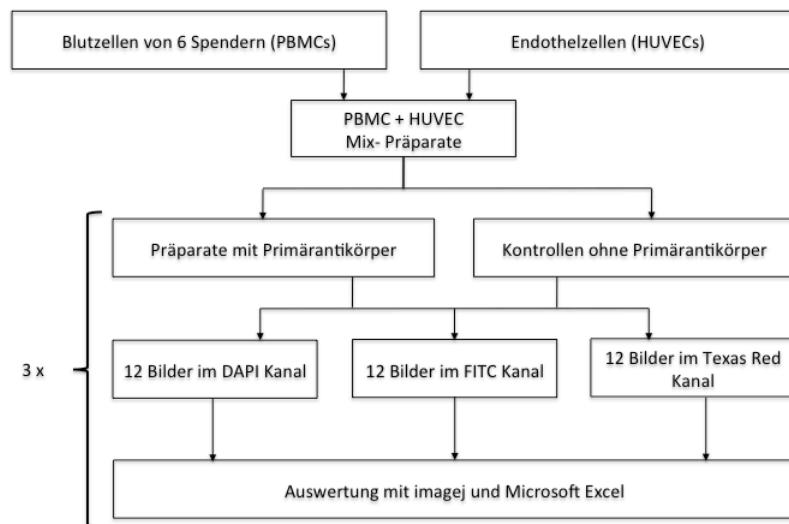


Abbildung 20 Vorgehensweise bei der Testung der Methodik anhand von Positivkontrollen

Es wurden von den Mischpräparaten zudem auch Aufnahmen zur qualitativen Beurteilung aufgenommen. Wie auf Abbildung 23 zu erkennen ist, stellten sich sowohl die HUVECs als

auch die PBMCs der Spender mit einer deutlichen Markierung dar. Die Präparate, auf denen nur der sekundäre Antikörper zu Anwendung kam, zeigten nur die DAPI-Fluoreszenz der Zellkerne.

Es wurden nun der mittlere Grauwert und die Summe der Pixel über dem Schwellengrauwert pro Bild, pro Präparat und im Mittel pro Spender berechnet. In der beispielhaften Darstellung (Abbildung 21) der 12 Bilder des Präparates Nr. 1 mit sekundärem Antikörper und der 12 Bilder des Präparates Nr. 1 ohne sekundären Antikörper zeigte sich die Streuung der Werte zwischen den einzelnen Bildern entlang der Gaskapillare. Es zeigten sich ein niedrigerer mittlerer Grauwert und ein geringerer Anteil der Pixel über dem Schwellenwert bei den Bildern ohne sekundären Antikörper.

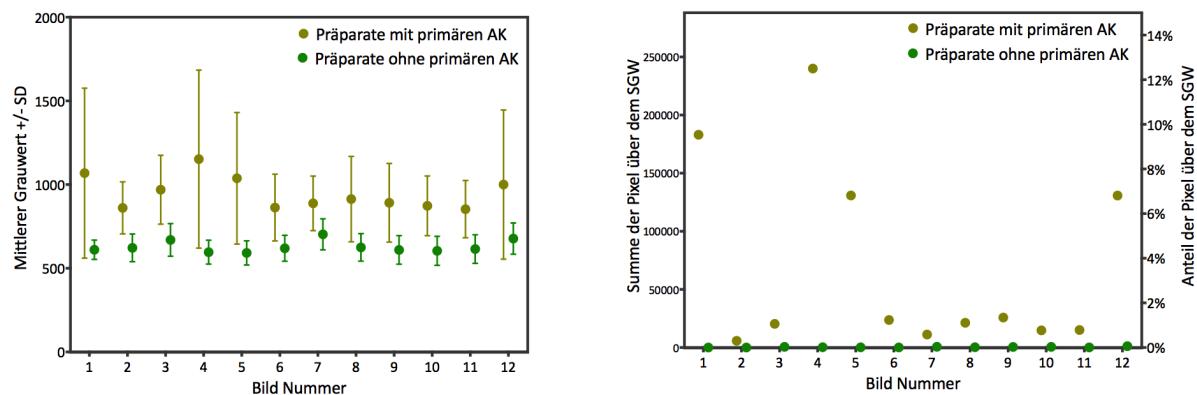


Abbildung 21 Streuung der mittleren Grauwerte und der Summen der überschwelligen Pixel der Einzelbilder

Aufgetragen sind für die Einzelbilder des Präparates Nr. 1 die mittleren Grauwerte (linke Grafik) und die Summen der Pixel über dem Schwellengrauwert (rechte Grafik) der Aufnahmen im FITC-Kanal.

Die Daten der drei gleichen Versuchsdurchgänge mit den Mischkulturen der HUCECs und PBMCs wurden zunächst auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse hin untersucht. Die Analyse der Ergebnisse für einen bestimmten Fluoreszenzkanal erfolgte jeweils mittels des Friedman-Tests (nichtparametrischer Test, mehrere verbundene Stichproben). Es sollte betrachtet werden, ob sich die Werte der Aufnahmen der Präparate mit und ohne den Primärantikörper in einem bestimmten Fluoreszenzkanal in den drei Versuchsdurchgängen bei einem vorgegebenen Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ signifikant unterscheiden. Sollte dies nicht der Fall sein, sollte von der Nullhypothese ausgegangen werden, dass sich die Ergebnisse in den drei Versuchsdurchgängen nicht signifikant unterscheiden. Aus den Daten der drei Versuchsdurchgänge im DAPI-, FITC-, und Texas Red-Kanal wurden jeweils der mittlere Grauwert und die Summe der Pixel über dem Schwellengrauwert der sechs Spender untersucht ($n=6$, 3 Versuchsdurchgänge). In der Tabelle 9 sind die entsprechenden p-Werte

für die drei Versuchsdurchgänge mit und ohne primären Antikörper in den jeweiligen Fluoreszenzkanälen aus dem Friedman-Test zu finden. Hierbei zeigte sich, dass die Ergebnisse in den drei Versuchsdurchgängen nicht signifikant verschieden waren. Somit sprachen die Ergebnisse der Untersuchung der Daten mittels des Friedman- Test nicht gegen die Reproduzierbarkeit der Methodik.

Tabelle 9 Ergebnisse des Friedman- Tests zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Untersuchungen

Präparate	Fluoreszenzfarbstoff	p-Wert	p-Wert	Bewertung
Mit primären Antikörper	DAPI	0,846	0,311	n.s.
	FITC	0,311	0,846	n.s.
	Texas Red	0,513	0,846	n.s.
Ohne primären Antikörper	DAPI	0,513	0,311	n.s.
	FITC	0,223	0,513	n.s.
	Texas Red	0,115	0,311	n.s.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Präparate mit und ohne Primärantikörper anhand der mittleren Grauwerte oder der Summen der Pixel über dem Schwellenwert zu unterscheiden waren. Dazu wurden aus den Werten der drei untersuchten Präparate ein mittlerer Grauwert und eine mittlere Summe der Pixel über den Schwellenwert pro Spender berechnet (Abbildung 20). Die Werte wurden mittels des Wilcoxon-Tests auf signifikante Unterschiede untersucht (nichtparametrischer Test, zwei verbundene Stichproben, Signifikanzniveau $\alpha=0,05$). Die Ergebnisse bezüglich der DAPI- Fluoreszenz zeigten für die Präparate mit und ohne Primärantikörper erwartungsgemäß keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 22 jeweils linke Abschnitte der beiden Grafiken); beide Proben wurden mit dem DAPI- Farbstoff inkubiert. Bezuglich der Werte im FITC- und im Texas Red- Kanal fanden sich Unterschiede (Abbildung 22 jeweils der mittlere und rechte Abschnitt der beiden Grafiken); die Unterschiede zwischen den mittleren Grauwerten im Texas Red-Kanal und zwischen den Summen der Pixel über dem Schwellengrauwert im FITC- und Texas Red- Kanal waren signifikant. Der mittlere Grauwert im FITC-Kanal war bei den Präparaten mit und ohne Primärantikörper knapp nicht signifikant verschieden ($p=0,065$). Bei der Bewertung dieses Ergebnisses muss der geringe Anteil FITC-positiver Strukturen berücksichtigt werden. Aus diesen Erkenntnissen konnte gefolgert werden, dass man anhand der Aufnahmen im FITC- und Texas Red- Kanal durch die Ermittlung der mittleren Grauwerte und, besser noch,

der Summen der Pixel über dem Schwellengrauwert die Präparate mit und ohne Primärantikörper unterscheiden konnte. Somit war die Anwendung der gewählten Antikörperkombination für die weiteren Untersuchungen dieser Arbeit geeignet.

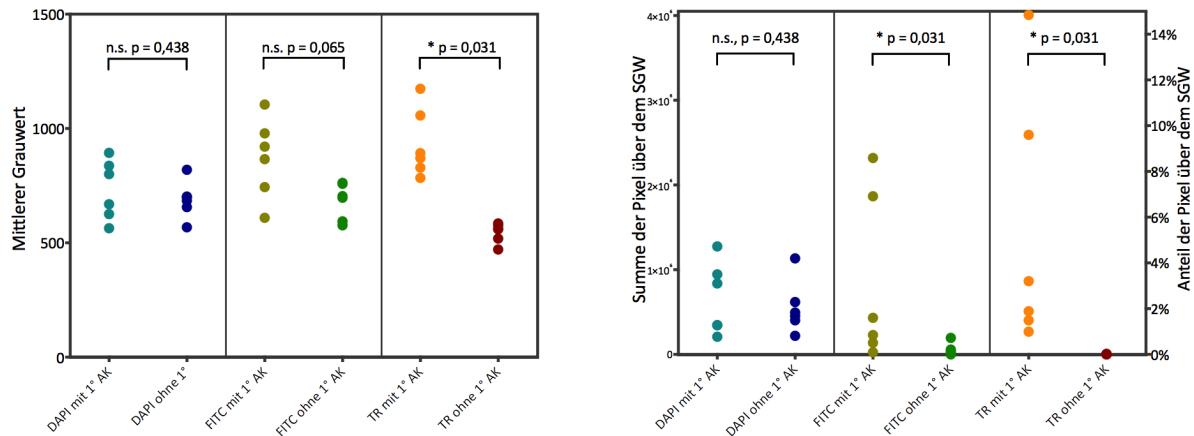


Abbildung 22 Mittlere Grauwerte und Summen der überschwelligen Pixel für die Präparate mit und ohne Primärantikörper

Aufgetragen sind die mittleren Grauwerte (links) sowie die Summen der Pixel über dem Schwellengrauwert (rechts) für die Aufnahmen der HUVEC-/PMBC- Mischpräparate als Positivkontrollen. In den unterteilten Bereichen der Graphen finden sich jeweils die Werte für die Präparate, auf die der primäre Antikörper und der sekundäre Fluorochrom-gekoppelte Antikörper angewandt wurde, und die Werte der Präparate, auf die nur der sekundäre Antikörper appliziert wurde. Für die Bilder im DAPI-Kanal fanden sich erwartungsgemäß keine signifikanten Unterschiede. Für die FITC- und Texas Red- Bilder zeigten sich Unterschiede, welche bezüglich der mittleren Grauwerte im Texas Red- Kanal und bezüglich der Summen der überschwelligen Pixel im FITC- und Texas Red- Kanal signifikant waren. (Wilcoxon- Test)

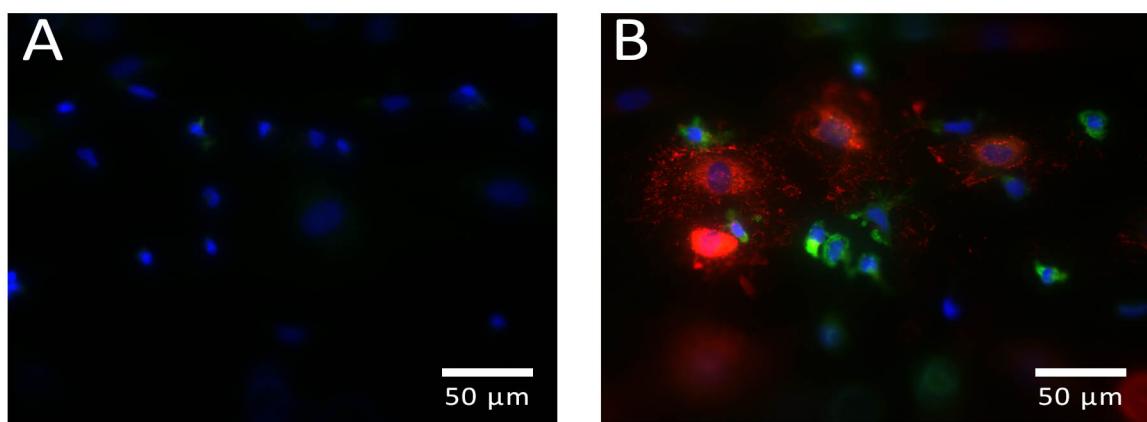


Abbildung 23 Mischpräparate von HUVECs und PBMCs auf Gaskapillarmattenstückchen

Sowohl HUVECs als auch PMBCs zeigten nach Applikation der gewählten Antikörperkombination gegen CD45 und vWF eine deutliche Fluoreszenz im FITC- bzw. im Texas Red- Kanal (B). Zellen, auf die nur der sekundäre Antikörper ohne vorherige Applikation des primären Antikörpers zu Anwendung kam, (A) wiesen keine Markierung durch Fluorochrom gekoppelte Antikörper auf und zeigten nur DAPI. (40x Objektiv, Auflösung 0,187 μm/Pixel)

2.8 Anwendung der Methodik auf Proben aus Membranoxygenatoren

Nachdem gezeigt wurde, dass sich die Analyse der Bildpunktinformationen zur Unterscheidung von Fluoreszenzfarbstoff-markierten und nicht-markierten Strukturen eignet, wurde die Methodik auf Präparate von Gaskapillarmattenstückchen aus Oxygenatoren nach Einsatz in der ECMO-Behandlung der Patienten angewandt. Es sollte gezeigt werden, dass eine Abhängigkeit der Immunfluoreszenz von dem Ausmaß der zellulären Ablagerungen bestand. Dazu wurden die Sequenzen der Bilder, die mit dem 20x Objektiv aufgenommen wurden, analysiert und in Bezug zu den tatsächlich ermittelten Zellzahlen gesetzt.

2.8.1 *DAPI-Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zellzahl pro Bild*

Die DAPI-Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zellzahl wurde auf den Präparaten des Maquet-Kollektivs untersucht. Es sollte für die weiteren Untersuchungen ein repräsentativer Wert für das Ausmaß der zellulären Ablagerungen gefunden werden. Dazu wurden der mittlere Grauwert und die Summe der Pixel über dem Schwellengrauwert, jeweils ermittelt für die Bilder des DAPI-Kanals, in Abhängigkeit von der mittleren Zellzahl pro Bild graphisch aufgetragen (Abbildung 24). Eine Korrelationsanalyse wurde mit dem Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman durchgeführt. Diese zeigte sowohl eine positive Korrelation des mittleren Grauwertes (Spearman's $r=0,87$, $p<0,0001$) als auch der Summe der Pixel über dem Schwellengrauwert (Spearman's $r=0,89$, $p<0,0001$). Im Rahmen der Zellzählung wurden auch zwei Präparate mit im Mittel über 200 Zellen pro Bild versuchsweise ausgezählt. Die Extrapolation der linearen Regression für die Abhängigkeit des mittleren Grauwertes von der Zellzahl zeigte eine Lage der beiden höheren Zellzahlen innerhalb des 95%igen Konfidenzintervalls.

In den weiteren Auswertungen dieser Arbeit wurde die Summe der Pixel über dem Schwellengrauwert als repräsentativer Wert für das Ausmaß der zellulären Ablagerungen herangezogen, da dieser, ausgedrückt in dem Anteil der Pixel über dem Schwellengrauwert in Prozent, einen anschaulichen Wert liefert.

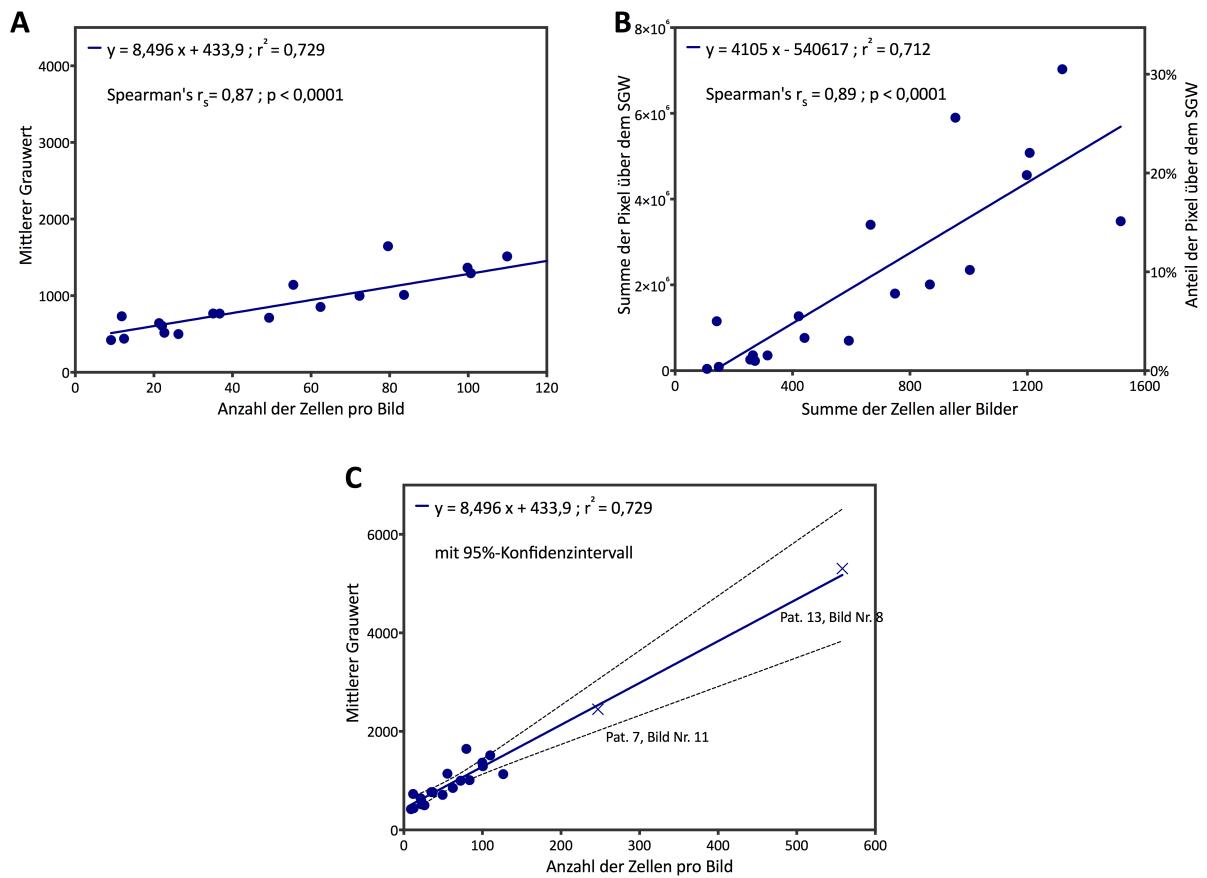


Abbildung 24 Parameter der DAPI-Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zellzahl

(A) Der mittlere Grauwert aller Pixel eines Bildes in Abhängigkeit von der Zahl der Zellen pro Bild, Lineare Regression; (B) Die Summe der Pixel über dem Schwellenwert von 1536 im DAPI-Kanal gegenüber der Anzahl der Zellen pro Bild, Lineare Regression; (C) die Linie der linearen Regression aus (A) wurde für Zellzahlen bis 600 pro Bild extrapoliert, zwei einzelne Bilder (X) mit hohen Zellzahl wurden ausgezählt, um die Anwendbarkeit der Extrapolierung zu testen, Linie mit 95%-Konfidenzintervall.

2.8.2 FITC- und Texas Red-Fluoreszenz in Abhängigkeit von Zahl FITC-positiver Zellen pro Bild

Ebenso wie das Ausmaß zellulärer Ablagerungen semiquantitativ erfasst wurde, sollte auch ein Wert gefunden werden, der Rückschlüsse auf das Vorkommen CD45-FITC-positiver und vWF-Texas Red-positiver Zellen ermöglicht. Aus den in dem jeweiligen Kanal fotografierten Bildern wurden der mittlere Grauwert und die Summe der Pixel über dem Schwellengrauwert ermittelt und jeweils in Abhängigkeit von der mittleren Zahl CD45-FITC-positiver Zellen pro Bild bzw. der Gesamtzellzahl graphisch aufgetragen (Abbildung 25 A und B).

In der Korrelationsanalyse mit dem Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman zeigte sich für die FITC-Fluoreszenz sowohl eine positive Korrelation des mittleren Grauwertes (Spearman's $r_s=0,798$, $p=0,0001$) als auch der Summe der Pixel über dem Schwellenwert (Spearman's $r_s=0,887$, $p<0,0001$) mit der tatsächlich ermittelten Zahl CD45-FITC-positiver

Zellen. Die gleiche Analyse der Werte aus dem Texas Red- Kanal erfolgte in Abhängigkeit von der Gesamtzellzahl pro Bild bestimmt mit der DAPI-Färbung, da keine eindeutige Zuordnung des vWF zu Zellen möglich war. Es zeigte eine positive Korrelation sowohl des mittleren Grauwertes (Spearman's $r_s=0,702$, $p=0,0008$, siehe Abbildung 25 C) als auch der Summe der Pixel über dem Schwellenwert (Spearman's $r_s=0,781$, $p<0,0001$, siehe Abbildung 25, D). Auch für das Ausmaß der Ablagerungen CD45-FITC-positiver Zellen wurde im Folgenden die Summe der Pixel über dem Schwellengrauwert als repräsentativer Wert herangezogen. Eine Verwendung der Summe der Pixel über dem Schwellengrauwert im Texas Red-Kanal als repräsentativer Parameter für die Anzahl vWF-positiver Zellen erschien nicht sinnvoll, da, wie weiter unten (3.1.4) dargestellt, vWF-positive Zellen nur vereinzelt zu finden waren, und eine Fluoreszenz im Texas Red- Kanal vor allem von nicht-zellulären Strukturen ausging.

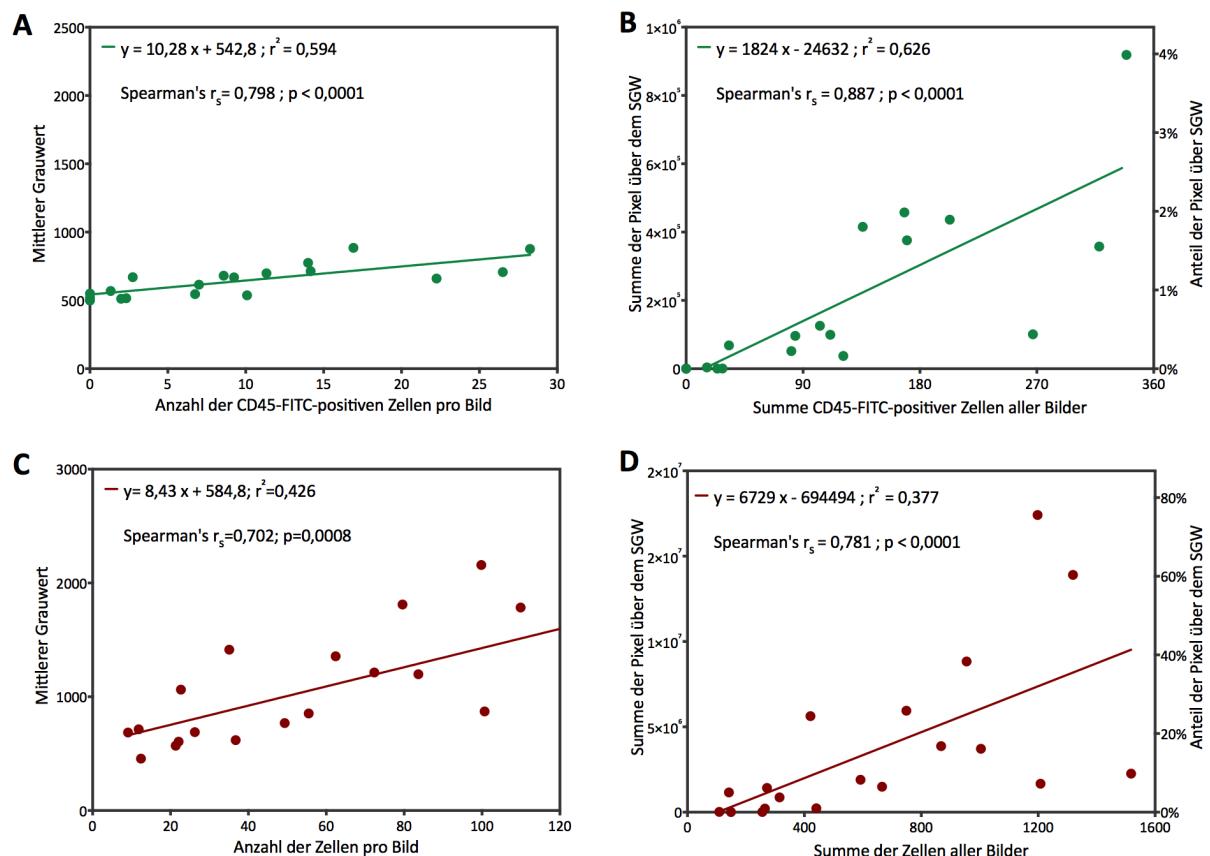


Abbildung 25 Parameter der FITC- und Texas Red- Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zellzahl

(A) Der mittlere Grauwert aller Pixel eines Bildes in Abhängigkeit von der Zahl CD45-FITC-positiver Zellen pro Bild, Lineare Regression; (B) Die Summe der Pixel über dem Schwellenwert von 1536 in Abhängigkeit von der Zahl CD45-FITC-positiver Zellen pro Bild, Lineare Regression; (C) Der mittlere Grauwert aller Pixel der Bilder im Texas Red-Kanal in Abhängigkeit von der Gesamtzellzahl pro Bild, Lineare Regression; (D) Die Summe der Pixel über dem Schwellenwert von 1536 in Abhängigkeit von der Gesamtzellzahl pro Bild im Texas Red- Kanal, Lineare Regression.

2.8.3 Auswertung der Oxygenatorpäparate

Anhand des Unterkollektives der Oxygenatoren der Firma Maquet wurde, wie oben beschrieben, eine positive Korrelation des mittleren Grauwertes und der Summe der Pixel über dem Schwellengrauwert mit dem Ausmaß der zellulären Ablagerungen auf den Präparaten gefunden. Es wurde auch gezeigt, dass diese Abhängigkeit auch bei höheren Zellzahlen als den eigentlich ausgezählten Zellzahlen (bis im Mittel 200 Zellen / Bild) Gültigkeit hat. Die Summe der Pixel über dem Schwellengrauwert konnte als Anteil der Pixel über dem Schwellengrauwert ausgedrückt werden. Die Berechnung dieses Anteils konnte Informationen über das Ausmaß zellulärer Ablagerungen auf allen 41 untersuchten Oxygenatorpräparaten liefern. Somit wurde ein Parameter gefunden, der Rückschlüsse auf das Ausmaß zellulärer Ablagerungen auch ohne eine eigentliche Zellzählung zulässt.

Um die Daten alle 41 Oxygenatoren auswerten zu können wurden jeweils die Summe bzw. die Anteile der Pixel über dem Schwellengrauwert (Y-Achse) nach Präparaten-Nr. geordnet (X-Achse) in einer Grafik aufgetragen. Dies erfolgte jeweils separat für die Daten aus dem DAPI-, FITC- und Texas Red- Fluoreszenzkanal. In diesen Grafiken konnten dann die Parameter der Immunfluoreszenz der einzelnen Präparate verglichen und gruppiert werden. Von den 41 Präparaten wurden die Präparate mit den jeweils höchsten Summen der Pixel über dem Schwellengrauwert in den einzelnen Fluoreszenzkanälen identifiziert. Diese Präparate wurden gegenüber den übrigen Präparaten gruppiert. In der weiteren Auswertung wurden dann die Präparate mit hohen Werten für die Parameter der Fluoreszenz und somit mit einem hohen Ausmaß zellulärer Ablagerungen mit den übrigen Präparaten bezüglich der klinischen Daten verglichen.

2.9 Klinische Parameter

Im Rahmen des stationären Aufenthaltes der Patienten, an denen der jeweils untersuchte Oxygenator zur Einsatz kam, wurden klinische Parameter kontinuierlich dokumentiert. Diese Daten wurden freundlicherweise von Herrn Alois Philipp (Klinik für Herz-, Thorax- und herznahe Gefäßchirurgie, Kardiotechnik) für diese Arbeit zur Verfügung gestellt (Regensburg ECMO Registry).

Bezüglich der ECMO-Unterstützung wurden das verwendete Oxygenator-Fabrikat, das Verfahren der ECMO (venovenös bzw. venoarteriell) und der Grund der Beendigung der Therapie mit dem untersuchten Oxygenator (Weaning bzw. Grund für Wechsel des MO) registriert. In Fällen, in denen ein Wechsel des MOs stattfand, wurde die Anzahl der benötigten MOs dokumentiert. Die Dauer der Unterstützung wurde zum einen bezogen auf die Gesamtunterstützungszeit zum anderen bezogen auf den untersuchten MO festgehalten.

Es wurden zudem Patienten-bezogene Daten aufgenommen. Hierbei fanden das Alter, das Geschlecht, der *body-mass-index* (BMI), die zugrunde liegende Diagnose und das Outcome Eingang in diese Untersuchung. Es wurden zudem, als Parameter der Schwere der Erkrankung, sowohl der *Sequential-Organ-Failure-Assessment-Score* (SOFA-Score) und als auch der *Lung-Injury-Score* (LIS) protokolliert.

Im Rahmen der Dokumentation während des Oxygenator-Einsatzes wurden darüberhinaus eine Reihe laborchemischer Parameter aufgenommen. In die Untersuchungen dieser Arbeit wurden die Parameter sowohl vor Beginn der ECMO-Therapie als auch im Verlauf einbezogen. Als Wert vor ECMO-Behandlung mit dem untersuchten MO wurde bei Patienten, bei denen nur ein MO eingesetzt wurde, der Wert vor Einsatz des Systems herangezogen während bei Patienten, die mehrere MOs benötigten, der Wert vom Vortag des MO-Wechsels (unter Einsatz des vorangegangenen MOs) festgehalten wurde. Als nächste Laborwerte wurden die Angaben am Tag 1 und 2 des Einsatzes des MO untersucht. Jeweils zwei Tage vor Beendigung der Unterstützung mit dem untersuchten MO wurde ein vierter Wert protokolliert, da eine klinische Relevanz dieses Zeitraums in Bezug zu den untersuchten Ablagerungen angenommen wurde. Es wurden sowohl Parameter des Blutbildes (Leukozyten-, Thrombozytenzahl), der Gerinnung (aPTT unter Heparintherapie= aktivierte partielle Thromboplastinzeit), die D-Dimere als Parameter der Gefahr einer Thrombusbildung, der Entzündung (CRP= C-reaktives Protein), als auch der Hämolyse (fHb= freies Hämoglobin) festgehalten.

2.10 Statistische Methoden

Alle erhobenen Daten wurden mittels des Shapiro-Wilk-Tests auf eine Normalverteilung hin überprüft. Die Annahme einer Normalverteilung traf nur für die mittleren Grauwerte der DAPI- und FITC-Fluoreszenz und die Summen der Pixel über dem Schwellenwert im DAPI-Kanal im Maquet-Kollektiv zu. Alle anderen Werte des Maquet- und Gesamtkollektivs waren nicht normalverteilt. Es wurden daher in dieser Arbeit, zur besseren Vergleichbarkeit, nur nichtparametrische statistische Tests angewendet.

Um die Abhängigkeit zweier Variablen von einander zu untersuchen, wurde eine Korrelationsanalyse mit Berechnung des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman durchgeführt. Eine anschließende Regressionsberechnung erfolgte mithilfe der Methode der kleinsten Quadrate.

Zum Vergleich von Daten verschiedener Gruppen, die durch kategoriale Variablen definiert wurden, wurden folgende nichtparametrische Tests angewendet: beim Vergleich zwischen zwei Gruppen bei verbundenen Stichproben der Wilcoxon-Test und bei unverbundenen Stichproben der Mann-Whitney-U-Test. Um Unterschiede zwischen mehr als zwei Gruppen zu ermitteln, wurden der Friedman-Test für verbundene Stichproben und der Kruskal-Wallis-Test für unverbundene Stichproben berechnet.

Die statistischen Auswertungen erfolgten mit Excel®2011, Microsoft Corp., SPSS®Statistics 20.0, IBM Corp. und mit Prism®6, Graphpad Software Inc.. Die vorliegenden Diagramme wurden ausschließlich mit Prism®6 erstellt.

3 Patienten und Oxygenatoren

Dieser Arbeit wurden 44 zufällig ausgewählte Oxygenatoren, die auf den Intensivstationen der Universitätsklinik Regensburg eingesetzt wurden, zugeführt. Von diesen mussten im Verlauf zwei Oxygenatoren (Typ Hilite der Firma Medos) ausgeschlossen werden, da das Membranmaterial dieses Oxygenatoren aus Polypropylen besteht. Ein weiterer Oxygenator (Nr. 26) zeigte deformierte Zellen auf den Gaskapillaren, die auf Artefakte hinwiesen, was auf Probleme bei der Präparation zurückzuführen war.

In den Tabellen 10 und 11 sind die patientenbezogenen bzw. ECMO-bezogenen klinischen Charakteristika des Gesamtkollektives (n=41) und der größten Untergruppe (Maquet-Oxygenatoren, n=27) aufgelistet. Die verschiedenen untersuchten Oxygenatoren sind in Tabelle 1 beschrieben.

Bei den untersuchten Oxygenatoren handelte es sich in 27 Fällen um ein Gerät der Firma Maquet Cardiopulmonary AG, Rastatt. Es wurden Oxygenatoren in den Ausführungen „permanent life support“ („PLS“), „extented life support“ („ELS“), „Quadrox-D“, und „Cardiohelp“ aufgearbeitet. Oxygenatoren der Firma Medos®-AG, Heilbronn, wurden vom Typ „Hilite®LT“ mit dem Polymethylpenten als Membranmaterial in die Arbeit eingeschlossen (n=6). Des Weiteren sind Oxygenatoren der Firma Novalung® mit den Oxygenatoren „Nova Breath®“ und dem „ILA-activ®“ (n=6) und zwei „ECC.O5“-Oxygenatoren der Firma Sorin, Mirandola, Italien in die Untersuchungen eingegangen. Alle Oxygenatoren waren entweder „Bioline“-, „Rheoparin®“ oder Physio-beschichtet.

Tabelle 10 Patienten-bezogene klinische Charakteristika

	Gesamtkollektiv (n=41)	Maquet- Oxygenatoren (n=27)
Anzahl der Patienten	41	27
Geschlecht (männlich/weiblich)	36 (87,8%) / 5 (12,2%)	21 (88,9%) / 3 (11,1%)
Alter		
Mittelwert (\pm SD)	56 (\pm 17)	56 (\pm 18)
Median (IQR)	59 (50 – 71)	61 (39 – 71)
Min. – Max.	18 – 84	18 – 78
BMI		
Median (IQR)	27,3 (25,2 – 32,6)	27,5 (25,6 – 32,6)
SOFA		
Median (IQR)	11,0 (8,0 – 14,3)	12,0 (10,0 – 16,3)
LIS		
Median (IQR)	3,3 (3 – 3,7)	3,7 (3,3 – 3,7)
Diagnose (%)		
Pneumonie	15 (36,6%)	9 (33,3%)
Extrapulmonale Sepsis	11 (26,8%)	8 (29,6%)
Andere Ursache*	5 (12,2%)	4 (14,8%)
Kardiale Ursache	10 (24,4%)	6 (22,2%)
Überleben		
Überlebt	23 (56,1%)	16 (59,3%)
Verstorben am System	11 (26,8%)	7 (25,93%)
Verstorben nach Explantation	7 (17,1%)	4 (14,8%)

*Andere ARDS-begünstigende Erkrankungen (n=5) waren ein Polytrauma (n=2), die Inhalation toxischer Gase, (n=1), ein konventionell nicht zu beherrschendes Asthma bronchiale (n=1) und eine Lungenembolie (n=1). Kardiale Ursachen (n=10), die eine Unterstützung nötig machten, waren ein *Low-cardiac-output* (n=7) und die kardiopulmonale Reanimation (n=3).

Tabelle 11 ECMO-bezogene klinische Charakteristika

	Gesamtkollektiv (n=41)	Maquet- Oxygenatoren (n=27)
Verfahren (%)		
Venovenöse ECMO	31 (75,6%)	21 (77,8%)
Venoarterielle ECMO	10 (24,4%)	6 (22,2%)
Dauer der gesamten Unterstützung des Patienten in Tagen		
Mittelwert (± SD)	14,1 (±11,5)	13,3 (±11,4)
Median (Quartile)	10,0 (5,0 – 21,0)	9,0 (5,5 – 15)
Min. – Max.	2 - 46	3 – 46
Dauer der Unterstützung mit dem untersuchten Oxygenator in Tagen		
Mittelwert (± SD)	9,4 (±5,8)	9,5 (±6,4)
Median (Quartile)	8 (5 – 13)	8,0 (5,0 – 12,5)
Min. – Max.	2 – 23	2 – 23
Anzahl der Oxygenator pro Patient (%)		
1	23 (56,1%)	16 (59,3%)
2	13 (31,7%)	9 (33,3%)
3	3 (7,3%)	1 (3,7%)
4	1 (2,4%)	1 (3,7%)
5	1 (2,4%)	
Grund für den Oxygenator- ausbau /-wechsel (%)		
Entwöhnung	27 (65,9%)	18 (66,7%)
Koagulationsstörung*	7 (17,1%)	4 (14,8%)
Tod des Patienten	5 (12,2%)	3 (11,1%)
Infektionsverdacht	1 (2,4%)	1 (3,7%)
akute MO-Thrombose	1 (2,4%)	1 (3,7%)
Oxygenatorfabrikate (%)		
Maquet	27 (65,85%)	27 (100%)
Medos Hilite LT	6 (14,6%)	
Sorin	2 (4,8%)	
Novalung	6 (14,6%)	

*Koagulationsstörungen (n=7) machten sich durch einen Anstieg der D-Dimere, ein erniedrigtes Fibrinogen oder einen Abfall der Thrombozyten bemerkbar (n=7).

4 Ergebnisse

4.1 Mikroskopischer Befund der Präparate

Im Folgenden wurden die Oxygenatoren entsprechend ihrer zellulären Besiedlung klassifiziert. Zum einen wurde das Gesamtkollektiv aller PMP-Oxygenatoren (n=41) und im Speziellen die Oxygenatoren der Firma Maquet (n=27) betrachtet.

4.1.1 Beurteilung der Übersichtsbilder nach morphologischen Kriterien

Aufnahmen, die mit dem 5x Objektiv im DAPI-Kanal erstellt wurden, wurden zu Übersichtsbildern der einzelnen Präparate in Adobe Photoshop® zusammengefügt. Die Übersichtsbilder aller 41 Oxygenatoren wurden nach drei einfach zu erfassenden morphologischen Kriterien beurteilt, um das Ausmaß und die Konfiguration zellulärer Ablagerungen zu beschreiben (2.6.1, Tabelle 8, Abbildung 18).

Tabelle 12 Ergebnisse der Beurteilung der Übersichtsbilder nach morphologischen Kriterien; Anzahl, Anteil in Prozent vom Gesamtkollektiv bzw. Maquet-Kollektiv

	Gesamtkollektiv (n = 41)	Maquet- Oxygenatoren (n = 27)
<hr/>		
1. Ausmaß zellulärer Ablagerungen		
wenig	18 (43,9%)	9 (33,3%)
viele	16 (39,0%)	11 (40,7%)
massenhaft	7 (17,1%)	7 (26,0%)
<hr/>		
2. Pseudomembranen		
nicht vorhanden	35 (85,4%)	21 (77,8%)
vorhanden	6 (14,6%)	6 (22,2%)
<hr/>		
3. Konzentration um Kreuzungspunkte		
keine	12 (29,3%)	7 (26,0%)
schwach	14 (34,1%)	8 (29,6%)
stark	15 (36,6%)	12 (44,4%)
<hr/>		

Auf 18 der 41 Präparate (Tabelle 12) waren wenige Zellen und auf 16 Präparaten viele Zellen zu verzeichnen. Sehr dichte Zellaufklagerungen fanden sich auf sieben Präparaten. Die meisten Präparate wiesen keine Pseudomembranen auf (n=35). Nur auf sechs Präparaten waren diese flächigen Auflagerungen nachweisbar (Abbildung 26 A). Die Ablagerungen der Zellen hatten sehr unterschiedlichen Bezug zu den Kreuzungsstellen der aufeinander liegenden Gaskapillaren. Auf zwölf Oxygenatorproben verteilten sich die zellulären Ablagerungen diffus über die Gaskapillaren. Bei 14 Präparaten war eine schwache Anreicherung von Zellen an Punkten sich berührender Kapillarröhrchen zu verzeichnen. Dieser Bezug war auf weiteren 15 Präparaten stärker. Auf diesen Präparaten fanden sich die Ablagerungen nahezu streng auf die Kreuzungsstellen beschränkt (Abbildung 26 B). Präparate mit einem starken Bezug der zellulären Ablagerungen zu den Kreuzungspunkten zeigten entweder viele oder massenhaft Zellen (Tabelle 13). Auf den Präparaten mit wenigen Zellen war kein Bezug zu den Kreuzungspunkten zu finden oder dieser war schwach ausgeprägt (Tabelle 13). Auf Präparaten mit Pseudomembranen fanden sich massenhaft Zellen. Auf einem Präparat zeigten sich zwar massenhaft Zellen, aber es waren keine Pseudomembranen ausgebildet (Tabelle 14).

Tabelle 13 Ausmaß von zellulären Ablagerungen in Abhängigkeit der Konzentration der Zellen an den Kreuzungspunkten übereinanderliegenden Gaskapillaren

Konzentration an den Kreuzungspunkten	Zelldichte Ablagerungen			Gesamt
	wenig	viele	massenhaft	
keine	8	3	1	12
schwach	10	3	1	14
stark	0	10	5	15
Gesamt	18	16	7	41

Tabelle 14 Ausmaß von zellulären Ablagerungen in Abhängigkeit des Vorkommens von Pseudomembranen

Pseudomembranen	Zelluläre Ablagerungen			Gesamt
	wenig	viele	massenhaft	
vorhanden	0	0	6	6
nicht vorhanden	18	16	1	35
Gesamt	18	16	7	41

Bei Betrachtung des Kollektive zeigte sich, dass alle Präparate mit massenhaft Zellen (n=7) und Pseudomembranen (n=6) in dem Kollektiv der Maquet- Oxygenatoren (Tabelle 11) zu finden waren. Der Anteil der Präparate mit wenigen Zellen (33,3% vs. 43,9% im Gesamtkollektiv) sowie der Anteil ohne Pseudomembranen (77,8% vs. 85,4%) waren im Maquet-Kollektiv entsprechend geringer. Der Anteil der Proben der Maquet- Oxygenatoren, die einen starken Bezug der zellulären Ablagerungen zu den Kreuzungspunkten aufeinanderliegender Gaskapillaren aufwiesen, war etwas höher (44,4% vs. 36,6%).

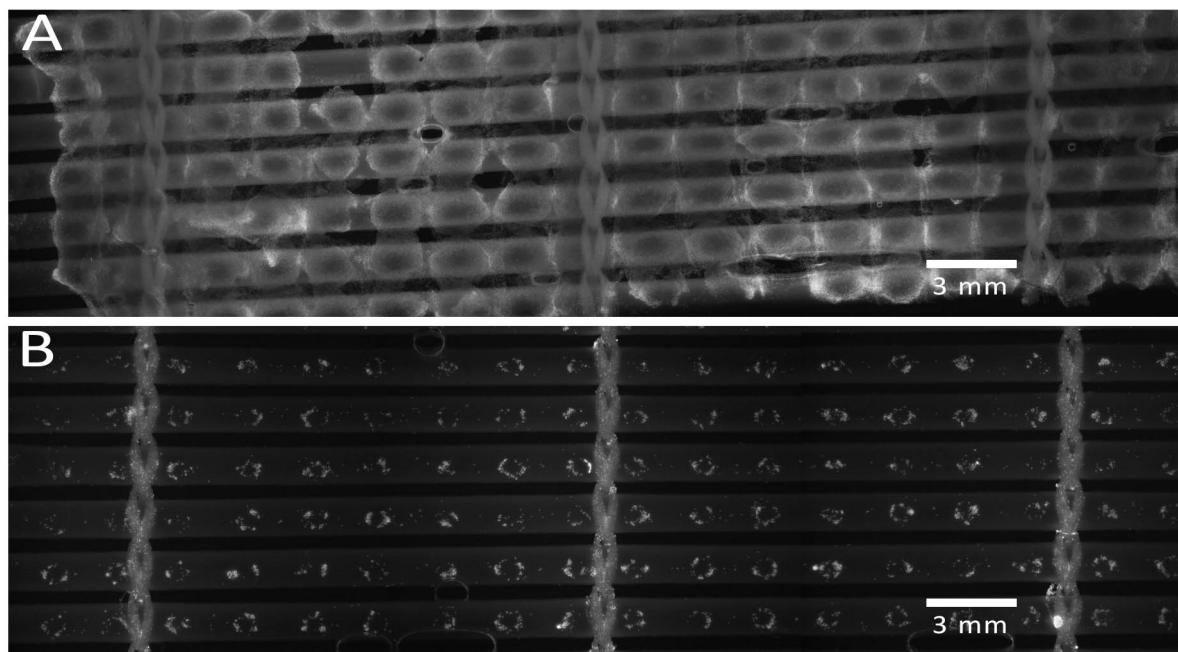


Abbildung 26 Repräsentative Übersichtsbilder der Präparate von Membranoxygenatoren

Das Präparat des Oxygenators Nr. 14 zeigte dichte Lagen von Pseudomembranen, die benachbarte Gaskapillaren überzogen (A). Auf den Gaskapillaren des Oxygenators Nr. 6 fanden sich die zellulären Ablagerungen mit einer starken Konzentration an den Kreuzungspunkten übereinanderliegender Gaskapillaren (B). (5x Objektiv, Auflösung 1,499µm/Pixel)

4.1.2 Auszählung von Zellen auf sequenziellen Bildern

Im Folgenden wurde die Zelldichte auf Gaskapillarmattenproben von Maquet-Oxygenatoren bestimmt. Das Vorgehen wurde unter 2.6.2 beschrieben. Auf 19 Oxygenatoren konnten Zellen ausgezählt werden (Tabelle 15). Auf weiteren acht Maquet-Oxygenatoren waren zu viele Zellen für eine Differenzierung vorhanden (mehr als 200 Zellen pro Bild).

Tabelle 15 Zellzahlen pro Bild

	Mittelwert (\pmSD)	Median (Quartile)	Min. – Max.
Zellen pro Bild	54,6 (\pm 50,3)	37,5 (15,0 – 82,3)	0 – 271
Morphologisch beurteilbare Zellen pro Bild	28,9 (\pm 27,0)	20,0 (9,0 – 42,3)	0 - 149

Von diesen Zellen waren im Mittel 53% der Kerne (im Mittel 28,9 von 54,6 Zellkernen) einer morphologischen Klassifizierung zugänglich. Die anderen Zellkerne waren nur anhand der Fluoreszenz von DAPI als Zellkern, dessen Grenzen jedoch nicht abgrenzbar waren, zu erkennen. 69% der beurteilbaren Zellkerne waren rundkernig, 21% nierenförmig und 10% stabkernig oder segmentkernig (Abbildung 27 A, Tabelle 16, Anteil in Prozent bezogen auf die morphologische beurteilbaren Zellen). Die Verteilung zwischen den drei Morphologiegruppen variierte zwischen den Oxygenatoren erheblich. Besonders auffällig war, dass die rundkernigen Zellen auf fast allen Oxygenatoren den größten Anteil ausgemachten. Die Anteile der nierenförmigen Kerne und der stab- oder segmentkernigen Zellen variierte stark und es gab einzelne Oxygenatoren mit einem sehr hohen Anteil dieser Zellen.

Tabelle 16 Klassifizierung der Zellen nach Zellkernmorphologie und Anti-CD45-positiver Markierung;

	Mittelwert (\pmSD)	Median (Quartile)	Min. – Max.	Anteil	Anteil FITC+
Rundkernige	20,0 (\pm 20,0)	13,0 (2,0 – 30,0)	0 – 94	68,9%	32,6%
Nierenförmig	6,1 (\pm 5,6)	5,0 (2,0 – 9,0)	0 – 30	21,1%	46,3%
Stab- /Segmentkernig	2,9 (\pm 6,1)	1,0 (0 – 3,0)	0 – 55	10,0%	10,4%

Zweite Spalte von rechts: Anteil bezogen auf die Anzahl beurteilbarer Zellkerne, Spalte ganz rechts: Anteil der Zellen einer Morphologigruppe, der FITC-positiv markiert ist.

Die Präparate wurden auch in Hinblick auf das Vorkommen Anti-CD45-FITC-positiv markierter Zellen beurteilt. Im Mittel stellten sich 9,7 Zellen pro Bild CD45-positiv dar. Diese Zahl entsprach einem Anteil von 31,9% aller beurteilbaren Zellen (Tabelle 17).

Tabelle 17 Anti-CD45-FITC-positive Zellen

	Mittelwert (\pmSD)	Median (Quartile)	Min. – Max.	Anteil
CD45-FITC- positive Zellen pro Bild	9,7 (\pm 10,7)	5,5 (0 – 16,0)	0 – 47	31,9%

Betrachtete man den Anteil der FITC-positiven Zellen von den beurteilbaren Zellen, fielen große Unterschiede zwischen den einzelnen Oxygenatoren auf. Auf dem Präparat mit dem geringsten Anteil positiver Zellen waren keine Zellen FITC-markiert (0 von 2,6 Zellen; 0%), während auf dem Oxygenator mit anteilig am meisten positiven Zellen 79,4% (6,8 von 8,5 Zellen) als positive Zellen gezählt werden konnten. In der graphischen Auftragung der mittleren Anzahl der CD45-FITC-markierten Zellen gegenüber der mittleren Anzahl der beurteilbaren Zellen erkannte man eine schwache Korrelation der beiden Werte (Spearman's $r_s=0,497$, $p=0,03$). Die Graphik in Abbildung 27 (B) zeigte zudem, dass der Anteil der CD45-positiven Zellen auf den meisten Präparaten unter 50% lag. Nur sieben Proben zeigten über 50% positive Zellen.

In Verbindung mit einer runden Zellkernmorphologie fand sich eine CD45-FITC positive Färbung bei 32,6% der Zellkerne. Zellen mit einem nierenförmigen Zellkern waren nahezu zur Hälfte (46,3%) positiv markiert, während stab- und segmentkernige Zellen nur in 10,4% eine Markierung mit Anti-CD45-FITC aufwiesen (Tabelle 16).

Abbildung 27 Anzahl Anti-CD45-FITC positiver Zellen in Abhängigkeit von der Anzahl beurteilbarer Zellen pro Bild

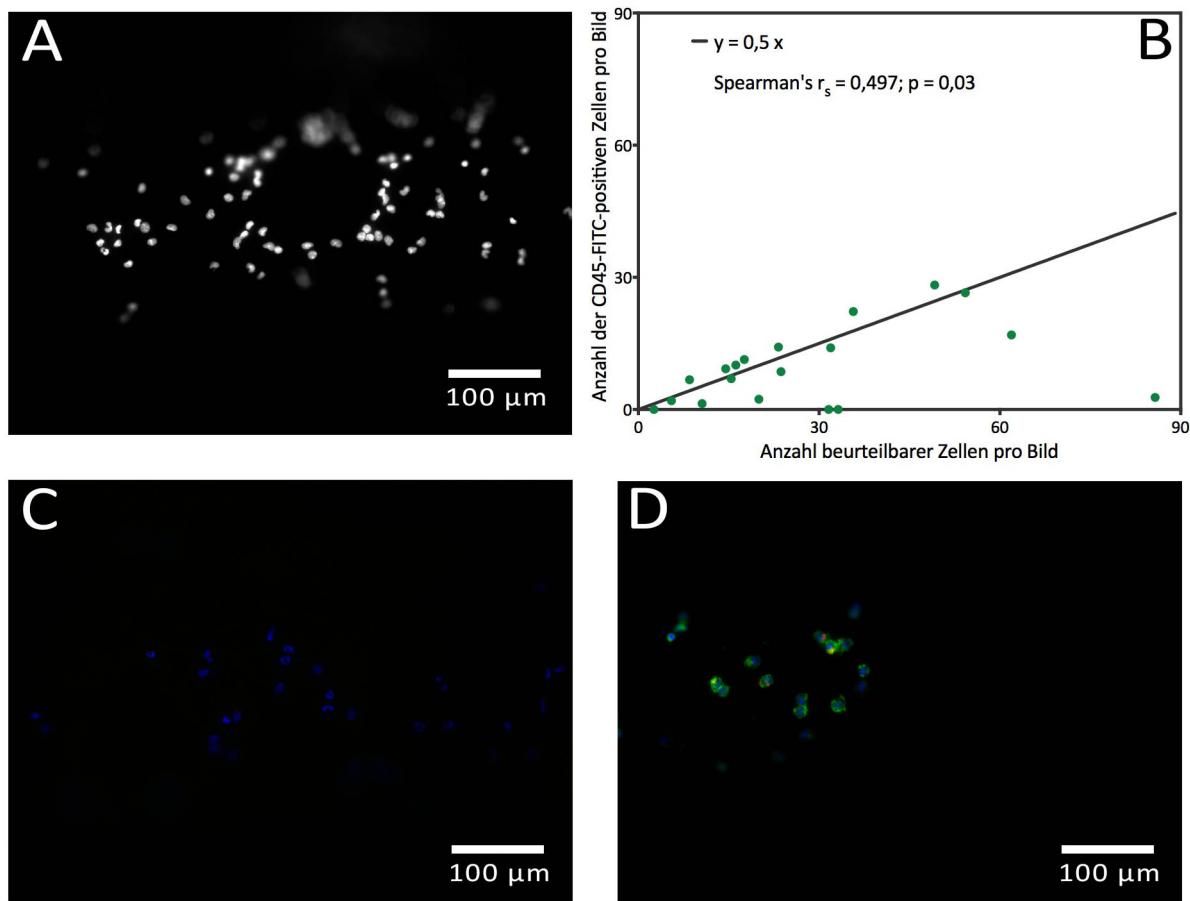


Abbildung 28 Zellzählung und Beurteilung einer Anti-CD45-FITC-positiven Markierung

Bild (A) zeigt eine beispielhafte Aufnahme, auf der die Zellzählung und die Klassifikation nach morphologischen Kriterien vorgenommen wurde (Oxygenator Nr.1). Aufgetragen ist in (B) die mittlere Anzahl der als Anti-CD45-FITC-positiv gewerteten Zellen in Abhängigkeit von der mittleren Anzahl von Zellen pro Bild, die einer morphologischen und immunhistochemischen Beurteilung zugänglich waren (n=19, Oxygenatoren des Maquet-Kollektivs). Nur sieben Präparate zeigten eine Markierung oberhalb der zur Veranschaulichung eingetragenen Linie $y = 0,5 x$ und wiesen somit über 50% FITC-positive Zellen auf. Der Anteil Anti-CD45-FITC-positiver Zellen variierte zwischen den einzelnen Präparaten. Oxygenator Nr. 38 zeigte keine FITC-positiven Zellen (C), während auf den Präparaten des Oxygenators Nr. 17 eine deutliche grüne Markierung festzustellen war (D). (alle Aufnahmen mit dem 20x Objektiv, Auflösung 0,375 µm/Pixel)

4.1.3 Auswertung der Berechnungen aus den Bildpunktinformationen der sequenziellen Bilder

Die Berechnungen von Bildpunktinformationen (2.6.3) wurden anhand der Bildersequenz (20x Objektiv) aller 41 Präparate vorgenommen. Es wurden die Präparate gruppiert, die gegenüber den übrigen Präparaten deutlich höhere Anteile von Pixeln über dem Schwellengrauwert aufwiesen. Dies erfolgte aus einer graphischen Auftragung der Summen bzw. der Anteile der Pixel über dem Schwellengrauwert nach Präparaten-Nr. heraus (Abbildung 29).

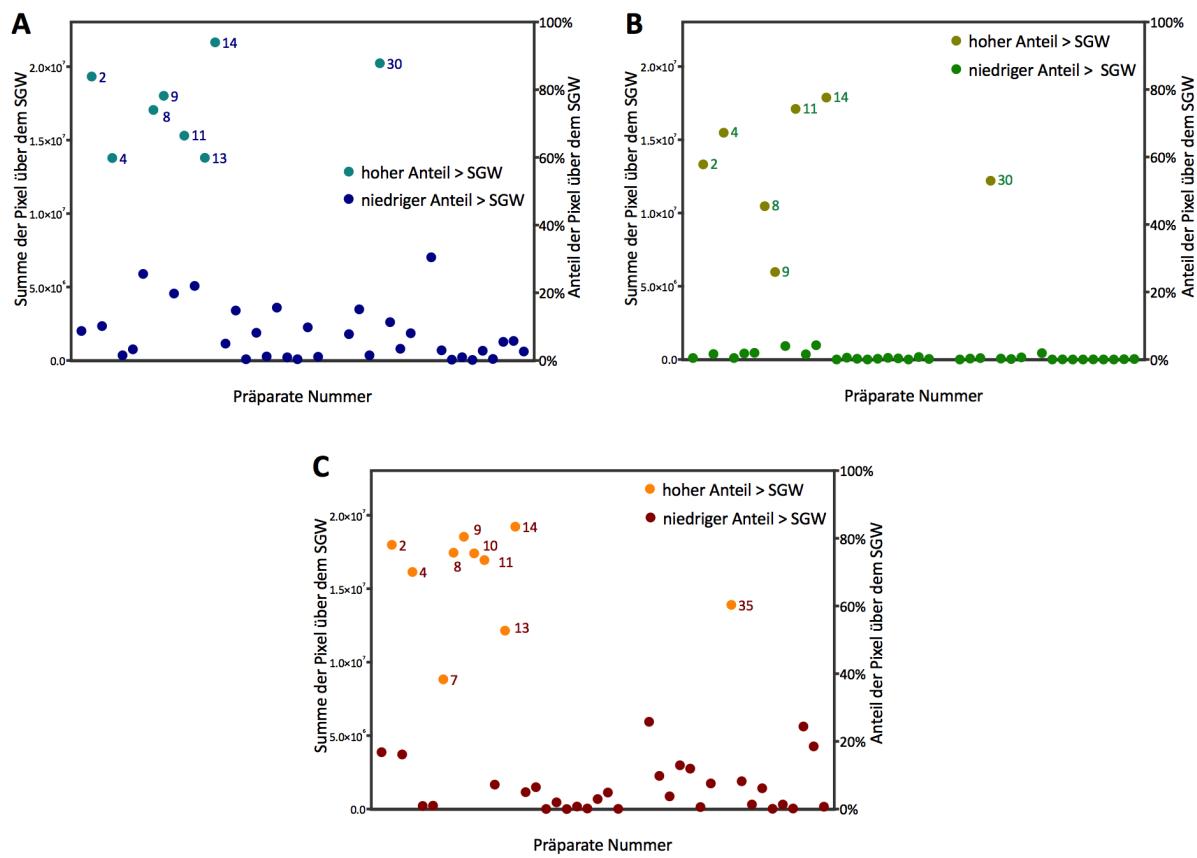


Abbildung 29 Ausmaß der Immunfluoreszenz anhand von Bildpunktinformationen

Dargestellt ist das Ausmaß der Fluoreszenz in den drei aufgenommenen Kanälen (DAPI (A), FITC (B), und Texas Red (C)), wiedergegeben durch die Summe bzw. den Anteil der Pixel mit Grauwerten über dem Schwellengrauwert (SGW), für jedes einzelne Präparat der Membranoxygenatoren (Präparatennummer auf der X-Achse). Farblich hervorgehoben sind jeweils die Präparate, die, aus der Darstellung in diesen Graphen ersichtlich, deutlich höhere Anteile von überschwelligen Pixeln zeigten (grün-blau Punkte in (A), grün-braune Punkte in (B) und orange Punkte in (C)).

Im DAPI-Kanal wiesen acht Präparate einen Anteil von Pixeln über dem Schwellengrauwert von mehr als 59% auf (blau-grüne Punkte in Abbildung 29 A). Bei diesen Präparaten war, nach der im Abschnitt „Methoden“ beschriebenen Abhängigkeit der DAPI-Fluoreszenz von der Zellzahl, von einem hohen Ausmaß an zellulären Ablagerungen auszugehen. Den

höchsten Wert zeigte das Präparat Nr. 14 mit einem Flächenanteil dieser Pixel von 94%. Auf dem Präparat mit dem niedrigsten Anteil hatten nur 0,18% der Pixel einen Graustufenwert über dem Schwellenwert (Präparat-Nr. 39).

Im FITC-Kanal wiesen die meisten Präparate sehr niedrige Anteile der überschwelligen Pixel auf. Nur sieben Präparate wiesen einen Pixelanteil von über 5% auf, wobei der höchste Pixelanteil bei 77,6% lag (Präparat-Nr. 14; grün-braune Punkte in Abbildung 29 B). Auf 8 Proben erreichten sehr wenige Pixel (21.784 von 23.040.000 Gesamtpixel aller zwölf Bilder) einen Graustufenwert, der über dem Schwellengrauwert lag.

Die Anteile der überschwelligen Pixel im Texas Red-Kanal waren wiederum höher. Es fanden sich zehn Präparate mit hohen Werten und einem Anteil von mindestens 38,3% (orange Punkte in Abbildung 29 C). Auf dem Präparat Nr. 14 mit den meisten überschwelligen Pixeln waren dies 83,5% der Bildpunkte. Auf den Bildern des Präparates mit den wenigsten Pixeln über dem Schwellengrauwerten machten diese 0,01% aus (Präparat-Nr. 19).

Die Präparate mit den jeweils höchsten Anteilen in den drei Fluoreszenzkanälen entsprachen sich somit weitestgehend für beide Werte in allen drei Fluoreszenzkanälen (bis auf die Präparate 7, 10 und 35). Die acht Präparate mit den höchsten Anteilen der Pixel über dem Schwellengrauwert im DAPI-Kanal (Nr. 2, 4, 8, 9, 11, 13, 14, und 30) und somit einem hohen Ausmaß der DAPI-Fluoreszenz wurden für die weitere Auswertung gegenüber den weiteren 33 Präparaten gruppiert.

4.1.3.1 Auswertung der Bildpunktinformationen in Bezug zur Einteilung nach morphologischen Kriterien

Die Einteilung nach morphologischen Kriterien wurde anhand der Übersichtsbilder vorgenommen, während die Berechnung der Parameter der Immunfluoreszenz anhand der sequenziellen Bilder erfolgte. Zwischen diesen verschiedenen Analysen fand sich erwartungsgemäß eine Übereinstimmung. So war der Anteil der Pixel über dem Schwellengrauwert bei den Präparaten mit vielen oder massenhaft Zellen signifikant höher als bei den Präparaten mit wenig Zellen (Abbildung 30 A). Ebenso war auch der Anteil überschwelliger Pixel auf den Bildern der Präparate mit Pseudomembranen signifikant höher als auf den Bildern der Präparate mit keinen Pseudomembranen (Abbildung 30 B). Von den acht Präparaten mit den höchsten Anteilen der Pixel über dem Schwellengrauwert im DAPI-Kanal zeigten fünf Präparate Pseudomembranen. Ein Präparat mit Pseudomembranen wies ein sehr viel geringeres Ausmaß der Fluoreszenz auf und gehört damit nicht zu den acht Präparaten.

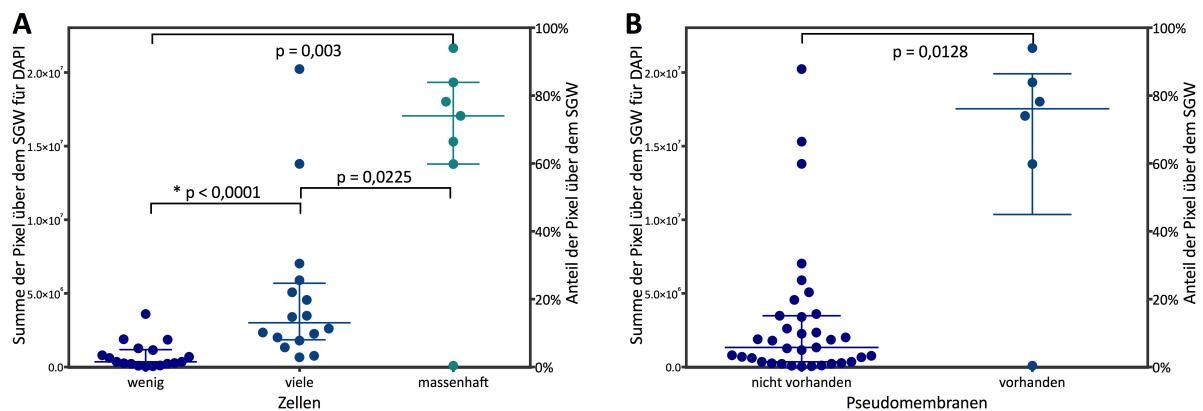


Abbildung 30 Ausmaß der Immunfluoreszenz anhand von Bildpunktinformationen in Bezug zu morphologischen Kriterien

Präparate, die viele oder massenhaft Zellen aufwiesen, hatten signifikant höhere Anteile von überschwelligen Pixeln in der Analyse der Grauwertinformationen der Aufnahmen (A). Ebenso war der Anteil überschwelliger Pixel in Aufnahmen von Präparaten mit Pseudomembranen signifikant höher als in den entsprechenden Bildern von Präparaten ohne Pseudomembranen (B). (Eingetragene Linien: Median und Interquartilenabstand; Mann-Whitney-U-Test)

4.1.4 Qualitative Beurteilung von Aufnahmen in hoher Vergrößerung

Neben den Übersichtsbildern (5x Objektiv) und den sequenziellen Bildern (20x Objektiv) wurden Aufnahmen mit dem 40x Objektiv zur qualitativen Beurteilung der Präparate ergänzt. Auf diesen erschien die Färbung der Zellkerne mit DAPI recht konstant. Unterschiedliche Zellkernmorphologien war genauso auszumachen wie auf den sequenziellen Bildern. Die Zellkerne auf den Präparaten waren entweder als Einzelzellen ($n=14$; Nr. 1, 7, 16, 17, 18, 19, 20, 33, 35, 36, 38, 39, 40 und 41) oder in Zellgruppen zu finden ($n=17$; Nr. 3, 5, 6, 12, 13, 15, 16, 22, 23, 24, 27, 28, 32, 37, 42, 43 und 44). Auf acht Proben lagen die Zellen in Haufen über- und nebeneinander und bildeten, so wie auch zuvor beim Befund der Pseudomembranen vermutet, mehrere dichte Zelllagen auf den Kapillaren (Abbildung 31 A; $n=9$; Nr. 2, 4, 8, 9, 10, 11, 14, 30, und 31).

Die Markierung mit Anti-CD45-FITC schwankte in ihrer Stärke erheblich zwischen den Präparaten. Eine deutliche Markierung fand sich auf einer ganzen Reihe von Proben ($n=21$): auf den Präparaten Nr. 2, 6, 10, 23, 24 und 29 waren die Zellen kräftig markiert und standen vor allem gruppiert oder in Haufen; die Präparate Nr. 3, 5, 6, 7, 17, 19, 21, 32, 35, 37 und 44 zeigten überwiegend Einzelzellen mit einer deutlichen FITC-Fluoreszenz ($n=11$). Die Markierung mit dem CD45-Antikörper war besonders dicht an der Zellmembran zu erkennen; bei einigen, besonders bei den morphologisch als rundkernig zu klassifizierenden Zellen, die Lymphozyten entsprechen könnten, ging die Fluoreszenz dicht vom geringen Zytoplasma aus. Bei einigen Zellen war zusätzlich zu der Markierung der Zellmembran eine punktförmige

Markierung im Zytoplasma auszumachen, welche auf Antigene in einem intrazellulären Organell hinweisen könnte. Die Proben Nr. 1, 9, 12, 13, 16, 31, 35, 40 und 43 hingegen wiesen nur eine sehr schwache Fluoreszenz auf. Die Markierung war diffus um den Zellkern herum lokalisiert und Strukturen des Zytoplasmas waren nicht abzugrenzen. Auf zehn Präparaten (Nr. 15, 18, 20, 22, 27, 28, 33, 36, 38 und 42) war bei gleicher Bildoptimierung aller Präparate keine FITC-Fluoreszenz zu erkennen.

Die Fluoreszenz im Texas Red-Kanal variierte sowohl in ihrer Stärke als auch ihrer Struktur zwischen den einzelnen Präparaten. Die Antikörper waren zumeist ohne Bezug zu Zellkernen auf dem Membranmaterial abgelagert. Die Präparate der Patienten 1, 2, 4, 7, 8, 10, 13, 14, 16, 23, 33 und 43 fielen durch eine deutliche Texas Red-Fluoreszenz auf, die entlang von strang- bis netzartigen Strukturen konfiguriert war (n=14). In diesen Strängen fanden sich perlschnurartig aufgereihte kräftig fluoreszierende Punkte, die Thrombozyten in Fibrinnetzen entsprechen könnten (Abbildung 31 B). Vereinzelt kam in den strangartigen Strukturen auch eine stärkere Fluoreszenz um Zellkerne herum vor, was auf eine Markierung vWF-tragender Zellen hinweisen könnte. Fraglich markierte Zellen waren auf elf Proben (Nr. 6, 9, 10, 11, 16, 28, 32, 35, 38, 43 und 46) zu finden. Bei Betrachtung der unmittelbaren Umgebung dieser betreffenden Zellkerne im Texas Red- und FITC-Kanal sah man, dass bei einigen Proben (Nr. 6, 11 und 16) sowohl eine Texas Red- als auch eine FITC-Markierung erfolgt war. Bei anderen Präparaten (Nr. 9, 10, 16, 32, 35, 38 und 43) war die Umgebung des Zellkerns nur mit Texas Red markiert, teils in der vWF- typischen granulären Struktur, sodass bei diesen Zellen eher von einer spezifischen Färbung ausgegangen werden konnte (Abbildung 31 C). Das Präparat Nr. 28 fiel dadurch auf, dass auch segmentkernige Zellen Texas Red markiert waren, wobei nicht zu erwarten war, dass diese Zellen, die am ehesten Granulozyten waren, vWF tragen. Auf einer Reihe von Präparaten war die Ablagerung der Texas Red-gekoppelten Antikörper nahezu flächig auf den Membrankapillaren vorzufinden (Nr. 7, 22, 27, 31, und 33). Sie war dabei zum Teil fein strukturiert und diffus, aber auch grobgranuliert und netzartig. In diesen netzartigen Konfigurationen waren wie auch bei den strangartigen Gebilden Ablagerungen und Markierungen von Thrombozyten denkbar. Eine deutliche und kräftige Texas Red-Fluoreszenz war nicht auf allen Proben zu finden. Auf den Präparaten der Patienten Nr. 8, 12 und 14 zog die Fluoreszenz nur wie ein „Schleier“ über die Gaskapillaren. Ein anderer, großer Teil der Präparate (n=19, Nr. 4, 14, 18, 19, 20, 21, 24, 25, 26, 30, 34, 36, 37, 39, 40, 41, 42 und 44) wies nur eine schwache oder gar keine Fluoreszenz im Texas Red-Kanal auf. Auch auf diesen schwach gefärbten Präparaten war keine Abhängigkeit der Texas

Red-gekoppelten Markierung von Zellen zu bemerken. Es gab zum Teil zellreiche Präparate ohne jegliche Texas Red Fluoreszenz.

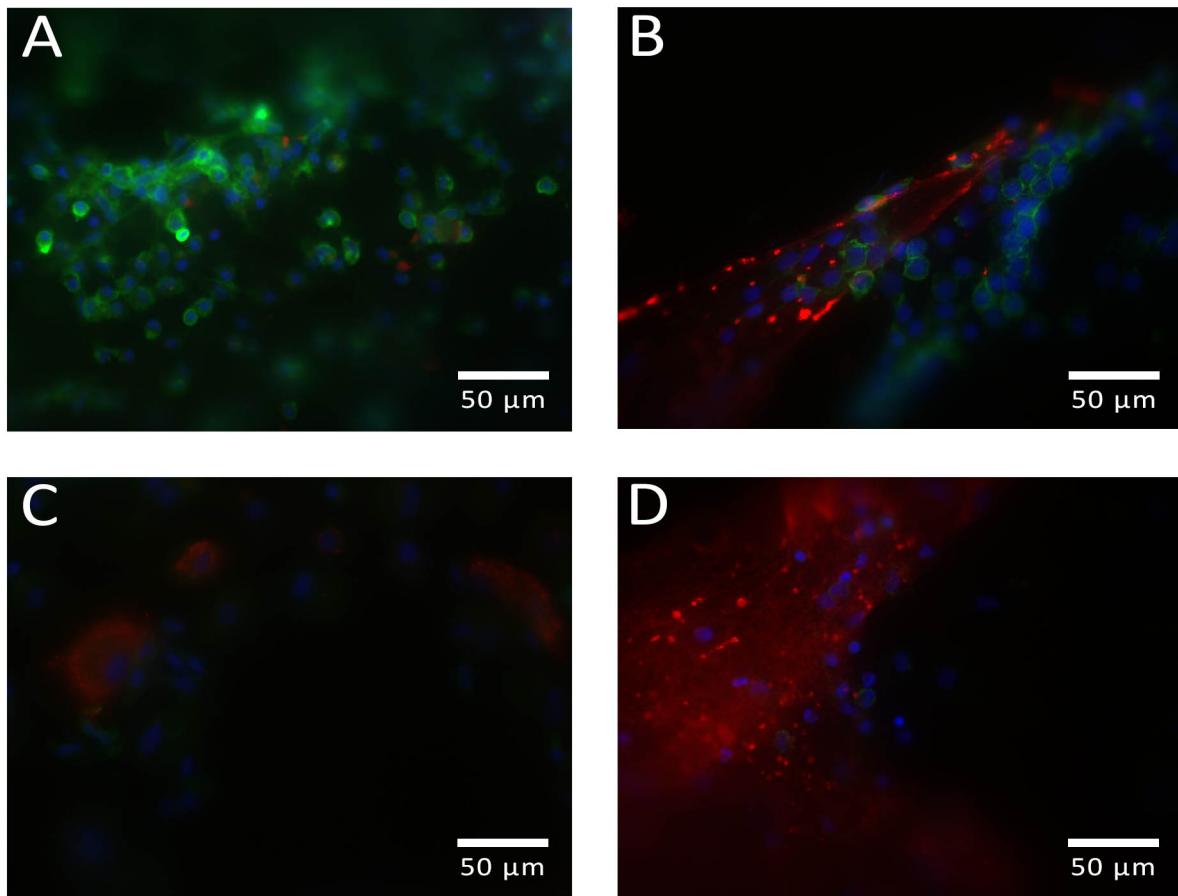


Abbildung 31 Aufnahmen in höherer Vergrößerung zur qualitativen Beurteilung

(A) Auf dem Präparat des Oxygenators Nr. 30 fanden sich die zellulären Ablagerungen in mehreren dichten Lagen; die Zellen zeigten eine deutliche Fluoreszenz des Anti-CD45-FITC. (B) Die Texas Red-Fluoreszenz war zum Teil entlang von strangartigen Strukturen zu bemerken (Aufnahme des Oxygenators Nr. 23). In diesen Strängen waren punktförmige Verdichtungen der Fluoreszenz zu erkennen, Strukturen, die eingelagerten Thrombozyten entsprechen könnten. Neben diesen Strukturen zeigten sich CD45-positive Zellen. (C) Sieben Präparate, z. B. Oxygenator Nr. 9, wiesen Texas Red-positive Zellen auf. (D) Auf einigen Präparaten war die Texas Red-Fluoreszenz flächig und diffus auf den Präparaten zu finden (z. B. Oxygenator Nr. 33). (40x Objektiv, Auflösung 0,187 μm/Pixel)

4.2 Bezug zu den klinischen Charakteristika

Im Folgenden wurden die bis hierher beschriebenen Auffälligkeiten aus der Mikroskopie und der Grauwertanalyse der Bilder mit den klinischen Parametern der untersuchten Oxygenatoren und der Patienten, an denen die Oxygenatoren ihren Einsatz fanden, in Bezug gesetzt.

4.2.1 Ausmaß zellulärer Ablagerungen in Bezug zu den ECMO-Charakteristika

Das Ausmaß zellulärer Ablagerungen wurde zum einen anhand der Einteilung der Präparate in Kategorien der Zelldichte erfasst. Zum anderen wurde die tatsächliche Anzahl der Zellen auf den Präparaten der Maquet-MOs ermittelt. Es fand sich zudem ein Zusammenhang der Parameter der Fluoreszenz im DAPI-Kanal mit den gezählten Zellen auf den Bildern der Präparate (siehe 2.8.1).

Anhand der Übersichtsbilder wurden die Präparate in Gruppen mit wenig, vielen und massenhaft Zellen eingeteilt (Tabelle 8). Statistische Analysen wurden in den Tabellen 28 und 29 für das Gesamtkollektiv bzw. das Maquetkollektiv zusammengefasst. Im Vergleich dieser Gruppen bezüglich der Dauer der Gesamtunterstützungszeit des Patienten durch ECMO fanden sich sowohl im Gesamtkollektiv als auch in dem Kollektiv der Maquetoxygenatoren keine Unterschiede. Betrachtete man jedoch die Unterstützungszeit durch den untersuchten MO konnten längere Einsatzzeiten durch die MOs mit vielen und massenhaft Zellen (8 bzw. 14 Tage im Gesamtkollektiv) gegenüber den MOs mit wenigen Zellen (5 Tage) festgestellt werden. Diese Unterschiede waren jedoch in beiden Kollektiven statistisch nicht signifikant ($p=0,14$ bzw. $p=0,25$; Abbildung 33 A; Tabelle 28 und 29). Ebenso fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen bezüglich der Parameter des Blutflusses während des Einsatzes des untersuchten MOs. Das durch den MO geflossene Blutvolumen war bei Oxygenatoren mit massenhaft Zellen mit 42.768 Litern deutlich gegenüber den MOs mit wenigen und vielen Zellen (13.608 Litern bzw. 23.832 Litern) erhöht, jedoch war auch dieser Unterschied statistisch nicht signifikant ($p=0,11$ bzw. $p=0,17$; Tabelle 28 und 29). Ein Vergleich der Widerstände über den MO war im Gesamtkollektiv aufgrund unterschiedlicher Normwerte der MO-Fabrikate nicht sinnvoll. Im Maquetkollektiv wurden tendenziell höhere Werte des dpMO bei den Präparaten mit vielen und massenhaft Zellen gemessen ($p=0,25$).

Nach Quantifizierung von Zellen auf den Maquet-Oxygenatoren ($n=19$ ausgezählt) stellte sich kein Zusammenhang der Zellzahl pro Bild mit der Dauer des Einsatzes des untersuchten

Oxygenators dar (Abbildung 32 A). Es zeigte sich kein Zusammenhang der Zellzahl mit dem Volumen des Blutflusses während der Unterstützungszeit mit dem untersuchten MO (Abbildung 32 B).

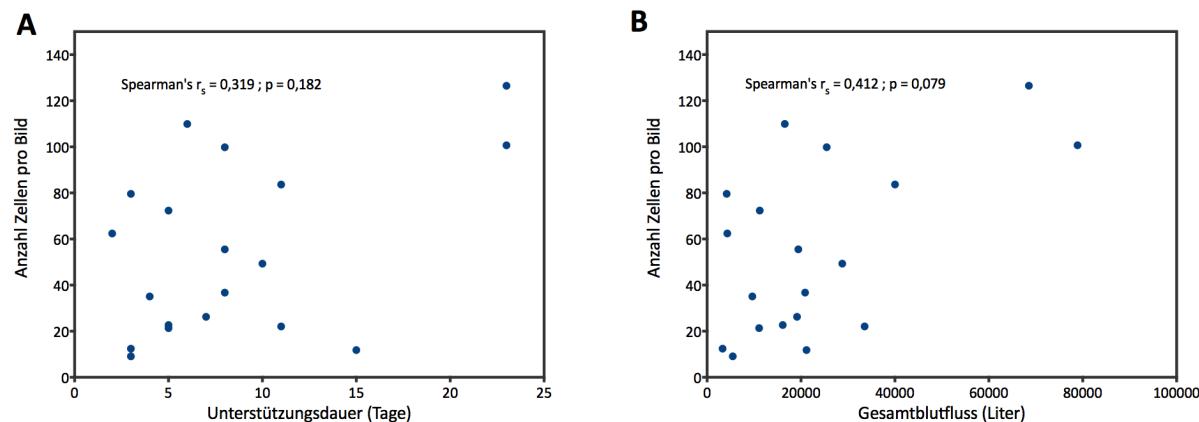


Abbildung 32 Anzahl der Zellen pro Bild in Abhängigkeit von Parametern der ECMO-Unterstützung bei 19 Maquet-MOs

(A) Es zeigt sich kein Zusammenhang der Anzahl der Zellen pro Bild mit der Dauer des Einsatzes des untersuchten Oxygenators (Spearman's $r_s = 0,319$). (B) Ein Zusammenhang der Zellzahl mit dem Blutvolumen, das über die Unterstützungszeit über den MO geflossen ist, war ebenfalls nicht gegeben (Spearman's $r_s = 0,412$).

Betrachtet man mit der Summe der Pixel über dem Schwellengrauwert für DAPI einen weiteren Parameter als Korrelat für die Zelldichte, war keine Korrelation mit der gesamten Unterstützungszeit festzustellen (Spearman's $r_s = 0,287$, $p=0,059$). Desgleichen war keine Abhängigkeit der Werte der DAPI-Fluoreszenz von der Dauer des Einsatzes des einzelnen Oxygenators zu erkennen (Abbildung 33 B). In Abhängigkeit von der Blutflussrate durch den untersuchten MO zwei Tage vor Ende der Unterstützung fand sich keine Korrelation des Anteils der Pixel über dem Schwellengrauwert für DAPI (Spearman $r_s = -0,132$, $p = 0,462$). Ebenso bestand kein Zusammenhang mit dem gesamten Blutflussvolumen während der Unterstützungszeit (Spearman $r_s = 0,285$, $p = 0,107$). Gleiches galt für das Maquet-Kollektiv.

Betrachtet man die Gruppe der acht Präparate, welche das größte Ausmaß zellulärer Ablagerungen anhand der DAPI-Fluoreszenz aufwies (Abbildung 29 A), im Vergleich zu den übrigen Präparaten ($n=33$; Tabelle 30 und 31), waren diese MOs signifikant länger am Patienten (14 Tage vs. 7 Tage, $p=0,035$ im Gesamtkollektiv, Abbildung 33 C; $p = 0,07$ im Maquet-Kollektiv). Bezogen auf die Parameter des Blutflusses fand sich kein Unterschied der Blutflussraten (Liter pro Minute), jedoch ein signifikant höheres Blutflussvolumen über die Einsatzdauer des MOs bei der Gruppe der Präparate mit hohen Fluoreszenzwerten gegenüber den Präparaten mit niedrigen Werten ($p = 0,03$ im Gesamtkollektiv, Abbildung 33 D; $p = 0,04$ im Maquet-Kollektiv).

im Maquet-Kollektiv; Tabelle 30 und 31). Ein Vergleich der Widerstände über den MO (dpMO) im Maquet-Kollektiv zeigte einen erhöhten Druckunterschied (18mmHg) bei den acht Präparaten mit hohem Anteil überschwelliger Pixel in der DAPI-Fluoreszenz gegenüber den übrigen Präparaten (12mmHg). Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

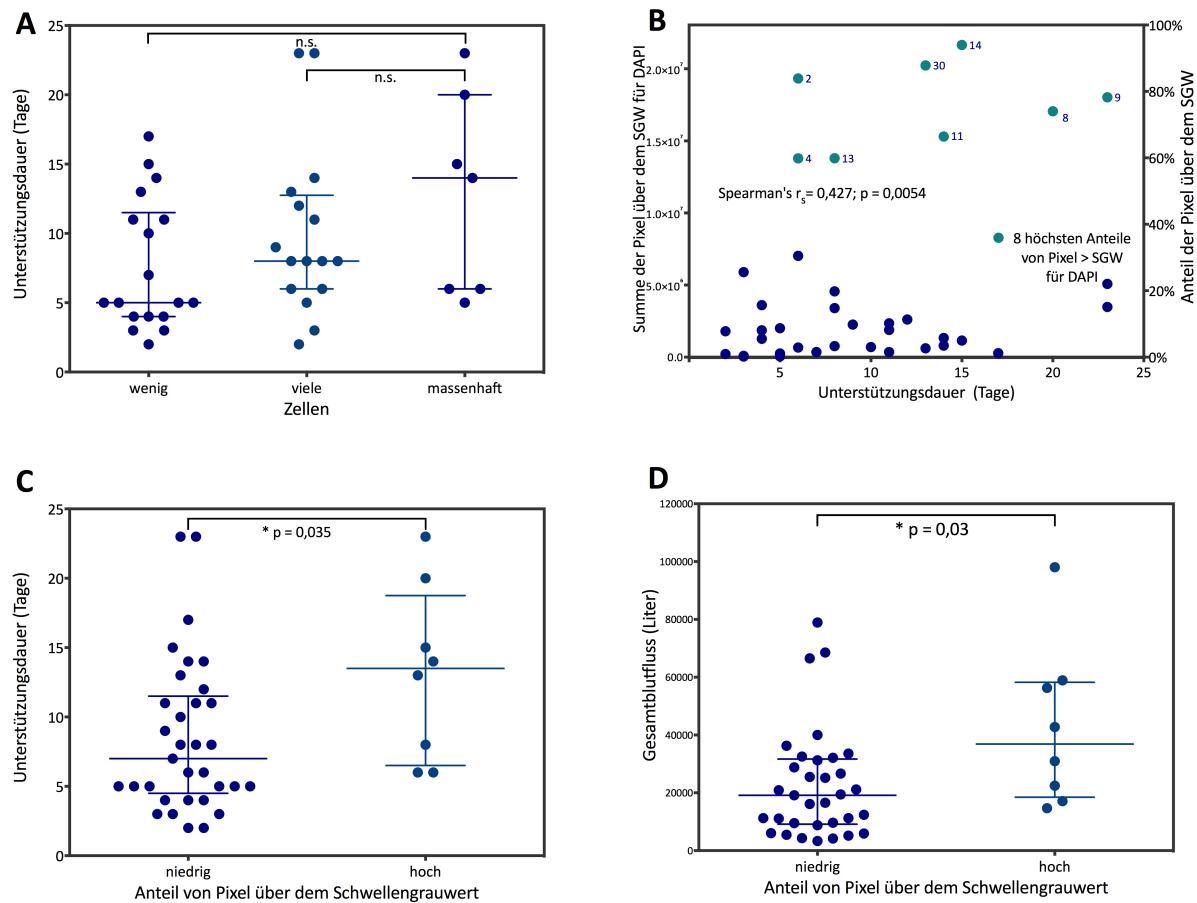


Abbildung 33 Parameter der ECMO-Unterstützung in Abhängigkeit des Ausmaßes zellulärer Ablagerungen im Gesamtkollektiv

(A) Präparate, die wenig, viele oder massenhaft Zellen aufwiesen, wurden, je höher das Ausmaß zellulärer Ablagerungen war, Oxygenatoren mit längeren Einsatzzeiten in Tagen entnommen. Die Unterschiede waren nicht signifikant. (B) Es fand sich kein Zusammenhang der Pixel über dem Schwellengrauwert im DAPI-Kanal (als Parameter der Immunfluoreszenz) mit der Unterstützungszeit mit dem untersuchten MO (Spearman's $r_s = 0,427$); markiert mit grün-blauen Punkten sind zudem die Oxygenatoren mit den acht höchsten Anteilen überschwelliger Pixel. (C) und (D) Diese acht Oxygenatoren mit hohen Anteilen von Pixeln über dem Schwellengrauwert im DAPI-Kanal wurden signifikant länger am Patienten eingesetzt (C) und von einem signifikant höheren Blutvolumen über die Unterstützungszeit durchflossen (D). (Eingetragene Linien: Median und Interquartilenabstand; Mann-Whitney-U-Test)

Die Verteilung der Oxygenatorfabrikate in den Gruppen mit wenig, vielen und massenhaft Zellen zeigte (Tabelle 18), dass alle Präparate mit massenhaft Zellen einem MO der Firma Maquet entstammten (7 von 27 = 26%). Unter den MOs mit massenhaft Zellen fanden sich keine MOs der Fabrikate Medos Hilite LT oder Oxygenatoren der Firma Sorin und Novalung. Auffallend war, dass alle untersuchten Hilite-LT-MOs mit nur wenig Zellen besiedelt waren.

Tabelle 18 Verteilung der Oxygenatorfabrikate in den Gruppen nach Kategorien der Zelldichte

Oxygenatorfabrikat	Zelldichte			Gesamt
	wenig	viele	massenhaft	
Maquet	9	11	7	27
Hilite LT	6	0	0	6
Sorin	1	1	0	2
Novalung	2	4	0	6
Gesamt	18	16	7	41

Bei Einsatz eines va-ECMO-Systems waren 70% der MOs mit wenig Zellen besiedelt. Bei einem vv-ECMO-Systems konnte dies lediglich bei 35% der MOs dokumentiert werden. Massenhafte Zellbesiedelung wurde bei 19% bzw. 10% der MOs aus vv- bzw. va-Systemen beobachtet.

Tabelle 19 Verteilung des ECMO-Verfahrens in den Gruppen nach Kategorien der Zelldichte

ECMO-Verfahren	Zelldichte			Gesamt
	wenig	viele	massenhaft	
Venovenös	11 (35%)	14 (45%)	6 (19%)	31
Venoarteriell	7 (70%)	2 (20%)	1 (10%)	10
Gesamt	18	16	7	41

Betrachtete man die Gründe für den Wechsel bzw. die Beendigung der ECMO-Unterstützung, war keine eindeutige Tendenz hinsichtlich der Zelldichte zu erkennen (Tabelle 20). Zu erwähnen ist, dass sechs der MOs mit massenhaft Zellen nach Weaning des Patienten gewonnen wurden. Ein MO mit massenhaft Zellen wurde bei Auftreten einer Koagulationsstörung ausgetauscht. Sowohl der MO, welcher aufgrund eines Verdachts einer MO-Infektion explantiert wurde, als auch der MO mit Zeichen einer MO-Thrombose zeigten viele Zellen. Gleichzeitig waren aber auch 11 MOs nach Weaning und 4 MOs bei Gerinnungsstörung untersucht worden, die nur wenig Zellen zeigten. Der Tod des Patienten war nicht mit der Ablagerung von massenhaft Zellen verbunden.

Tabelle 20 Verteilung der Gründe für den Wechsel des Oxygenators bzw. für die Beendigung der ECMO-Unterstützung in den Gruppen nach Kategorien der Zelldichte

Grund für MO-Explantation bzw. Wechsel	Zelldichte			Gesamt
	wenig	viele	massenhaft	
Weaning	11 (40%)	10 (37%)	6 (22%)	27
Koagulationsstörung	4	2	1	7
Tod des Patienten	3	2	0	5
Infektion des MO	0	1	0	1
Akute MO-Thrombose	0	1	0	1
Gesamt	18	16	7	41

Bei den acht MOs mit hohen Werten für die DAPI-Fluoreszenz war auffällend, dass sieben Präparate aus Maquet-Systemen stammten (Tabelle 21). Ein Präparat mit hohen Fluoreszenzwerten wurde aus einem Novalung-MO gewonnen.

Tabelle 21 Verteilung der Oxygenatorfabrikate in der Gruppe der acht Präparate mit den höchsten Anteilen überschwelliger Pixel gegenüber den übrigen Oxygenatoren

Oxygenatorfabrikat	Immunfluoreszenz		
	Hohe Werte	Niedrige Werte	Gesamt
Maquet	7 (26%)	20 (74%)	27
Hilite LT	0 (0%)	6 (100%)	6
Sorin	0 (0%)	2 (100%)	2
Novalung	1 (17%)	5 (83%)	6
Gesamt	8	33	41

Alle acht MOs mit Präparaten mit einer hohen Immunfluoreszenz wurden in einem venovenösen ECMO-System angewandt (Tabelle 22). Demgegenüber fanden sich die zehn Oxygenatoren aus einem venoarteriellen ECMO-System bei den Präparaten mit niedrigen Parametern der Immunfluoreszenz.

Tabelle 22 Verteilung des ECMO-Verfahrens in der Gruppe der acht Präparate mit den höchsten Anteilen überschwelliger Pixel gegenüber den übrigen Oxygenatoren

Immunfluoreszenz			
ECMO-Verfahren	Hohe Werte	Niedrige Werte	Gesamt
Venovenös	8	23	31
Venoarteriell	0	10	10
Gesamt	8	33	41

Der Grund für eine MO-Explantation war in sieben Fällen bei Präparaten mit hohen Fluoreszenzwerten das Weaning der Patienten (Tabelle 23); in einem Fall fanden sich hohe Fluoreszenzwerte bei einer Koagulationsstörung. Die weiteren sechs MOs, bei denen ein Austausch aufgrund einer Koagulationsstörung stattfand, zeigten niedrige Fluoreszenzwerte. Auch alle MOs, die aufgrund des Todes des Patienten ausgebaut wurden und die beiden MOs mit einer Infektion bzw. einer Thrombose des MOs, zeigten nur eine niedrige Fluoreszenz.

Tabelle 23 Verteilung der Gründe für den Wechsel des Oxygenators bzw. für die Beendigung der ECMO-Unterstützung in der Gruppe der acht Präparate mit den höchsten Anteilen überschwelliger Pixel gegenüber den übrigen Oxygenatoren

Immunfluoreszenz			
Grund für MO-Explantation bzw. Wechsel	Hohe Werte	Niedrige Werte	Gesamt
Weaning	7	18	27
Koagulationsstörung	1	6	7
Tod des Patienten	0	5	5
Infektion des MO	0	1	1
Akute MO-Thrombose	0	1	1
Gesamt	8	33	41

4.2.2 Ausmaß zellulärer Ablagerungen in Bezug zu den Patienten-Charakteristika

Verglich man die Präparate der Gruppen mit wenig, vielen und massenhaft Zellen bezüglich der Patienten-bezogenen Daten (Tabelle 28 und 29) und betrachtete die Verteilung des Alters der Patienten fiel auf, dass die Oxygenatoren, die in der Mikroskopie massenhaft Zellen

zeigten, an signifikant jüngeren Patienten zum Einsatz kamen ($p=0,04$). Die den Präparaten mit massenhaft Zellen zugehörigen Patienten waren im Median 37 Jahren alt, während die Patienten der Präparate mit wenigen und vielen Zellen im Median 65 bzw. 59 Jahren alt waren (Abbildung 34 A, Tabelle 28). Dieser Unterschied fand sich auch im Kollektiv der Maquet-Oxygenatoren ($p=0,04$, Tabelle 29). Unterschiede bezüglich des BMI, des SOFA- und des LI-Scores waren nicht signifikant (Tabellen 28 und 29).

Untersuchte man die patientenbezogenen Daten im Kollektiv der Maquet-Oxygenatoren, die in die Auszählung von Zellen auf den Präparaten Eingang gefunden hatten ($n=19$), fand man keine Korrelation des Alters mit der Zellzahl pro Bild (Spearman $r_s = -0,09$). Die Korrelation des SOFA-Score mit der Zellzahl war schwach (Spearman $r_s = 0,429$, Abbildung 34 B).

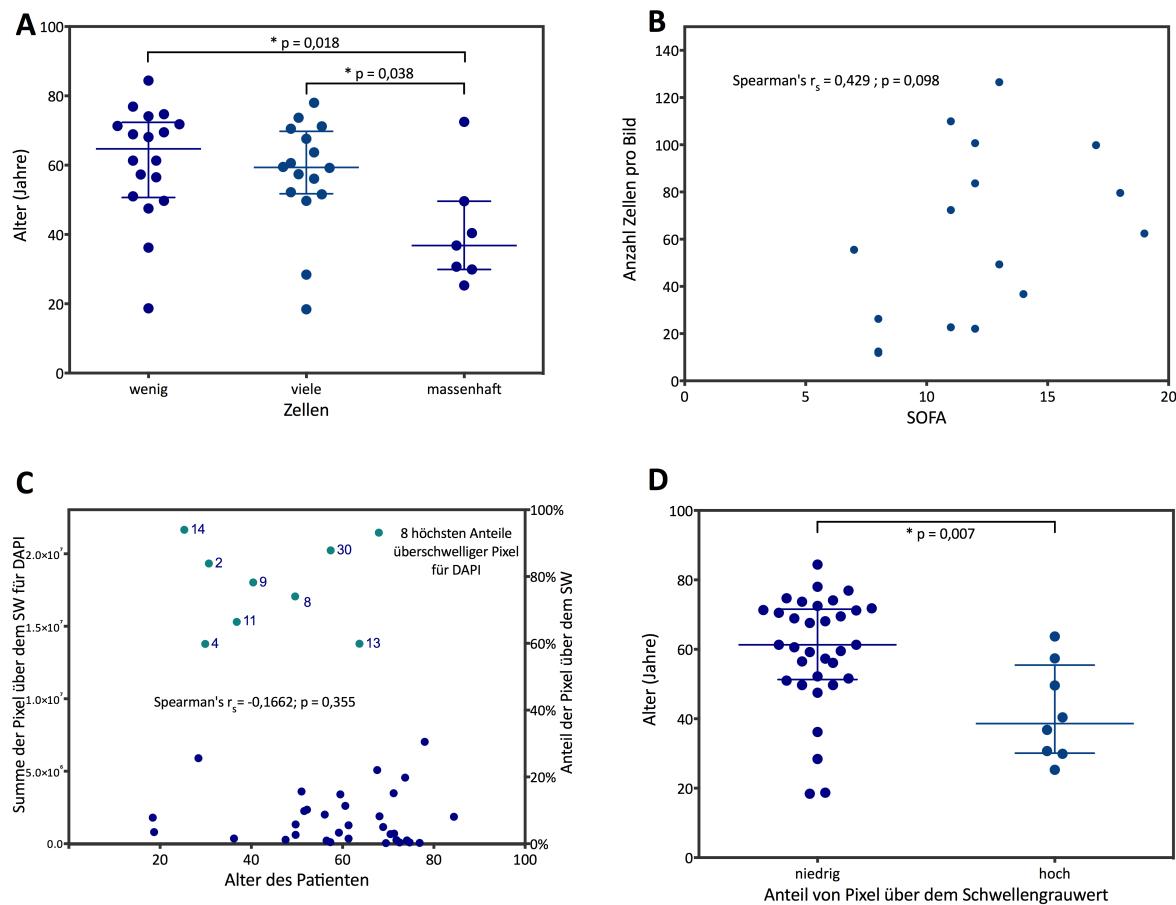


Abbildung 34 Patienten-bezogene Charakteristika in Abhängigkeit des Ausmaßes zellulärer Ablagerungen

(A) Die den Präparaten mit massenhaft Zellen zugehörigen Patienten waren signifikant jünger als Patienten, deren Oxygenatoren in der Untersuchung wenig oder viele Zellen zeigten (eingetragene Linien: Median und Interquartilenabstand, Mann-Whitney-U-Test). (B) Die Schwere der Erkrankung der Patienten, angegeben mit dem *sequential-organ-failure-score*, war höher bei Patienten, deren Präparate höhere Zellzahlen zeigten. (C) Es bestand kein Zusammenhang des Ausmaßes der Immunfluoreszenz im DAPI-Kanal mit dem Alter der Patienten (Spearman's $r_s = -0,1662$). Jedoch waren Patienten, deren Präparate einen höheren Anteil überschwelliger Pixel aufwiesen, signifikant jünger (D, eingetragene Linien: Median und Interquartilenabstand, Mann-Whitney-U-Test).

Zwischen den aus den Graustufenbildern ermittelten Parametern für die DAPI-Fluoreszenz und dem Alter der Patienten bestand keine Korrelation (Spearman r_s -0,166). Abbildung 34 C legte jedoch nahe, dass Präparate, für die hohe Werte für die DAPI-Fluoreszenz ermittelt wurden, Oxygenatoren von jüngeren Patienten entstammten. Dieser Eindruck bestätigte sich auch, wenn man die Gruppe der acht Präparate, welche hohe Anteile der Pixel über dem DAPI-Schwellengrauwert zeigten, mit den übrigen Präparaten verglich (39 gegenüber 61 Jahren) (Abbildung 34 D, Anhang Tabelle 30 und 31). Es gab somit zwar keine Korrelation der Parameter der DAPI-Fluoreszenz mit dem Alter der Patienten, aber einen signifikanten Unterschied zwischen den Präparaten mit hohem und niedrigem Ausmaß der zellulären Ablagerungen.

Die Zelldichte auf den MOs zeigte keinen Zusammenhang mit der Indikation zur ECMO-Behandlung (Tabelle 24). So führte eine Pneumonie nicht zwangsläufig zu einer massenhaften Zellbesiedelung. Dies trifft auf für die anderen zugrundeliegenden Diagnosen zu. Fälle sämtlicher Diagnosen fanden sich in allen drei Gruppen der Kategorien von Zelldichte. So wurden die Präparate mit massenhaft Zellen drei Patienten mit einem Lungenversagen aufgrund einer Pneumonie, jeweils einem Patienten mit einer extrapulmonalen Sepsis bzw. einer kardiale Ursache, und zwei weiteren Erkrankungen zugeordnet (Tabelle 24).

Tabelle 24 Verteilung der Diagnose in den Gruppen nach Kategorien der Zelldichte

Diagnose	Zelldichte			Gesamt
	wenig	viele	massenhaft	
Pneumonie	5	7	3	15
Extrapulmonale Sepsis	4	6	1	11
Andere Erkrankung	2	1	2	5
Kardiale Erkrankung	7	2	1	10
Gesamt	18	16	7	41

Zwischen dem Überleben der Therapie und der Zelldichte bestand ebenfalls kein Zusammenhang (Tabelle 25). Auffallend war, dass bei den MOs der Patienten, die am System verstarben, keine massenhaften Zellablagerungen dokumentiert wurden.

Tabelle 25 Überleben in den Gruppen nach Kategorien der Zelldichte

Outcome	Zelldichte			Gesamt
	wenig	viele	massenhaft	
Überlebt	10	7	6	23
Verstorben nach Explantation	3	3	1	7
Verstorben am System	5	6	0	11
Gesamt	18	16	7	41

Bei der Analyse der Präparate mit hohem und niedrigem Ausmaß der DAPI-Fluoreszenz zeigte sich kein Zusammenhang mit der Indikation für eine ECMO-Therapie (Tabelle 26). Es fiel auf, dass bei einer kardialen Ursache nur niedrige Fluoreszenz-Werte auftraten. Diese Präparate stammen alle aus va-Systemen.

Tabelle 26 Verteilung der Diagnosen in der Gruppe der acht Präparate mit den höchsten Anteilen überschwelliger Pixel gegenüber den übrigen Oxygenatoren

Immunfluoreszenz			
Diagnose	Hohe Werte	Niedrige Werte	Gesamt
Pneumonie	4 (27%)	11 (73%)	15
Extrapulmonale Sepsis	2 (20%)	9 (82%)	11
Andere Erkrankung	2 (40%)	3 (60%)	5
Kardiale Erkrankung	0	10 (100%)	10
Gesamt	8	33	41

Das Überleben war ebenfalls nicht einem hohen bzw. niedrigen Anteil überschwelliger Pixel in der DAPI-Fluoreszenz assoziiert (Tabelle 27). 26% der Überlebenden und 29 % der Patienten, die im Verlauf nach Ende der Therapie verstarben, hatten Präparate mit hohen DAPI-Werten.

Tabelle 27 Überleben in der Gruppe der acht Präparate mit den höchsten Anteilen überschwelliger Pixel gegenüber den übrigen Oxygenatoren

Immunfluoreszenz			
Outcome	Hohe Werte	Niedrige Werte	Gesamt
Überlebt	6	17	23
Verstorben nach Explantation	2	5	7
Verstorben am System	0	11	11
Gesamt	8	33	41

In Abhängigkeit der aufgeführten Parameter des Ausmaßes der zellulären Ablagerungen zeigten die untersuchten Laborparameter (Leukozyten, Thrombozyten, CRP, PTT, D-Dimere, fHb) bis auf die Thrombozyten am Tag 2 der Therapie keine Auffälligkeiten. Dies traf sowohl für das Gesamtkollektiv als auch für das Kollektiv der Maquetoxygenatoren zu (Tabelle 28 bis 31). Aus den dokumentierten Werten an vier Zeitpunkten vor und während der ECMO-Therapie zeigten sich jedoch Auffälligkeiten im Verlauf. Die Entzündungsparameter (CRP, Leukozyten) waren zu Beginn der ECMO-Behandlung (vor MO-Einsatz, Tag 1, Tag 2) erhöht und gegen Ende der Unterstützungszeit (2 Tage vor Explantation) rückläufig. Der Rückgang des CRPs (Vergleich des Wertes vor Beginn der Therapie und zwei Tage vor Explantation) war signifikant ($p=0,01$); der Abfall der Leukozyten war statistisch nicht signifikant ($p=0,81$). Beim Vergleich der Thrombozytenzahlen vor Beginn der Therapie und zwei Tage vor Explantation fand sich wiederum ein signifikanter Abfall ($p=0,001$). Bei der Untersuchung der Thrombozytenzahlen in den Gruppen der MOs mit wenigen, vielen und massenhaft Zellen ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen an den vier Zeitpunkten erkennen (Tabelle 28 bis 31). An Tag 2 wurden tendenziell niedrige Thrombozytenwerte beim Vorkommen von massenhaft Zellen gemessen ($p=0,12$). Es fiel jedoch auf, dass der Abfall der Thrombozyten nur in den Gruppen mit wenigen und vielen Zellen ($p=0,001$ bzw. $p=0,007$), nicht jedoch in der Gruppe mit massenhaft Zellen ($p=0,93$) signifikant war. Im Vergleich der Präparate mit hohem und niedrigen Anteil überschwelliger Pixel in der DAPI-Fluoreszenz fand sich am Tag 2 der ECMO-Behandlung ein halb so hoher Thrombozytenwert in der Gruppe mit hohem Anteil wie in der Gruppe mit niedrigem Anteil. Sowohl im Gesamt- als auch im Maquetkollektiv war dieser Unterschied signifikant ($p=0,047$ bzw. $p=0,047$). Auch hier ist jedoch der Abfall vom Wert vor Einbau des Systems auf den Wert zwei Tage vor Explantation nur bei den Präparaten mit einem niedrigen Ausmaß der DAPI-Fluoreszenz signifikant ($p<0,0001$ vs. $p=0,7$ bei den Präparaten mit hohen Werten).

Tabelle 28 ECMO- und Patientencharakteristika im Gesamtkollektiv in Bezug zum Ausmaß zellulärer Ablagerungen

Parameter (Einheit)	Fehlende Werte	Präparate mit wenig Zellen	Präparate mit vielen Zellen	Präparate mit massenhaft Zellen	p- Wert	Bewertung
	Anzahl	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)		
Alter (Jahre)	0; n=41	64,7 (52,4 – 71,7)	59,4 (52,1 – 68,3)	36,8 (30,3 – 45,0)	0,04	signifikant
BMI (kg/m ²)	0; n=41	27,4 (23,7 – 31,2)	29,3 (26,2 – 34,6)	26 (25,3 – 26,8)	0,26	n.s.
SOFA	5; n=36	9 (8 – 12)	13 (11 – 16)	11 (10 – 17)	0,16	n.s.
LIS	3; n=38	3 (2 – 4)	4 (3 – 4)	3 (3 – 4)	0,07	n.s.
Gesamtunterstützungszeit (Tage)	0; n=41	10 (5 – 15)	10 (6 – 21)	14 (6 – 25)	0,64	n.s.
Unterstützung mit untersuchtem MO (Tage)	0; n=41	5 (4 – 11)	8 (6 – 12)	14 (6 – 18)	0,14	n.s.
Mittlerer Blutfluss (L/min)	0, n=41	2,5 (2,1 – 3)	2,3 (2,2 – 2,9)	2,9 (2,5 – 3,1)	0,40	n.s.
Blutfluss 2 Tage vor Explantation (L/min)	0; n=41	2,0 (1,8 – 2,5)	2,1 (2,0 – 2,7)	2,0 (1,7 – 2,5)	0,76	n.s.
Blutvolumen über die Unterstützungszeit (L)	0; n=41	13.608 (6.732 – 30.636)	23.832 (15.228 – 31.248)	42.768 (15.912 – 57.600)	0,11	n.s.
Leukozyten Tag vor ECMO (Tsd/µl)	0; n=41	14,5 (7,4 – 18,5)	16,8 (11,5 – 17,7)	20,0 (14,9 – 23,6)	0,41	n.s.
Leukozyten Tag 1 (Tsd/µl)	1; n=40	12,3 (8,8 – 15,0)	15,1 (11,4 – 19,6)	18,1 (10,7 – 22,5)	0,35	n.s.
Leukozyten Tag 2 (Tsd/µl)	0; n=41	13,9 (8,1 – 17,8)	17,2 (13,3 – 17,8)	12,8 (9,2 – 25)	0,60	n.s.
Leukozyten 2 Tage vor Explantation (Tsd/µl)	0; n=41	13,1 (7,6 – 17,1)	18 (8,8 – 24,9)	16,5 (15,7 – 24,6)	0,13	n.s.
CRP prä (mg/l)	4; n=37	170 (98 – 253)	93 (41 – 201)	118 (19 – 254)	0,38	n.s.
CRP Tag 1 (mg/l)	4; n=37	109 (54 – 244)	107 (60 – 201)	150 (102 – 196)	0,81	n.s.
CRP Tag 2 (mg/l)	6; n=35	169 (140 – 235)	102 (71 – 224)	186 (175 – 259)	0,45	n.s.
CRP 2 Tage vor Ex. (mg/l)	2; n=39	78 (43 – 166)	57 (22 – 160)	98 (55 – 121)	0,85	n.s.
Thrombozyten prä (Tsd/µl)	0; n=41	186 (79 – 234)	119 (76 – 208)	140 (25 – 246)	0,67	n.s.
Thrombozyten Tag 1 (Tsd/µl)	1; n=40	142 (76 – 211)	81 (63 – 154)	79 (53 – 166)	0,44	n.s.
Thrombozyten Tag 2 (Tsd/µl)	4; n=37	119 (68 – 183)	105 (58 – 162)	56 (42 – 94)	0,12	n.s.
Thrombozyten 2 Tage vor Ex. (Tsd/µl)	0; n=41	91 (60 – 139)	65 (55 – 111)	112 (55 – 169)	0,65	n.s.
D-Dimere prä (mg/l)	6; n=35	5,5 (2,0 – 17,3)	11,5 (5,3 – 29,3)	5,0 (2,0 – 20,0)	0,54	n.s.
D-Dimere Tag 1 (mg/l)	1; n=40	5,0 (2,0 – 11,0)	7,0 (3,0 – 14,3)	5,0 (1,5 – 16,5)	0,64	n.s.
D-Dimere Tag 2 (mg/l)	6; n=35	7,0 (3,3 – 22,5)	6,0 (3,5 – 15,0)	4,5 (1,8 – 8,8)	0,73	n.s.
D-Dimere 2 Tage vor Ex. (mg/l)	6; n=35	7,0 (3,0 – 17,5)	7,5 (4,3 – 17,8)	7,5 (3,0 – 28,5)	0,94	n.s.
Freies Hämoglobin 2 Tage vor Ex. (mg/l)	0; n=41	65 (38 – 79)	74 (52 – 193)	115 (43 – 229)	0,51	n.s.
aPTT prä (sec.)	0; n=41	46 (43 – 59)	55 (40 – 69)	52 (40 – 72)	0,94	n.s.
aPTT Tag 1 (sec.)	1; n=40	48 (42 – 58)	60 (50 – 68)	45 (43 – 75)	0,37	n.s.
aPTT Tag 2 (sec.)	5; n=36	53 (47 – 56)	53 (48 – 59)	45 (43 – 55)	0,64	n.s.
aPTT 2 Tage vor Ex. (sec.)	1; n=40	52 (46 – 60)	60 (52 – 68)	45 (43 – 52)	0,19	n.s.

Tabelle 29 ECMO- und Patientencharakteristika im Kollektiv der Maquet-MOs in Bezug zum Ausmaß zellulärer Ablagerungen

Parameter (Einheit)	Fehlende Werte	Präparate mit wenig Zellen	Präparate mit vielen Zellen	Präparate mit massenhaft Zellen	p- Wert	Bewertung
	Anzahl	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)		
Alter (Jahre)	0; n=27	69,5 (61,3 – 71,8)	59,5 (54,2 – 69,4)	36,8 (30,3 – 45,0)	0,04	signifikant
BMI (kg/m ²)	0; n=27	28,7 (26,1 – 31,3)	29,2 (26,3 – 34,8)	26,0 (25,3 – 26,8)	0,38	n.s.
SOFA	3; n=24	10 (8 – 12)	13 (12 – 17)	11 (10 – 18)	0,19	n.s.
LIS	2; n=25	3 (2 – 4)	4 (4 – 4)	3 (3 – 4)	0,08	n.s.
Gesamtunterstützungszeit (Tage)	0; n=27	10 (5 – 15)	8 (6 – 13)	14 (6 – 25)	0,68	n.s.
Unterstützung mit untersuchtem MO (Tage)	0; n=27	5 (4 – 10)	8 (6 – 10)	14 (6 – 18)	0,25	n.s.
dpMO 2 Tage vor Explantation (mmHg)	7; n=20	11 (10 – 16)	12 (11 – 16)	18 (13 – 19)	0,25	n.s.
Mittlerer Blutfluss (L/min)	0, n=27	2,6 (2,5 – 3,4)	2,6 (2,5 – 3,0)	2,9 (2,5 – 3,1)	0,90	n.s.
Blutfluss 2 Tage vor Explantation (L/min)	0; n=27	2,3 (2,0 – 3,3)	2,3 (2,1 – 2,9)	2,0 (1,7 – 2,5)	0,43	n.s.
Blutvolumen über die Unterstützungszeit (L)	0; n=27	16.128 (9.648 – 21.168)	20.880 (13.896 – 32.760)	42.768 (15.912 – 57.600)	0,17	n.s.
Leukozyten Tag vor ECMO (Tsd/µl)	0; n=27	15,2 (6,7 – 18,7)	15,8 (8,4 – 16,9)	20,0 (14,9 – 23,6)	0,48	n.s.
Leukozyten Tag 1 (Tsd/µl)	1; n=26	13,2 (11,1 – 13,9)	14,6 (10,5 – 19,9)	18,1 (10,7 – 22,5)	0,45	n.s.
Leukozyten Tag 2 (Tsd/µl)	4; n=23	15,6 (11,4 – 16,8)	15,8 (9,3 – 17,4)	12,8 (9,2 – 25,0)	0,98	n.s.
Leukozyten 2 Tage vor Explantation (Tsd/µl)	0; n=27	15,3 (7,4 – 16,2)	22,5 (8,2 – 26,1)	16,5 (15,7 – 24,6)	0,25	n.s.
CRP prä (mg/l)	3; n=24	129 (98 – 185)	192 (63 – 221)	118 (19 – 254)	0,84	n.s.
CRP Tag 1 (mg/l)	2; n=25	79 (55 – 209)	112 (106 – 238)	150 (102 – 196)	0,39	n.s.
CRP Tag 2 (mg/l)	5; n=22	162 (109 – 210)	197 (100 – 243)	186 (175 – 259)	0,59	n.s.
CRP 2 Tage vor Ex. (mg/l)	2; n=25	77 (41 – 143)	89 (34 – 168)	98 (55 – 121)	0,91	n.s.
Thrombozyten prä (Tsd/µl)	0; n=27	175 (90 – 228)	155 (105 – 215)	140 (25 – 246)	0,97	n.s.
Thrombozyten Tag 1 (Tsd/µl)	1; n=26	142 (74 – 217)	102 (63 – 153)	79 (53 – 166)	0,68	n.s.
Thrombozyten Tag 2 (Tsd/µl)	4; n=23	113 (63 – 177)	74 (53 – 121)	56 (42 – 94)	0,34	n.s.
Thrombozyten 2 Tage vor Ex. (Tsd/µl)	0; n=27	86 (56 – 169)	60 (54 – 102)	112 (55 – 169)	0,54	n.s.
D-Dimere prä (mg/l)	4; n=23	6,0 (4,0 – 13,0)	7,0 (5,0 – 27,0)	5,0 (2,0 – 20,0)	0,83	n.s.
D-Dimere Tag 1 (mg/l)	0; n=27	7 (4,0 – 11,0)	6,0 (4,0 – 15,5)	5,0 (1,5 – 16,5)	0,75	n.s.
D-Dimere Tag 2 (mg/l)	5; n=22	11,5 (4,3 – 30,0)	6,0 (4,3 – 20,5)	4,5 (1,8 – 8,8)	0,62	n.s.
D-Dimere 2 Tage vor Ex. (mg/l)	3; n=24	7,0 (4,0 – 17,9)	14,0 (6,0 – 21,0)	7,5 (3,0 – 28,5)	0,73	n.s.
Freies Hämoglobin 2 Tage vor Ex. (mg/l)	0; n=27	70 (63 – 82)	90 (48 – 219)	115 (43 – 229)	0,90	n.s.
aPTT prä (sec.)	0; n=27	43 (40 – 56)	55 (44 – 674)	52 (40 – 72)	0,57	n.s.
aPTT Tag 1 (sec.)	1; n=26	52 (44 – 63)	60 (49 – 72)	45 (43 – 75)	0,68	n.s.
aPTT Tag 2 (sec.)	4; n=23	55 (53 – 56)	57 (48 – 63)	45 (43 – 55)	0,29	n.s.
aPTT 2 Tage vor Ex. (sec.)	1; n=26	55 (46 – 63)	59 (53 – 68)	45 (43 – 52)	0,15	n.s.

Tabelle 30 ECMO- und Patientencharakteristika im Gesamtkollektiv in Abhängigkeit des Anteils von Pixeln über dem Schwellengrauwert für DAPI

Parameter (Einheit)	Fehlende Werte	Präparate mit niedrigem Anteil Pixel über SGW	Präparate mit hohem Anteil Pixel über SGW	p- Wert	Bewertung
	Anzahl	Median (IQR)	Median (IQR)		
Alter (Jahre)	0; n=41	61,3 (51,6– 71,3)	38,5 (30,5 – 51,5)	0,007	signifikant
BMI (kg/m ²)	0; n=41	27,3 (24,8 – 32,6)	26,8 (25,9 – 30,2)	0,94	n.s.
SOFA	5; n=36	11 (8 – 14)	14 (10 – 17)	0,38	n.s.
LIS	3; n=38	4 (3 – 4)	3 (3 – 4)	0,20	n.s.
Gesamtunterstützungszeit (Tage)	0; n=41	10 (5 – 15)	18 (8 – 24)	0,20	n.s.
Unterstützung mit untersuchtem MO (Tage)	0; n=41	7 (5 – 11)	14 (8 – 16)	0,04	signifikant
Mittlerer Blutfluss (L/min)	0, n=41	2,6 (2,1 – 2,9)	2,6 (2,3 – 3,1)	0,62	n.s.
Blutfluss 2 Tage vor Explantation (L/min)	0; n=41	2,0 (1,8 – 2,8)	1,9 (1,7 – 2,2)	0,20	n.s.
Blutvolumen über die Unterstützungszeit (L)	0; n=41	19.152 (9.504 – 31.248)	36.864 (21.132 – 56.952)	0,03	signifikant
Leukozyten Tag vor ECMO (Tsd/µl)	0; n=41	15,2 (9,2 – 17,7)	19,2 (12,1 – 23,2)	0,37	n.s.
Leukozyten Tag 1 (Tsd/µl)	1; n=40	13,5 (10,1 – 18,1)	16,7 (12,5 – 20,4)	0,55	n.s.
Leukozyten Tag 2 (Tsd/µl)	0; n=41	15,7 (8,8 – 17,7)	15,7 (13,3 – 21,3)	0,79	n.s.
Leukozyten 2 Tage vor Explantation (Tsd/µl)	0; n=41	15,3 (8,5 – 22,5)	15,8 (13,3 – 21,7)	0,58	n.s.
CRP prä (mg/l)	4; n=37	129 (47 – 229)	194 (95 – 237)	0,79	n.s.
CRP Tag 1 (mg/l)	4; n=37	106 (54 – 229)	160 (113 – 223)	0,35	n.s.
CRP Tag 2 (mg/l)	6; n=35	165 (76 – 232)	188 (143 – 297)	0,25	n.s.
CRP 2 Tage vor Ex. (mg/l)	2; n=39	77 (27 – 150)	106 (59 – 153)	0,35	n.s.
Thrombozyten prä (Tsd/µl)	0; n=41	175 (82 – 235)	90 (27 – 168)	0,26	n.s.
Thrombozyten Tag 1 (Tsd/µl)	1; n=40	142 (72 – 193)	72 (59 – 98)	0,10	n.s.
Thrombozyten Tag 2 (Tsd/µl)	4; n=37	110 (72 – 183)	51 (40 – 109)	0,047	signifikant
Thrombozyten 2 Tage vor Ex. (Tsd/µl)	0; n=41	85 (56 – 127)	123 (57 – 223)	0,32	n.s.
D-Dimere prä (mg/l)	6; n=35	6,5 (2,0 – 21,8)	5,0 (3,5 – 35,0)	0,76	n.s.
D-Dimere Tag 1 (mg/l)	1; n=40	5,5 (2,8 – 14,3)	5,5 (2,8 – 12,8)	0,96	n.s.
D-Dimere Tag 2 (mg/l)	6; n=35	6,0 (3,0 – 15,8)	5,0 (3,0 – 18,0)	0,95	n.s.
D-Dimere 2 Tage vor Ex. (mg/l)	6; n=35	7,0 (4,0 – 18,0)	5,5 (2,8 – 17,5)	0,77	n.s.
Freies Hämoglobin 2 Tage vor Ex. (mg/l)	0; n=41	70 (40 – 115)	58 (42 – 187)	1,0	n.s.
aPTT prä (sec.)	0; n=41	53 (43 – 62)	46 (40 – 70)	0,57	n.s.
aPTT Tag 1 (sec.)	1; n=40	53 (43 – 64)	47 (43 – 64)	0,88	n.s.
aPTT Tag 2 (sec.)	5; n=36	52 (43 – 56)	46 (45 – 57)	0,87	n.s.
aPTT 2 Tage vor Ex. (sec.)	1; n=40	54 (46 – 63)	46 (43 – 62)	0,54	n.s.

Tabelle 31 ECMO- und Patientencharakteristika im Kollektiv der Maquet-MOs in Abhängigkeit des Anteils von Pixeln über dem Schwellengrauwert für DAPI

Parameter (Einheit)	Fehlende Werte	Präparate mit niedrigem Anteil Pixel über SGW	Präparate mit hohem Anteil Pixel über SGW	p- Wert	Bewertung
	Anzahl	Median (IQR)	Median (IQR)		
Alter (Jahre)	0; n=27	68,3 (58,4 – 72,0)	36,8 (30,3 – 45)	0,008	signifikant
BMI (kg/m ²)	0; n=27	28,3 (25,4 – 34,0)	26,0 (25,9 – 28,4)	0,61	n.s.
SOFA	3; n=24	12 (11 – 13)	16 (10 – 18)	0,62	n.s.
LIS	2; n=25	4 (3 – 4)	3 (3 – 4)	0,75	n.s.
Gesamtunterstützungszeit (Tage)	0; n=27	9 (5 – 15)	14 (7 – 25)	0,22	n.s.
Unterstützung mit untersuchtem MO (Tage)	0; n=27	7 (5 – 10)	14 (7 – 18)	0,07	n.s.
dpMO 2 Tage vor Explantation (mmHg)	7; n=20	12 (10 – 16)	18 (13 – 19)	0,11	n.s.
Mittlerer Blutfluss (L/min)	0, n=27	2,7 (2,5 – 3,0)	2,6 (2,5 – 3,1)	1,0	n.s.
Blutfluss 2 Tage vor Explantation (L/min)	0; n=27	2,3 (2,0 – 2,9)	2,0 (1,7 – 2,3)	0,08	n.s.
Blutvolumen über die Unterstützungszeit (L)	0; n=27	17.856 (10.728 – 26.316)	42.768 (19.800 – 57.600)	0,048	signifikant
Leukozyten Tag vor ECMO (Tsd/µl)	0; n=27	15,4 (8,8 – 17,0)	20,0 (9,1 – 23,6)	0,46	n.s.
Leukozyten Tag 1 (Tsd/µl)	1; n=26	13,2 (10,6 – 15,8)	18,1 (10,1 – 22,5)	0,48	n.s.
Leukozyten Tag 2 (Tsd/µl)	4; n=23	15,7 (9,2 – 17,2)	12,8 (8,6 – 25,0)	0,97	n.s.
Leukozyten 2 Tage vor Explantation (Tsd/µl)	0; n=27	16,0 (8,5 – 22,6)	16,5 (13,9 – 24,6)	0,73	n.s.
CRP prä (mg/l)	3; n=24	129 (52 – 217)	189 (71 – 254)	0,71	n.s.
CRP Tag 1 (mg/l)	2; n=25	107 (78 – 224)	170 (125 – 226)	0,46	n.s.
CRP Tag 2 (mg/l)	5; n=22	170 (98 – 232)	235 (184 – 304)	0,18	n.s.
CRP 2 Tage vor Ex. (mg/l)	2; n=25	79 (36 – 141)	98 (55 – 123)	0,88	n.s.
Thrombozyten prä (Tsd/µl)	0; n=27	176 (98 – 232)	124 (25 – 196)	0,50	n.s.
Thrombozyten Tag 1 (Tsd/µl)	1; n=26	142 (66 – 196)	76 (53 – 118)	0,19	n.s.
Thrombozyten Tag2 (Tsd/µl)	4; n=23	101 (68 – 174)	46 (39 – 76)	0,047	signifikant
Thrombozyten 2 Tage vor Ex. (Tsd/µl)	0; n=27	71 (56 – 114)	112 (53 – 169)	0,57	n.s.
D-Dimere prä (mg/l)	4; n=23	6,0 (3,0 – 19,0)	5,0 (2,8 – 27,5)	0,92	n.s.
D-Dimere Tag 1 (mg/l)	0; n=27	5,5 (3,0 – 14,3)	6,0 (3,5 – 17,5)	0,89	n.s.
D-Dimere Tag 2 (mg/l)	5; n=22	6,0 (3,0 – 17,3)	7,5 (4,3 – 22,0)	0,80	n.s.
D-Dimere 2 Tage vor Ex. (mg/l)	3; n=24	8,0 (5,0 – 21,0)	8,0 (3,0 – 23,0)	0,85	n.s.
Freies Hämoglobin 2 Tage vor Ex. (mg/l)	0; n=27	80 (57 – 218)	66 (43 – 229)	0,89	n.s.
aPTT prä (sec.)	0; n=27	54 (41 – 71)	40 (40 – 61)	0,34	n.s.
aPTT Tag 1 (sec.)	1; n=26	56 (45 – 68)	45 (45 – 62)	0,50	n.s.
aPTT Tag 2 (sec.)	4; n=23	56 (48 – 61)	52 (52 – 57)	0,58	n.s.
aPTT 2 Tage vor Ex. (sec.)	1; n=26	58 (52 – 65)	45 (45 – 52)	0,07	n.s.

4.2.3 Vorhandensein von Pseudomembranen in Bezug zu den ECMO-Charakteristika

Anhand der Übersichtsbilder wurde das Vorhandensein von Pseudomembranen (zell- und/oder fibrinhaltige Schichten, die mehrere Gaskapillaren überziehen) erfasst. Die Präparate wurden in zwei Gruppen mit und ohne Pseudomembranen eingeteilt. Sechs sehr ausgeprägt besiedelte Oxygenatoren wiesen Pseudomembranen auf. Die Ergebnisse der statistischen Analysen wurden in den Tabellen 37 (Gesamtkollektiv) und 38 (Maquetoxygenatoren) zusammengefasst.

Die Dauer der Gesamtunterstützungszeit durch ECMO und die Dauer des Einsatzes des untersuchten MO waren zwischen der Gruppe der sechs Präparate mit Pseudomembranen und der Präparate ohne Pseudomembranen nicht verschieden ($p=0,58$ bzw. $p=0,25$ im Gesamtkollektiv; $p=0,51$ bzw. $p=0,32$ im Maquetkollektiv; Abbildung 35 A, Tabelle 37 und 38). Auch bezüglich des Blutflusses und Blutvolumens während der Unterstützungszeit ergaben sich keine Unterschiede, sowohl im Gesamtkollektiv als auch im Kollektiv der Maquet-Oxygenatoren. Für die Daten dieser Arbeit lagen von 20 Maquet-Oxygenatoren Angaben zum dpMO zwei Tage vor Explantation des Systems vor. Es wurden signifikant höhere dpMO-Werte bei fünf Präparaten mit Pseudomembranen gemessen (für einen MO mit Pseudomembranen wurde kein dpMO dokumentiert) als bei Oxygenatoren ohne Nachweis von Pseudomembranen ($p = 0,04$, Abbildung 35 B).

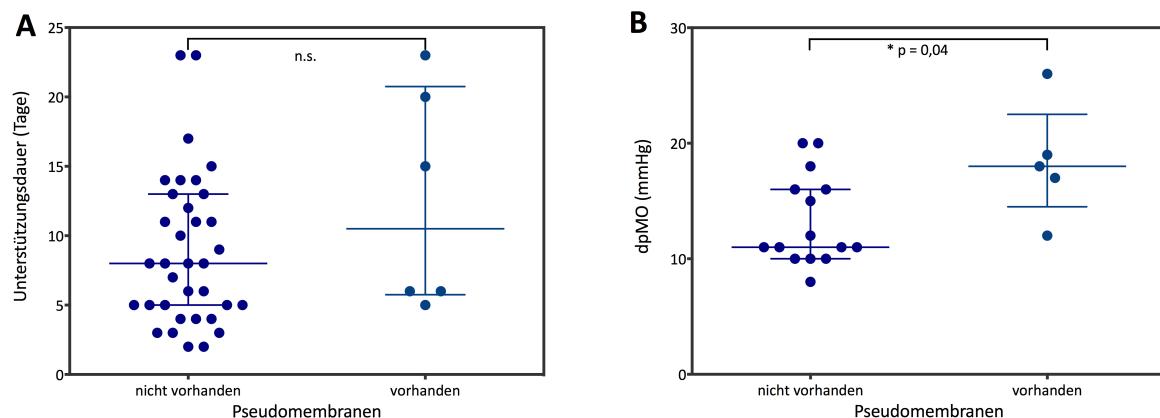


Abbildung 35 Parameter der ECMO-Unterstützung in Abhängigkeit des Vorkommens von Pseudomembranen

(A) Die Einsatzdauer des untersuchten Oxygenators am Patienten in Tagen unterschied sich nicht zwischen den Gruppen von Oxygenatoren, deren Präparate Pseudomembranen zeigten, und auf deren Präparate keine Pseudomembranen zu finden waren ($n=41$). (B) Im Maquetkollektiv wurde zwei Tage vor Ende der Unterstützung mit dem untersuchten MO ein signifikant höherer dpMO gemessen, wenn Präparate bei der späteren Untersuchung Pseudomembranen aufwiesen ($n=5$, für ein Präparat wurde kein dpMO festgehalten). (Eingetragene Linien: Median und Interquartilenabstand, Mann-Whitney-U-Test).

Die sechs MOs mit Pseudomembranen waren alle dem Kollektiv von Maquet-MOs zuzuordnen. Kein MO der anderen Hersteller wies Pseudomembranen auf (Tabelle 32).

Tabelle 32 Verteilung der Oxygenatorfabrikate in den Gruppen der Präparate mit und ohne Pseudomembranen

Oxygenatorfabrikat	Pseudomembranen		
	Vorhanden	Nicht vorhanden	Gesamt
Maquet	6	21	27
Hilite LT	0	6	6
Sorin	0	2	2
Novalung	0	6	6
Gesamt	6	35	41

Pseudomembranen traten in MOs aus va-Systemen (10%) ebenso auf wie in MOs aus vv-Systemen (16%, Tabelle 33).

Tabelle 33 Verteilung des ECMO-Verfahrens in den Gruppen der Präparate mit und ohne Pseudomembranen

ECMO-Verfahren	Pseudomembranen		
	Vorhanden	Nicht vorhanden	Gesamt
Venovenös	5 (16%)	26 (84%)	31
Venoarteriell	1 (10%)	9 (90%)	10
Gesamt	6	35	41

Die Proben mit Pseudomembranen waren in Bezug auf den Grund für den Oxygenatorausbau oder -wechsel in der Gruppe der entwöhnten Patienten (5 von 27 Patienten) und in einem Fall in der Gruppe der Patienten mit Koagulationsstörung zu finden (Tabelle 34).

Tabelle 34 Verteilung der Gründe für den Wechsel des Oxygenators bzw. für die Beendigung der ECMO-Unterstützung in den Gruppen der Präparate mit und ohne Pseudomembranen

Pseudomembranen			
Grund für MO-Explantation bzw. Wechsel	Vorhanden	Nicht vorhanden	Gesamt
Weaning	5 (19%)	22 (81%)	27
Koagulationsstörung	1 (17%)	6 (83%)	7
Tod des Patienten	0 (0%)	5 (100%)	5
Infektion des MO	0 (0%)	1 (100%)	1
Akute MO-Thrombose	0 (0%)	1 (100%)	1
Gesamt	6	35	41

4.2.4 Vorhandensein von Pseudomembranen in Bezug zu den Patienten-Charakteristika

Die Patienten, deren Oxygenatoren Pseudomembranen nach der Unterstützungszeit aufwiesen, waren mit im Median 36 Jahren signifikant jünger als die übrigen Patienten mit 61 Jahren (Abbildung 36 A, $p = 0,04$, Tabelle 37). Im Kollektiv der Maquet-Oxygenatoren war dieser Unterschied auch festzustellen, jedoch statistisch gerade nicht signifikant ($p = 0,057$). Bezüglich des BMIs der Patienten und der intensivmedizinischen Scores (SOFA, LIS) gab es keine Unterschiede sowohl im Gesamt- als auch im Maquet-Kollektiv (Tabelle 37 und 38).

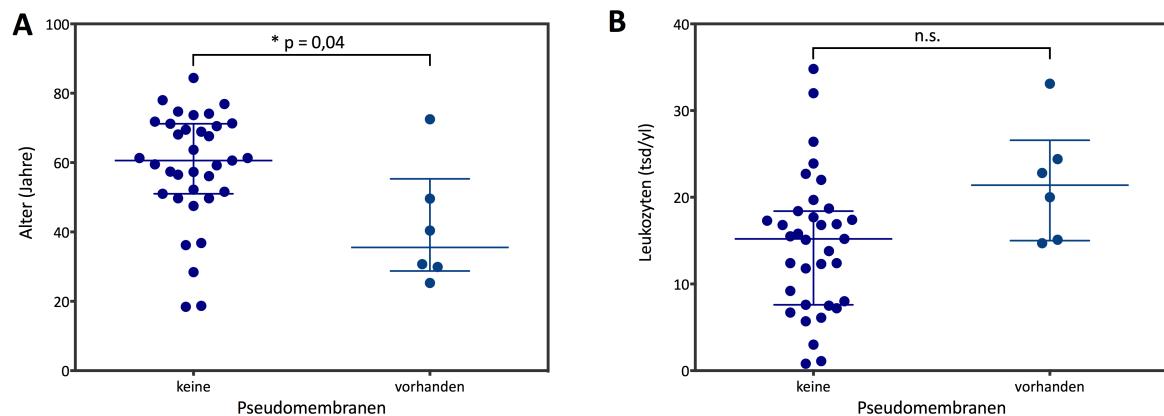


Abbildung 36 Patientenbezogene Charakteristika in Abhängigkeit des Vorkommens von Pseudomembranen

(A) Patienten, deren Oxygenatoren Pseudomembranen aufwiesen, waren signifikant jünger als die übrigen Patienten. (B) Patienten, deren MOs Pseudomembranen zeigte, hatten höhere Leukozytenzahlen vor Implantation des ECMO-Systems als Patienten mit MOs ohne Pseudomembranen. Dieser Unterschied war knapp nicht signifikant ($p=0,051$). (Eingetragene Linien: Median und Interquartilenabstand, Mann-Whitney-U-Test).

Die eine ECMO-Behandlung notwendig machende Diagnose war in den Fällen der Präparate mit Pseudomembranen in zwei Fällen eine Pneumonie, in einem Fall eine extrapulmonale septische Erkrankung, in jeweils einem Fall eine kardiale Einschränkung, ein Polytrauma mit Aspirationspneumonie, und ein Asthma bronchiale (Tabelle 35).

Tabelle 35 Verteilung der Diagnosen in den Gruppen der Präparate mit und ohne Pseudomembranen

Diagnose	Vorhanden	Nicht vorhanden	Gesamt
Pneumonie	2	13	15
Extrapulmonale Sepsis	1	10	11
Andere Erkrankung	2	3	5
Kardiale Erkrankung	1	9	10
Gesamt	6	35	41

Betrachtete man die Übersichtsbilder in Abhängigkeit des Überlebens der Patienten fiel auf, dass die sechs Präparate mit Pseudomembranen zu den sechs Patienten, die nicht verstorben waren, gehörten (Tabelle 36).

Tabelle 36 Überleben in den Gruppen der Präparate mit und ohne Pseudomembranen

Pseudomembranen			
Outcome	Vorhanden	Nicht vorhanden	Gesamt
Überlebt	6	17	23
Verstorben nach Explantation	0	7	7
Verstorben am System	0	11	11
Gesamt	6	35	41

Bei Betrachtung der protokollierten Laborwerte fand sich ein Unterschied der Leukozytenkonzentration vor Implantation des untersuchten MOs. Bei Patienten, deren Oxygenatoren Pseudomembranen aufwiesen, wurden höhere Leukozytenzahlen vor Anwendung des untersuchten MOs gemessen als bei den übrigen Patienten (21,4Tsd/yL vs. 15,2Tsd/yL, $p=0,051$, Abbildung 36 B). Im Maquet-Kollektiv war dieser Unterschied signifikant (21,4Tsd/yL vs. 15,2Tsd/yL, $p=0,042$). Auch am Tag 1 war in beiden Kollektiven diese Tendenz weiterhin zu erkennen (nicht signifikant). Ansonsten fanden sich bezüglich des Vorhandenseins oder Nicht-Vorhandenseins von Pseudomembranen bei den weiteren untersuchten Laborparametern keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen von Präparaten (Tabellen 37 und 38). Insbesondere bezüglich der protokollierten D-Dimere-Werte wurden bei Präparaten mit Pseudomembranen keine höheren Werte als bei den übrigen Präparaten gemessen. Ein Oxygenator mit Pseudomembranen wurde aufgrund einer diagnostizierten Störung des Gerinnungssystems ausgetauscht. Diese machte sich u. a. mit erhöhten D-Dimer-Werten bemerkbar (34mg/l), welche nach Austausch des MOs rückläufig waren.

Tabelle 37 ECMO- und Patientencharakteristika im Gesamtkollektiv in Abhängigkeit des Vorhandenseins von Pseudomembranen

Parameter (Einheit)	Fehlende Werte	Präparate ohne Pseudomembranen	Präparate mit Pseudomembranen	p- Wert	Bewertung
	Anzahl	Median (IQR)	Median (IQR)		
Alter (Jahre)	0; n=41	60,6 (51,3– 70,8)	35,5 (30,1 – 47,3)	0,04	signifikant
BMI (kg/m ²)	0; n=41	27,8 (25,4 – 32,8)	26,0 (25,1 – 27,2)	0,44	n.s.
SOFA	5; n=36	12 (8 – 14)	11 (10 – 16)	0,92	n.s.
LIS	3; n=38	4 (3 – 4)	3 (3 – 4)	0,65	n.s.
Gesamtunterstützungszeit (Tage)	0; n=41	10 (5 – 17)	15 (6 – 25)	0,58	n.s.
Unterstützung mit untersuchtem MO (Tage)	0; n=41	8 (5 – 11)	11 (6 – 19)	0,25	n.s.
Mittlerer Blutfluss (L/min)	0, n=41	2,6 (2,1 – 3,0)	2,8 (2,4 – 3,0)	0,44	n.s.
Blutfluss 2 Tage vor Explantation (L/min)	0; n=41	2,0 (1,8 – 2,6)	2,3 (1,6 – 2,5)	0,76	n.s.
Blutvolumen über die Unterstützungszeit (L)	0; n=41	20.880 (9.576 – 31.680)	29.952 (15.300 – 54.864)	0,22	n.s.
Leukozyten Tag vor ECMO (Tsd/µl)	0; n=41	15,2 (7,8 – 18,1)	21,4 (16,4 – 24,4)	0,051	n.s.
Leukozyten Tag 1 (Tsd/µl)	1; n=40	13,5 (9,6 – 17,9)	18,2 (16,0 – 24,6)	0,16	n.s.
Leukozyten Tag 2 (Tsd/µl)	0; n=41	15,7 (8,6 – 17,8)	16,8 (15,5 – 27,1)	0,52	n.s.
Leukozyten 2 Tage vor Explantation (Tsd/µl)	0; n=41	14,1 (8,3 – 22,7)	16,4 (15,5 – 17,6)	0,40	n.s.
CRP prä (mg/l)	4; n=37	167 (52 – 226)	123 (17 – 270)	0,70	n.s.
CRP Tag 1 (mg/l)	4; n=37	108 (55 – 231)	138 (101 – 208)	0,95	n.s.
CRP Tag 2 (mg/l)	6; n=35	165 (80 – 236)	183 (172 – 188)	0,80	n.s.
CRP 2 Tage vor Ex. (mg/l)	2; n=39	79 (28 – 168)	81 (50 – 109)	0,81	n.s.
Thrombozyten prä (Tsd/µl)	0; n=41	155 (66 – 229)	190 (57 – 249)	0,82	n.s.
Thrombozyten Tag 1 (Tsd/µl)	1; n=40	126 (66 – 187)	118 (69 – 170)	0,87	n.s.
Thrombozyten Tag 2 (Tsd/µl)	4; n=37	110 (55 – 179)	74 (43 – 95)	0,11	n.s.
Thrombozyten 2 Tage vor Ex. (Tsd/µl)	0; n=41	85 (56 – 131)	123 (75 – 186)	0,27	n.s.
D-Dimere prä (mg/l)	6; n=35	7,0 (2,0 – 27,0)	5,0 (2,8 – 27,5)	0,82	n.s.
D-Dimere Tag 1 (mg/l)	1; n=40	5,5 (3,0 – 13,3)	5,5 (2,0 – 21,7)	0,90	n.s.
D-Dimere Tag 2 (mg/l)	6; n=35	6,0 (3,3 – 17,3)	4,0 (1,0 – 10,0)	0,48	n.s.
D-Dimere 2 Tage vor Ex. (mg/l)	6; n=35	7,0 (3,3 – 17,8)	12,0 (3,0 – 34,0)	0,45	n.s.
Freies Hämoglobin 2 Tage vor Ex. (mg/l)	0; n=41	70 (42 – 63)	82 (39 – 138)	0,99	n.s.
aPTT prä (sec.)	0; n=41	53 (43 – 63)	46 (39 – 69)	0,68	n.s.
aPTT Tag 1 (sec.)	1; n=40	53 (43 – 63)	44 (43 – 68)	0,90	n.s.
aPTT Tag 2 (sec.)	5; n=36	53 (48 – 56)	45 (42 – 54)	0,35	n.s.
aPTT 2 Tage vor Ex. (sec.)	1; n=40	54 (46 – 63)	45 (43 – 55)	0,27	n.s.

Tabelle 38 ECMO- und Patientencharakteristika im Kollektiv des Maquet- MOs in Abhängigkeit des Vorhandenseins von Pseudomembranen

Parameter (Einheit)	Fehlende Werte Anzahl	Präparate ohne Pseudomembranen Median (IQR)	Präparate mit Pseudomembranen Median (IQR)	p- Wert	Bewertung
Alter (Jahre)	0; n=27	63,7 (56,1– 71,3)	35,5 (30,1 – 47,3)	0,057	n.s.
BMI (kg/m ²)	0; n=27	28,7 (25,7 – 33,9)	26,0 (25,1 – 27,2)	0,29	n.s.
SOFA	3; n=24	12 (11 – 16)	11 (10 – 16)	0,54	n.s.
LIS	2; n=25	4 (3 – 4)	3 (3 – 4)	0,83	n.s.
Gesamtunterstützungszeit (Tage)	0; n=27	9 (5 – 15)	15 (6 – 25)	0,51	n.s.
Unterstützung mit untersuchtem MO (Tage)	0; n=27	8 (5 – 11)	11 (6 – 19)	0,32	n.s.
dpMO 2 Tage vor Explantation (mmHg)	7; n=20	11 (11 – 16)	18 (17 – 19)	0,042	signifikant
Mittlerer Blutfluss (L/min)	0, n=27	2,6 (2,5 – 3,0)	2,8 (2,4 – 3,0)	0,80	n.s.
Blutfluss 2 Tage vor Explantation (L/min)	0; n=27	2,3 (2,0 – 2,9)	2,3 (1,6 – 2,5)	0,44	n.s.
Blutvolumen über die Unterstützungszeit (L)	0; n=27	19.440 (11.088 – 28.800)	29.952 (15.300 – 54.864)	0,32	n.s.
Leukozyten Tag vor ECMO (Tsd/µl)	0; n=27	15,2 (7,5 – 16,9)	21,4 (16,4 – 24,4)	0,042	signifikant
Leukozyten Tag 1 (Tsd/µl)	1; n=26	13,2 (9,9 – 15,5)	18,2 (16,0 – 24,6)	0,08	n.s.
Leukozyten Tag 2 (Tsd/µl)	4; n=23	15,6 (8,9 – 17,1)	16,8 (15,5 – 27,1)	0,47	n.s.
Leukozyten 2 Tage vor Explantation (Tsd/µl)	0; n=27	15,7 (7,6 – 22,8)	16,4 (15,5 – 17,6)	0,63	n.s.
CRP prä (mg/l)	3; n=24	150 (81 – 213)	123 (17 – 270)	0,92	n.s.
CRP Tag 1 (mg/l)	2; n=25	110 (79 – 231)	138 (101 – 208)	0,88	n.s.
CRP Tag 2 (mg/l)	5; n=22	187 (100 – 243)	183 (172 – 188)	0,88	n.s.
CRP 2 Tage vor Ex. (mg/l)	2; n=25	79 (38 – 156)	81 (50 – 109)	0,64	n.s.
Thrombozyten prä (Tsd/µl)	0; n=27	155 (90 – 228)	190 (57 – 249)	0,71	n.s.
Thrombozyten Tag 1 (Tsd/µl)	1; n=26	102 (58 – 181)	118 (69 – 170)	0,98	n.s.
Thrombozyten Tag 2 (Tsd/µl)	4; n=23	74 (53 – 170)	74 (43 – 95)	0,32	n.s.
Thrombozyten 2 Tage vor Ex. (Tsd/µl)	0; n=27	70 (55 – 110)	123 (75 – 186)	0,20	n.s.
D-Dimere prä (mg/l)	4; n=23	6,0 (3,0 – 19,0)	5,0 (2,8 – 27,5)	0,92	n.s.
D-Dimere Tag 1 (mg/l)	0; n=27	6,0 (3,0 – 14,0)	5,5 (2,0 – 21,7)	0,84	n.s.
D-Dimere Tag 2 (mg/l)	5; n=22	7,0 (4,0 – 24,0)	4,0 (1,0 – 10,0)	0,40	n.s.
D-Dimere 2 Tage vor Ex. (mg/l)	3; n=24	8,0 (4,5 – 19,5)	12,0 (3,0 – 34,0)	0,63	n.s.
Freies Hämoglobin 2 Tage vor Ex. (mg/l)	0; n=27	78 (63 – 220)	82 (39 – 138)	0,63	n.s.
aPTT prä (sec.)	0; n=27	53 (40 – 68)	46 (39 – 69)	0,71	n.s.
aPTT Tag 1 (sec.)	1; n=26	55 (46 – 67)	44 (43 – 68)	0,70	n.s.
aPTT Tag 2 (sec.)	4; n=23	55 (51 – 60)	45 (42 – 54)	0,14	n.s.
aPTT 2 Tage vor Ex. (sec.)	1; n=26	57 (50 – 64)	45 (43 – 55)	0,14	n.s.

4.2.5 Ablagerungen an den Kreuzungspunkten aufeinanderliegender Gaskapillaren in Bezug zu den ECMO-Charakteristika

Die Auswertung bezüglich der klinischen Daten in Abhängigkeit von der Konzentration von Zellen an den Kreuzungspunkten aufeinanderliegender Gaskapillaren wurden in den Tabellen 44 (Gesamtkollektiv) und 45 (Maquet-Oxygenatoren) zusammengestellt.

Bezüglich der Unterstützungszeiten durch ECMO und die Parameter des Blutflusses fanden sich keine Auffälligkeiten.

Die Anreicherung von Zellen an den Berührungs punkten aufeinander liegender Gaskapillaren fand man in 44% bzw. 50% der MOs von Maquet bzw. Novalung. Auf den Gaskapillaren der Hilit-LT- und Sorin- Oxygenatoren fand sich kein starker Bezug der Zellen zu den Kreuzungspunkten (Tabelle 39).

Tabelle 39 Verteilung der Oxygenatorfabrikate in den Gruppe nach Bezug der zellulären Ablagerungen zu den Kreuzungsstellen übereinanderliegenden Gaskapillaren

Oxygenatorfabrikat	Konzentration			Gesamt
	keine	schwach	stark	
Maquet	7 (26%)	8 (30%)	12 (44%)	27
Hilit LT	2	4	0	6
Sorin	1	1	0	2
Novalung	2 (33%)	1 (17%)	3 (50%)	6
Gesamt	12	14	15	41

Die Oxygenatoren mit starker Konzentration der Zellen um die Kreuzungspunkte herum wurden alle in einem venovenösen ECMO-System eingesetzt. Die Zellen auf den Gaskapillaren der Oxygenatoren aus den venoarteriellen Systemen waren entweder diffus über die Membranen verteilt oder waren schwach in Richtung der Berührungs punkte orientiert (Tabelle 40).

Tabelle 40 Verteilung des ECMO-Verfahrens in den Gruppe nach Bezug der zellulären Ablagerungen zu den Kreuzungsstellen übereinanderliegenden Gaskapillaren

ECMO-Verfahren	Konzentration			Gesamt
	kein	schwach	stark	
Venovenös	7	9	15	31
Venoarteriell	5	5	0	10
Gesamt	12	14	15	41

4.2.6 Ablagerungen an den Kreuzungspunkten aufeinanderliegender Gaskapillaren in Bezug zu den Patienten-Charakteristika

Patienten, deren Zellen auf den Präparaten einen starken Bezug zu den Berührungs punkten benachbarter Gaskapillaren zeigten, waren tendenziell jünger als die übrigen Patienten. Im Kollektiv der Maquet-Oxygenatoren war dieser Unterschied statistisch signifikant ($p=0,008$, 43 Jahre vs. 70 bzw. 67 Jahre, Tabelle 45).

Der Verteilung zwischen venovenösen Systemen und venoarteriellen Systemen entsprechend, fand man bei den zugehörigen Patienten der MOs mit starkem zellulären Bezug zu den Kreuzungspunkten keine kardiale Erkrankung als Diagnose. Die weitere Verteilung der Diagnosegruppen zeigte keine Auffälligkeiten (Tabelle 41).

Tabelle 41 Verteilung der Diagnosen in den Gruppen in Bezug auf die Konzentration der Zellen an den Kreuzungsstellen übereinanderliegender Gaskapillaren

Diagnose	Konzentration			Gesamt
	keine	schwach	stark	
Pneumonie	1	5	9	15
Extrapulmonale Sepsis	3	4	4	11
Andere Erkrankung	3	0	2	5
Kardiale Erkrankung	5	5	0	10
Gesamt	12	14	15	41

Die meisten Präparate mit starkem Bezug zu den Kreuzungspunkten fand man bei den von der ECMO-Behandlung entwöhnten Patienten ($n=10$). Die weiteren fünf Präparate mit diesem Bezug waren gleichmäßig über die weiteren Gruppen verteilt (Tabelle 42).

Tabelle 42 Verteilung der Gründe für den Wechsel des Oxygenators bzw. für die Beendigung der ECMO-Unterstützung in den Gruppen in Bezug auf die Konzentration der Zellen an den Kreuzungstellen übereinanderliegender Gaskapillaren

Grund für MO-Explantation bzw. Wechsel	Konzentration			Gesamt
	kein	schwach	stark	
Weaning	9	8	10	27
Koagulationsstörung	2	3	2	7
Tod des Patienten	1	3	1	5
Infektion des MO	0	0	1	1
Akute MO-Thrombose	0	0	1	1
Gesamt	12	14	15	41

Bezüglich des Überlebens der Patienten waren keine Auffälligkeiten zu erkennen (Tabelle 43).

Tabelle 43 Überleben in den Gruppen in Bezug auf die Konzentration der Zellen an den Kreuzungstellen übereinanderliegender Gaskapillaren

Outcome	Konzentration			Gesamt
	kein	schwach	stark	
Überlebt	6	7	10	23
Verstorben nach Explantation	3	3	1	7
Verstorben am System	3	4	4	11
Gesamt	12	14	15	41

Betrachtete man die untersuchten Laborparameter, welche zwei Tage vor Ende der ECMO-Unterstützung bestimmt wurden, fiel auf, dass Patienten, deren Oxygenatorpräparate einen starken Bezug der zellulären Ablagerungen zu den Kreuzungspunkten benachbarter Gaskapillaren zeigten, höhere Leukozytenzahlen 2 Tage vor Explantation des Systems aufwiesen als Patienten mit Präparaten mit keinem oder schwachem Bezug ($p=0,03$ im Gesamtkollektiv bzw. $p=0,05$ im Maquetkollektiv, Abbildung 37 A). Diese Tendenz war auch schon am Tag 1 und 2 der Unterstützung mit dem untersuchten MO festzustellen. Als weiterer Entzündungsparameter war das CRP vor Implantation des untersuchten Systems bei den MOs, deren Präparate einen schwachen Bezug zu den Kreuzungspunkten zeigten, signifikant

höher als bei den Präparaten mit keinem oder starkem Bezug der Zellen zu diesen Punkten ($p=0,02$ im Gesamtkollektiv, Abbildung 37 B, $p=0,039$ im Maquet-Kollektiv). In der Verteilung der weiteren Laborparameter fanden sich keine Unterschiede zwischen den drei Gruppen (Tabelle 44 und 45).

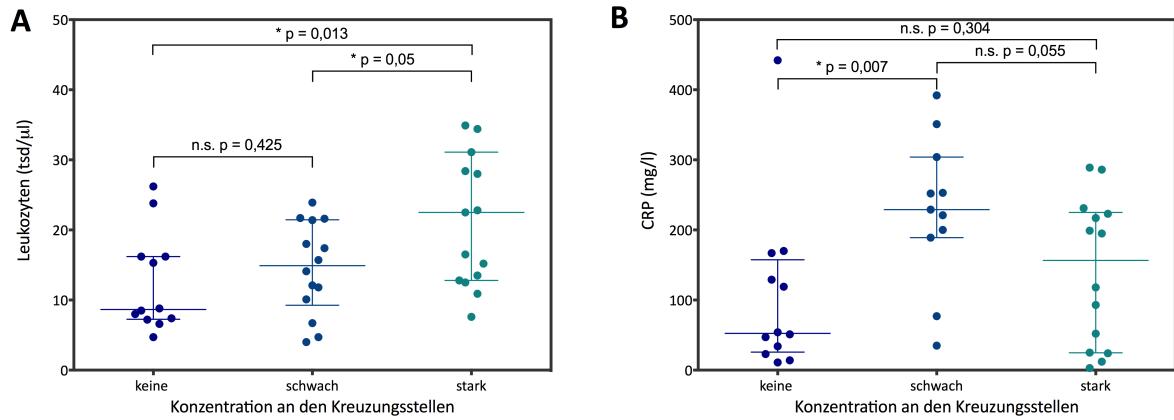


Abbildung 37 Laborparameter in Abhängigkeit der Konzentration zellulärer Ablagerungen an den Kreuzungsstellen übereinanderliegenden Gaskapillaren

(A) Bei Patienten, deren MOs durch starke Konzentration von Zellen an den Berührungs punkten benachbarter Gaskapillaren auffielen, wurden signifikant höhere Leukozytenzahlen zwei Tage von Explantation des untersuchten Systems gemessen als bei keiner oder schwacher Konzentration. (B) Bei Betrachtung der CRP-Werte zeigten sich tendenziell höhere Werte im Blut der Patienten, deren Präparate einen schwachen Bezug der Zellen zeigten. (Eingetragene Linien: Median und Interquartilenabstand, Mann-Whitney-U-Test).

Tabelle 44 ECMO- und Patientencharakteristika im Gesamtkollektiv in Abhängigkeit des Bezugs der zellulären Ablagerungen zu den Kreuzungstellen übereinanderliegenden Gaskapillaren

Parameter (Einheit)	Fehlende Werte	Präparate mit keinem Bezug	Präparate mit schwachem Bezug	Präparate mit starkem Bezug	p- Wert	Bewertung
	Anzahl	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)		
Alter (Jahre)	0; n=41	64,7 (55,9 – 70,0)	62,5 (49,7 – 73,5)	52,2 (30,3 – 59,9)	0,07	n.s.
BMI (kg/m ²)	0; n=41	26,2 (24,2 – 28,9)	26,7 (24,4 – 31,2)	30,1 (26,2 – 35,7)	0,07	n.s.
SOFA	5; n=36	11 (7 – 11)	13 (9 – 15)	12 (10 – 18)	0,29	n.s.
LIS	3; n=38	4 (3 – 4)	3 (2 – 3)	4 (3 – 4)	0,02	signifikant
Gesamtunterstützungszeit (Tage)	0; n=41	10 (5 – 14)	13 (6 – 22)	19 (6 – 23)	0,79	n.s.
Unterstützung mit untersuchtem MO (Tage)	0; n=41	7 (5 – 10)	8 (5 – 14)	8 (6 – 14)	0,66	n.s.
Mittlerer Blutfluss (L/min)	0; n=41	2,5 (2,1 – 2,9)	2,6 (2,2 – 3,0)	2,6 (2,3 – 3,0)	0,87	n.s.
Blutfluss 2 Tage vor Explantation (L/min)	0; n=41	2,2 (1,8 – 2,8)	2,0 (1,9 – 2,3)	2,0 (1,9 – 2,5)	0,95	n.s.
Blutvolumen über die Unterstützungszeit (L)	0; n=41	18.000 (9.432 – 27.180)	20.808 (9.900 – 33.300)	25.200 (12.960 – 41.400)	0,58	n.s.
Leukozyten Tag vor ECMO (Tsd/µl)	0; n=41	13,5 (6,9 – 17,0)	15,5 (12,8 – 18,5)	16,8 (10,8 – 23,0)	0,39	n.s.
Leukozyten Tag 1 (Tsd/µl)	1; n=40	13,1 (7,8 – 16,8)	13,2 (9,1 – 16,5)	16,7 (12,6 – 25,7)	0,16	n.s.
Leukozyten Tag 2 (Tsd/µl)	0; n=41	13,9 (7,0 – 17,5)	14,1 (8,4 – 17,8)	17,0 (12,8 – 25,7)	0,21	n.s.
Leukozyten 2 Tage vor Explantation (Tsd/µl)	0; n=41	8,7 (7,4 – 16,2)	14,9 (10,5 – 20,6)	22,5 (13,2 – 29,8)	0,03	signifikant
CRP prä (mg/l)	4; n=37	53 (31 – 139)	229 (195 – 279)	157 (32 – 222)	0,02	signifikant
CRP Tag 1 (mg/l)	4; n=37	97 (72 – 122)	215 (53 – 257)	112 (99 – 170)	0,59	n.s.
CRP Tag 2 (mg/l)	6; n=35	172 (88 – 215)	165 (141 – 205)	143 (64 – 248)	0,92	n.s.
CRP 2 Tage vor Ex. (mg/l)	2; n=39	79 (15 – 138)	88 (51 – 154)	64 (26 – 133)	0,49	n.s.
Thrombozyten prä (Tsd/µl)	0; n=41	215 (104 – 232)	119 (53 – 199)	140 (39 – 252)	0,53	n.s.
Thrombozyten Tag 1 (Tsd/µl)	1; n=40	163 (70 – 179)	90 (68 – 185)	101 (66 – 155)	0,73	n.s.
Thrombozyten Tag 2 (Tsd/µl)	4; n=37	96 (64 – 179)	104 (55 – 170)	99 (53 – 151)	0,99	n.s.
Thrombozyten 2 Tage vor Ex. (Tsd/µl)	0; n=41	75 (59 – 118)	92 (63 – 127)	106 (49 – 144)	0,95	n.s.
D-Dimere prä (mg/l)	6; n=35	4,5 (2,0 – 13,8)	7,0 (5,0 – 35,0)	5,5 (5,0 – 29)	0,43	n.s.
D-Dimere Tag 1 (mg/l)	1; n=40	4,5 (1,8 – 9,5)	8,0 (4,0 – 15,0)	5,0 (3,0 – 11,5)	0,51	n.s.
D-Dimere Tag 2 (mg/l)	6; n=35	7,0 (1,5 – 14,5)	8,0 (4,5 – 25,5)	5,0 (2,5 – 9,0)	0,41	n.s.
D-Dimere 2 Tage vor Ex. (mg/l)	6; n=35	10,0 (4,3 – 20,0)	8,0 (6,0 – 17,5)	4,5 (3,0 – 17,0)	0,75	n.s.
Freies Hämoglobin 2 Tage vor Ex. (mg/l)	0; n=41	66 (46 – 186)	67 (38 – 79)	78 (47 – 219)	0,36	n.s.
aPTT prä (sec.)	0; n=41	50 (44 – 96)	47 (40 – 59)	53 (39 – 69)	0,69	n.s.
aPTT Tag 1 (sec.)	1; n=40	55 (43 – 65)	47 (42 – 55)	58 (43 – 70)	0,41	n.s.
aPTT Tag 2 (sec.)	5; n=36	52 (42 – 56)	55 (49 – 56)	50 (44 – 57)	0,76	n.s.
aPTT 2 Tage vor Ex. (sec.)	1; n=40	58 (48 – 66)	52 (39 – 58)	53 (45 – 71)	0,33	n.s.

Tabelle 45 ECMO- und Patientencharakteristika im Kollektiv des Maquet- MOs in Abhängigkeit des Bezugs der zellulären Ablagerungen zu den Kreuzungsstellen übereinanderliegenden Gaskapillaren

Parameter (Einheit)	Fehlende Werte Anzahl	Präparate mit keinem Bezug Median (IQR)	Präparate mit schwachem Bezug Median (IQR)	Präparate mit starkem Bezug Median (IQR)	p- Wert	Bewertung
Alter (Jahre)	0; n=27	69,5 (65,1 – 71,9)	67,5 (56,1 – 72,4)	43,2 (29,5 – 56,9)	0,008	signifikant
BMI (kg/m ²)	0; n=27	25,5 (25,0 – 28,3)	28,1 (25,8 – 31,0)	28,8 (26,0 – 35,8)	0,27	n.s.
SOFA	3; n=24	11 (8 – 11)	12 (10 – 15)	13 (11 – 18)	0,21	n.s.
LIS	2; n=25	4 (3 – 4)	3 (3 – 4)	4 (3 – 4)	0,21	n.s.
Gesamtunterstützungszeit (Tage)	0; n=27	10 (6 – 13)	12 (7 – 17)	9 (6 – 17)	0,88	n.s.
Unterstützung mit untersuchtem MO (Tage)	0; n=27	6 (5 – 9)	8 (5 – 14)	8 (6 – 14)	0,69	n.s.
dpMO 2 Tage vor Explantation (mmHg)	7; n=20	15 (12 – 16)	11 (10 – 19)	14 (11 – 18)	0,64	n.s.
Mittlerer Blutfluss (L/min)	0, n=27	2,9 (2,4 – 3,1)	2,6 (2,5 – 2,8)	2,8 (2,6 – 3,0)	0,96	n.s.
Blutfluss 2 Tage vor Explantation (L/min)	0; n=27	2,8 (2,2 – 3,2)	2,0 (2,0 – 2,4)	2,2 (2,0 – 2,6)	0,45	n.s.
Blutvolumen über die Unterstützungszeit (L)	0; n=27	16.560 (11.016 – 20.304)	20.808 (14.868 – 42.300)	23.184 (13.824 – 46.152)	0,51	n.s.
Leukozyten Tag vor ECMO (Tsd/µl)	0; n=27	15,5 (10,2 – 17,2)	15,5 (12,1 – 19,8)	16,0 (8,8 – 21,0)	0,91	n.s.
Leukozyten Tag 1 (Tsd/µl)	1; n=26	15,1 (8,7 – 15,8)	12,3 (8,0 – 13,4)	18,2 (12,4 – 24,7)	0,11	n.s.
Leukozyten Tag 2 (Tsd/µl)	4; n=23	15,5 (8,3 – 17,4)	12,5 (8,3 – 16,0)	16,4 (13,4 – 27,1)	0,35	n.s.
Leukozyten 2 Tage vor Explantation (Tsd/µl)	0; n=27	15,3 (8,1 – 16,2)	13,9 (6,2 – 17,6)	22,7 (14,6 – 31,9)	0,05	n.s.
CRP prä (mg/l)	3; n=24	47 (18,5 – 124)	210 (192 – 245)	195 (73 – 227)	0,039	signifikant
CRP Tag 1 (mg/l)	2; n=25	89 (79 – 108)	215 (72 – 234)	131 (107 – 215)	0,38	n.s.
CRP Tag 2 (mg/l)	5; n=22	180 (118 – 195)	167 (153 – 219)	233 (92 – 268)	0,73	n.s.
CRP 2 Tage vor Ex. (mg/l)	2; n=25	79 (15 – 104)	117 (76 – 160)	77 (37 – 128)	0,25	n.s.
Thrombozyten prä (Tsd/µl)	0; n=27	228 (103 – 235)	150 (66 – 197)	148 (21 – 254)	0,83	n.s.
Thrombozyten Tag 1 (Tsd/µl)	1; n=26	156 (66 – 172)	82 (69 – 161)	122 (61 – 177)	0,94	n.s.
Thrombozyten Tag 2 (Tsd/µl)	4; n=23	83 (59 – 106)	74 (56 – 142)	76 (48 – 140)	0,99	n.s.
Thrombozyten 2 Tage vor Ex. (Tsd/µl)	0; n=27	63 (58 – 90)	92 (69 – 183)	81 (45 – 129)	0,49	n.s.
D-Dimere prä (mg/l)	4; n=23	7,0 (2,0 – 27,0)	6,0 (5,0 – 7,0)	5,0 (3,5 – 21,5)	0,85	n.s.
D-Dimere Tag 1 (mg/l)	0; n=27	5,0 (3,5 – 20,0)	7,5 (4,3 – 9,8)	5,5 (2,8 – 14,5)	0,93	n.s.
D-Dimere Tag 2 (mg/l)	5; n=22	15,0 (3,0 – 35,0)	7,5 (4,0 – 21,5)	5,0 (4,0 – 10,0)	0,81	n.s.
D-Dimere 2 Tage vor Ex. (mg/l)	3; n=24	14 (5,5 – 21,0)	8,0 (5,0 – 14,6)	6,0 (3,0 – 21,0)	0,83	n.s.
Freies Hämoglobin 2 Tage vor Ex. (mg/l)	0; n=27	115 (67 – 384)	68 (39 – 73,4)	165 (44 – 243)	0,26	n.s.
aPTT prä (sec.)	0; n=27	80 (44 – 104)	41 (40 – 58)	53 (40 – 68)	0,26	n.s.
aPTT Tag 1 (sec.)	1; n=26	63 (48 – 68)	50 (45 – 58)	53 (40 – 68)	0,75	n.s.
aPTT Tag 2 (sec.)	4; n=23	55 (44 – 56)	56 (52 – 57)	50 (46 – 59)	0,73	n.s.
aPTT 2 Tage vor Ex. (sec.)	1; n=26	63 (51 – 67)	56 (46 – 59)	52 (46 – 66)	0,67	n.s.

4.3 Auffällige Präparate aus den Bildpunktinformationen

Das Präparat Nr. 14 (Abbildung 38) war in allen Fluoreszenzkanälen die Probe mit dem höchsten Anteil überschwelliger Pixel, was für die dichteste Besiedelung mit Zellen und die dichteste Markierung mit den verwendeten Antikörpern unter den untersuchten Oxygenatoren sprach. In der Übersicht war zu erkennen, dass die Membrankapillaren mit Pseudomembranen überzogen waren und das Präparat massenhaft Zellen aufwies. Die Aufnahmen in hoher Vergrößerung zeigten eine eher diffuse Färbung. Strukturen wie die FITC-Markierung entlang der Zellmembranen waren an einzelnen Zellen abzugrenzen, jedoch war durch die Überlagerung mehrerer Zelllagen an den meisten Stellen der Aufnahmen nur ein „Fluoreszenz-Dunst“ auszumachen. Das Präparat entstammte aus dem zweiten Oxygenator einer 25-jährigen Patientin, die an einem ARDS aufgrund einer Pneumonie litt. Es wurde ein Maquet Quadrox ELS- MO benutzt, der 15 Tage im Einsatz war. Die Patientin konnte entwöhnt werden und überlebte ihre Erkrankung.

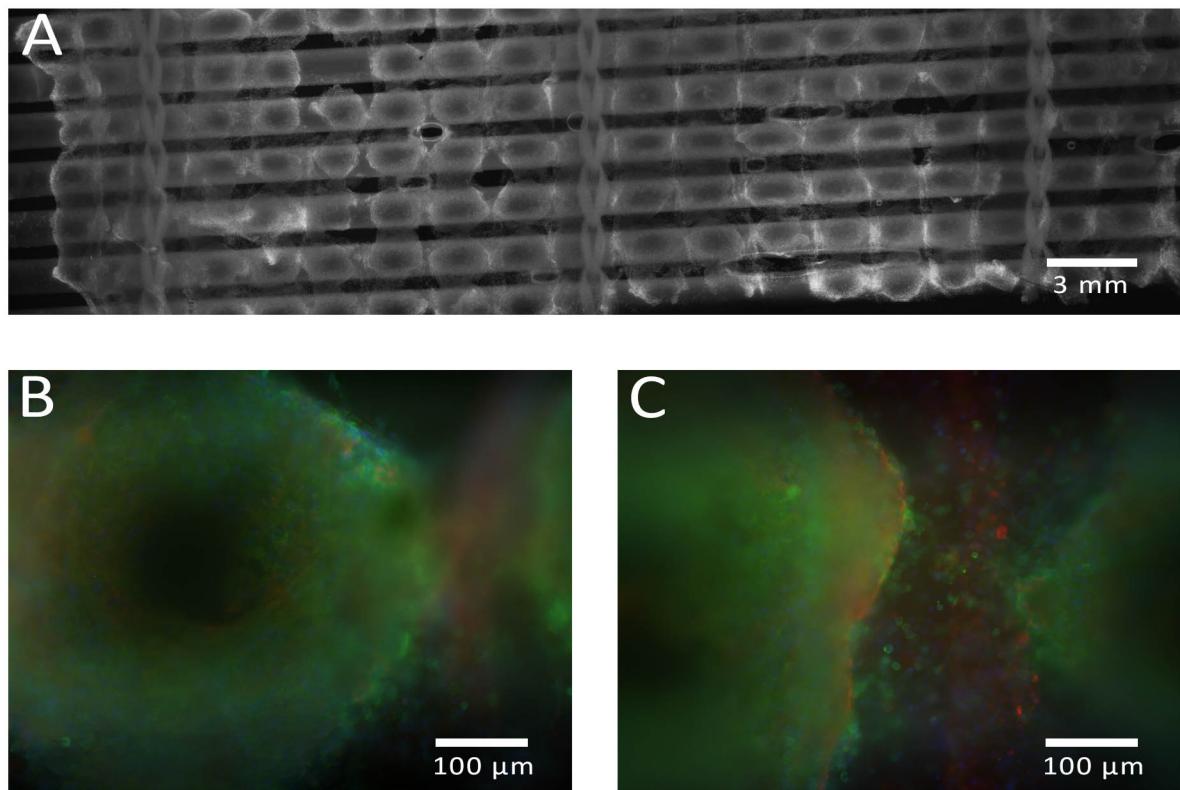


Abbildung 38 Präparat des Oxygenator Nr. 14

(A) Präparat des Oxygenators Nr. 14 in der Übersicht. Es zeigte sich eine dichte DAPI-Fluoreszenz durch Ablagerung von Zellen in Form von Pseudomembranen, die sich flächig über mehrere Gaskapillaren erstreckten (5x Objektiv, Auflösung 1,499 μ m/Pixel). Die Aufnahmen in höheren Vergrößerung zeigten eine diffuse Fluoreszenz (B) mit nur teilweise erkennbarer Markierung durch FITC entlang der Zellmembranen und Texas Red (C). (20x Objektiv, Auflösung 0,375 μ m/Pixel)

Die Oxygenatorproben der Patienten Nr. 2, 8 und 11 gehörten ebenfalls zu den Präparaten mit den höchsten Werten für die Parameter der Immunfluoreszenz. Dies sprach für eine dichte Besiedelung bzw. Markierung. Alle drei Präparate waren anhand des Übersichtsbildes mit massenhaft Zellen besetzt. Die Zellen waren besonders an den Kreuzungsstellen übereinanderliegender Kapillarmatten konzentriert. Außerdem wiesen die Proben Nr. 2 und 8 Pseudomembranen auf. Das Präparat Nr. 2 (Abbildung 39) zeigte in Vergrößerung mit dem 40x Objektiv Züge von dicht stehenden, kräftig FITC-positiven Zellen und strangartige Strukturen mit Texas Red-fluoreszierenden Punkten, die ,wie oben beschrieben, Thrombozyten entsprechen könnten (siehe auch Abbildung 31 B). Man konnte erkennen, dass die Zellen an der Oberfläche der zellulären Ablagerungen deutlich FITC-gefärbt waren, während die Markierung der Zellen in den Pseudomembranen schwach erschien. Das Präparat Nr. 2 gehörte zu einem 30-jährigen Mann, bei dem eine ECMO-Unterstützung nach einer Aspirationspneumonie im Rahmen eines Polytraumas notwendig geworden war. Er wurde sechs Tage mit einem Oxygenator behandelt und überlebte die Erkrankung. Die Aufnahmen des Präparates Nr. 8 zeigten eine ähnlich diffuse Färbung wie das oben beschriebene Präparat Nr. 14. Der zugehörige 50-jährige Patient wurde aufgrund eines ARDS aufgrund einer Pneumonie 25 Tage mit ECMO unterstützt. Es erfolgte ein Austausch des Gerätes nach 20 Tagen aufgrund eines sichtbaren Thrombus im MO; dieser wurde mit einem nur geringen Anstieg des dpMO von 10 auf 21mmHg im Vorfeld begleitet. Nach Austausch fiel der dpMO auf 15mmHg. Die Probe des Patienten Nr. 11 zeigte reich besiedelte Membrankapillaren, jedoch ohne Pseudomembranen. Die FITC-Färbung war sehr kräftig und das Bild wirkte fast überbelichtet. Auf den Kapillaren waren vereinzelt fraglich positive Texas Red-markierte Zellen zu finden. Die Probe wurde einem Oxygenator entnommen, der 14 Tage bei einem 37-jährigen Patienten mit einer Pneumonie eingesetzt wurde. Der Patient konnte zwar entwöhnt werden, verstarb aber 35 Tage nach der Beendigung der Unterstützung. Bei allen drei Patienten (Nr. 2, 8 und 11) wurde ein Maquet Quadrox PLS- Oxygenator eingesetzt.

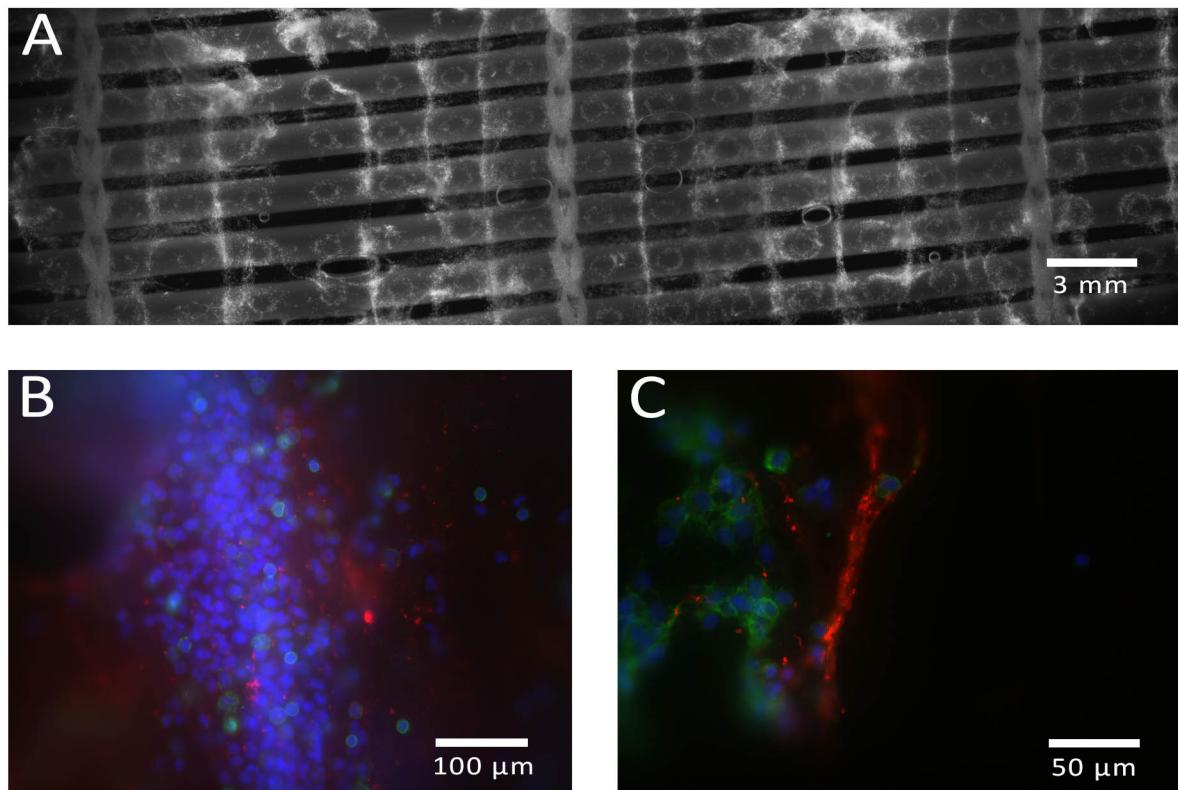


Abbildung 39 Präparat des Oxygenators Nr. 2

Die Aufnahme in der Übersicht (A) zeigte massenhaft Zellen und Pseudomembranen (5x Objektiv, Auflösung 1,499 μm/Pixel). In der höheren Vergrößerung erkannte man, dass die an die Oberfläche liegenden Zellen in den Zellansammlungen FITC-markiert waren, während von tiefer gelegenen Zellen nur eine diffuse Fluoreszenz ausging (B) (20x Objektiv, Auflösung 0,375 μm/Pixel). Auf der Aufnahme (C) mit dem 40x-Objektiv erkannte man deutlich Texas Red-markierte Punkte in strangartigen Gebilden neben FITC-markierten Zellen mit einem CD45-typischen Muster. (40x Objektiv, Auflösung 0,187 μm/Pixel)

Zu den besonders dicht und kräftig FITC-gefärbten Proben gehörten neben den schon in diesem Abschnitt beschriebenen Präparate Nr. 2, 8 und 14 auch die Präparate Nr. 4 und 30. Beide Proben hatten einen hohen Anteil von Pixeln über dem Schwellenwert im FITC-Kanal, jedoch im Texas Red-Kanal nur einen geringen Anteil überschwelliger Pixel. In der Übersicht war Präparat Nr. 4 mit massenhaft Zellen besiedelt und wies Pseudomembranen auf. Das Präparat Nr. 30 (Abbildung 40) zeigte viele Zellen und eine starke Konzentration der zellulären Ablagerungen an den Kreuzungspunkten der übereinanderliegenden Kapillaren. Es gab zarte zellhaltige Brücken zwischen Nachbarkapillaren, jedoch keine Pseudomembranen (siehe Abbildung 40 A). Auf den Aufnahmen des Präparates Nr. 4 in großer Vergrößerung sah man die mehreren Zellenlagen, die den Membranenkapillaren auflagerten. Die Zellen der oberen Lagen waren deutlich mit dem FITC-gekoppelten Antikörper markiert. Die Fluoreszenz, die von den tiefer in den Zellansammlungen liegenden Zellen ausging, war genauso wie die Texas Red-Fluoreszenz eher diffus. Die aufgearbeitete Kapillarmatte Nr. 4 wurde aus einem Maquet Quadrox PLS- MO entnommen, der bei einem 30-jährigen Patienten mit einem konservativ nicht zu beherrschenden Asthma bronchiale eingesetzt worden war. Der Patient wurde am sechsten Tag entwöhnt und überlebte die Behandlung. Die Präparate des Oxygenators Nr. 30 fielen durch eine kräftige FITC-Markierung nahezu aller Zellen auf. Diese standen zum größten Teil einzeln oder in kleineren Haufen zusammen, sodass die Färbung hier alle Zellen erreicht hatte. Eine Texas Red-Fluoreszenz war kaum vorhanden. Der zugehörige 58-jährige Patient wurde aufgrund eines ARDS bei Pneumonie insgesamt 21 Tage unterstützt. Es erfolgte ein Oxygenatorwechsel aufgrund von Thromben im Gerät. Der zweite Oxygenator des Patienten, eine Novalung NovaBreath-MO, wurde nach 13 Tage Einsatz in dieser Arbeit untersucht. Die dpMO-Werte blieben während der Behandlung unauffällig und der Patient überlebte die Erkrankung.

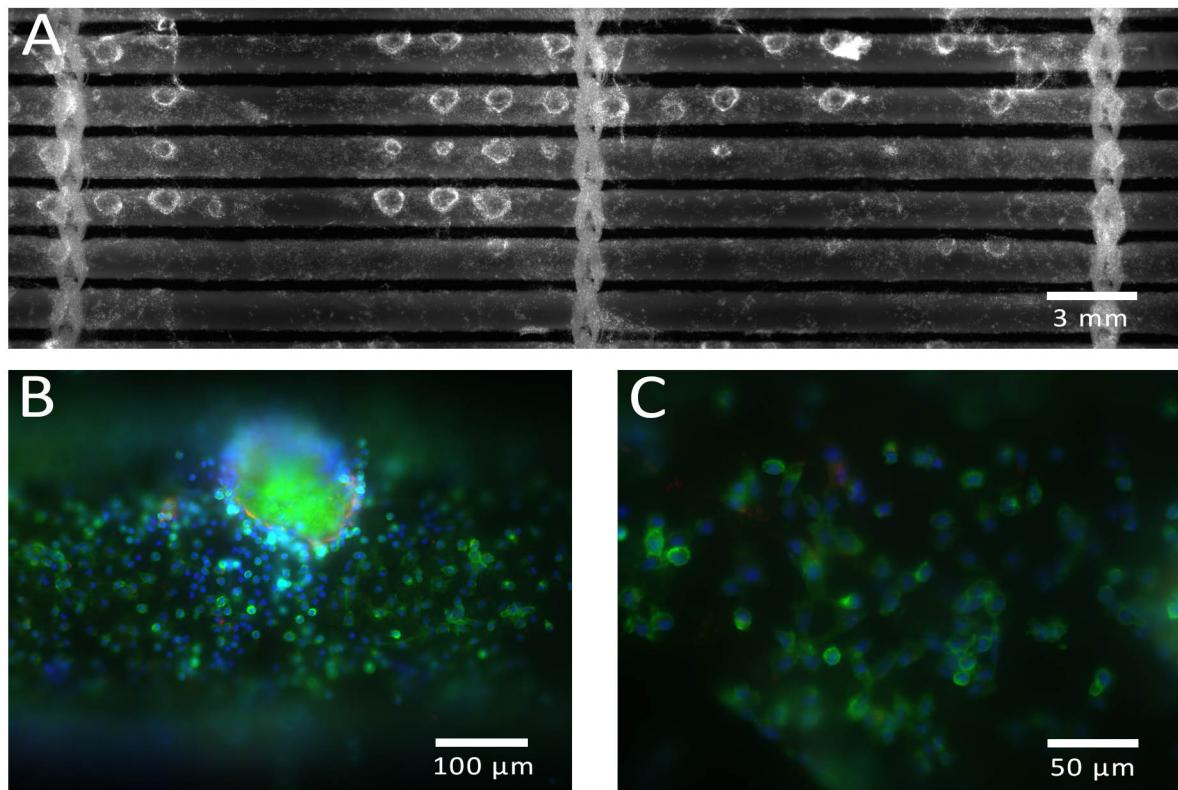


Abbildung 40 Präparat des Oxygenators Nr. 30

In der Übersicht (A) zeigte sich eine reich mit Zellen besetzte Kapillarmatte mit deutlicher Konzentration der zellulären Ablagerungen an den Punkten sich kreuzender, übereinanderliegender Gaskapillaren (5x Objektiv, Auflösung 1,499 μ m/Pixel). In der Vergrößerung mit dem 20x-Objektiv (B, Auflösung 0,375 μ m/Pixel) und in der Vergrößerung mit dem 40x-Objektiv (C, Auflösung 0,187 μ m/Pixel) war eine deutliche FITC-Markierung nahezu aller Zellen zu erkennen.

Im Texas Red-Kanal emittierten die Präparate 2, 7, 8, 9 und 11 eine besonders starke Fluoreszenz, die sich zudem auch über einen großen Anteil des Präparates erschreckte. Die Proben 2, 8 und 11 wurden oben bereits beschrieben. Das Präparat Nr. 7 zeigte im Überblick eine Besiedelung mit vielen Zellen, die auch kräftigere Brücken zwischen benachbarten Membrankapillaren ausbildeten. Es bestand eine Anreicherung der Zellen im Bereich der Kreuzungspunkte. In Vergrößerung mit dem 40x-Objektiv sah man Texas Red- markierte strangartige Strukturen, die über die Kapillaren zogen und sich verästelten, mit eingebetteter punktförmiger, dichter Fluoreszenz. Neben einzeln stehenden Zellen saßen diese Strukturen Zellen auf, die eine deutliche FITC-Fluoreszenz aufwiesen. Dieses Präparat gehörte zu einem 28-jährigen Patienten, der vor einer Lebertransplantation ein ARDS entwickelt hatte und nur drei Tage mit einem Maquet Quadrox D BE unterstützt wurde. Der Patient überlebte diese Behandlung. Auf dem Präparat Nr. 9 waren wiederum Pseudomembranen zu erkennen und massenhaft Zellen. In Vergrößerung waren auf den Membrankapillaren Zellen mit einer feingranulären Texas Red-Fluoreszenz, welche die Zellkerne weiträumig umgaben, zu erkennen. Diese Zellen könnten somit als positive Zellen gewertet werden, zumal in dem Bereich der Texas Red-Markierung keine FITC-Fluoreszenz zu verzeichnen war (siehe Abbildung 31, C). Der Patient Nr. 9 wurde aufgrund eines ARDS bei Pneumonie 30 Tage lang mit ECMO unterstützt. Am siebten Tag wurde der MO aufgrund eines Anstiegs des dpMO von 14 auf 56mmHg gewechselt. Der zweite MO, ein Maquet Quadrox ELS, wurde die weiteren 23 Tage eingesetzt, wobei die Werte des dpMO unauffällig blieben. Der 41-jährige Patient konnte von der Unterstützung entwöhnt werden und überlebte.

5 Diskussion

Trotz des erschwerten Zugangs zu den zellulären Ablagerungen in den Oxygenatoren konnten in der vorliegenden Arbeit das Ausmaß und das morphologische Erscheinungsbild der zellulären Ablagerungen auf der Oberfläche von PMP-Gaskapillaren nach einer ECMO-Therapie mittels DAPI-Kernfärbung untersucht werden. Eine weiterführende Charakterisierung der adhärenten Zellen mittels spezifischer Antikörperfärbung und Anwendung von Immunfluoreszenztechnik führte dagegen zu keiner klaren Aussage. Eine Korrelation mit den klinischen Daten der Patienten zeigte, dass Oxygenatoren mit einem hohen Ausmaß an zellulären Ablagerungen signifikant länger am Patienten eingesetzt und von einem höheren Blutvolumen durchflossen worden waren. Auffallend war außerdem, dass diese Oxygenatoren von Patienten stammten, die signifikant jünger waren und erfolgreich von der ECMO-Behandlung entwöhnt worden waren. Die Indikation zur ECMO-Behandlung schlug sich nicht in den Unterschieden der zellulären Ablagerungen nieder. Oxygenatoren mit massenhaft Zellen und Pseudomembranen waren allesamt Oxygenatoren der Firma Maquet.

5.1 Methodik

Bereits in einer früheren Untersuchung stand unsere Arbeitsgruppe vor dem Problem, Zugang zu den zellulären Ablagerungen im Inneren der Oxygenatoren zu bekommen (Lehle et al. 2008). Durch Fixierung der Ablagerungen mit Paraformaldehyd direkt nach dem Ausbau der MOs vom Patienten und sofortiger Einbettung in ansteigend-konzentrierte Glukoselösungen (Vermeidung von Kristallbildungen beim anschließenden Auftauen), war der Erhalt der Zellstrukturen auf den PMP-Gaskapillaren gewährleistet. Lediglich in einem Fall war die Probenaufarbeitung mangelhaft, sodass sich dies in einer deutlichen Änderung der Zellmorphologie widerspiegelte. Eine große Herausforderung stellte im Anschluss die Freilegung des Kerns der Gaskapillarmatten dar. Zum einen wurden vier verschiedene Oxygenatortypen mit verschiedenen Bauweisen bearbeitet. Zum anderen musste die kompakte Kunststoffhülle des gefrorenen Oxygenators unter Schutzbedingungen mit einer Knochensäge entfernt werden. In jedem Fall durfte die Kühlkette nicht unterbrochen werden und die Präparate nicht austrocknen, da es sonst bei der anschließenden Fluoreszenzmethodik zu Artefakten, insbesondere zur Erhöhung der Autofluoreszenz, gekommen wäre.

Zur Untersuchung der zellulären Ablagerungen auf den PMP-Gaskapillaren wurde die Fluoreszenzmikroskopie gewählt. Unter Zuhilfenahme einer einfachen aber effektiven Kernfärbetechnik – DAPI – war es möglich, Zellen auf der Oberfläche der nicht-transparenten

PMP-Gaskapillaren sichtbar zu machen, die Kerne morphologisch einzuteilen und zu quantifizieren. Eine Automatisierung der Kernzählung wurde im Rahmen dieser Arbeit versuchsweise ausgetestet, war jedoch aufgrund von Problemen bei der Fokussierung der Kerne, die sich aus der zylindrischen Struktur der Gaskapillaren ergaben, nicht durchführbar. Eine Automatisierung zur Quantifizierung der Zelldichte wurde 1993 von Tarnowski et al. beschrieben und ist bis heute ein gängiges Verfahren (Tarnowski et al. 1993). Ähnliche automatisierte Analyseverfahren unter Zuhilfenahme einer DAPI-Färbung wurden auch bei Krtolica et al (Krtolica et al. 2002) und Al-Khazraji et al. beschrieben (Al-Khazraji et al. 2011). Dabei erwies sich die automatisierte Zählung als eine akkurate und effiziente Methode, die auch in dieser Arbeit nützlich gewesen wäre. Eventuell wäre auf Gaskapillaren eine automatisierte Kernzählung möglich, wenn zugleich eine automatische Einschränkung des Analysefeldes auf den fokussierten Bereich der Aufnahmen mittels der Software durchgeführt werden könnte. Bei der manuellen Zellzählung in dieser Arbeit wurden im Mittel 54,6 Zellkerne pro Bild gefunden. Im Mittel wurde eine Fläche von $0,15\text{mm}^2$ ($600\mu\text{m} \times 250\mu\text{m}$) auf den Gaskapillarmatten ausgezählt, sodass die Anzahl einer Dichte von 364 Zellen/mm^2 entsprach. In der morphologischen Untersuchung der Zellkerne fanden sich vor allem rundkernige Zellen (69%), während Zellen mit nierenförmigen Kernen (21%) und stabkernige und segmentkernige Zellen (10%) zu einem geringeren Anteil zu finden waren. Im Blut eines Erwachsenen lassen sich bis zu 40% mononukläre Zellen (2%-6% Monozyten, 5%-40% Lymphozyten) finden. Stabkernige neutrophile Granulozyten sind mit einem Anteil zwischen 3%-5% und segmentkernige Granulozyten mit einem Anteil zwischen 50%-70% im Blut vertreten (Benninghoff und Drenckhahn 2004). Die gefundene Verteilung der Zellkerntypen auf den Membranoxygenatoren wichen somit vor allem bezüglich der segmentkernigen neutrophilen Granulozyten von der Verteilung im Blut ab. Der hohe Anteil rundkernig erscheinender Zellen könnte dadurch erklärt werden, dass auch andere Kerntypen rundlich erscheinen, wenn sie auf dem Präparat seitlich abgebildet werden. Aus der gefundenen Verteilung wäre zu schließen, dass vor allem Monozyten und Lymphozyten auf der Gasaustauschmembran abgelagert werden. Dafür sprechen auch zahlreiche Untersuchungen, die zeigten, dass der direkte Blutkontakt mit Biomaterialien zunächst zu einer schnellen Adsorption von Plasmaproteinen (z. B. Albumin, Fibrinogen, Fibronektin, etc.) führt, gefolgt von einer Adhäsion von Monozyten und Makrophagen, die über spezifische Integrinrezeptoren vermittelt wird (Anderson et al. 2008). Neben der Beurteilung von Einzelzellen erfolgte die morphologische Beschreibung der zellulären Ablagerungen anhand von Übersichtsaufnahmen der DAPI-Färbung. Es wurde zum einen das Ausmaß der

Zellablagerungen beschrieben und zum anderen Auffälligkeiten bezüglich der Konfiguration festgehalten. Es fanden sich sechs Präparate, die besonders dichte zell- und fibrinhaltige Auflagerungen in Form von Pseudomembranen aufwiesen. Hiermit bestätigte diese Arbeit die morphologischen Erkenntnisse der vorangegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe (Lehle et al. 2008).

Da eine automatisierte Zellzählung auf den runden PMP-Gaskapillaren nicht möglich war, wurde ein Verfahren gesucht, um das Ausmaß der zellulären Ablagerungen indirekt zu bemessen. Hierzu fand eine Analyse der in den digitalen Bildpunkten festgehaltenen Grauwertinformationen statt (Burger und Burge 2009). Es wurde ein Schwellengrauwert, der die positiv-markierten Strukturen von der Hintergrundfluoreszenz trennte, festgelegt. Es konnte dann eine direkte Korrelation der manuell bestimmten Zahl DAPI-gefärbter Kerne und des Anteils überschwelliger Bildpunkte in der ausgezählten Aufnahme gefunden werden. Bei der manuellen Zählung bereitete die starke Aggregation der kernhaltigen Zellen, insbesondere in den Pseudomembranen, Probleme, sodass eine Auszählung der dicht besiedelten Präparate nicht möglich war. Die versuchsweise vorgenommene Auszählung von Zellen auf zwei dicht besiedelten Präparaten und die Korrelation zu den aus den Bildpunkten gewonnenen Informationen zeigte, dass auch in diesen Fällen der Anteil überschwelliger Bildpunkte eine Einschätzung des Ausmaßes zellulärer Ablagerungen zuließ.

Die weitere Identifizierung der adhärenten Zellen auf den Gaskapillaren mittels Immunfluoreszenztechnik erwies sich in der vorliegenden Arbeit als überaus schwierig. Es wurde eine Vielzahl leukozytärer und endothelialer Marker untersucht. Die Antikörper wurden in Hinblick auf die zu erwartenden Zellen ausgewählt. Das Vorkommen von Blutzellen lag nahe (Anderson 1988; Jones 2008) und die Anhaftung von hämatopoetischen Stammzellen bzw. monozytären Zellen auf PMP ist belegt (Laluppa et al. 1997). Gleichzeitig wurde spekuliert, dass sich unter Umständen endothiale Vorläuferzellen (*endothelial progenitor cells*, EPCs) anlagern könnten (Hoesli et al. 2010; Bui et al. 2010). So konnte gezeigt werden, dass EPCs im Blut von Patienten mit einem akuten Lungenschaden nachweisbar sind und deren Konzentration im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant erhöht sind (Burnham et al. 2005). EPCs wird eine Rolle bei der Reendothelialisierung und Neovaskularisation nach Gefäßschäden zugesprochen (Hristov und Weber 2004). Die Zellen entstammen dem Knochenmark und sind durch die Expression von CD34, CD133, und VEGF-Rezeptor II gekennzeichnet (Peichev et al. 2000). Im Verlauf ihrer Migration verlieren diese Zellen ihre Vorläufereigenschaften und zeigen eine endothelzell-typische Expression

von VE-Cadherin und von-Willebrand-Faktor (Hristov und Weber 2004). Endotheliale Progenitorzellen wurden u. a. in Blutproben pädiatrischer Patienten unter ECMO-Therapie nachgewiesen (Hoesli et al. 2010; Bui et al. 2010). Die klinische Relevanz ist jedoch weitgehend unbekannt. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Antikörper getestet. Technische Probleme schränkten die Auswahl jedoch stark ein. Ein Teil der Antikörper erwies sich als ungeeignet (z. B. CD146) oder war zu unspezifisch (z. B. UEA-1-Lektin). Es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass durch die Fixierung mit Paraformaldehyd die Bindungsstellen für Antikörper häufig maskiert wurden, sodass diese nicht binden konnten, was zu falsch-negativen Ergebnissen führte. Speziell für CD146, einem Adhäsionsmolekül, das am Zell-Zell-Kontakt von Endothelzellen untereinander beteiligt ist, wurde in unserem Labor gezeigt, dass nur bei eng aneinander liegenden Endothelzellen ein positiver Nachweis für CD146 möglich war (persönliche Mitteilung von K. Bielenberg). UEA-1-Lektin gilt als ein guter Marker für Gefäßendothelien (Holthöfer et al. 1982). In der vorliegenden Arbeit wurden Ergebnisse aus der Dissertation von Eva Hagemeister bestätigt (Hagemeister 2009), nämlich, dass auch PBMCs ein Antigen exprimieren, an welches das UEA-1-Lektin binden kann. Somit eignete sich diese Färbung nicht, um Endothelzellen von mononukleären Blutzellen zu unterscheiden. In der vorliegenden Arbeit erwiesen sich insbesondere die Antikörper gegen CD45 (*common leucocyte antigen*), von-Willebrand-Faktor, VE-Cadherin und CD68 als geeignet.

CD45, auch bekannt als „*leucocyte common antigen*“ (LCA), gehört zur Familie der Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTP) (Tonks et al. 1988) und wird auf allen kernhaltigen hämatopoetischen Zellen (u. a. Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten, Eosinophilen und Thymozyten) in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert (Mason et al. 2002; Thomas und Lefrançois 1988). Dagegen findet sich kein entsprechendes Antigen auf zirkulierenden Erythrozyten, Thrombozyten oder ausgereiften erythroiden Zellen aus dem Knochenmark oder von nicht-hämatopoetischem Gewebe (Datenblatt der Herstellerfirma des Antikörpers, BD Bioscience 2006). Die spezifische Expression auf isolierten PBMCs und die fehlende Expression auf HUVECs wurde in der vorliegenden Arbeit bestätigt. Bei der Analyse der adhärenten Zellen auf den Patientenpräparaten konnte jedoch eine spezifische CD45-Färbung bei nur 32% der Zellen nachgewiesen werden. Gleichzeitig variierten der Anteil der CD45-markierten Zellen sowie die Stärke der Fluoreszenz stark zwischen den einzelnen Präparaten. Drei Präparate waren ohne CD45-Nachweis und auf dem Präparat mit dem höchsten Anteil CD45-positiver Zellen waren sogar 79% der Zellen positiv. Es konnte nicht geklärt werden, warum zwei Drittel der kernhaltigen Zellen keine eindeutige CD45-Markierung zeigten und

zu welchen Zellreihen die nicht CD45-positiv markierten Zellen gehörten. Aufgrund der hohen Autofluoreszenz der Gasaustauschfasern und der schwachen CD45-FITC-Fluoreszenz kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Zahlen auf Artefakten beruhen. Dafür spricht, dass weiterführende Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe eine hohe Frequenz an CD45-positiven Zellen auf den PMP-Membranen zeigten (Lehle et al. 2015). Für diese Untersuchungen wurden Oxygenatoren nach Einsatz am Patienten durchspült und Zellen mit Trypsin abgelöst. Die anschließende Analyse in der Durchflusszytometrie zeigte, dass nahezu alle abgelösten Zellen CD45 exprimierten (Lehle et al. 2015). Es ist eine schlechte Zugänglichkeit der in den Ablagerungen auf den Gaskapillaren befindlichen Zellen für die Antikörper im Gegensatz zu abgelösten Einzelzellen vorstellbar. Auf den Aufnahmen der Gaskapillaren in hoher Vergrößerung war der Eindruck zu gewinnen, dass nur die oberflächlich liegenden Zellen eine deutlich Fluoreszenz zeigten. In den inneren Lagen der zellulären Ablagerungen war nur die Zellkernmarkierung mit DAPI darstellbar, während die FITC- und Texas Red-Fluoreszenz diffus und schwach erschien.

Der von Willebrand Faktor (vWF) ist ein ausschließlich in Endothelzellen (Jaffe et al. 1973) und Megakaryozyten (Nachman et al. 1977) synthetisiertes Glykoprotein, das sowohl eine wichtige Rolle in der Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten als auch als Bindungsprotein des Gerinnungsfaktors VIII spielt (Sakariassen et al. 1979; Lollar 1991; Dejana et al. 1989). Durch die zusätzliche Kernfärbung war es möglich, Endothelzellen von thrombozytären Reaktionen abzugrenzen. Allerdings konnten nur auf 7 Präparaten vWF-positive Zellen identifiziert werden. Diese Zellen waren Einzelbefunde, ein Vorkommen in größerer Anzahl war nicht nachzuweisen. Es ist also nicht anzunehmen, dass sich endotheliale Zellen mit eingelagertem vWF auf den PMP-Gaskapillaren absetzten. Zumindest erfolgte dies nicht in den für den Antikörper zugänglichen Bereichen. Dagegen fanden sich auf fast allen Präparaten vWF-positive Strukturen ohne Bezug zu Zellkernen. Auf einigen Präparaten war eine Texas Red-Fluoreszenz entlang perlschnurartiger Strukturen nachzuweisen. Diese Beobachtung würde zu netzartig eingelagerten vWF-positiven Thrombozyten passen (Reininger 2015). Thrombozyten können unabhängig von einer Aktivierung Aggregate bilden, wenn löslicher vWF vorhanden ist und gleichzeitig hohe Scherraten vorliegen. Es gilt als bewiesen, dass die Bindung von gelöstem vWF an den Glykoprotein GPIb-IX-V Rezeptorkomplex der initiale Schritt bei der Scher-induzierten Thrombozytenaktivierung ist (Reséndiz et al. 2004; Linneweber et al. 2008). Linneweber et al. konnten zeigen, dass die Thrombenbildung in schnell fließendem Blut in nicht-pulsatilen Linksherzunterstützungssystemen (LVAD) durch die Interaktion von vWF-Multimeren mit

GP-Ib auf den Thrombozyten vermittelt wird. Dabei ist die Scher-induzierte Thrombozytenaggregation wohl unabhängig von der Heparin-Antikoagulation (Philipp 2007). Bei der Untersuchung von Patienten an ECMO wurde ein erworbenes von-Willebrand-Syndrom und der Verlust an hochmolekularem vWF beobachtet (Heilmann et al. 2012; Tauber et al. 2015). Ob dieser lösliche vWF-Multimer in die netzartigen Thrombozytenkonglomerate eingelagert wird, kann nur spekuliert werden. Tauber et al. machten hierzu keine Aussagen. In der vorliegenden Arbeit war keine Quantifizierung der vWF-Färbung möglich.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass die verwendete Immunofluoreszenz-Methodik nur eine eingeschränkte Beurteilung der Einzelzellen zuließ und eine Automatisierung aufgrund technischer Schwierigkeiten nur sehr eingeschränkt möglich war. Die Bestimmung der DAPI-Fluoreszenz ermöglichte eine direkte Korrelation mit der Zellzahl. Jedoch war eine Auszählung bei einer Zelldichte von > 200 Zellen pro Gesichtsfeld nicht mehr praktikabel. Durch lineare Extrapolation wäre es möglich gewesen auf die Zelldichten zu schließen. Dies wurde aber in der vorliegenden Arbeit nicht weiter verfolgt. Weiterhin konnte eine Korrelation zwischen der FITC-Fluoreszenz (Anteil CD45-positiver Zellen) und der Zellzahl bestimmt werden. Bei der Texas Red-Fluoreszenz war die Korrelation mit der Zellzahl am schlechtesten, was sich damit begründen ließ, dass der größte Anteil an Texas Red-Fluoreszenz nicht in Kombination mit einem Zellkern (DAPI-Färbung) auftrat. Es handelte sich, wie oben bereits angesprochen, vermutlich um eingelagerten vWF. Ein Beweis für diese These konnte mit den vorliegenden Daten nicht erbracht werden.

Aufgrund dieser Einschränkungen wurde nur eine qualitative Bewertung der Präparate in der DAPI-Färbung vorgenommen. Betrachtete man die „subjektiven“ Einteilungskriterien (Zelldichte, Pseudomembranen, Bezug zu Kreuzungspunkten), so war auffallend, dass nur in 15% der Präparate eine Pseudomembran identifiziert wurde, was gleichbedeutend mit massenhaft Zellen und überwiegend nachgewiesenem starkem Bezug zu den Kreuzungspunkten war. Die Mehrheit der Präparate (85%) war dagegen ohne Pseudomembranen, mit geringer Zelldichte und keinem bzw. nur schwachem Bezug der Zellen zu den Kreuzungspunkten. Die Klassifizierung in Präparate mit hoher DAPI-Fluoreszenz zeigte, dass Pseudomembranen in 83% (5/6 Präparate) der Fälle mit vielen kernhaltigen Zellen, mit einem hohen Anteil an CD45-positiven Zellen und mit einer hohen Konzentration an eingelagertem vWF verbunden waren. Nur bei einem Präparat mit Pseudomembranen war keine hohe Fluoreszenz für DAPI, FITC und Texas Red nachweisbar.

5.2 Klinik

Aufgrund steigender Zahlen mit ECMO behandelter Patienten (Sauer et al. 2015) und der hohen Komplikationsraten, insbesondere die Thrombenbildung im System (Zangrillo et al. 2013; Lubnow et al. 2014; Dornia et al. 2014; Dornia et al. 2015; Gartner et al. 2000), wird der Aufklärung der subzellulären Mechanismen, die zur Thrombenbildung beitragen, hohe Relevanz für die moderne ECMO-Therapie zugemessen. So treten in etwa einem Drittel der Fälle Blutungskomplikationen, in etwa 20% eine Hämolyse und in einem Drittel Oxygenator-Dysfunktionen auf, die einen Wechsel des Systems erfordern (Zangrillo et al. 2013). Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass nach Langzeit-Anwendung zelluläre Ablagerungen auf Membranoxygenatoren zu finden sind, die zu einem Anstieg des dpMO führen können und die Gasaustauschleistung beeinträchtigen (Lehle et al. 2008). Da sich die Identifizierung der Zellen als schwierig herausstellte, wurde lediglich eine Klassifizierung der Oxygenatoren anhand von DAPI-gefärbten Präparaten vorgenommen und mit den klinischen Aussagen korreliert.

Bei der Untersuchung der Konfiguration der zellulären Ablagerungen in der vorliegenden Arbeit fanden sich sechs Präparate, deren Gaskapillaren von Pseudomembranen überzogen waren, wie sie bereits in einer früheren Arbeit beschrieben wurden (Lehle et al. 2008). Die Ablagerungen führen zu einer Erhöhung des Widerstandes über den MO (dpMO) und zu einem eingeschränkten Gasaustausch. Der Anstieg des dpMO erfolgte bei den in dieser Arbeit untersuchten Oxygenatoren langsam und erreichte in keinem Fall Werte über „normal“ (6-34 mmHg, Herstellerangaben), sodass in allen bis auf einen Fall nicht von einer akuten Oxygenatorthrombose (Lubnow et al. 2014; Lehle et al. 2014) ausgegangen werden konnte. Der Oxygenator, welcher aufgrund einer klinischen Oxygenatorthrombose explantiert wurde, wies keine Pseudomembranen und lediglich viele Zellen auf. Der Verbleib der dpMO-Werte im Normbereich bei tendenziell höheren (bei massenhaft Zellen) bzw. signifikant erhöhten dpMO-Werten (bei Pseudomembranen) ist durch die Prozesse des „Weaning“ erklärbar. Die Oxygenatoren mit deutlichen zellulären Ablagerungen wurden in sechs von sieben Fällen (bei massenhaft Zellen) bzw. fünf von sechs Fällen (bei Pseudomembranen) nach Weaning erhalten. Im Rahmen des Weaning wird der Blutfluss reduziert, sodass dies zur Abnahme des dpMO führt. Es ist daher trotz des normwertigen Widerstandes eine Auswirkung der Pseudomembranen auf den dpMO wahrscheinlich. Ein Austausch war in den hier betroffenen Fällen nicht indiziert, da sich der Gasaustausch der Patienten soweit gebessert hatte, dass eine Beendigung der Therapie erfolgen sollte.

Bei der Sichtung der klinischen Angaben zu den Präparaten mit Pseudomembranen war auffallend, dass alle Präparate aus Maquet-Systemen stammten. Bei keinem der anderen Systeme waren Pseudomembranen nachweisbar. Eine wichtige Beobachtung war das Fehlen von Pseudomembranen in den untersuchten HILITE-LT-Oxygenatoren. Ebenso wurden sieben von acht (88%) Präparate mit hohen Werten der DAPI-Fluoreszenz aus Maquet-MOs explantiert (ein MO von Novalung). Es kann nur darüber spekuliert werden, ob die spezielle Wickeltechnik der verschiedenen Oxygenatoren und die unterschiedliche Strömungsdynamik in diesen Oxygenatoren (Lehle et al. 2014) für diese Befunde verantwortlich sind oder ob die antithrombogene Beschichtung von Medos-Oxygenatoren (Rheoparin) die Bildung von Pseudomembranen verhindern konnte. Einschränkend muss jedoch berücksichtigt werden, dass in dieser Arbeit eine ungleiche Verteilung der Oxygenatorfabrikate zugunsten der Maquet-Systeme (27 Maquet gegenüber sechs Medos-MOs) vorlag.

Bereits im Jahr 2000 konnten Gartner et al. zeigen, dass die Flusseigenschaften des Blutes im Oxygenator direkt mit der Thrombenbildung im MO in Verbindung gebracht werden können. Es wurden Anschnitte des Oxygenators mit den enthaltenden Bündel von Gaskapillaren fotografiert und das Ausmaß der Thrombusbildung im Vergleich zu standardisierten Oxygenatorquerschnitten erfasst. In Bereichen niedriger Flussgeschwindigkeiten wurde eine vermehrte Thrombusbildung nachgewiesen. Es zeigte sich zudem eine positive Korrelation der Thrombusbildung mit der Unterstützungszeit des Patienten (Gartner et al. 2000). In einer Untersuchung von Dornia und Kollegen des Regensburger Universitätsklinikums wurden 20 MOs mit computertomographischen Methoden (*multidetector computer tomography*) auf die Thrombusbildung hin analysiert. Hierbei wurden thrombotische Ablagerungen in allen MOs gefunden. Die Thromben stellten sich vor allem im venösen Bluteinflussbereich des MOs dar. Eine Korrelation des Volumens der Gerinnung und der Unterstützungszeit wurde in dieser Arbeit nicht nachgewiesen (Dornia et al. 2014). In ergänzenden Untersuchungen zeigte sich, dass das Thrombusvolumen zunahm, wenn erhöhte D-Dimer-Werte über mehr als 2 Tage zugelassen wurden (Dornia et al. 2015). In der vorliegenden Arbeit fanden sich bezüglich der protokollierten D-Dimere bei den Präparaten mit Pseudomembranen keine Auffälligkeiten. Detaillierte Untersuchungen der Ablagerung des thrombotischen Materials entlang der Gaskapillaren fanden in den genannten Arbeiten bisher nicht statt. Der Nachweis der thrombotischen Ablagerungen in MOs mittels *multidetector computer tomography* erfolgte ebenfalls nur in Maquet-Systemen (Dornia et al. 2014).

Bei der Betrachtung der protokollierten Laborwerte fielen die niedrigeren Thrombozytenzahlen (am Tag 2 nach ECMO-Implantation) bei den Präparaten mit massenhaft Zellen oder Pseudomembranen auf. Die Thrombozyten waren bei den gruppierten Präparaten mit hoher DAPI-Fluoreszenz sogar signifikant niedriger ($p=0,047$) als bei den Präparaten mit geringerem Ausmaß des DAPI-Fluoreszenz. Auch in einer Arbeit von Weingart et al. konnte eine signifikante Abnahme der Thrombozytenzahl innerhalb eines Tages nach Implantation einer vv-ECMO gezeigt werden (Weingart et al. 2015). Es ist somit zu vermuten, dass bei den Patienten mit hohem Ausmaß zellulärer Ablagerungen in den MOs vermehrt Thrombozyten eingelagert werden und dies zu einer Abnahme der Thrombozytenzahl im peripheren Blut führt. Die Thrombozytenlast in den Ablagerungen auf den MOs wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

Die Frage, was der Grund für das hohe Ausmaß zellulärer Ablagerungen auf den Oxygenatoren von verschiedenen Patienten sein könnte, ist aus den bisherigen Betrachtungen heraus nicht zu beantworten. Daher wurden weitere relevante ECMO-Charakteristika und Patientendaten in die Analyse aufgenommen. Naheliegend war die Untersuchung der Perfusionszeiten der untersuchten MOs. Im Gegensatz zu der Arbeit von Gartner et al. (Gartner et al. 2000), die einen Zusammenhang ($r=0,45$, $p=0,04$) zwischen thrombotischer Beladung und der Perfusionszeit des MOs nachweisen konnten, zeigte sich in der vorliegenden Arbeit keine Korrelation zwischen Perfusionszeit und DAPI-Fluoreszenz der einzelnen MOs (Anteil der Pixel über dem Schwellengrauwert). Auch die Abschätzung des Thrombenvolumens mittels *multidetector computer tomography* lieferte keine Korrelation zur Perfusionszeit des MOs (Dornia et al. 2015). Aus den einzelnen Werten für die DAPI-Fluoreszenz war jedoch zu erkennen, dass die MOs mit Präparaten mit hoher DAPI-Fluoreszenz länger am Patienten eingesetzt worden waren als die übrigen MOs, auch wenn es keine Korrelation der Parameter gab. Die Unterteilung in Präparate mit hoher bzw. niedriger DAPI-Fluoreszenz zeigte folglich signifikant unterschiedliche Perfusionszeiten in den beiden Gruppen ($p=0,04$). Gleichzeitig wurden die länger eingesetzten MOs mit hoher DAPI-Fluoreszenz mit einem signifikant höheren Blutvolumen durchströmt ($p=0,03$). Letzteres wurde in keinem der oben aufgeführten Arbeiten analysiert. Ein längerer Einsatz der vv-ECMO-Therapie verschlechtert nicht das Überleben der Patienten (Camboni et al. 2011). Die höheren Perfusionszeiten der Oxygenatoren mit höherem Ausmaß zellulärer Ablagerung sind also mit dem guten Outcome der zugehörigen Patienten in Einklang zu bringen.

Die Indikation für eine ECMO-Unterstützung hatte keine Auswirkung auf das Ausmaß der Besiedelung mit kernhaltigen Zellen. Auch der Tod eines Patienten am ECMO-System war nicht mit hohen DAPI-Werten verbunden. Es war sogar so, dass alle 8 MOs mit hohen DAPI-Werten von Überlebenden stammten (Patienten, die das Krankenhaus verlassen konnten (n=6) und Patienten, die erfolgreich von der ECMO-Unterstützung entwöhnt wurden und erst im Anschluß (>48 h später) verstarben (n=2)). Alle Patienten, die am System verstarben (n=11) hatten niedrige DAPI-Werte.

Unabhängig von den Auswahlkriterien für die Klassifizierung der Präparate konnte in der statistischen Analyse eindeutig ein signifikanter Bezug eines hohen Ausmaßes zellulärer Ablagerungen mit einem jungen Alter der Patienten festgestellt werden. Dieser Befund spricht für eine bessere Kapazität dieser Patienten auf Fremdmaterial zu reagieren und für eine höhere immunologische Antwort auf das Fremdmaterial in den Oxygenatoren, welche zur Ansiedelung von Zellen auf den Gaskapillaren führt. Die für diese Arbeit durchgeführten Literaturrecherchen zeigten keine vergleichbaren Ergebnisse in der ECMO-Therapie. Es ist allerdings bekannt, dass die Regenerationsfähigkeit von Zellen und Organen, insbesondere von Lunge, Skelettmuskel, Herz, Nervensystem, Linsen und Leber, mit dem Alter abnimmt (Sousounis et al. 2014). Mit steigendem Alter ändert sich auch die Funktion von Neutrophilen und Monozyten und damit die Immunfunktion („Immunoseneszenz“) (Ginaldi et al. 2001, 1999). Die Immunoseneszenz geht mit einer erhöhten Kapazität der Zellen zur Adhäsion einher (Ginaldi et al. 2001). Es wird jedoch auch eine verminderte Fähigkeit zur Adhäsion durch die veränderte Expression von zellulären Adhäsionsmolekülen (CAM) diskutiert (De Martinis et al. 2004). Dieses „Inflamm-aging“ wird nicht nur die treibende Kraft für altersabhängige Pathologien (z. B. Neurodegeneration, Atherosklerose, Diabetes), sondern auch für sonstige inflammatorische Pathogenesen (Franceschi und Bonafè 2003) – wie eben die inflammatorischen Reaktionen auf Fremdmaterial – sein. Die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit deuten auf eine verminderte Adhäsionsfähigkeit und geringere inflammatorische Reaktionsfähigkeit der Zellen älterer Patienten hin. Die zugrundeliegenden Mechanismen können mit den vorliegenden Daten nicht aufgeklärt werden.

Ursächlich für die Bildung der Pseudomembranen scheinen inflammatorische Prozesse ebenso wie scherkraft-induzierte Thrombozytenaktivierungen zu sein. Die Aktivierung von Neutrophilen, Monozyten und Thrombozyten beim direkten Kontakt mit den Biomaterialien ist vielfach untersucht (Franz et al. 2011). In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl CD45-positive Zellen (Leukozytenadhäsion an Biomaterialien; (Gorbet und Sefton 2004)) wie auch

vWF-Einlagerungen (Beteiligung des vWF an Thrombozytenaggregation unter Scherstress; (Goto et al. 1995; Kroll et al. 1996; Schullek et al. 1984)) in den Ablagerungen auf den Gaskapillaren gefunden. Fuchs et al. beschrieben in einer u. a. Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopischen Arbeit netzartige Strukturen, die in Gefäßen im Rahmen der antimikrobiellen Abwehr geformt werden und als neutrophil extracellular traps (NETs) bezeichnet werden. NETs bestehen aus extrazellulären DNA-Strängen mit Histonen und neutrophilen antimikrobiellen Proteinen. Die Arbeitsgruppe berichtete über eine Rolle der NETs auch bei der Stimulation der Thrombusformation und zeigte die Thrombozytenadhäsion in den NETs (Fuchs et al. 2010). Ein Zusammenspiel mit der Bildung von NETs ist auch in der Formation zellulärer Ablagerungen auf MO-Gaskapillaren bis hin zur Bildung einer Oxygenatorthrombose vorstellbar.

In Anbetracht der inflammatorischen Reaktionen bei Biomaterialkontakt wurden auch die inflammatorischen Parameter (Leukozytenzahl, CRP) untersucht. Patienten, deren Oxygenatoren Pseudomembranen aufwiesen, hatten tendenziell höhere Leukozytenzahlen vor Beginn der Therapie (im Maquetkollektiv ein signifikanter Unterschied, $p=0,04$). Präparate, bei denen sich die DAPI-gefärbten Zellen mit starkem Bezug um die Kreuzungspunkte übereinanderliegender Gaskapillaren anlagerten, stammten von Patienten, die 2 Tage vor Ausbau des MOs signifikant erhöhte Leukozytenzahlen zeigten. Auch der präinterventionelle CRP-Wert war bei dieser Betrachtung signifikant unterschiedlich, jedoch waren hier eher die Präparate mit schwachem Bezug zu den Kreuzungspunkten auffällig hoch. Diese Befunde sprechen für eine vermehrte Aktivierung des Immunsystems der Patienten mit auffälligen MO-Präparaten, im Falle der Pseudomembranen schon bereits vor der ECMO-Unterstützung. Eine Analyse der Routineparameter in den klinischen Subgruppen (z. B. der Vergleich der CRP-Wert bei Überlebenden und Nicht-Überlebenden) fand aufgrund des gewählten Studiendesigns nicht statt.

Somit ist aus den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen herauszulesen, dass bei der Ausbildung von zellulären Ablagerungen sowohl die Eigenschaften des Systems an sich als auch der Konstitution des Patienten eine Rolle spielen. Die jüngeren Patienten mit einem aktivierten Immunsystem scheinen vermehrt auf das Fremdmaterial der MOs zu reagieren, was sich durch eine dichte Ablagerung von Zellen auf den Gaskapillaren bemerkbar macht. Trotz einer längeren Perfusionszeit und einem höheren durch den MO transportierten Blutvolumen konnten diese Patienten erfolgreich mit ECMO behandelt werden. Neben den inflammatorisch aktiven Zellen scheinen die Thrombozyten bei der Ausbildung von

Ablagerungen in den Oxygenatoren eine Rolle zu spielen. Die immunhistochemische Färbung des vWF lieferte dazu indirekte Hinweise. Eine gezielte Detektion von Thrombozyten fand in dieser Arbeit nicht statt. Auch waren die Erkenntnisse zur genaueren Differenzierung der leukozytären Zellen in den Ablagerungen aufgrund der oben beschriebenen Schwierigkeiten in der Immunhistochemie sehr rudimentär. In unserer Arbeitsgruppe sind bereits Untersuchung mit den in dieser Arbeit erfolgreich getesteten Antikörpern gegen CD68 (Leukozyten) und VE-Cadherin (Endothelzellen) durchgeführt worden. Erste Ergebnisse bestätigen deutlicher als die Färbung gegen CD45, dass es sich bei der überwiegenden Anzahl der Zellen auf den Gaskapillarmembranen um leukozytäre Zellen handelt. Auch mit dem Antikörper gegen VE-Cadherin lassen sich keine eindeutig endothelialen Zellen nachweisen, obwohl sich der Antikörper, angewandt auf einen Endothelzellmonolayer, als geeignet für die Anwendung auf PMP-Gaskapillaren erwiesen hat. Sollte es möglich sein, die Anwendung weiterer Antikörper zur Applikation auf MO-Präparaten zu optimieren, ist eine genauere Differenzierung der vorhandenen Zellen möglich. Aufgrund der weiterhin hohen Zahl von Komplikationen unter der ECMO-Therapie trotz Weiterentwicklung der Membranmaterialien, sind weitere Modifikationen der ECMO-Systeme notwendig. Auch aus dieser Arbeit lässt sich ableiten, dass die Flusseigenschaften des Blutes durch den MO herausragende Bedeutung für die Ablagerung thrombotischen Materials haben. Eine Optimierung der Perfusion in Bereichen niedriger Flussgeschwindigkeiten würde zu einem verringerten Ausmaß zellulärer Ablagerungen führen. Zudem sind weitere Modifikationen der PMP-Gaskapillaren und deren Beschichtungen notwendig. Erste Ansätze einer Endothelialisierung der Gaskapillaroberflächen wurden in in-vitro Ansätzen verfolgt (Hess et al. 2010; Polk et al. 2010). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass eine Absetzung von endothelialen Zellen auf den Membranen in nennenswertem Umfang in-vivo nicht geschieht. Um eine Endothelialisierung der Oxygenatoren und damit eine geringere Exposition des Patienten mit Fremdmaterialien zu erreichen, sind weitergehende Veränderung an der Oberflächenbeschichtung der Membranen notwendig. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass die hier mikroskopisch nachgewiesenen zellulären Ablagerungen nicht mit einem schlechten Überleben der Patienten verbunden waren. Die genannten Weiterentwicklungen der ECMO-Systeme würden aber sicherlich dazu beitragen, die Komplikationsraten zu senken und die ECMO-Therapie im Sinne einer noch sichereren Behandlung zu verbessern.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden 41 Membranoxygenatoren mit Polymethylpenten-Gaskapillaren nach Einsatz am Patienten zur Behandlung eines Lungenversagens oder einer kardialen Dekompensation auf das Vorkommen zellulärer Ablagerungen hin untersucht. Es wurden nach Fixierung und Kryokonservierung der Membranoxygenatoren immunhistochemische Färbungen von leukozytären und endothelialen Markern (*leucocyte-common-antigen* (CD45), von-Willebrand-Faktor (vWF)) ergänzt durch eine Zellkernfärbung (DAPI) vorgenommen. Die Ausprägung der vom DAPI ausgehenden Fluoreszenz, berechnet aus den Bildpunktinformationen der aufgenommenen Bilder, wurde als ein Parameter für das Ausmaß zellulärer Ablagerungen herangezogen. Etwa die Hälfte der Präparate zeigte wenig Zellen, während acht Präparate durch ein hohes Ausmaß der zellulären DAPI-Fluoreszenz auffielen. Sechs Präparate wiesen zell- und fibrinhaltige Schichten in Form von Pseudomembranen auf. Von den untersuchten Zellen waren 32% positiv gegen CD45 gefärbt. vWF-positive Zellen fanden sich nur vereinzelt; es wurden jedoch in großem Ausmaß vWF-positive, nicht zellassoziierte Strukturen gefunden, die von Thrombozyten und anhaftendem vWF ausgehen könnten. Die Zugehörigkeit der nicht CD45-positiven Zellen konnte nicht weiter geklärt werden.

Die MOs mit einem hohen Ausmaß der zellulären Ablagerungen und mit Pseudomembranen wurden an jungen Patienten mit einem, wie aus den erhobenen Laborparametern ersichtlich, stärkeren Aktivierungszustand des Immunsystems eingesetzt. Diese Patienten wurden über signifikant längere Perfusionszeiten durch eine ECMO-System unterstützt und in der überwiegenden Mehrheit von der Therapie erfolgreich entwöhnt. Die zugrundliegende Diagnose, die eine ECMO-Therapie notwendig machte, spielte beim Vergleich der Oxygenatoren keine Rolle. Alle Oxygenatoren mit einem hohen Ausmaß der zellulären Ablagerungen und mit Pseudomembranen stammten aus einem Maquet-System. Hilite-LT-System der Firma Medos wiesen geringere Ablagerungen auf, wobei einschränkend eine ungleichmäßige Verteilung der Oxygenatorfabrikate vorlag. Die Erkenntnisse der Arbeit deuten darauf hin, dass vor allem die Scherkraft-induzierte Thrombozytenaktivierung und inflammatorische Mechanismen bei der Ausbildung von Zellablagerungen auf Oxygenatormembranen eine Rolle spielen. Eine weitere Aufklärung dieser Prozesse wird grundlegend wichtig für eine erfolgreiche moderne ECMO-Anwendung sein.

7 Anhang

7.1 Antigen-Antikörper-Reaktionen

7.1.1 Antikörper

Es gibt fünf verschiedene Klassen von Immunglobulinen: das Immunglobulin M (IgM) spielt bei der primären Immunantwort eine wichtige Rolle, das Immunglobulin D (IgD) wirkt auf die Differenzierung von B- Lymphozyten hin, das Immunglobulin E (IgE) ist ein Mediator bei der Allergie vom Soforttyp, das Immunglobulin A (IgA) ist der dominierende Antikörper auf den Schleimhäuten, und das Immunglobulin G (IgG) wird bei der sekundären Immunantwort gebildet. IgGs sind die Immunglobuline mit der höchsten Konzentration im Blutplasma und spielen in der Bioanalytik die herausragende Rolle (Pschyrembel 2007).

Das IgG weist eine Struktur ähnlich des Buchstabens „Y“ auf, das ein Stilregion mit zwei Armen darstellt. Es wird von je zwei identischen schweren und leichten Ketten aus Immunglobulindomänen gebildet. Sowohl die beiden schweren Ketten miteinander, als auch jeweils eine leichte und eine schwere Kette sind mit Disulfidbrücken verbunden. Während die schwere Kette die Immunglobulinklasse definiert, gibt es von den leichten Ketten zwei Typen, den Kappa- und den Lambda-Typ. Das aminotermrale Ende der schweren und leichten Ketten ist variabel und bildet die Antigen-bindende Struktur. Wendet man auf das IgG das Enzym Papain an, werden die beiden Arme des Moleküls abgespalten; diese werden als Antigen-bindende Fragmente (Fab) bezeichnet, während der Stil als karboxyterminales Fragment (Fc) bezeichnet wird. Dieses letzte Fragment ist wichtig bei der Kommunikation des Antikörpers mit Zellen, da es von deren Fc-Rezeptoren erkannt wird (Benninghoff und Drenckhahn 2004).

7.1.2 Immunbindung

Bei einem Bindungstest läuft eine Antigen-Antikörper-Reaktion an einem entweder immobilisierten Antigen oder einem immobilisierten Antikörper ab. Zur Detektion der Reaktion wird ein amplifizierendes System genutzt. Dies kann eine enzymatische Farbreaktion, eine radioaktive Antwort, die Reduktion von Silbersalzen, die Lumineszenz oder die Ausnutzung von fluoreszierenden Stoffen sein. Die Verstärkung der Antigen-Antikörper-Reaktion ermöglicht das Sichtbarmachen auch nur weniger Bindungen, jedoch

ergibt sich das Problem, dass unspezifische von spezifischen Adsorptionen unterschieden werden müssen. Daher ist bei Etablierung eines immunologischen Verfahrens die genaue Einstellung des Tests mit seinem spezifischen Fenster nötig. Ziel ist es, unter Bewahrung der Reaktionsstärke, das Antiserum soweit zu verdünnen, dass konkurrierende, unspezifische Adsorptionen reduziert werden und damit Signal und Hintergrund besser zu unterscheiden sind. Des Weiteren können unspezifische Bindungen durch Blocken von Bindungsstellen durch Gelatine, Magermilchpulver oder tierischem Serum minimiert werden. Auch die Zugabe von nichtionischen Detergenzien in die Waschlösung können unerwünschte Wechselwirkungen reduzieren (Lottspeich und Engels 2012).

Bei der direkten Methode ist der Amplifikator mit dem Antikörper kovalent verbunden. Dieser Ansatz ist einfach und schnell durchzuführen. Demgegenüber wird bei der indirekten Anordnung erst ein gegen einen Primärantikörper gerichteter Sekundärantikörper mit einem Amplifikator gekoppelt. Dabei werden der erste und der zweite Antikörper aus verschiedenen Tierspezies gewonnen, wobei der Sekundärantikörper gegen alle Primärantikörper beliebiger Spezifität der ersten Tierspezies gerichtet ist (Bratke et al. 2008).

7.2 Fluoreszenz

7.2.1 Licht

Elektromagnetische Strahlung wird durch ihre Frequenz und Wellenlänge beschrieben. Der sichtbare Anteil elektromagnetischer Strahlung wird im alltäglichen Sprachgebrauch als Licht bezeichnet und umfasst die Wellenlängen von 380nm- bis 780nm (Zwahr 2006). Es ist üblich, besonders in der Mikroskopie, auch die an das sichtbare Spektrums angrenzenden Bereiche mit der ultravioletten Strahlung im kurzwelligen Bereich und der Infrarot- Strahlung im langwelligen Umfeld (bis 1200nm) dem Licht zuzuordnen. Licht transportiert Energie in Form von Photonen, wobei kurzwelliges Licht energiereicher als langwellige Strahlung ist (Harten 2011).

7.2.2 Fluoreszenz

In einem Molekül sind energetische Übergänge zwischen Rotations-, Schwingungs- und Elektronenniveaus möglich. Durch ultraviolette und sichtbare Strahlung werden vor allem die elektronischen Übergänge beeinflusst und Elektronenanregung ist dafür verantwortlich, was wir als Farben wahrnehmen. Die Energieniveaus eines Moleküls sind von dessen chemischen Zusammensetzung und Struktur abhängig. So sind in mehratomigen Molekülen neben elektronischen Übergängen gleichzeitig zahlreiche Rotations- und Schwingungszustände möglich, sodass in Darstellungen ihrer Adsorptions- und Emissionsspektren breite Banden auftreten. Die für das Strahlungsverhalten verantwortliche Einheit eines Moleküls ist das sogenannte Chromophor wie etwa eine $-C=C-$ oder $-O-H-$ Bindung. Das Adsorptionsspektrum eines Moleküls kann vereinfacht als Summe der Adsorptionsspektren seiner Chromophore angesehen werden (Engel und Reid 2006). Die als Fluoreszenzmarker genutzten Stoffe, Fluorochrome oder Fluorophore genannt, zeichnen sich typischer Weise durch konjugierte Doppelbindungen mit delokalisierten Elektronen (in pi-Bindungen) aus und haben aromatische Ringstrukturen (Lichtman und Conchello 2005).

Zur Veranschaulichung der Vorgänge beim Übergang zwischen verschiedenen Energieniveaus werden Jablonski Diagramme herangezogen. Der energetische Grundzustand des nicht angeregten Molekül wird als S_0 - Zustand bezeichnet (S für Singulett: Normalzustand von zwei Elektronen eines Molekülorbitals mit entgegengesetzten Spin (+1/2 und -1/2) und somit aufgehobener magnetische Ladung) und die Level jeweils höherer

Energie als S_1 und S_2 . Daneben gestellt werden die Energieniveaus T_1 und T_2 (T für Triplet: ein Elektronenpaar, das in zwei verschiedenen Molekülorbitalen und mit parallel ausgerichtetem Spin existiert, führt dazu, dass das Molekül eine magnetische Ausrichtung aufweist, die parallel, senkrecht oder antiparallel zum magnetischen Feld steht, was als Triplet- Zustand bezeichnet wird), die besonders bei Phosphorenz, die im Vergleich zur Fluoreszenz langsamer abläuft, eine Rolle spielen (Lichtman und Conchello 2005). Die Übergänge zwischen den Energieniveaus können als strahlende Übergänge oder als nichtstrahlende Übergänge stattfinden. Das Molekül wird von der Energie eines Photons des Anregungslichts auf ein höheres Energieniveau gebracht. Dazu ist mindestens die Energie nötig, um einen Übergang $S_0 \rightarrow S_1$ zu ermöglichen. Wird darüberhinaus durch kurzwelligeres Licht mehr Energie übertragen, kann das Molekül höhere Schwingungs- und Rotationsniveaus erreichen. Daher ist ein Spektrum verschiedener Wellenlängen geeignet, das Molekül anzuregen. Von seinem angeregten Zustand kehrt das Molekül über nichtstrahlende und strahlende Übergänge zurück zum Grundzustand. Ein alleinstehendes, isoliertes Molekül müsste die Energie in Form von Licht abgeben. In Lösung, Kristall oder Gas können Moleküle jedoch miteinander in Wechselwirkung treten und kollidieren, sodass sie untereinander Energie abgeben und in niedrigere Schwingungszustände kommen. Dies erfolgt aber nur bis zum niedrigsten Schwingungsniveau des S_1 - Zustand. Von hier aus ist der Energiesprung bei guten Fluorophoren zu groß für nichtstrahlende Übergänge und die verbleibende Energie wird in Form von Licht abgegeben. Das emittierte Fluoreszenzspektrum hängt von der Energie der ausgesandten Photonen ab. Da die Fluoreszenz vom S_1 - Zustand abgegeben wird, hängt dessen Wellenlänge nicht von der Wellenlänge des Anregungslichts ab, sodass man mit der Veränderung der Wellenlänge des Anregungslichts nicht die Wellenlängen des Emissionsspektrums verschieben kann. Da vor dem Abgeben von Photonen zunächst ein Energieverlust in Form von innerer Konversion und Abklingen des Schwingungszustandes erfolgt, wird immer ein energieärmeres, langwelligeres Licht als Fluoreszenz abgegeben. Dieses Phänomen wird als „Stokes Verschiebung“ bezeichnet. Von Vorteil sind Fluorophore mit einer großen Stokes Verschiebung, da diese die Unterscheidung des Exzitations- und des Emissionslicht vereinfacht (Engel und Reid 2006; Lichtman und Conchello 2005; Valeur 2002) .

7.3 Image Processing Systems

Moderne Mikroskope sind mit Bildverarbeitungssystemen (Englisch: *Image processing systems*) gekoppelt, die eine Aufnahme des Gesichtsfeldes und die Speicherung als digitales Bild ermöglichen.

Ein System für die Bildverarbeitung weist folgende Komponenten auf:

1. Bildaufnahme: durch Bildsensoren, z. B. durch eine CCD- Kamera
2. Bilddigitalisierer (englisch: *frame grabber*): wandelt das analoge Signal des Bildsensors in digitale Daten um, die gespeichert werden können
3. Arbeitsstation: ein *Personal Computer* (PC) zur Anzeige und Weiterverarbeitung der digitalen Bilder
4. Bildverarbeitungssoftware: zur Bearbeitung und Analyse von digitalen Bildern

nach (Jaehne 2005).

7.3.1 Bildsensoren

Die Bildaufnahme an Mikroskopen mit Bildverarbeitungssystemen erfolgt zumeist mit Kameras, die einen CCD-Bildsensor (*charge-coupled devices*) aufweisen. CCDs sind aus einer photosensitiven Matrix aus *pixels* (englische Kurzform für *photosensitive element*) auf einem Silizium- Halbleiter- Feld aufgebaut. Die Energie der Photonen des einfallenden Lichts setzt in den einzelnen *pixels* Elektronen frei, sodass positiv-geladene „Löcher“ in der Matrix generiert werden. Diese elektronische Spannung ist linear proportional zur Intensität der Belichtung. An den *pixels* ist eine externe Spannung angelegt, sodass die Spannung der *pixels* über den Bildsensor bewegt und letztendlich ausgelesen werden kann. Dabei wird die elektronische Spannung durch einen Verstärker in eine analoge Spannung umgewandelt, die an den Bilddigitalisierer weitergegeben werden kann (Spring 2007).

7.3.2 Bilddigitalisierung

Ein digitales Bild wird durch seine Größe, ein Koordinatensystem von Bildpunkten, seine Auflösung und durch Informationen für die einzelnen Bildpunkte beschrieben. Die Größe ist durch die Anzahl von M Spalten und N Reihen von Bildpunkten in der Breite und Höhe festgelegt. Die einzelnen Bildpunkte werden über ein Koordinatensystem einer Position auf

dem Bild zugeordnet. Die Auflösung, oder besser die Bildpunktdichte, gibt an, wie genau das Bild die Realität wiedergibt. Sie wird in Einheiten wie *dots per inch* (dpi), *lines per inch* (lpi) oder *pixels per inch* (ppi) angegeben und ist gewöhnlich in der Breite und der Höhe gleich (Burger und Burge 2009). Bei der Auswahl einer Kamera und eines Digitalisierers für ein Mikroskop ist darauf zu achten, dass die Auflösung dieser digitalisierenden Komponenten der Auflösung des Mikroskops entspricht. Bei einer maximalen Auflösung zweier $0,2\mu\text{m}$ von einander entfernter Punkte unter dem Mikroskop, sind in einem Abstand von $0,05\mu\text{m}$ angeordnete *pixel* geeignet das Bild aufzunehmen und in vier Bildpunkte zu digitalisieren. Bei einem Abstand von lediglich $1\mu\text{m}$ zwischen den *pixel* ist das Bild nur eine schlechte Abbildung des Gesichtsfeldes (Cardullo und Hinchcliffe 2007). Die Bildintensität und Helligkeit wird in einen Wert für den einzelnen Bildpunkt festgeschrieben (englisch: *pixel values*). Die Länge dieses Wertes hängt von der Art des Bildes ab. Bei einem Bild in der Binärdarstellung (englisch: *binary image*) gibt es nur schwarz oder weiß, was in den Werten 0 bzw. 1 ausgedrückt wird. In einem Graustufenbild (englisch: *grayscale image*) hingegen, das bei vielen Applikationen in der Photographie und in der naturwissenschaftlichen und medizinischen Bildgebung genutzt wird, ist für jeden Bildpunkt ein binärer Wert der Länge k festgehalten, sodass in diesem Bild eine Anzahl von 2^k Stufen zwischen schwarz und weiß wiedergegeben werden kann. Der Wert k wird als bit- Tiefe des Bildes bezeichnet. Bei einer Tiefe von beispielsweise 8-bit ist der Wert 0 der geringsten Helligkeit, also schwarz, zugeordnet, während der Wert 255 für reines Weiß steht $[0...2^k-1]$. Ein farbiges Bild wird meistens aus je einem Kanal für die drei Farben Rot, Grün und Blau zusammengesetzt (*RGB-color*). In einem Farbbild mit 8-bit Tiefe ist für jeden Kanal ein Intensitätsumfang von $[0...255]$ gespeichert, sodass für jeden Bildpunkt $3 \times 8 \text{ bit} = 24 \text{ bit}$ benötigt werden (Burger und Burge 2009).

7.3.3 Bildformate

Die oben beschriebenen Bildinformationen werden in Dateien zusammengefasst, die die Speicherung, die Archivierung und den Austausch von Bildern ermöglichen. In der Photographie und in den Naturwissenschaften ist das TIFF- Format (*Tagged Image File Format*) ein oft herangezogenes Dateiformat um Bilder zu archivieren. TIFF- Dateien können entweder unkomprimiert oder mit verschiedensten Komprimierungsverfahren gespeichert werden und unterstützen sowohl Graustufen als auch Farbbilder. Als komprimierte Dateiformate, die wenig Speicher in Anspruch nehmen, stehen vor allem die JPEG (*Joint*

Photographic Experts Group)- Kompression und das GIF- Format (Graphics Interchange Format) zur Verfügung. Beide Formate haben den Vorteil schnell, besonders über das Internet, ausgetauscht werden zu können. Beim JPEG- Format wird die Bilddatei auf die Charakteristika komprimiert, die mit dem menschlichen Auge auf Bildern wahrgenommen werden. Aufgrund der dadurch stark reduzierten Bildpunktinformationen sind sie für quantitative Bildanalysen ungeeignet (Durcan und Hinchcliffe 2007).

7.3.4 Bildverarbeitung

Die Bildbearbeitung und Analyse wird in Softwarepaketen wie NIH imagej oder Adobe Photoshop ® durchgeführt. Zur Beurteilung von Bildern können in diesen Programmen Histogramme angezeigt werden. Dabei stellen die Histogramme eine Häufigkeitsverteilung der Intensitäten von *pixel* dar. Sie zeigen jedoch nicht, wo ein *pixel* im Bild (im Koordinatensystem) lokalisiert ist. Histogramme geben so Informationen darüber, ob ein Bild über- oder unterbelichtet ist, ob das volle Spektrum von minimaler bis maximaler Intensität genutzt wird (der Kontrast), und ob alle möglichen Intensitätswerte genutzt werden (dynamischen Bereich) (Burger und Burge 2009).

Im Rahmen dieser Beurteilung ermöglichen Bildverarbeitungsprogramme eine Gamma-Korrektur durchzuführen. Dies ist nötig, um die Anzeige eines Bildes auf einem Gerät wie einem Computerbildschirm an die Empfindung des Auges anzupassen. Der Wert „gamma“ stellt einen Bezug zwischen den numerischen Bildpunktwerten und den physikalischen Größen „Helligkeit“ oder „Intensität“ her. Der Begriff entstammt der Fotographie, da hier der Wert „gamma“ bei der graphischen Auftragung der Filmdichte in Abhängigkeit von der Lichtintensität die Steigung der Kurve angibt.

7.4 Einstellung des Mikroskopes und der Software

Tabelle 46 Einstellungen des Mikroskopes

Vergrößerungswechsler	1 x
Kondensorfrontlinse	In den Strahlengang geklappt
Polarisator	Aus dem Strahlengang geklappt
Analysator	Aus dem Strahlengang gezogen
Kondensorrevolver	Position H
Interferenzrevolver	Position HF
Fluoreszenzrevolver	Position 1 für Durchlichtmikroskopie Position 2-4 für die entsprechenden Fluoreszenzkanäle

Tabelle 47 Einstellungen der Software

Binning	1
Color Adjust Dialog	Monochrome
Camera area	Full
Live Bin	2

7.4.1 Macro für die Berechnungen der Bildpunktinformation

```

dir1 = getDirectory("Choose Source Directory ");
format="8-bit TIFF";
list = getFileList(dir1);
setBatchMode(true);
for (i=0; i<list.length; i++) {
    showProgress(i+1, list.length);
    open(dir1+list[i]);
    run("Properties...", "channels=1 slices=1 frames=1 unit=pixel pixel_width=1 pixel_height=1
voxel_depth=1.0000000 frame=[0 sec] origin=0,0,0");
    run("Set Measurements...", "area mean standard modal min limit display redirect=None decimal=2");
    run("Measure");
    setAutoThreshold("Default");
    //run("Threshold...");
    setAutoThreshold("Default dark");
    setThreshold(0, 511);
    run("Measure");
    setThreshold(512, 1023);
    run("Measure");
    setThreshold(1024, 1535);
    run("Measure");
    setThreshold(1536, 2047);
    run("Measure");

```

```
setThreshold(2048, 2559);
run("Measure");
setThreshold(2560, 3071);
run("Measure");
setThreshold(3072, 3583);
run("Measure");
setThreshold(3584, 4095);
run("Measure");
setThreshold(4096, 4607);
run("Measure");
setThreshold(4608, 5119);
run("Measure");
setThreshold(5120, 5631);
run("Measure");
setThreshold(5632, 6143);
run("Measure");
setThreshold(6144, 6655);
run("Measure");
setThreshold(6656, 7167);
run("Measure");
setThreshold(7168, 7679);
run("Measure");
setThreshold(7680, 8191);
run("Measure");
setThreshold(8192, 8703);
run("Measure");
setThreshold(8704, 9215);
run("Measure");
setThreshold(9216, 9727);
run("Measure");
setThreshold(9728, 10239);
run("Measure");
setThreshold(10240, 10751);
run("Measure");
setThreshold(10752, 11263);
run("Measure");
setThreshold(11264, 11775);
run("Measure");
setThreshold(11776, 12287);
run("Measure");
setThreshold(12288, 12799);
run("Measure");
setThreshold(12800, 13311);
run("Measure");
setThreshold(13312, 13823);
run("Measure");
setThreshold(13824, 14335);
run("Measure");
setThreshold(14336, 14847);
run("Measure");
setThreshold(14848, 15359);
run("Measure");
setThreshold(15360, 15871);
run("Measure");
setThreshold(15872, 16383);
run("Measure");
close();
}
```

7.5 Materialien

Tabelle 48 Hilfs- und Analysegeräte

Autoklav Varioclav Damsterilisator	H + P Labortechnik GmbH (Oberschleißheim, D)
CASY® Cell Counter and Analyzer System, Modell TTC	Roche Diagnostics GmbH (Penzberg, D)
CO ₂ - Begasungs- Brutschrank <i>CO₂- Auto- Zero</i>	Heraeus Holdings GmbH (Hanau, D)
Dispensiersystem <i>Multipette plus</i>	Eppendorf AG (Hamburg, D)
Durchflusszytometer <i>FACSCalibur™ 4CA- E1913</i>	BD Bioscience (Heidelberg, D)
Fluoreszenzmikroskop Leica <i>DMRE</i>	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH (Wetzlar, D)
Knick- Lab- pH- Meter Digital Typ 647	Escolab (Utrecht, NL)
Mikroskop Fluovert FU	Leitz GmbH (Wetzlar, D)
Pipetten <i>pipetman</i> 20/100/200/500/1000 µl	Gilson Inc. (Middleton, USA)
Pipettierhilfe <i>Pipetboy acu</i>	Integra Bioscience GmbH (Fernwald, D)
Präzisions- Waage <i>Precisa 310 M</i>	Precisa Gravimetrics AG (Dietikon, CH)
Sterilbank <i>Hera safe</i> Heraeus Instruments	Heraeus Holdings GmbH (Hanau, D)
Sterilbank <i>Laminair</i> Heraeus Instruments	Heraeus Holdings GmbH (Hanau, D)
Vortex Mixer <i>MS2 Minishaker</i>	IKA® Werke GmbH & Co. KG (Staufen, D)
Zentrifuge <i>Megasfuge 1.0 R</i> Heraeus Systems Sepatech	Heraeus Holdings GmbH (Hanau, D)
Zentrifuge <i>Biofuge pico</i>	Heraeus Holdings GmbH (Hanau, D)

Tabelle 49 Einwegmaterialien

6- well- Platten, steril <i>Nunclon™ Surface</i>	Nunc™ (Roskilde, DK)
12- well- Platten, steril <i>Cellstar ®</i>	Greiner Labortechnik (Frickenhausen, D)
CASY®- Cup mit Deckel	Roche Diagnostics GmbH (Penzberg, D)
Falcon- Röhrchen 15 ml, steril	Nunc™ (Roskilde, DK)
Falcon- Röhrchen 50 ml, steril	Greiner Labortechnik (Frickenhausen, D)
Feather <i>disposable scalpel</i>	Feather Safety Razor Co., Ltd. (Osaka, Japan)
Kryogefäße, steril, 2 ml	Carl Roth GmbH + Co. KG
Metallringe	Physikalische Mechanisches Werkstatt der Universität Regensburg

Monovette EDTA KE/ 9ml	Sarstedt AG & Co (Nürnberg, D)
Monovette Citrat 5ml	Sarstedt AG & Co (Nürnberg, D)
Objektträger, steril <i>SlideFlask</i>	Nunc TM (Roskilde, DK)
Objektträger Ground Edges Frosted	VWR International GmbH
Pipettenspitzen 200/1000 µl	Sarstedt AG & Co (Nürnberg, D)
Röhrchen 5ml	Sarstedt AG & Co (Nürnberg, D)
Sterilfilter <i>Minisart</i> ®	Sartorius Stedim Biotech (Aubagne Cedex, F)
T- 25-/T- 75- Kulturflaschen Nunclon TM Surface	Nunc TM (Roskilde, DK)

Tabelle 50 Zellmedien und Reagenzien

Amphotericin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D)
BD <i>FACS</i> TM Lysing Solution	BD Biosciences (Heidelberg, D)
CASY®- Ton Verdünnungslösung	Roche Diagnostics GmbH (Penzberg, D)
Endothelzell- Basal- Medium	PromoCell GmbH (Heidelberg, D)
Endothelzell SupplementMix (Wachstumsfaktoren)	PromoCell GmbH (Heidelberg, D)
<i>Ficoll- Paque</i> TM Plus Separationsmedium	GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg, D)
Fluoromount G	Southern Biotech (Birmingham, Alabama, USA)
GIBCO Trypsin 2,5%	Invitrogen GmbH (Darmstadt, D)
Paraformaldehyd	Merck (Darmstadt, D)
RPMM-1640 Medium	PAN Biotech GmbH (Aidenbach, D)

7.5.1 Herstellung von Puffern und Gebrauchslösungen

7.5.1.1 Endothelzellmedium

500ml	Endothelzell- Basal- Medium
+ 1ml	Amphotericin
+ 500µl	Gentamicin
+ 10ml	Endothelzell-SupplementMix

7.5.1.2 Puffer

PB- Puffer (Stammlösung 10x)	11,5g	Na ₂ HPO ₄
	2g	KCl
	2g	KH ₂ PO ₄
PBS- Puffer (Stammlösung 10x)	80g	NaCl
	11,5g	Na ₂ HPO ₄
	2g	KCl
	2g	KH ₂ PO ₄
PBS- Puffer (Gebrauchslösung 1x)	100 ml	PBS- Lösung (10x)
	ad 1000 ml	Aqua bidest.
PBST- Puffer (1 x mit 0,1% Triton)	1 ml	Triton
	100 ml	PBS- Lösung (10x)
	ad 1000 ml	Aqua bidest.
PBS- Lösung mit fetalem Kälberserum	98%	PBS- Lösung (10x)
	2%	FKS

Alle Puffer- Lösung werden mit HCl bzw. NaOH auf einen pH- Wert von 7,4 eingestellt.

7.5.1.3 Weitere Lösungen

Gelatinevorratslösung	2,5 g	Gelatinepulver (0,25 %)
	1 L	PBS 1x
Gelatineverbrauchslösung	200 ml	Gelatinevorratslösung
	1 ml	Gentamycin
Paraformaldehyd-Vorratslösung (8%)	800ml	Aqua bidest.
	80g	Paraformaldehyde
	2 Plättchen	NaOH
	200ml	PBS- Lösung (10x)
Paraformaldehyd-Verbrachslösung (4%)	½	Paraformaldehyd-
		Vorratslösung (8%)
	½	PBS- Lösung (10x)

7.5.2 Antikörper

Tabelle 51 Verwendete Antikörper

Antikörper	Anti-vWF	VE-Cadherin
Hersteller, Nr.	DakoCytomation, A 0082	Bender MedSystems, BMS158
Typ, Host, Isotyp	Polyklonal, <i>rabbit</i>	Polyklonal, <i>rabbit</i>
Verdünnungen getestet	1:100 – 1:10.000	1: 100 – 1:500
Verdünnungen gewählt	1:5000	1:200
Belichtungszeit	800msec.	1,5 sec.
Tonwerteinstellung		
Tiefen	5	20
Lichter	160	140

Tabelle 52 Verwendete Antikörper

Antikörper	UEA-1-Lektin-FITC	CD45-APC
Hersteller, Nr.	Sigma Aldrich, L9006	BD Pharmingen, 555485
Typ, Host, Isotyp	Lektin	Monoklonal, <i>mouse</i> , IgG1k
Verdünnungen getestet	1:100 – 1:1000	1:20
Verdünnungen gewählt	1:1000	1:20
Belichtungszeit	800msec.	nur Durchflusszytometrie
Tonwerteinstellung		
Tiefen	30	-
Lichter	140	-

Tabelle 53 Verwendete Antikörper

Antikörper	CD45	CD68
Hersteller, Nr.	BD Pharmingen, 555482	DakoCytomation, M 0814
Typ, Host, Isotyp	Monoklonal, <i>mouse</i> , IgG1k	Monoklonal, <i>mouse</i> , IgG1k
Verdünnungen getestet	1:50 – 1:200	1:50 – 1:600
Verdünnungen gewählt	1:100	1:600
Belichtungszeit	2 sec.	3 sec.
Tonwerteinstellung		
Tiefen	5	10
Lichter	100	200

Tabelle 54 Verwendete Antikörper

Antikörper	CD146	CD68
Hersteller, Nr.	Abcam, ab49492	DakoCytomation, M 0814
Typ, Host, Isotyp	Monoklonal, <i>mouse</i> , IgG1	Monoklonal, <i>mouse</i> , IgG1k
Verdünnungen getestet	1:50 – 1:40	1:50 – 1:600
Verdünnungen gewählt	-	1:600
Belichtungszeit	Bis 8sec sec.	3 sec.
Tonwerteinstellung		
Tiefen	-	10
Lichter	-	200

7.5.3 Sekundäre Antikörper

Tabelle 55 Verwendete sekundäre Antikörper

Antikörper	Esel-anti-Maus-FITC	Esel-anti-Kaninichen- Texas Red
Hersteller, Nr.	Abcam, ab49492	DakoCytomation, M 0814
Typ, Host, Isotyp	Monoklonal, <i>mouse</i> , IgG1	Monoklonal, <i>mouse</i> , IgG1k
Verdünnungen getestet	1:50– 1:1000	1:50 – 1:600
Verdünnungen gewählt	1:250	1:400

7.6 Präparierung der am Patienten eingesetzten Membranoxygenatoren

7.6.1 Aufbau

- Die Kanülen werden von den Schläuchen abgetrennt
- Dem zuvor vom Patienten wegführendem Schenkel wird das Autotransfusionsreservoir vorgeschaltet; dieses wird in seiner Halterung in einer Höhe oberhalb des Oxygenators platziert
- Die Flussmessung wird distal des Oxygenators beibehalten

7.6.2 Spülung mit Natriumchlorid- Lösung

- Kreislauf distal des Oxygenators abklemmen
- 10 Liter NaCl (0,9%)- Lösung über einen Trichter in Fraktionen in das 2 Liter fassende Reservoir einfüllen und das System hiermit entlüften
- Die Pumpe langsam starten, bei ca. 2000 U/min die Klemme öffnen und die NaCl- Lösung bei einem Fluss von 1 Liter/ min in ein Waschenbecken ablaufen lassen
- Sinkt der Spiegel der NaCl (0,9%)-Lösung in den Schlauch hinein, wird zunächst distal des Oxygenators abgeklemmt und dann die Pumpe auf 0 U/min herunterfahren

7.6.3 Fixieren mit Paraform- Lösung

- 0,5 Liter 4%ige Paraform- Lösung in das Reservoir geben
- die Pumpendrehzahl hochfahren und die Paraform- Lösung durch das System laufen lassen; dabei die Lösung auffangen (Paraform- haltig!) und sonderentsorgen
- Sinkt der Spiegel der Paraform- Lösung in den Schlauch hinein wird distal des Oxygenators abgeklemmt und der Fluss wie oben beschrieben reduziert
- Weitere 0,5 Liter 4%ige Paraform- Lösung werden in das Reservoir gefüllt, der Trichter entfernt und der vom Oxygenator wegführende Schlauch wird an das Reservoir angeschlossen
- Die Pumpe wird wie oben beschrieben gestartet und die Klemme geöffnet
- 30 min. zirkulieren lassen bei einem Fluss von 1 Liter/ min
- Die Klemme setzen und den Fluss stoppen

- Die vom Oxygenator wegführende Leitung vom Reservoir abziehen und die Lösung wie oben beschrieben in ein Auffanggefäß ablaufen lassen bis der Spiegel unter das Reservoir sinkt
- Abklemmen und Fluss auf 0 U/min. herunterfahren

7.6.4 *Spülen mit Phosphat Puffer*

- 1,5 Liter in das Reservoir füllen, die Pumpe anfahren und die Klemme öffnen
- Die PB- Lösung bei einem Fluss von 1 Liter/min. in ein Waschbecken ablaufen lassen
- Ist der Spiegel aus dem Reservoir bis in den Schlauch hineingesunken, wird die Klemme gesetzt und der Fluss gestoppt
- Weitere 1,5 Liter in das Reservoir füllen
- den vom Oxygenator wegführenden Schenkel an das Reservoir anschließen, die Pumpe starten und die Klemme öffnen
- 30 min. zirkulieren lassen bei einem Fluss von 1 Liter/min.
- Die Klemme setzen und den Fluss stoppen
- Die vom Oxygenator wegführenden Schenkel vom Reservoir abziehen, die Pumpe anfahren, die Klemme öffnen und die Lösung in ein Waschbecken ablaufen lassen bis der Spiegel unter das Reservoir sinkt
- Abklemmen und Fluss auf 0 U/min herunterfahren

7.6.5 *Saccharose (10%, 20%, 30%)*

- Wie bezüglich der vorangegangenen Schritte beschrieben, werden zunächst jeweils 500ml der Saccharose- Lösungen durch das System laufen gelassen, die restlichen 500ml zirkulieren für eine halbe Stunde
- Aufsteigend mit 10%iger bis hin zur 30%iger Saccharose- Lösung perfundieren
- Die 30%ige Saccharose im Oxygenator belassen.

7.6.6 *Einfrieren des Oxygenators*

- Zunächst den vom Oxygenator wegführenden Schenkel vom Oxygenator entfernen und auf den Auslauf ein mit 30%iger Saccharose- Lösung gefülltes Blind Tube setzen

- Den Oxygenator so kippen, dass die Sacharose- Lösung den Oxygenator vollständig entlüftet
- Den zum Oxygenator führenden Schlauch und auf den Einlauf ein mit 30%iger Saccharose- Lösung (aus dem Schlauch) gefülltes Blind Tube setzen
- Zunächst wird der Oxygenator bei -20°C eine Nacht lang gelagert und dann bei -80°C eingefroren.

8 Literaturverzeichnis

- Aicher A, Zeiher AM, and Dimmeler S. 2005. Mobilizing endothelial progenitor cells. *Hypertension* 45 (3): 321-5.
- Al-Khazraji BK, Medeiros PJ, Novielli NM, and Jackson DN. 2011. An automated cell-counting algorithm for fluorescently-stained cells in migration assays. *Biol Proced Online* 13 (1): 9.
- Anderson JM, Rodriguez A, and Chang DT. 2008. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol* 20 (2): 86-100.
- Anderson J M. 1988. Inflammatory response to implants. *ASAIO Trans* 34 (2): 101-7.
- Asahara, T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, and Isner JM. 1997. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275 (5302): 964-7.
- BD Bioscience. 2006. *FITC Mouse Anti-human CD45*. San Jose, CA: BD Bioscience. <http://www.bdbiosciences.com/ds/pm/tds/555482.pdf>.
- Bein T, Weber F, Philipp A, Prasser C, Pfeifer M, Schmid FX, Butz B, Birnbaum D, Taeger K, and Schlitt HJ. 2006. A new pumpless extracorporeal interventional lung assist in critical hypoxemia/hypercapnia. *Crit Care Med* 34 (5): 1372-7.
- Benninghoff, A and Drenckhahn D. 2004. *Anatomie 2: Herz-Kreislauf-System, Lymphatisches System, Endokrines System, Nervensystem, Sinnesorgane, Haut*. 16 ed. Ed. Detlev Drenckhahn. München : Urban & Fischer Verlag.
- Bratke K, Küpper M, Luttmann W, and Myrtek D. 2008. *Der Experimentator: Immunologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Bui, KCT, Senadheera D, Wang X, Hendrickson B, Friedlich P, and Lutzko C. 2010. Recovery of multipotent progenitors from the peripheral blood of patients requiring extracorporeal membrane oxygenation support. *Am J Respir Crit Care Med* 181 (3): 226-37.
- Burger W and Burge M. 2009. *Principles of Digital Image Processing : Fundamental Techniques*. London: Springer.
- Burnham EL, Mealer M, Gaydos J, Majka S, and Moss M. 2010. Acute lung injury but not sepsis is associated with increased colony formation by peripheral blood mononuclear cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 43 (3): 326-33.

- Burnham EL, Taylor WR, Quyyumi AA, Rojas M, Brigham KL, and Moss M. 2005. Increased circulating endothelial progenitor cells are associated with survival in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 172 (7): 854-60.
- Camboni D, Philipp A, Lubnow M, Bein T, Haneya A, Diez C, Schmid C, and Müller T. 2011. Support time-dependent outcome analysis for veno-venous extracorporeal membrane oxygenation. *Eur J Cardiothorac Surg* 40 (6): 1341-6;discussion 1346-7.
- Cardullo RA and Hinchcliffe EH. 2007. Digital manipulation of brightfield and fluorescence images: Noise reduction, contrast enhancement, and feature extraction. *Methods in Cell Biology* 81:285-314.
- Combes A, Bacchetta M, Brodie D, Müller T, and Pellegrino V. 2012. Extracorporeal membrane oxygenation for respiratory failure in adults. *Curr Opin Crit Care* 18 (1): 99-104.
- Davies A, Jones D, Bailey M, Beca J, Bellomo R, Blackwell N, Forrest P, et al. 2009. Extracorporeal membrane oxygenation for 2009 influenza A(H1N1) acute respiratory distress syndrome. *JAMA* 302 (17): 1888-95.
- Dejana E, Lampugnani MG, Giorgi M, Gaboli M, Federici AB, Ruggeri ZM, and Marchisio PC. 1989. Von willebrand factor promotes endothelial cell adhesion via an arg-gly-asp-dependent mechanism. *J Cell Biol* 109 (1): 367-75.
- Dornia C, Philipp A, Bauer S, Stroszczynski C, Schreyer AG, Müller T, Koehl G, and Lehle K. 2015. D-dimers are a predictor of clot volume inside membrane oxygenators during extracorporeal membrane oxygenation. *Artif Organs* doi:10.1111/aor.12460.
- Dornia C, Philipp A, Bauer S, Lubnow M, Müller T, Lehle K, Schmid C, et al. 2014. Analysis of thrombotic deposits in extracorporeal membrane oxygenators by multidetector computed tomography. *ASAIO J* 60 (6): 652-6.
- Durcan TM and Hinchcliffe EH. 2007. Digital image files in light microscopy. *Methods in Cell Biology* 81:315-333.
- Elliot SC, Paramasivam K, Oram J, Bodenham AR, Howell SJ, and Mallick A. 2007. Pumpless extracorporeal carbon dioxide removal for life-threatening asthma. *Crit Care Med* 35 (3): 945-8.
- Engel T and Reid P. 2006. *Physikalische Chemie*. München: Pearson Studium.
- Enger T, Philipp A, Videm V, Lubnow M, Wahba A, Fischer M, Schmid C, Bein T, and Müller T. 2014. Prediction of mortality in adult patients with severe acute lung failure

receiving veno-venous extracorporeal membrane oxygenation: A prospective observational study. *Crit Care* 18 (2): R67.

Evening M. 2006. *Adobe Photoshop Für Fotografen : Handbuch Für Professionelle Bildgestalter : [aktuell Zu Photoshop CS2]*. München: Addison-Wesley.

Extracorporeal Life Support Organization. 2015. *ECLS Registry Report*. International Summary, July, 2015. Ann Arbor.

Fischer S, Hoeper MM, Bein T, Simon AR, Gottlieb J, Wisser W, Frey L, et al. 2008. Interventional lung assist: A new concept of protective ventilation in bridge to lung transplantation. *ASAIO J* 54 (1): 3-10.

Flörchinger B, Philipp A, Klose A, Hilker M, Kobuch R, Rupprecht L, Keyser A, et al. 2008. Pumpless extracorporeal lung assist: A 10-year institutional experience. *Ann Thorac Surg* 86 (2): 410-7; discussion 417.

Fluorescence SpectraViewer. <http://de-de.invitrogen.com/site/de/de/home/Products-and-Services/Applications/Cell-Analysis/Labeling-Chemistry/Fluorescence-SpectraViewer.html> (accessed April 26, 2013).

Franceschi C and Bonafè M. 2003. Centenarians as a model for healthy aging. *Biochem Soc Trans* 31 (2): 457-61.

Franz S, Rammelt S, Scharnweber D, and Simon JC. 2011. Immune responses to implants - a review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials. *Biomaterials* 32 (28): 6692-709.

Gartner M J, Wilhelm CR, Gage KL, Fabrizio MC, and Wagner WR. 2000. Modeling flow effects on thrombotic deposition in a membrane oxygenator. *Artif Organs* 24 (1): 29-36.

GE Healthcare Ficoll-Paque products. <http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp01077.nsf/Content/Products?OpenDocument&parentid=666913&moduleid=166511&zone=> (accessed March 10, 2011).

Ginaldi L, De Martinis M, D'Ostilio A, Marini L, Loreto F, Modesti M, and Quaglino D. 2001. Changes in the expression of surface receptors on lymphocyte subsets in the elderly: Quantitative flow cytometric analysis. *Am J Hematol* 67 (2): 63-72.

Ginaldi L, De Martinis M, D'Ostilio A, Marini L, Loreto MF, and Quaglino D. 1999. The immune system in the elderly: III. Innate immunity. *Immunol Res* 20 (2): 117-26.

Gorbet MB and M Sefton MV. 2004. Biomaterial-associated thrombosis: Roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. *Biomaterials* 25 (26): 5681-703.

Goto S, Salomon DR, Ikeda Y, and Ruggeri ZM. 1995. Characterization of the unique mechanism mediating the shear-dependent binding of soluble von willebrand factor to platelets. *J Biol Chem* 270 (40): 23352-61.

Hagemeister E. 2009. Isolierung und charakterisierung von zirkulierenden endothelzellen aus patientenproben bei operation mit extrakorporaler zirkulation. Dissertation, Medizinische Fakultät der Universität Regensburg

Haneya A, Philipp A, Foltan M, Camboni D, Müller T, Bein T, Schmid C, and Lubnow M. 2012. First experience with the new portable extracorporeal membrane oxygenation system cardiohelp for severe respiratory failure in adults. *Perfusion* 27 (2): 150-5.

Harten, U. 2011. *Physik Für Mediziner : Eine Einführung*. 13 ed. Heidelberg: Springer.

HeilmannC, Geisen U, Beyersdorf F, Nakamura L, Benk C, Trummer G, Berchtold-Herz M, Schlensak C, and Zieger B. 2012. Acquired von willebrand syndrome in patients with extracorporeal life support (ECLS). *Intensive Care Med* 38 (1): 62-8.

Hess C, Wiegmann B, Maurer AN, Fischer P, Möller L, Martin U, Hilfiker A, Haverich A, and Fischer S. 2010. Reduced thrombocyte adhesion to endothelialized poly 4-methyl-1-pentene gas exchange membranes—a first step toward bioartificial lung development. *Tissue Eng Part A* 16 (10): 3043-53.

Hoesli SJ, Mead LE, Prater D, Javed MJ, Ingram DA, and Denne SC. 2010. Endothelial colony-forming cells and mesenchymal stem cells from ECMO circuits of term infants. *J Perinatol* 30 (11): 724-30.

Holthöfer H, Virtanen I, Kariniemi AL, Hormia M, Linder E, and Miettinen A. 1982. Ulex europaeus I lectin as a marker for vascular endothelium in human tissues. *Lab Invest* 47 (1): 60-6.

Horton S, Thuys C, Bennett M, Augustin S, Rosenberg M, and Brizard C. 2004. Experience with the jostra rotaflow and quadrox oxygenator for ECMO. *Perfusion* 19 (1): 17-23.

Hristov M and Weber C. 2004. Endothelial progenitor cells: Characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. *J Cell Mol Med* 8 (4): 498-508.

Jaehne B. 2005. *Digital Image Processing : Concepts, Algorithms, and Scientific Applications*. New York, NY: Springer.

Jaffe EA, Hoyer LW, and Nachman RL. 1973. Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells. *J Clin Invest* 52 (11): 2757-64.

Jones KS. 2008. Effects of biomaterial-induced inflammation on fibrosis and rejection. *Semin Immunol* 20 (2): 130-6.

Khoshbin E, Roberts N, Harvey C, Machin D, Killer H, Peek GJ, Sosnowski AW, and Firmin RK. 2005. Poly-methyl pentene oxygenators have improved gas exchange capability and reduced transfusion requirements in adult extracorporeal membrane oxygenation. *ASAIO J* 51 (3): 281-7.

Ko WJ, Hsu HH, and Tsai PR. 2006. Prolonged extracorporeal membrane oxygenation support for acute respiratory distress syndrome. *J Formos Med Assoc* 105 (5): 422-6.

Kroll M H, Hellums JD, McIntire LV, Schafer AI, and Moake JL. 1996. Platelets and shear stress. *Blood* 88 (5): 1525-41.

Krtolica A, Ortiz de Solorzano C, Lockett S, and Campisi J. 2002. Quantification of epithelial cells in coculture with fibroblasts by fluorescence image analysis. *Cytometry* 49 (2): 73-82.

LaIuppa JA, McAdams TA, Papoutsakis ET, and Miller WM. 1997. Culture materials affect ex vivo expansion of hematopoietic progenitor cells. *J Biomed Mater Res* 36 (3): 347-59.

Lehle K, Philipp A, Gleich O, Holzamer A, Müller T, Bein T, and Schmid C. 2008. Efficiency in extracorporeal membrane oxygenation-cellular deposits on polymethylpentene membranes increase resistance to blood flow and reduce gas exchange capacity. *ASAIO J* 54 (6): 612-7.

Lehle K, Philipp A, Müller T, Schettler F, Bein T, Schmid C, and Lubnow M. 2014. Flow dynamics of different adult ECMO systems: A clinical evaluation. *Artif Organs* 38 (5): 391-8.

Lehle K, Friedl L, Wilm J, Philipp A, Müller T, Lubnow M and Schmid C. 2015. Accumulation of multipotent progenitor cells on polymethylpentene membranes during extracorporeal membrane oxygenation. *Artif Organs*, epub ahead of print.

Leica Microsystems. 1997. *Leica DM R Benutzerhandbuch*. Wetzlar.

Lichtman JW and Conchello JG. 2005. Fluorescence microscopy. *Nat Methods* 2 (12): 910-9.

Liebold A, Reng CM, Philipp A, Pfeifer M, and Birnbaum DE. 2000. Pumpless extracorporeal lung assist - experience with the first 20 cases. *Eur J Cardiothorac Surg* 17 (5): 608-13.

- Lim MW. 2006. The history of extracorporeal oxygenators. *Anaesthesia* 61 (10): 984-95.
- Linneweber J, Dohmen PM, Kerscher U, Affeld K, and Konertz W. 2007. Increased von willebrand factor binding to platelets in continuous flowvad: Evidence for shear-induced platelet aggregation. *Cardivascular Science Forum 2007* 2 (4): 12-25.
- Linneweber J, Dohmen PM, Kertzscher U, Affeld K, and Konertz W. 2008. Local glycoprotein iib/iiia receptor inhibitor delivery from the pump surface attenuates platelet adhesion in continuous flow ventricular assist devices. *Artif Organs* 32 (10): 792-9.
- Lollar P. 1991. The association of factor VIII with von willebrand factor. *Mayo Clin Proc* 66 (5): 524-34.
- Lottspeich F und Engels JW. *Bioanalytik*. 2012. 3 ed. Ed. Heidelberg: Spektrum.
- Lubnow M, Philipp A, Foltan M, Enger TB, Lunz D, Bein T, Haneya A, et al. 2014. Technical complications during veno-venous extracorporeal membrane oxygenation and their relevance predicting a system-exchange--retrospective analysis of 265 cases. *PLoS One* 9 (12): e112316.
- De Martinis M, Modesti M, and Ginaldi L. 2004. Phenotypic and functional changes of circulating monocytes and polymorphonuclear leucocytes from elderly persons. *Immunol Cell Biol* 82 (4): 415-20.
- Mason D, Andre P, Bensussan A, Buckley C, and Civin C. 2002. *Leucocyte Typing VII*. Oxford Univ. Press.
- McKinlay J, Chapman S, Elliot S, and Mallick A. 2008. Pre-emptive novalung-assisted carbon dioxide removal in a patient with chest, head and abdominal injury. *Anaesthesia* 63 (7): 767-70.
- Membrana GmbH. 2007. Membrana products for oxygenation. *Membrana Products for Oxygenation*. Wuppertal.
- Muntean W. 1999. Coagulation and anticoagulation in extracorporeal membrane oxygenation. *Artif Organs* 23 (11): 979-83.
- Murphy DB and Davidson MW. 2013. *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging*. Wiley-Blackwell.
- Müller T, Philipp A, Luchner A, Karagiannidis C, Bein T, Hilker M, Rupprecht L, et al. 2009. A new miniaturized system for extracorporeal membrane oxygenation in adult respiratory failure. *Crit Care* 13 (6): R205.

Müller T, Bein T, Philipp A, Graf B, Schmid C, and Riegger G. 2013. Extracorporeal pulmonary support in severe pulmonary failure in adults: A treatment rediscovered. *Dtsch Arztbl Int* 110 (10): 159-66.

Nachman R, Levine, R, and Jaffe EA. 1977. Synthesis of factor VIII antigen by cultured guinea pig megakaryocytes. *J Clin Invest* 60 (4): 914-21.

Niimi Y, Ichinose F, Ishiguro Y, Terui Y, Uezono S, Morita S, and Yamane S. 1999. The effects of heparin coating of oxygenator fibers on platelet adhesion and protein adsorption. *Anesth Analg* 89 (3): 573-9.

Oliver WC. 2009. Anticoagulation and coagulation management for ECMO. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth* 13 (3): 154-75.

Peek GJ, Mugford M, Tiruvoipati R, Wilson A, Allen E, Thalanany MM, Hibbert CL, et al. 2009. Efficacy and economic assessment of conventional ventilatory support versus extracorporeal membrane oxygenation for severe adult respiratory failure (CESAR): A multicentre randomised controlled trial. *Lancet* 374 (9698): 1351-63.

Peek GJ and Firmin RK. 1999. The inflammatory and coagulative response to prolonged extracorporeal membrane oxygenation. *ASAIO J* 45 (4): 250-63.

Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MZ, et al. 2000. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 95 (3): 952-8.

Peinemann K and Pereira-Nunes S. *Membranes for life sciences*. 2008. Weinheim: Wiley-VCH.

Pesenti A, Zanella A, and Patroniti N. 2009. Extracorporeal gas exchange. *Curr Opin Crit Care* 15 (1): 52-8.

Philipp A, Foltan M, Schettler F, Gietl M, Thrum A, Schmidt S, Holzamer A, et al. 2009. Langzeitfunktion von oxygentoren bei extrakorporaler lungenunterstützung. *Kardiotechnik*, no. 1.

Philipp, Alois, Thomas Müller, Thomas Bein, Maik Foltan, Franz-Xaver Schmid, Dietrich Birnbaum, and Christof Schmid. 2007. Inhibition of thrombocyte aggregation during extracorporeal lung assist: A case report. *Perfusion* 22 (4): 293-7.

Photoshop-Hilfe, Hilfe und Tutorials. Adobe Systems Inc.
<http://helpx.adobe.com/content/help/de/photoshop/topics.html> (accessed February 19, 2013).

- Polk AA, Maul TM, McKeel DT, Snyder TA, Lehocky CA, Pitt B, Stolz DB, Federspiel WJ, and Wagner WR. 2010. A biohybrid artificial lung prototype with active mixing of endothelialized microporous hollow fibers. *Biotechnol Bioeng* 106 (3): 490-500.
- Pschyrembel W. 2007. *Pschyrembel® Klinisches Wörterbuch*. Berlin: W. de Gruyter.
- Pulford KA, Sipos A, Cordell JL, Stros WP, and Mason DY . 1990. Distribution of the CD68 macrophage/myeloid associated antigen. *Int Immunol* 2 (10): 973-80.
- Reininger AJ. 2015. The function of ultra-large von willebrand factor multimers in high shear flow controlled by ADAMTS13. *Hamostaseologie* 35 (3)doi:10.5482/HAMO-14-12-0077.
- Reng M, Philipp A, Kaiser M, Pfeifer M, Gruene S, and Schoelmerich J. 2000. Pumpless extracorporeal lung assist and adult respiratory distress syndrome. *Lancet* 356 (9225): 219-20.
- Reséndiz JC, Feng S, Ji G, and Kroll MH. 2004. Von willebrand factor binding to platelet glycoprotein ib-ix-v stimulates the assembly of an alpha-actinin-based signaling complex. *J Thromb Haemost* 2 (1): 161-9.
- Roche Diagnostics. *CASY Modell TTC- Cell Counter and Analyszer*. 2010. Auth. Roche Diagnostics GmbH. www.roche-applied-science.com.
- Romeis B, Mullisch M, and Aescht E. 2010. *Romeis Mikroskopische Technik*. 18. Auflage ed. Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl.. Web.
- Sakariassen KS, Bolhuis PA, and Sixma JJ. 1979. Human blood platelet adhesion to artery subendothelium is mediated by factor viii-von willebrand factor bound to the subendothelium. *Nature* 279 (5714): 636-8.
- Sauer CM, Yuh DD, and Bonde P. 2015. Extracorporeal membrane oxygenation use has increased by 433% in adults in the united states from 2006 to 2011. *ASAIO J* 61 (1): 31-6.
- Schaadt J. 1999. Oxygenator thrombosis: An international phenomenon. *Perfusion* 14 (6): 425-35.
- Schmid C, Philipp A, Mueller T, and Hilker M. 2009. Extracorporeal life support - systems, indications, and limitations. *Thorac Cardiovasc Surg* 57 (8): 449-54.
- Schmidt Martina. 2013. Material Kettfäden. Email correspondance.
- Schullek J, Jordan J, and Montgomery RR. 1984. Interaction of von willebrand factor with human platelets in the plasma milieu. *J Clin Invest* 73 (2): 421-8.

Sidebotham D. 2011. Extracorporeal membrane oxygenation--understanding the evidence: CESAR and beyond. *J Extra Corpor Technol* 43 (1): P23-6.

Sousounis K, Baddour JA, and Tsionis PA. 2014. Aging and regeneration in vertebrates. *Curr Top Dev Biol* 108:217-46.

Spring KA and Davidson MW. 2013. *Introduction to Fluorescence Microscopy*. MicroscopyU - The source for microscopy education. <http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/fluorescenceintro.html> (accessed February 7, 2013).

Spring KR. 2007. Cameras for digital microscopy. *Methods in Cell Biology* 81:171-186.

Stammers AH, Fristoe LW, Christensen K, Deptula J, Sydzyik RT, Zavadil D, and Willett L. 1997. Coagulopathic-induced membrane dysfunction during extracorporeal membrane oxygenation: A case report. *Perfusion* 12 (2): 143-9.

Tarnowski BI, Sens DS, Nicholson JH, Hazen-Martin DJ, Garvin AJ, and Sens MA. 1993. Automatic quantitation of cell growth and determination of mitotic index using DAPI nuclear staining. *Pediatr Pathol* 13 (2): 249-65.

Tauber H, Ott H, Streif W, Weigel G, Loacker L, Fritz J, Heinz A, and Velik-Salchner C. 2015. Extracorporeal membrane oxygenation induces short-term loss of high-molecular-weight von willebrand factor multimers. *Anesth Analg* 120 (4): 730-6.

Thomas ML and Lefrançois L. 1988. Differential expression of the leucocyte-common antigen family. *Immunol Today* 9 (10): 320-6.

Tonks NK, Charbonneau H, Diltz CD, Fischer EH, and Walsh KA. 1988. Demonstration that the leukocyte common antigen CD45 is a protein tyrosine phosphatase. *Biochemistry* 27 (24): 8695-701.

Toomasian JM, Schreiner RJ, Meyer DE, Schmidt ME, Hagan SE, Griffith GW, Bartlett RH, and Cook KE. 2005. A polymethylpentene fiber gas exchanger for long-term extracorporeal life support. *ASAIO J* 51 (4): 390-7.

Valeur B. 2002. *Molecular Fluorescence : Principles and Applications*. Weinheim ; New York: Wiley-VCH.

Visitron Systems GmbH. 2013. *VisiView® Imaging Software*. http://www.visitron.de/Products/Software/VisiView/VisiView_Software.pdf (accessed January 22, 2013).

Weingart C, Lubnow M, Philipp A, Bein T, Camboni D, and Müller T. 2015. Comparison of coagulation parameters, anticoagulation, and need for transfusion in patients on interventional lung assist or veno-venous extracorporeal membrane oxygenation. *Artif Organs* 39 (9): 765-73.

Wendel HP, Philipp A, Weber N, Birnbaum DE, and Ziemer G. 2001. Oxygenator thrombosis: Worst case after development of an abnormal pressure gradient--incidence and pathway. *Perfusion* 16 (4): 271-8.

Wiesenack C, Liebold A, Philipp A, Ritzka M, Koppenberg J, Birnbaum DE, and Keyl C. 2004. Four years' experience with a miniaturized extracorporeal circulation system and its influence on clinical outcome. *Artif Organs* 28 (12): 1082-8.

Yamada M, Kubo H, Ishizawa K, Kobayashi S, Shinkawa M, and Sasaki H. 2005. Increased circulating endothelial progenitor cells in patients with bacterial pneumonia: Evidence that bone marrow derived cells contribute to lung repair. *Thorax* 60 (5): 410-3.

Zangrillo A, Landoni G, Biondi-Zocca G, Greco M, Greco T, Frati G, Patroniti N, Antonelli M, Pesenti A, and Pappalardo F. 2013. A meta-analysis of complications and mortality of extracorporeal membrane oxygenation. *Crit Care Resusc* 15 (3): 172-8.

Zimmermann M, Philipp A, Schmid FX, Dorlac W, Arlt M, and Bein T. 2007. From baghdad to germany: Use of a new pumpless extracorporeal lung assist system in two severely injured US soldiers. *ASAIO J* 53 (3): e4-6.

Zimmermann M, Bein T, Arlt M, Philipp A, Rupprecht L, Mueller T, Lubnow M, Graf B, and Schlitt HJ. 2009. Pumpless extracorporeal interventional lung assist in patients with acute respiratory distress syndrome: A prospective pilot study. *Crit Care* 13 (1): R10.

Zwahr A. 2006. *Brockhaus Enzyklopädie : In 30 Bänden.* Leipzig; Mannheim: F.A. Brockhaus.

Danksagung

Zunächst bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Christof Schmid für die Möglichkeit meine Promotionsarbeit in seiner Klinik für Herz-, Thorax-, und herznahe Gefäßchirurgie erarbeiten zu können.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Karla Lehle für die langjährige, geduldige Betreuung meiner Arbeit. Sie hat mich immer wieder motiviert und bestärkt, diese Arbeit zum Abschluss zu bringen. Für die unermüdliche Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten bin ich ihr sehr dankbar. Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Otto Gleich, Klinik für Hals-, Nasen- und Ohren Heilkunde, für die Vermittlung der methodischen Grundlagen und auch seine geduldige Begleitung dieser Arbeit. Ohne ihn wäre die Erstellung der Arbeit mit dieser Methodik nicht möglich gewesen. Herrn Alois Philipp, Kardiotechniker der Klinik, danke ich für die Akquirierung der untersuchten Oxygenatoren und den Einblick in die Welt der Kardiotechnik, den ich durch ihn erhalten habe. Sara Bergmann, Christina Leykauf, Karin Hollnberger und vor allem Katrin Bielenberg danke für die große Unterstützung bei den Laborarbeiten und die vielen gemeinsamen Stunden im H4.

Zuletzt möchte ich mich auch meiner Familie und meiner Frau Anna für den guten Zuspruch, die seelische Unterstützung und den Verzicht auf so viele gemeinsame Stunden von ganzem Herzen „Danke“ sage.

Lebenslauf

Persönliche Daten	Julius Günther Wilm
	Geboren am 06.04.1986 in Osnabrück
	Verheiratet mit Frau Dr. med. Anna Wilm, eine Tochter Charlotte Marie
Schulausbildung	Gymnasium
1998 – 2005	Gymnasium Carolinum, Osnabrück
2005	Erwerb der allgemeinen Hochschulreife
2002 – 2003	Auslandsschuljahr
	St. Francis Xavier Catholic High School
	Hammond, Ontario, Canada
Zivildienst	Krankenpflege
2005 – 2006	Klinikum Osnabrück, Innere Medizin
Hochschulausbildung	Studium der Humanmedizin
2006 – 2012	Universität Regensburg
2008	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2012	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Famulaturen	
2009	Anästhesie
	Marienhospital Osnabrück
2009	Innere Medizin und Neurologie
	National University Hospital of Singapore
2010	Herz-, Thorax und herznahe Gefäßchirurgie
	Universitätsklinikum Regensburg
2011	Neurologie
	Asklepios Klinik St. Georg Hamburg

Praktisches Jahr

2011	Chirurgie Barmherzige Brüder Regensburg
2012	Innere Medizin Universitätsspital Zürich
2012	Frauenheilkunde und Geburtshilfe Caritas Krankenhaus St. Josef Regensburg

Berufliche Tätigkeit

Seit 2013	Assistenzarzt Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Caritas Krankenhaus St. Josef Direktor: Prof. Dr. med. Olaf Ortmann Lehrstuhl für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Universität Regensburg
-----------	---

Promotionsarbeit

2009 - 2016	Arbeitsgruppe Prof. Dr. Karla Lehle Klinik für Herz-, Thorax und herznahe Gefäßchirurgie Direktor: Prof. Dr. med. Christof Schmid Lehrstuhl der Universität Regensburg
-------------	--

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlung- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation steht. Die Arbeit wurde bisher weder im in- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Julius Günther Wilm

Regensburg, Januar 2016