

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

Beteiligung des von Willebrand Faktors an der Clotbildung
in Membranoxygenatoren einer extrakorporalen
Membranoxygenierung

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

**der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg**

**vorgelegt von
Tamara Rebecca Steiger**

2019

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

Beteiligung des von Willebrand Faktors an der Clotbildung
in Membranoxygenatoren einer extrakorporalen
Membranoxygenierung

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

**der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg**

**vorgelegt von
Tamara Rebecca Steiger**

2019

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Karla Lehle
2. Berichterstatter: PD Dr. Martin Kieninger
Datum der mündlichen Prüfung: 05.11.2019

Für Michel.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Hinführung zum Thema	6
1.2	Extrakorporale Membranoxygenierung: Mechanik des Kreislaufsystems	7
1.3	Beteiligung des vWF an der Thrombusbildung	13
1.4	Projektskizze	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Probenauswertung Teil 1: Identifizierung unterschiedlicher Erscheinungsformen des vWF (auf Basis der Bilder von J. Wilm)	15
2.1.1	Untersuchungsmaterial	16
2.1.2	Fotodokumentation von J. Wilm – verwendetes Material	16
2.1.3	Fotodokumentation von J. Wilm – Bildauswertung	17
2.2	Probenauswertung Teil 2: Erweiterte Färbung von Gasfasern und Fokussierung auf vWF-Strukturen	20
2.2.1	Probenvorbereitung für weiterführende Untersuchungen	20
2.2.2	Mikroskopie der erweiterten Färbungen	22
2.2.3	Verblindung der Proben	24
2.2.4	Identifizierung und Charakterisierung von Kreuzungspunkten auf den Proben	24
2.2.5	Bildauswertung der vWF-Strukturen in verblindeten Proben	28
3	Statistik	29
4	Ergebnisse: Identifizierung von vWF-positiven Strukturen auf Gasaustauschmembranen von Membranoxygenatoren nach Systemwechsel oder Therapieende	30
4.1	Ergebnisse Teil 1: Klassifizierung von vWF-positiven Strukturen anhand der Bilddokumentation von J. Wilm	30
4.1.1	Granuläre Strukturen	31
4.1.2	Flächige Netzbildung - Spiderwebs	31
4.1.3	Fadenartige Strukturen	32
4.1.3.1	Mischform aus Granulum und Faden - Targets	33
4.2	Entblindung der Präparate	34
4.3	Ergebnisse Teil 2: Optimierung der Klassifizierung von vWF-Strukturen auf Gasaustauschmembranen	37
4.3.1	vWF-Fäden	38
4.3.1.1	Ungerichtete Anordnung von vWF-Fäden auf den Gasaustauschmembranen	41
4.3.1.2	Gerichtete Anordnung von vWF-Fäden auf den Gasaustauschmembranen	41
4.3.1.3	Assoziation der vWF-Fäden mit Zellkernen oder Granulae	42
4.3.2	Spiderwebs	43
4.3.2.1	Spiderwebs mit eingelagerten Thrombozyten/Leukozyten	45
4.3.2.2	Spiderwebs mit eingelagerten vWF-Granulae („Targets“)	45
4.3.3	Granulae	46
4.3.3.1	Extrazytoplasmatische Granulae (EZP G)	48
4.3.3.2	Intrazytoplasmatische Granulae (IZP G)	49

4.3.3.3	Gleichzeitiges Auftreten von extra- und intrazytoplasmatischen Granulae	50
4.3.4	P-Selektin positive Zellen	51
4.4	Vorkommenshäufigkeit der unterschiedlichen vWF-Strukturen	52
4.5	Versuch: Beschreiben der Strömungsverhältnisse um die KP anhand der Bilder des Oxygenators #20	56
5	Diskussion	58
6	Zusammenfassung	68
7	Anhang	69
7.1	Manuskript und Poster	69
7.2	Material	84
7.2.1	Hilfsmittel und Analysegeräte	84
7.2.2	Einwegmaterialien	84
7.2.3	Puffer	85
7.2.4	Antikörper	85
7.2.5	Weitere Reagenzien/Chemikalien/Farbstoffe	86
7.3	Protokolle zur Probenvorbereitung	86
7.4	Abbildungsverzeichnis	87
7.5	Tabellenverzeichnis	92
8	Literaturverzeichnis	93

Abkürzungsverzeichnis

ADAMTS-13	<i>a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin-1-like domains</i> 13
ALI	<i>acute lung injury</i>
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrome</i>
AVWS	<i>acquired von willebrand syndrome</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CP	<i>crossing point</i> , Kreuzungspunkt
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ECLS	<i>extracorporeal life support</i>
ECMO	extrakorporale Membranoxygenierung
EZP G	extrazytoplasmatische(s) Granulum/(-ae)
fHb	freies Hämoglobin
FiO ₂	<i>fraction of inspired oxygen</i> , inspiratorische Sauerstoff-Fraktion
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GP	Glykoprotein
GvHD	<i>graft versus host disease</i>
IF	Immunfluoreszenz
IZP G	intrazytoplasmatische(s) Granulum/(-ae)
HMWvWF	<i>high molecular weight von willebrand factor</i>
LTX	Lungentransplantation
MO	Membranoxygenator
MOV	Multiorganversagen
PHT	<i>pump head thrombosis</i> , Pumpenkopfthrombose
PMP	Polymethylpenten
SAB	Subarachnoidalblutung
SIPA	<i>shear induced platelet activation</i>
SW	Spiderwebs
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor α
ULvWF	<i>ultra large von willebrand factor</i>
VA ECMO	venoarterielle extrakorporale Membranoxygenierung
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VV ECMO	venovenöse extrakorporale Membranoxygenierung
vWF	von Willebrand Faktor
WPB	<i>weibel palade bodies</i> , Weibel-Palade-Körperchen

1 Einleitung

1.1 Hinführung zum Thema

In Deutschland wird seit den 1980er Jahren eine Therapie mittels extrakorporaler Membranoxygenierung (ECMO) immer dann in Erwägung gezogen, wenn die Funktion von Herz und/oder Lunge des betroffenen Patienten so stark eingeschränkt ist, dass ein suffizienter Gasaustausch nicht mehr ausreichend gewährleistet ist. Einsatzgebiete der ECMO sind ein respiratorisches Versagen, wie beispielsweise ein akutes Lungenversagen (ARDS), eine chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD), ein terminales hyperkapnisches Lungenversagen im Bridging zur Lungentransplantation oder auch eine „graft versus host disease“ (GvHD) [1][2][3][4]. Kardiale Ursachen können ein kardiogener Schock, eine Lungenarterienembolie oder eine dekompensierte Kardiomyopathie sein [5][6][7]. Außerdem werden die Patienten dank der ECMO-Therapie nicht automatisch intubationspflichtig und bleiben so hinsichtlich therapeutischer Maßnahmen und Entscheidungen häufig einwilligungsfähig. Das Prinzip der ECMO-Therapie basiert auf der Anreicherung des Blutes mit Sauerstoff und der Eliminierung von Kohlenstoffdioxid bei gleichzeitiger Schonung des geschädigten Organs. Ebenso sollte das ECMO-System über Schnittstellen verfügen, um invasive Eingriffe, wie z.B. eine Herzkatheteruntersuchung, zu ermöglichen, sowie mit Messvorrichtungen ausgestattet sein, um Blutfluss, Blutdruck und Sauerstoffsättigung zu überwachen.

Ein Goldstandard für den Einsatz von ECMO gibt es bislang noch nicht. Die CESAR-Studie (*conventional ventilatory support vs extracorporeal membrane oxygenation for severe adult respiratory failure*) zeigte zwar eine Überlegenheit der ECMO über die konventionelle Überdruckbeatmung in Bauchlage, jedoch sind diese Zahlen aufgrund des Studiendesigns kritisch zu interpretieren [1]. Im klinischen Alltag wird die ECMO zum Beispiel bei lebensbedrohlicher Hypoxämie und auch zunehmend in Form einer ECPR (*ECMO cardiopulmonary resuscitation*) bei out-of-hospital-cardiac arrest (OHCA) eingesetzt. Dem Annual International ELSO Registry Report für Juli 2019¹ ist zu entnehmen, dass im Jahr 2019 bisher 21.800 erwachsene Patienten mit einer venösen ECMO (VV ECMO) behandelt wurden. 59% seien erfolgreich therapiert und nach Hause entlassen worden. Bei 9.500 venoarteriellen ECMO-Behandlungen (VA ECMO) konnten 43% der Patienten erfolgreich behandelt werden. Vergleicht man die Zahlen mit 2015 [8] (VV ECMO 57%, VA ECMO 41%), so hält sich das Patienten-Outcome in den letzten 4 Jahren stabil.

Ein großes Problem beim ECMO-Einsatz stellt der massive Eingriff in die Physiologie

¹ online verfügbar unter: <https://www.else.org/Registry/Statistics/InternationalSummary.aspx>, zuletzt geprüft am 13.08.2019

des Blutkreislaufs und der Hämodynamik dar. Der Einsatz von Fremdmaterial in Form von Schlauchsystem, Membranoxygenator (MO) und Pumpe begünstigt thrombotische Ereignisse und beeinträchtigt somit die Funktionalität des Systems [9]. Durch systemische Antikoagulation der Patienten und Heparinbeschichtung der Einzelkomponenten lässt sich die Wahrscheinlichkeit der Thrombusbildung zwar reduzieren, jedoch stellt die Gerinnselbildung an den Kapillaren der Gasfasermembranen des MO noch immer ein Problem dar. Ein effektiver Gasaustausch über die Membranen kann so nicht mehr gewährleistet werden.

Es ist daher Gegenstand der aktuellen Forschung, die physiologischen Aspekte der Blutgerinnung in Zusammenschau mit den chemischen, mechanischen und physikalischen Eigenschaften des ECMO-Systems zu betrachten. Schwerwiegende Komplikationen einer Gerinnungsentgleisung unter ECMO-Therapie - thrombotische Ereignisse und Blutungen gleichermaßen - müssen vermieden werden. Es gilt daher die Ursachen für die Thrombusbildung im ECMO-System zu erforschen und auf Basis dieser Erkenntnisse Mittel und Wege zu finden, die Gerinnselbildung zu mindern und gleichzeitig die Blutungsneigung aufgrund der Antikoagulation so gering wie möglich zu halten.

1.2 Extrakorporale Membranoxygenierung: Mechanik des Kreislaufsystems

Es gibt zwei verschiedene Typen der extrakorporalen Membranoxygenierung. Man unterscheidet die venovenöse ECMO (VV ECMO) und die venoarterielle ECMO (VA ECMO). Die Wahl des passenden Systems ist vor allem abhängig von den Bedürfnissen des Patienten. Die VV ECMO oder „respiratorische“ ECMO findet Einsatz beim schweren hypoxischen Lungenversagen, wohingegen die VA ECMO bei kombiniertem Herz-Lungen-Versagen oder einer Rechtsherzinsuffizienz mit oder ohne Lungenbeteiligung eine gute Option darstellt. Steht eine Hyperkapnie im Vordergrund, fällt die Wahl auf einen niederen Blutflussbereich ($<2,5\text{L}/\text{min}$), da hier die CO_2 -Elimination im Vordergrund steht [10]. Liegt eine kombinierte Eliminations- und Oxygenierungsstörung wie beim hypoxischen Lungenversagen vor, so fällt die Wahl auf ein System mit hoher Blutflussrate ($>3\text{L}/\text{min}$) [10]. Eine individuelle Justierung des Blutflusses ist allerdings notwendig, da sich dieser am Herz-Zeit-Volumen des Patienten orientiert [10].

Durch die Verbesserung des Materials und den Zuwachs an klinischer Erfahrung wird die Indikation zur ECMO-Therapie immer häufiger gestellt. Das Patienten-Outcome jedoch hängt stark von der zu Grunde liegenden Erkrankung ab [11]. In der CESAR-Studie wurde die ECMO-Therapie bei Patienten mit Lungenversagen mit der herkömmlichen Beatmungstherapie verglichen. Für die Prognosestellung wurden beispielsweise der Oxygenierungsindex (FiO_2) und die vorausgegangenen Beatmungstage herange-

zogen [1]. Als Therapieerfolg galt hier das Überleben des Patienten ohne schwere körperliche Einschränkungen [1]. In der EOLIA-Studie (*ECMO to rescue lung injury in severe ARDS*) sollte der Effekt eines früheren Einsatzes der ECMO-Therapie bei Patienten mit schweren Verlaufsformen des ARDS überprüft werden [12]. Hier wurde die Konstitution des Patienten mittels BMI, gezeigter Neurologie, vorausgegangener Langzeitsauerstofftherapie sowie des Gefäßstatus ermittelt und zur Prognosestellung herangezogen [13]. Aktuell folgen weder die Stellung der Therapieindikation, noch die Therapiedauer einer offiziellen Leitlinie. Es gilt der Grundsatz des „no hope for healthy survival“ [14], was so viel bedeutet wie das Miteinbeziehen des Patientenwunsches, die Berücksichtigung möglicher maligner Begleiterkrankungen oder nicht therapierbare, bzw. nicht mit dem Leben vereinbare Komplikationen, wie irreversible Hirnschäden, ein Multiorganversagen oder die fehlende Aussicht auf eine baldige Transplantation [14]. Es gilt daher schon bei Therapiebeginn mögliche Komplikationen in die Therapieentscheidung miteinzubeziehen, um die „bridge to nowhere“, also ein künstliches Aufrechterhalten lebenswichtiger Organfunktionen ohne Aussicht auf Heilung des Patienten, zu vermeiden [15][16].

Ein extrakorporaler Kreislauf besteht aus dem Membranoxygenator, welcher die Lungenfunktion ersetzt, dem Schlauchsystem, den Punktionskanülen und einer Pumpe, welche durch Aufbau eines Unterdrucks das Blut aus dem venösen Schenkel ansaugt. Ausnahme bildet das pECLA-Verfahren (pumpenloser extrakorporaler Lungenersatz), welches den arteriellen Blutfluss allein als Antrieb des Kreislaufs nutzen kann. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten ECMO-Systeme und Pumpen sind in Tabelle 1 aufgelistet [17]. Je nach Hersteller arbeiten die Pumpen flusskontrolliert (*engl. occlusive*) oder druckkontrolliert (*engl. nonocclusive*).

System	PLS-System	Cardiohelp HLS-set	Delta-stream/ Hi-lite7000LT	ECC.O5	iLA-active
Abkürzung	PLS	CH	HL	ECC.O5	ILA
Hersteller	Maquet	Maquet	Xenios	Sorin	Xenios /NovaLung
Wärmetauscher	PU ^a	PU	PET ^b	Stahl	kein
Beschichtung	Bioline [®]	Bioline [®]	Rheoparin [®]	Phisio [®]	x.ellence [®]
Pumpe	Rotaflow (Zentrifugalpumpe)	Rotaflow ^c (Zentrifugalpumpe)	Delta-stream, DP3 (Diagonalpumpe)	Revolution5 (Zentrifugalpumpe)	Delta-stream, DP3 (Diagonalpumpe)

^a Polyurethan; ^b; Polyethylenterephthalat; ^c integrierte Pumpe
Maquet Cardiopulmonary, Rastatt, Deutschland; Xenios/ NovaLung, Heilbronn, Deutschland; Sorin Group, Modena, Italien.

Tabelle 1: ECMO-Systeme und Pumpen der vorliegenden Studie

In Oxygenatoren von Maquet oder Novalung sind die Polymethylpentenmembranen (PMP-Membranen) immer 90° versetzt zueinander gestapelt (s. Abb.1²). Die Gasfasern in Modellen von Xenios oder Sorin hingegen laufen aufgrund der anderen Bauweise schräg zueinander (s. Abb.2³). Eine PMP-Membran wird aus aneinandergelegten Gasfasern gebildet, welche vom Atemgas durchströmt werden. Das Blut des Patienten umspült die Gasfasern ohne dass es zu einem direkten Kontakt von Blut und Gas kommt (s. Abb.3 [18]). Der Gasaustausch findet durch Diffusion über die Membran statt. Die Stärke des Blutflusses richtet sich nach dem Durchmesser und der Länge des Schlauchsystems, sowie dem systemischen Widerstand im Gefäßsystem des Patienten. Auch die Größe der Punktionskanüle, sowie das Kaliber des punktierten Gefäßes spielen eine wichtige Rolle [19]. Nach erfolgter Anreicherung mit Sauerstoff bzw. Eliminierung von CO₂ wird das Blut wieder dem Körper zugeführt. Neben den PMP-Gasfasern verfügt der Membranoxygenator (mit Ausnahme von iLA, Novalung) auch über einen Wärmetauscher, welcher die Körpertemperatur des Patienten regulieren kann.

²Bilddatei aus Beitrag von Science Direct, online verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/membrane-oxygenator>, zuletzt geprüft am 18.06.2019

³Bilddatei aus Beitrag von 3M Sciences, online verfügbar unter: <https://www.membrana.com/technology/makeup/double-layer-cross-wound-mat>, zuletzt geprüft am 18.06.2019

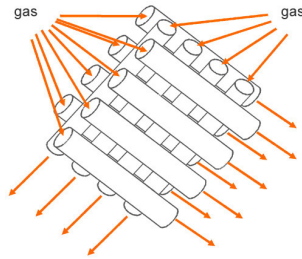


Abbildung 1: Anordnung der Gasfasern im Membranoxygenator der Modelle PLS, Cardiohelp oder iLA-active

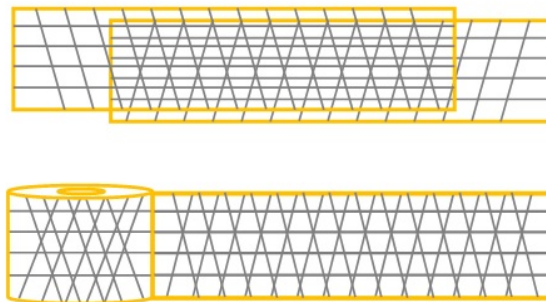


Abbildung 2: Anordnung der Gasfasern im Membranoxygenator der Modelle Hilite7000LT oder ECC.O5

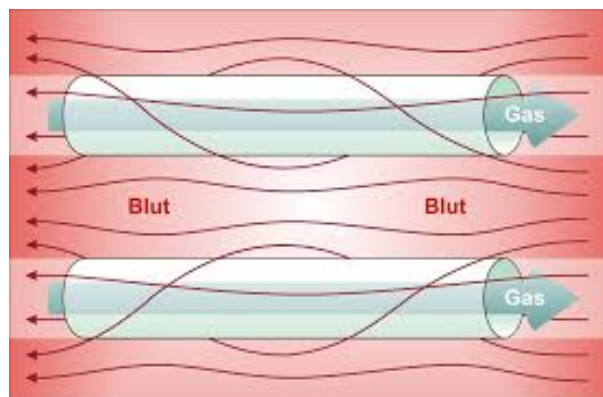


Abbildung 3: Blutfluss um die Gasfasern

Bei erfolgreicher Entwöhnung von der maschinellen Beatmung, früher Rückkehr zur Spontanatmung und Mobilisation von ECMO-Patienten verändert sich das Outcome gegenüber Patienten mit Langzeitüberdruckbeatmung positiv [1]. In der CESAR Studie zeigte sich, dass Patienten, welche unter einem schweren, aber potentiell reversiblen ARDS litten, von einer ECMO-Therapie mehr profitierten als von einer konventionellen mechanischen Beatmung. Unter ECMO-Therapie überlebten 63% der ARDS-Patienten [1], solange alle Parameter sorgsam justiert und das optimale System (VV oder VA) für den Patienten ausgewählt wurden. Hinsichtlich des Studiendesigns müssen die Ergebnisse der CESAR-Studie allerdings kritisch gesehen werden. Bei der

Auswahl der Patienten sei es möglicherweise zu einem Bias gekommen, zum anderen müssen Confounder berücksichtigt werden - so waren die Patienten zur Therapie in eine spezialisierte Einrichtung verlegt worden [20].

Neben allen Vorteilen für den Patienten bleibt die extrakorporale Membranoxygenierung ein rein mechanischer Ersatz der körpereigenen Gasaustauschfunktion. Eine Komplikation, wie sie bereits beim mechanischen Herzklappenersatz beschrieben wurde, ist die mechanische Hämolyse der Erythrozyten. Im ECMO-Kreislauf erfolgt die Hämolyse durch die Rotorblätter, welche sich durch die Erhöhung des freien Hämoglobins (fHb) im Patientenblut äußert [21]. Es konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass bei korrekt angewandter VV ECMO-Therapie eine technisch induzierte Hämolyse unwahrscheinlich ist [21]. Bei Vorliegen einer Pumpenkopfthrombose jedoch zeigte sich laborchemisch ein Anstieg von fHb im Patientenblut auf vierstellige Werte [21]. Zusätzlich lysiert auch der von der Pumpe generierte Unterdruck (mit Ausnahme von iLA, Novalung) zelluläre Blutbestandteile. Übersteigt der Unterdruck (zum Beispiel in einem flusskontrollierten System) einen Wert von -100 bis -200mmHg, kann das Freiwerden der intrazellulär gespeicherten Gase durch Zellyse zu Mikrogasembolien (*engl. gaseous microemboli*, GME) führen. Bei Unterdrücken von -250mmHg oder höher steigt das Risiko für Luftembolien [14].

Der extrakorporale Kreislauf präsentiert darüber hinaus eine große Materialoberfläche, welche vom Immunsystem des Patienten als körperfremd erkannt wird. Untersuchungen zeigten, dass der fremdmaterialassoziierten Aktivierung der Gerinnungskaskade immer zuerst eine Adhäsion von Plasmaproteinen an die körperfremde Oberfläche zugrunde liegt [22][23]. Es kommt zur Ablagerung von Fibrin und Fibronectin sowie thrombotischen Aggregaten [9][24]. Körper eigene Thrombozyten erkennen die Oberflächenstrukturen dieser Plasmaproteine, adhären, aggregieren und induzieren so die Thrombusbildung. Folge kann eine Verbrauchskoagulopathie sein. Neben der Rekrutierung von Thrombozyten kann auch eine Entzündungsreaktion durch die Ausbildung von Thrombozyt-Leukozyt-Koaggregaten getriggert werden [25].

Die Pumpe des ECMO-Systems erzeugt einen kontinuierlichen Blutfluss. Thrombotische Ablagerungen aber verändern die physikalischen Verhältnisse im Oxygenator. Im druckgesteuerten System würde in Folge der Ablagerungen der Widerstand im Oxygenator steigen und bei gleichbleibender Leistung der Pumpe somit der Blutfluss abnehmen. Im flussgesteuerten System muss die Pumpe in Folge des gesteigerten Strömungswiderstandes höhere Drücke generieren, um einen konstanten Fluss zu gewährleisten. Dies könnte zu einer mechanischen Überhitzung der Pumpe führen oder zu einer Pumpenobstruktion, was einen retrograden Blutfluss zur Folge hätte [14].

Gleichzeitig behindern größere Ablagerungen auch den Gasaustausch [9]. Das thrombotische Material auf den Gasfasern verlängert die Diffusionsstrecke zwischen Blut und Gaskapillare und erschwert den Gasaustausch über die Membran [9]. Der Ein-

satz von Gerinnungshemmern wie unfraktioniertem Heparin dient dem Versuch die körpereigenen antithrombotischen Mechanismen zu unterstützen und die Gerinnungsbildung im ECMO-System zu verlangsamen. Trotz antithrombotischer Beschichtung des Systems (z.B. Heparin, Phosphorylcholin) und der Antikoagulation des Patienten kommt es unabhängig von der Dauer der ECMO-Therapie dennoch zur Bildung von Ablagerungen auf den PMP-Membranen. Es wird sogar angenommen, dass die Beschichtung des ECMO-Systems mit Heparin die Ablagerung von Fibronektin auf den Gasfasern zusätzlich begünstigt [26].

An der Blutgerinnung sind eine Reihe von Proteinen, Gerinnungsfaktoren und Proteasen beteiligt, welche unter Normalbedingungen ein Gleichgewicht zwischen Thrombusbildung und Thrombolysis einstellen [27][28][29]. Da eine ECMO-Therapie dieses Gleichgewicht nachweislich beeinflusst [30][31][32], besteht ein möglicher Ansatz zur Verbesserung der Membranoxygenierung darin, die Gerinnung unter Berücksichtigung einzelner Komponenten der Blutgerinnung zu analysieren. Der komplexe Mechanismus der Hämostase basiert auf dem Zusammenspiel von zellulären und azellulären Blutbestandteilen [33]. Eine zentrale Rolle in der Blutgerinnung spielt der von Willebrand Faktor (vWF) [34][35], da er sowohl in Thrombozyten als auch in Endothelzellen [36][37][38][39][40] gespeichert wird und sowohl bei Kontakt von Thrombozyten mit subendothelialer Matrix (z.B. bei einer Gefäßverletzung) [41] als auch bei Thrombozyt-Leukozyt-Bindungen (z.B. bei Entzündung) [42][43] freigesetzt wird. Durch die Invasivität der ECMO-Therapie sind sowohl traumatische [44], als auch inflammatorische Aspekte [45] erfüllt. Daher wurde besonderes Augenmerk auf die Rolle des vWF an der Thrombusbildung im Membranoxygenator (MO) gerichtet.

Mehrere Studien zur Hämodynamik zeigten, dass nach einer Gefäßschädigung die Freisetzung des vWF aus Endothelzellen zur Thrombozytenrekrutierung und Aktivierung des Faktors VIII der Gerinnungskaskade führt und so zur primären Hämostase beiträgt [27][33][41]. In-vitro Studien zeigten, dass vWF die Fähigkeit besitzt, fadenartige Strukturen auszubilden, welche Thrombozyten an ihre Oberfläche binden können [46][47][48][49]. Herbig und Diamond [46] konnten zeigen, dass freigesetzte vWF-Multimere unter Einfluss hoher Scherkräfte untereinander Quervernetzungen ausbilden und zum Längenwachstum befähigt sind. Außerdem hatten diese Fasern einen elastischen Charakter. Die Fähigkeit zur Retraktion war vergleichbar mit der Elastizität von Fibrinfäden. Faserdurchmesser, -anzahl und -länge wuchsen proportional zu den vorherrschenden Scherkräften. Getestet wurden im Versuchsaufbau Scherraten von 5.000 -10.000/s, wobei die Fasern bei 10.000/s am deutlichsten zu erkennen waren [46]. Da derart hohe Scherkräfte aber im gesunden Organismus nicht auftreten [50], sich aber bei Sichtung der Membranoxygenatoren fadenartige Strukturen auf den PMP-Membranen zeigten, ist davon auszugehen, dass das ECMO-System

Scherkräfte generiert, welche eine vWF-Fadenbildung induzieren können. Unter Berücksichtigung der Erkenntnisse zu den Auswirkungen von Strömungsgeschwindigkeit und Strömungswiderstand auf den vWF [50][51][52][53] und dem Einfluss von thrombotischen Ablagerungen im ECMO-System [54] auf diese beiden Parameter, lässt sich also ein direkter Zusammenhang zwischen der vorherrschenden Form des vWF und den physikalisch-mechanischen Bedingungen im MO vermuten. Inwieweit diese Zusammenhänge auch auf wissenschaftlicher Ebene beweisbar sind, soll im Folgenden erörtert werden.

1.3 Beteiligung des vWF an der Thrombusbildung

Der vWF lässt sich im menschlichen Körper in den Zellen des Gefäßendothels nachweisen, genauer in den Weibel-Palade-Körperchen (*engl. weibel-palade-bodies*, WPB) [37][38], in welchen der vWF aufgrund des niedrigen pH-Wertes in geknäulter Form vorliegt [55][56][57]. Außerdem findet man den vWF in den α -Granulae von Megakaryozyten [39] und den zellkernlosen Thrombozyten. Auslöser für die Freisetzung von vWF aus den Endothelzellen ist eine Aktivierung des Endothels durch Mediatoren wie Thrombin, Histamin, VEGF, Fibrin und $TNF\alpha$ [50]. Auch Tumorzellen können Endothelzellen stimulieren [58]. In den WPB liegt der vWF als ultra-large vWF (ULvWF) vor [38]. Die A1-Domäne ist wesentlich für die Bindung an den GPIIb α -Rezeptor auf Thrombozyten verantwortlich [59] und somit unverzichtbar für die Bindung von Thrombozyten an den vWF (s. Abb.4 [60]) [57]. Insbesondere dann, wenn sehr hohe Scherkräfte im Gefäßsystem wirken, ist die A1-GPIIb α -Bindung als einzige ausreichend stark genug, um eine Thrombozytenadhäsion an den vWF noch zu gewährleisten [57][61].

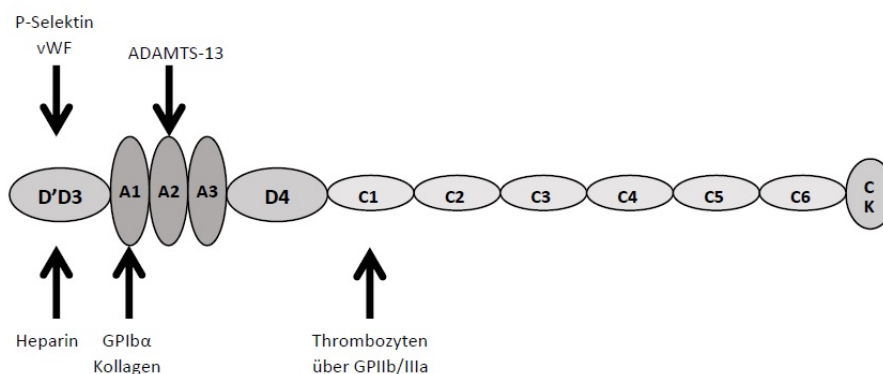


Abbildung 4: Proteinstruktur des vWF mit Bindungsstellen und Angriffspunkt für die spezifische Protease ADAMTS13

Die A2-Domäne dient als Angriffspunkt für eine zinkhaltige Disintegrin- und Metalloprotease mit Thrombospondin-Typ-1-Motiv 13 (ADAMTS-13, s. Abb. 4 [60]) [62][63][64],

welche größenregulierend auf den vWF wirkt. Im geknäulten Zustand sind jedoch beide Bindestellen nicht zugänglich (s. Abb.5⁴) [57]. Erst durch Exozytose und Verankerung des vWF auf der Endotheloberfläche mittels $\alpha 5\beta 3$ -Integrin-Anker [65] kann die Strömung des Blutes den vWF mechanisch linearisieren und durch den pH-Anstieg [55][56] können durch Deprotonierung des Moleküls ionische Wechselwirkungen innerhalb des vWF-Proteins überwunden werden, sowie Disulfidbrücken (S-S) gespalten werden [57]. So kann der vWF in eine lineare Konformation überführt werden (s. Abb.5³) [57]. In der linearen Konformation spricht man auch vom „aktivierten vWF“ [57][66]. Sobald die A2-Untereinheit für ADAMTS-13 zugänglich ist, spaltet die Protease den vWF vom Endothel ab. Danach geht dieser von seiner endothelialen (e-vWF) in seine lösliche Struktur (soluble vWF, s-vWF) über [57].

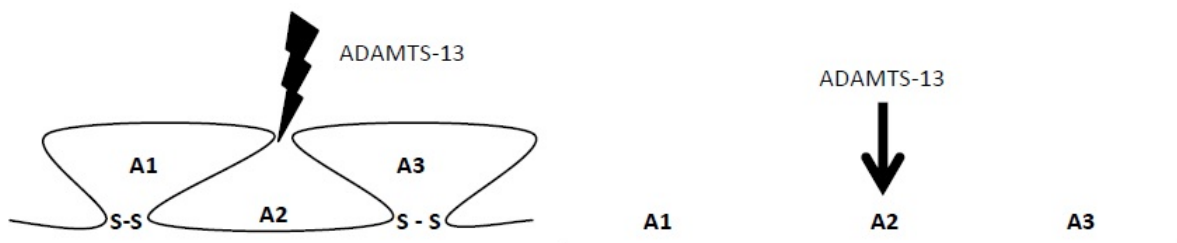


Abbildung 5: Konformationsänderung des vWF von der geknäulten zur linearisierten Struktur

In der s-vWF Konformation liegt der vWF in geknäulter Form vor, was ihn vor der Spaltung durch die ADAMTS-13 Proteinase schützt [57]. Ist s-vWF in ausreichend hoher Konzentration vorhanden, kommt es durch Freisetzung von verschiedenen Mediatoren aus verletztem Endothel zur Konglomeratbildung mehrerer s-vWF-Aggregate untereinander und zur weiteren Rekrutierung von Thrombozyten. Durch diese Reaktivierung [67] des vWF erhält auch ADAMTS-13 wieder die Möglichkeit an die A2-Domäne anzudocken. Durch weiteres Spalten wird der vWF schließlich inaktiviert und über Leber und Milz abgebaut [68]. Es besteht also ein sensibles Gleichgewicht zwischen vWF-Freisetzung aus dem Endothel und dem Abbau durch ADAMTS-13 [57].

1.4 Projektskizze

Die Studie wurde vom Ethikkommittee der Universität Regensburg genehmigt. Das entsprechende Ethikvotum (# 106-336-104) liegt vor.

Das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Erstellung von Kriterien zur Charakterisierung von vWF-Strukturen auf den Gasaustauschmembranen, welche mittels Immunfluoreszenzfärbung (IF-Färbung) unter dem Mikroskop sichtbar gemacht werden

⁴Bilddatei aus Beitrag von Glycoforum, online verfügbar unter: <https://www.glycoforum.gr.jp/glycoword/teoglycan/PGB07E.html>, zuletzt geprüft am 18.06.2019

können. Hierzu wurden zunächst Mikroskopaufnahmen von 53 Membranoxygenatoren aus der Dissertation von J. Wilm, welche mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, Kernfärbung) und Antikörpern gegen vWF und CD45 (Leukozytenmarker) gefärbt wurden, ausgewertet. In einem zweiten Schritt wurde versucht, die Strukturen hinsichtlich Form, Auftretenshäufigkeit und Lokalisation im Membranoxygenator zu analysieren und durch Vergleich der Oxygenatoren mögliche Rückschlüsse auf deren Entstehung zu ziehen.

Desweiteren wurden alle bislang asservierten Membranoxygenatoren (n=57) hinsichtlich vWF-Strukturen verblindet analysiert. Eine Färbung der Membranoxygenatoren mit anti-vWF und anti-CD62P (P-Selektin, Thrombozytenmarker) sollte die Beteiligung von aktivierten Thrombozyten an der Thrombenbildung aufzeigen, welche über P-Selektin-Bindungen an den vWF-Fasern anhaften. Die DAPI-Färbung lieferte zusätzliche Informationen zur Interaktion des vWF mit kernhaltigen Zellen. Herbig und Diamond [46] beschrieben, dass die sogenannte „shear-induced platelet activation“ (SIPA) und die damit einhergehende Freisetzung von P-Selektin erst ab Scherkräften von 3000/s beobachtet werden kann. Somit wäre der Nachweis von P-Selektin-positiven Thrombozyten auf den Oxygenatormembranen ein weiterer Hinweis für das Vorherrschen unphysiologischer Flussbedingungen im Oxygenator.

2 Material und Methoden

2.1 Probenauswertung Teil 1: Identifizierung unterschiedlicher Erscheinungsformen des vWF (auf Basis der Bilder von J. Wilm)

In einer früheren Studie von J. Wilm wurde nachgewiesen, dass sich auf den Gasaustauschmembranen von Polymethylpenten-Membranoxygenatoren kernhaltige Zellen ablagern, die als Leukozyten (CD45-positiv) identifiziert wurden [69]. In diesem Zusammenhang wurden als Zufallsbefund faser- und netzartige Strukturen auf diesen Gasaustauschmembranen detektiert, die mittels spezifischer Färbung eindeutig vWF-positiv waren. Neben diesen ausgedehnten dreidimensionalen Strukturen waren auch kleinere „körnige“ vWF-positive Ablagerungen nachweisbar.

Da ursprünglich nur ein kleiner Teil einer Gasfasermatte in der Mitte des Oxygenator-kerns gefärbt und analysiert wurde, kann diese Klassifizierung nur einen ersten Eindruck über möglichen Strukturen liefern. Der Vorteil dieser Fotodokumentation war, dass ursprünglich nach Endothelzellen (also körnige vWF-Strukturen im Zytoplasma von kernhaltigen Zellen) und nicht gezielt nach intra- oder extrazellulär lokalisierten vWF-Strukturen gesucht wurde, was ausschließt, dass der Operator nur diese Struk-

turen fotografiert hat.

Aus der klinischen Beobachtung heraus, dass die Verweildauer von Oxygenatoren am Patienten bis zu 30 Tagen betragen kann, stellte sich damals die Frage, ob diese Oxygenatoren durch in-vivo Endothelialisierung eine bessere Hämokompatibilität aufweisen als Oxygenatoren mit kurzen Laufzeiten. In der Arbeit von J. Wilm konnte dies nicht bestätigt werden. Es findet keine in-vivo Endothelialisierung am Patienten statt [69].

2.1.1 Untersuchungsmaterial

Als Untersuchungsmaterial dienten Proben einer vorangegangenen Studie [69]. Die Probenakquise und -vorbereitung wurden dort ausführlich beschrieben. An dieser Stelle seien die wichtigsten Punkte genannt.

Im Zeitraum von 16.04.2008 bis 12.03.2012 wurden sporadisch 57 Membranoxygenatoren, die aufgrund klinischer Notwendigkeit (entweder Wechsel aufgrund Gastransferproblemen oder Ende der Therapie) vom Patienten genommen wurden, gesammelt, ins Labor transferiert und mit 10L physiologischer 0,9%iger Kochsalzlösung gespült (1,5L/min). Hierbei wurde darauf geachtet, dass das System entlüftet war und sich keine Luftblasen im Oxygenator sammelten. Anschließend wurde Paraformaldehyd (4%) eingeleitet, welches 30min lang bei 1,5L/min Flussrate im Oxygenator zirkulierte. Auch hier musste wieder darauf geachtet werden, dass das System keine Raumluft zieht. Danach wurde 30min mit Phosphatpuffer (PB) gespült. Um die Oxygenatoren für die Lagerzeit im Gefrierschrank vorzubereiten und dafür zu sorgen, dass die enthaltenen Zellen durch das Einfrieren nicht platzen, folgte eine Aufsättigung mit Saccharose. In drei Spülschritten von je 30min wurde 10%, 20% und 30%ige Saccharose-Lösung durch den Oxygenator gespült. Anschließend wurden alle Schläuche entfernt, die Anschlüsse verschlossen und der Oxygenator bei -80 °C eingefroren. In gefrorenem Zustand wurde zuerst das Gehäuse entfernt und der Oxygenator dann mit Hilfe einer Tisch-Knochensäge („Robusta SO 23 CE“, Firma ADE) in 9 gleich große Blöcke zerteilt. Bis zur Weiterverarbeitung lagerten die beschrifteten Oxygenatorteilstücke im Gefrierschrank bei -80 °C in Aluminiumfolie eingeschlagen, um sie vor Austrocknung zu schützen.

2.1.2 Fotodokumentation von J. Wilm – verwendetes Material

Wie aus der Dissertation von J. Wilm hervorgeht, wurde damals aus dem mittleren Block eine Gasfasermatte (=Probe) herausgenommen, aufgetaut, zurechtgeschnitten (0,5cm x 1cm Kantenlänge) und mit Antikörpern (CD45, Leukozytenmarker; vWF, Endothelzellmarker) und DAPI (Kernmarkierung) für die anschließende Immunfluoreszenzfärbung (IF) versetzt. Im Zuge dieser Arbeit wurden verschiedene Stellen der Proben in 3 Fluoreszenzkanälen aufgenommen (CD45-FITC, grün; vWF-TexasRed, rot; DAPI,

blau). Es existieren Aufnahmen in hoher Vergrößerung (400x), mittlerer Vergrößerung (200x) und als Übersicht (50x) (s. Tab.2).

Vergrößerung	Nutzbarkeit
50x	Übersicht, Verteilung der vWF-positiven Strukturen und der Leukozyten
200x	Darstellung der Kontaktpunkte zwischen den Kettfäden (Kreuzungspunkte); Form, Größe, Lokalisierung der vWF-positiven Strukturen entlang der Gasfasern
400x	Klassifizierung der vWF-positiven Strukturen

Tabelle 2: Fotodokumentation von J. Wilm

Übersichtsaufnahmen zu den Oxygenatoren dienten lediglich als Orientierung. Sie spiegeln die Verteilung der Leukozyten entlang der Gasfasern wider. Damit wurde auch das Vorhandensein der Kreuzungspunkte (Beschreibung siehe unten) dokumentiert. Die Detailaufnahmen (400x Vergrößerung, Bildgröße 0,07mm², s. Tab.3) sollten eine genauere Klassifizierung der vWF-Strukturen erlauben. Für die vorliegende Bildanalyse wurden 387 Aufnahmen aus der Dissertation von J. Wilm in 400-facher Vergrößerung betrachtet.

Objektiv	Auflösung	Breite/Höhe	Fläche des Bildausschnitts
5x Objektiv	1,5µm/Pixel	2400µm/1800µm	4,31mm ²
20x Objektiv	0,4µm/Pixel	600µm/450µm	0,27mm ²
40x Objektiv	0,2µm/Pixel	300µm/225µm	0,07mm ²

Tabelle 3: Objektive des Mikroskops und Bildmaße

2.1.3 Fotodokumentation von J. Wilm – Bildauswertung

Betrachtet wurden DAPI-positive Zellkerne, um einen Eindruck von der Zelldichte und somit der Besiedelung der Gasfasern zu erhalten. Um die Leukozytendichte auf den Gasfasern des Präparates näherungsweise zu bestimmen, wurden die Zellkerne pro Bildausschnitt gezählt. Da pro Präparat unterschiedlich viele Aufnahmen gemacht wurden, wurde die Gesamtzellzahl aller Aufnahmen eines Präparates gemittelt. Die Fläche eines Bildausschnittes in 400x Vergrößerung ist aus der Dissertation von J. Wilm bekannt und beträgt 0,07mm². Die Zelldichte des Präparates ergibt sich also aus der Gesamtzellzahl / (0,07mm² * Anzahl der Bilder). Tabelle 4 zeigt einige Beispiele zur Besiedelung von Gasaustauschmembranen mit Leukozyten (Übersichtsaufnahmen 50x)

und die Berechnung der Zelldichte auf den 400x vergrößerten Bildausschnitten im entsprechenden Präparat.

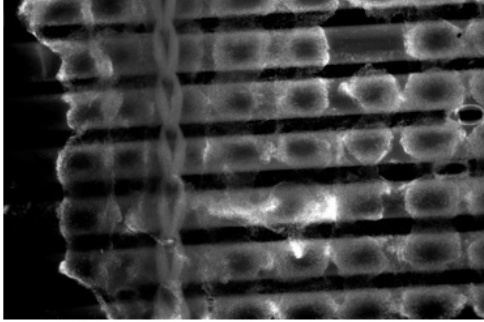
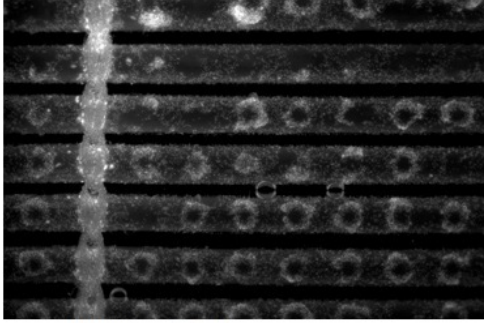
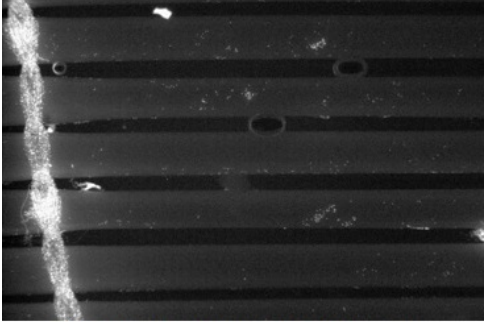
Übersichtsaufnahmen (50x)	Bestimmung der Zelldichte in 400x vergrößerten Bildausschnitten
 <p>Pseudomembranen</p>	<p>Anzahl Bilder: 4</p> <p>Summe Zellkerne: 120</p> <p>MW ZK/Bild: 30</p> <p>ZK/mm²: 448</p>
 <p>Dichter Zellrasen</p>	<p>Anzahl Bilder: 7</p> <p>Summe Zellkerne: 161</p> <p>MW ZK/Bild: 23</p> <p>ZK/mm²: 343</p>
 <p>Geringe Zellbesiedelung</p>	<p>Anzahl Bilder: 4</p> <p>Summe Zellkerne: 42</p> <p>MW ZK/Bild: 10,5</p> <p>ZK/mm²: 156</p>

Tabelle 4: Übersichtsaufnahmen (DAPI-Färbung) dreier Präparate (50x Vergrößerung) und zugehörige Berechnung der Zelldichte in den 400x vergrößerten Bildausschnitten des entsprechenden Präparates. Die Besiedelung der Gasfasermatten mit Zellkernen variiert. Oben: Starke Besiedelung mit Ausbildung von Pseudomembranen (bei 5/53 Oxygenatoren), Kreuzungspunkt ausgespart. Mitte: Moderate Besiedelungsdichte, Kreuzungspunkte sind noch erkennbar. Unten: Spärliche oder fehlende Besiedelung, Kreuzungspunkte nicht mehr erkennbar.

Wie den Abbildungen aus Tabelle 4 zu entnehmen ist, variierte die Zellzahl stark zwischen einzelnen Oxygenatoren. Auf manchen Gasfasermembranen waren wenig bis keine Zellkerne zu finden (Tab.4, Abb. unten), auf anderen fand sich ein „Zellrasen“ welcher sich teilweise beim Abheben der Gasfasermatten ablöste. Zeigte sich dieses Phänomen, wurde dies als „Pseudomembranen“ (Tab.4, Abb. oben) bezeichnet.

Nach Bestimmung der Zelldichte erfolgte die Charakterisierung der vWF-Strukturen hinsichtlich ihrer Form, Größe und Vorkommenshäufigkeit. Außerdem wurde besonderes Augenmerk auf die direkte Umgebung der vWF-positiven Strukturen gelegt. Die Auswertung der Fotodokumentation erfolgte mittels Adobe Photoshop CS5. Für eine detaillierte Beschreibung des Verfahrens zum „Merging“ der Einzelkanalbilder siehe Dissertation von J. Wilm. Für die Interpretation der Fotos mit 400x Vergrößerung war es notwendig, die einzelnen Kanäle auch getrennt voneinander betrachten und analysieren zu können. Zu Beginn der Auswertung wurde durch alle 3 Kanäle gefächert, um Informationen über die Lagebeziehungen der einzelnen immunfluoreszenzgefärbten Strukturen zu erhalten. Mögliche Konstellationen wären hierbei, dass

- die Zellkerne in ein Netz aus vWF-positiven Fasern eingebettet sind,
- sich Zellhaufen gebildet haben, welche von einzelnen vWF-positiven Fäden durchzogen sind,
- sich stark fluoreszierende vWF-Gebilde ablagern, welche sich zu einem Clot verdichtet und einzelne Zellkerne eingeschlossen haben,
- die Zellkerne auf der Membran diffus verstreut liegen und keinen direkten Bezug zu vWF-positiven Strukturen aufweisen, da sie sich in höher- oder tieferliegenden Fokusebenen befinden.

Im Anschluss daran erfolgte die separate Analyse der einzelnen Kanäle. Der blaue Kanal entspricht der DAPI-Kernfärbung. Die Verteilung der Zellkerne über den Bildausschnitt ist Teil der Analyse der Lagebeziehungen, welche oben bereits beschrieben wurde.

Der grüne Kanal entspricht der CD45-Färbung, welcher ein membranständiges Glykoprotein hämatopoetischer Stammzellen markiert. Da die Bilder ursprünglich in einem anderen Studiendesign generiert wurden, spielt dieser Kanal für die Auswertung des vWF eine untergeordnete Rolle und wird daher vernachlässigt.

Der rote Kanal entspricht der vWF-Färbung. Nach Sichtung aller Aufnahmen lassen sich wiederkehrende Formen und Muster erkennen, welche zusammengefasst und im Folgenden erläutert werden.

1. Granuläre Strukturen (s. Abb.6A)

2. Flächige Netzbildungen - Spiderwebs (s. Abb. 6B)
3. Fadenartige Strukturen (s. Abb.6C)
4. Mischform aus Granulum und Spiderweb - „Targets“ (s. Abb.6D)

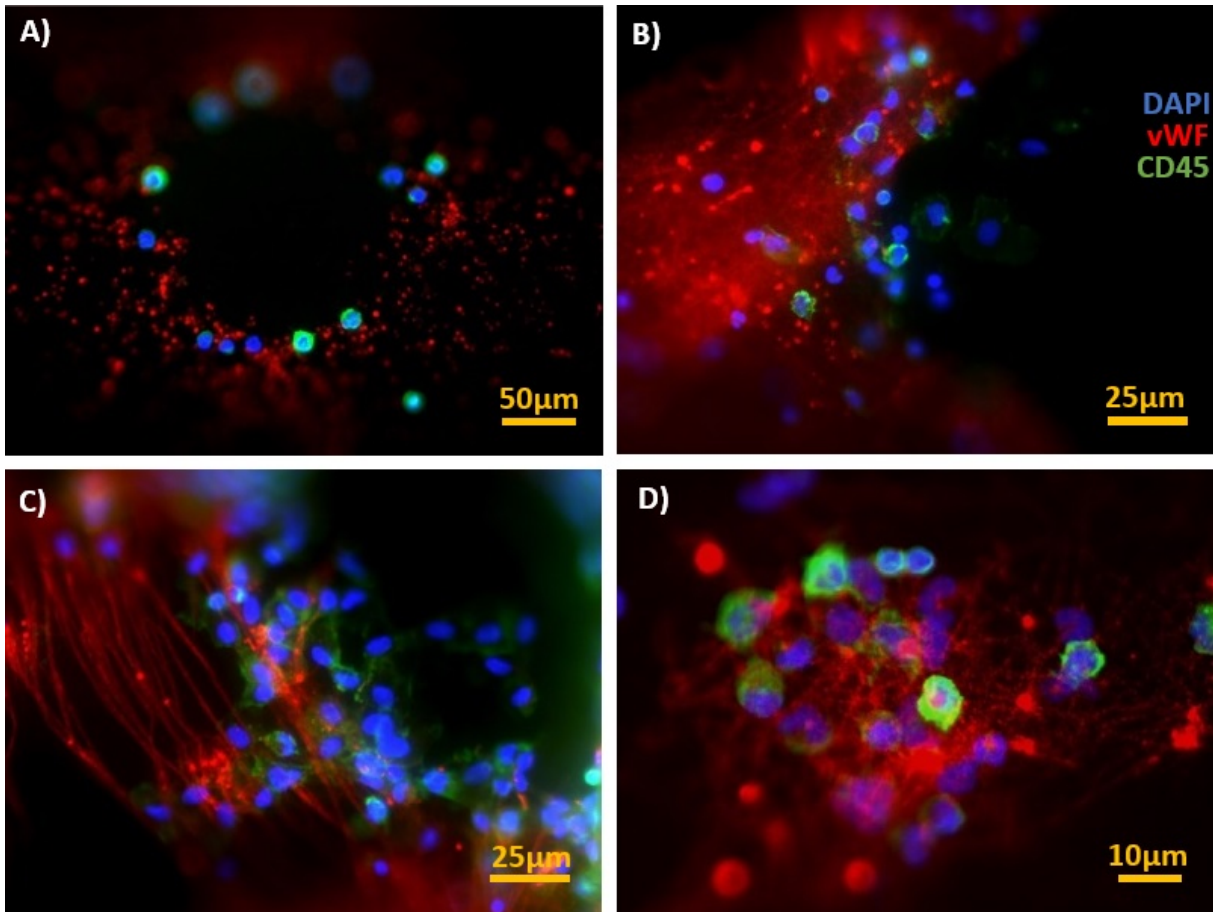


Abbildung 6: Übersicht über die vWF-Strukturen der Bilddokumentation von J. Wilm.
 Bild A: Kreuzungspunkt mit typischer Aussparung in der Mitte. Herum sind granuläre vWF-Strukturen (rot) angeordnet, vermischt mit einzelnen Zellkernen (blau), von denen einige als Leukozyten (grün) identifiziert werden können. Bild B: Flächige, vWF-positive Struktur (rot), welche ähnlich einem Spinnennetz quervernetzt ist und Zellen in diese dreidimensionale Struktur einlagert. Bild C: Kreuzungspunkt angeschnitten, identifizierbar durch die Aussparung am rechten oberen Bildrand. Vom linken Pol des Kreuzungspunktes ziehen vWF-positive fadenartige Strukturen parallelverlaufend nach unten. Auch hier sind Zellkerne angelagert. Bild D: Netzartiger vWF wie in Bild B mit zusätzlichen vWF-Granularen, „Target“.

2.2 Probenauswertung Teil 2: Erweiterte Färbung von Gasfasern und Fokussierung auf vWF-Strukturen

2.2.1 Probenvorbereitung für weiterführende Untersuchungen

Für die vorliegende Arbeit wurden neue Präparate aus einem willkürlich ausgewählten Block im Oxygenator verwendet und neu gefärbt (s. 2.1.1, 2.1.2).

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurde ein Block aus einem eingefrorenen Membranoxygenator aufgetaut. Die obersten vier Membranen wurden verworfen. Die fünfte Membran wurde abgenommen und für die Färbung vorbereitet. In einer Petrischale mit PBS wurde die Membran für die Auslage auf dem Objektträger zugeschnitten. Als Richtwert galten drei Kettfäden in Reihe und 10 Gasfaserröhrchen in der Länge. Bei manchen Präparaten waren nur 2 Kettfäden mit größerem Abstand vorhanden (stammen aus Hilite 7000LT oder ECC.O5 Oxygenatoren). Die Probenabmessungen wiesen Kantenlängen von 1,5cm x 0,5cm auf. Die zugeschnittenen Membranen wurden mit einer Pinzette in 500µL Eppendorfreaktionsgefäße überführt und mit PBS dreimalig gewaschen, um die Zuckerlösung auszuspülen.

Nach dem Waschen wurden die Proben für 30min in 10% NDS (Normal Donkey Serum, Sigma, D-9663) in PBST (PBS + 0,1% Triton-X 100) inkubiert (Blockierung unspezifischer Bindungen), erneut in PBS gewaschen und mit den Primärantikörpern (s. Tab.5) gefärbt. In einem ersten Schritt wurden die Proben mit vWF-Antikörper (1:500) und P-Selektin-Antikörper (1:100) für 1,5h bei Raumtemperatur (RT) oder über Nacht bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Danach wurde 1x mit PBST (0,1% Triton) und 4x mit PBS (jeweils 5min) gewaschen. In einem zweiten Schritt wurde der Sekundärantikörper anti-Kaninchen-IgG (1:300) für 1 Stunde bei RT im Dunkeln inkubiert.

Antikörper (Verdünnung)	Bestell-Nr.	Hersteller	Detektion
Monoklonaler Maus, anti-Human CD62P, P-Selektin (1:100) ^a	NBP1-22046	Novus	direkt konjugiert, FITC
Polyklonaler Kaninchen, anti-Human vWF, unkonjugiert (1:500) ^a	A 0082	Dako Cytomation	unkonjugiert (Primärantikörper)
Monoklonaler Esel, anti-Kaninchen IgG (1:300) ^b	AF594	Dianova	direkt konjugiert (Sekundärantikörper)

^a Antikörper wurden mit PBST (0,1% Triton-X-100) verdünnt.

^b Antikörper wurden mit PBS verdünnt.

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Antikörper

Nach dreimaligem Waschen in PBS wurde die Probe mit DAPI (D9542, Sigma-Aldrich), Endkonzentration 0,5µg/mL in PBS versetzt und 30min bei RT im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss daran wurde nochmals 2x mit PBS gewaschen und anschließend die Gasfasermembran auf den Objektträger aufgebracht. Hierfür wurde ein 60mm Deckgläschen beschriftet, mit einem Fettstift ein ausreichend großes Rechteck angezeich-

net und ein Tropfen Fluoromount (Fluoromount-G[®], ThermoFisher, CO-4958-02) aufgetropft. In diesen wurde die Membran eingebettet. Mit einem zweiten Deckgläschen wurde die eingebettete Membran überschichtet. Die Auspolymerisierung erfolgte über Nacht bei 4 °C lichtgeschützt im Kühlschrank.

2.2.2 Mikroskopie der erweiterten Färbungen

Die Visualisierung der gefärbten Strukturen erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop (Leica DM RBE, Leica, Wetzlar, D). Es wurden Bildausschnitte in 3 Kanälen aufgenommen (s. Tab.6).

DAPI-Kanal	Exzitation, 340 nm	Emission, 488 nm
FITC-Kanal	Exzitation, 480 nm	Emission, 535 nm
TRITC-Kanal	Exzitation, 535 nm	Emission, 620 nm

Tabelle 6: Beschreibung der drei Fluoreszenzkanäle

Für die Auswertung wurden verschiedene Objektive eingesetzt (5x, 20x, 40x). Bei 10x Vergrößerung durch das Okular ergeben sich also 50-, 200- und 400-fache Vergrößerungen der mikroskopierten Präparate.

Die 50- und 200-fachen Vergrößerungen dienten der Übersicht und zur Lokalisierung und Beschreibung der Kreuzungspunkte (KP). Durch die 3x-Färbung war es möglich, Aussagen zur Form der vWF-Ablagerungen, der Koloalisation mit Leukozyten und der Einlagerung von aktivierten Thrombozyten (P-Selektin-Färbung) zu machen.

Die Detailaufnahmen mittels 400-facher Vergrößerung wurden gemacht, um die verschiedenen vWF-Strukturen zu dokumentieren. Mithilfe der einzelnen Kanäle war es möglich vWF (s. Abb.7C), Zellkerne (s. Abb.7B) und P-Selektin (s. Abb.7D) auch getrennt voneinander zu betrachten. Übereinandergelegt konnten die räumlichen Beziehungen der einzelnen Elemente zueinander studiert werden (s. Abb.7A).

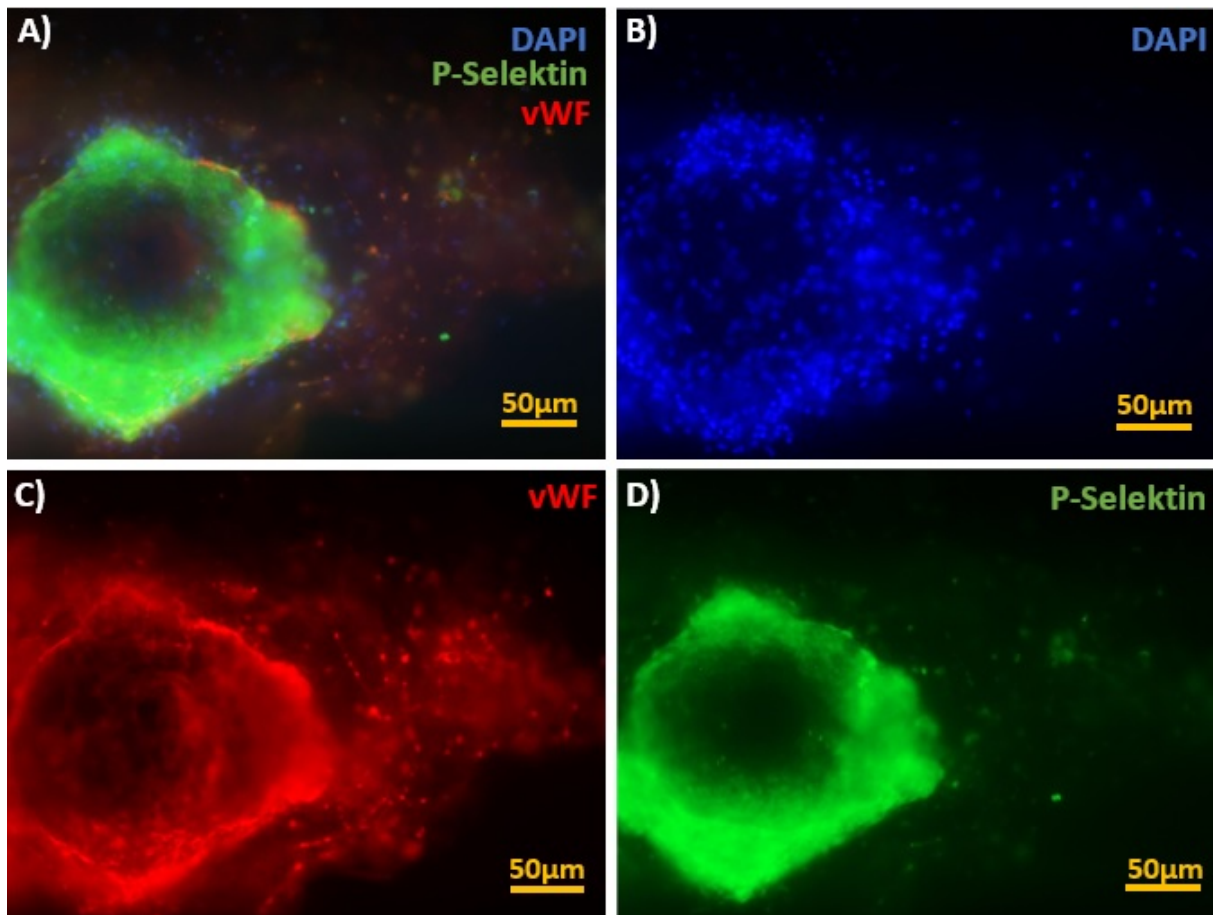
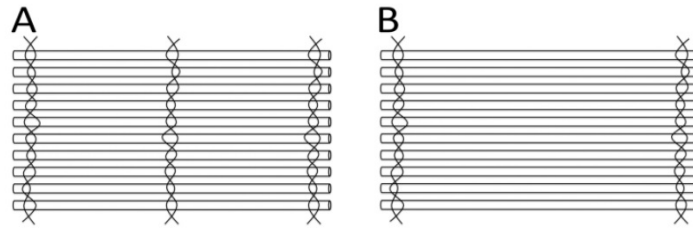


Abbildung 7: Beispiel für einzelne Kanäle und „Merging“. Bild A: Alle drei Fluoreszenzkanäle nach Merging. Eine detaillierte Analyse der einzelnen Strukturen ist aber so aufgrund der Überlagerungen der Kanäle nicht möglich. Der Monolayer aus Spiderwebs ist in Bild A kaum zu erkennen, wohingegen er in Bild C sehr gut darzustellen ist. Ebenso zeigt sich der vWF-Saum besser in Bild C als in Bild A. Zum Auffinden des Kreuzungspunktes eignet sich auch besonders gut der DAPI-Kanal (Bild B), da Zellkerne besonders deutlich einen Kreuzungspunkt markieren. Die in den Spiderweb-Monolayer eingelagerten Zellkerne sind aber ebenfalls besser in Bild B als Bild A zu erkennen. Der fluoreszenzintensive grüne Kanal (P-Selektin) überstrahlt häufig die anderen beiden Kanäle und lässt sich daher auch besser gesondert betrachten (Bild D).

Um auf jedem Präparat eine immer gleich groß definierte Fläche für die Auswertung zu betrachten, wurde im Vorhinein festgelegt, dass pro Präparat 6 Gasfasern analysiert werden und sich der auszuwertende Bereich zwischen drei Kettfäden (Modell A, Oxygenator Typ – PLS oder Cardiohelp Maquet Cardiopulmonary, Rastatt oder iLA-active, Xenios, Stolberg, s. Abb.8A, Abb.9 links), bzw. zwei Kettfäden (Modell B, Oxygenator-Typ: Hilite7000LT, Xenios oder ECC.O5, Sorin Group, Modena, Italien, s. Abb.8B, Abb.9 rechts) befindet. Daraus ergab sich eine Kantenlänge für die Proben von 1,5cm Länge und 0,5cm Breite. Die Abbildungen 8 und 9 stammen aus der Dissertation von J. Wilm [69].



Proben aus jeweils 10 Gasfasern und drei (links, Probe aus PLS, Cardiohelp oder iLA-active Oxygenatoren), bzw. zwei (rechts, Probe aus Hilite7000LT oder ECC.O5 Oxygenatoren) Kettfäden

Abbildung 8: Beispiele für Proben



links: PLS, Cardiohelp oder iLA-active Oxygenatoren (entspricht Abb. 8A)
rechts: Hilite7000LT oder ECC.O5 Oxygenatoren (entspricht Abb. 8B)

Abbildung 9: Beispielhafte Oxygenatorenmodelle

2.2.3 Verblindung der Proben

Die Proben wurden für die Auswertung verblindet. Hierfür stellte Frau Katrin Bielenberg gefärbte Proben her, deren Herkunft sie in einer verdeckt geführten Liste dokumentierte. Die Probennummerierung erfolgte fortlaufend von 1 bis 71. Erst am Ende der Auswertung wurden die Proben entblindet, sodass nachträglich eine Zuordnung zu den entsprechenden Oxygenatoren möglich wurde. Damit konnte dann auch ein Vergleich mit den Daten aus dem ersten Teil hergestellt werden. Aufgrund der modifizierten Klassifikation im 2. Teil war dieser Vergleich nicht in vollem Umfang möglich.

2.2.4 Identifizierung und Charakterisierung von Kreuzungspunkten auf den Proben

Da im Hinblick auf das Strömungsverhalten innerhalb des Membranoxygenators die Kreuzungspunkte eine sensible Stelle im Oxygenator darstellen, galt den Kreuzungspunkten auf den Gasfasermembranen besonderes Augenmerk. Ein Kreuzungspunkt

gibt jene Stelle wieder, wo sich übereinander liegende Gasfasern berühren. Auf den Übersichtsaufnahmen (s. Tab.2) der Dissertation von J. Wilm konnte man erkennen, dass bei ausreichend starker Besiedelung des Präparates besonders an den Kreuzungspunkten ebenfalls mit einer hohen Dichte an vWF zu rechnen ist. In der Literatur wird die strömungsinduzierte Aktivierung von vWF beschrieben [50][51][52][53][66][70]. Die Kreuzungspunkte scheinen also einen Einfluss auf den Blutfluss im Oxygenator zu haben. Somit stellt die Begutachtung der Kreuzungspunkte eine zentrale Rolle im Hinblick auf die Beteiligung des vWF an der strömungsinduzierten Thrombusbildung dar.

Abbildung 10 zeigt eine schematische Übersicht über Form und Ausrichtung von Kreuzungspunkten. Die vier Pole des kreisförmigen Kreuzungspunktes wurden von oben beginnend im Uhrzeigersinn mit den Ziffern 1-4 bezeichnet. Mithilfe dieser Zuordnung kann der Punkt der höchsten Fluoreszenzintensität des vWF identifiziert werden. Dieser Bereich (mit a. bezeichnet) wies vorrangig spinnennetzartige Strukturen („Spiderwebs“, SW) auf.

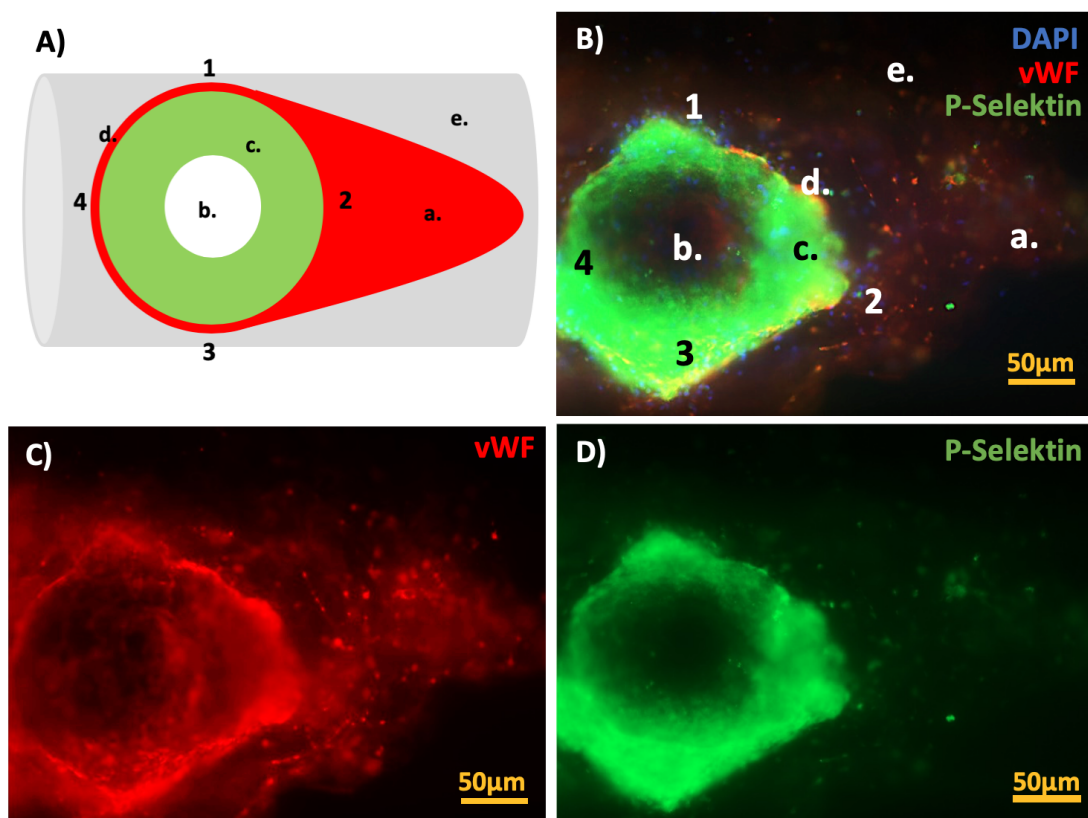
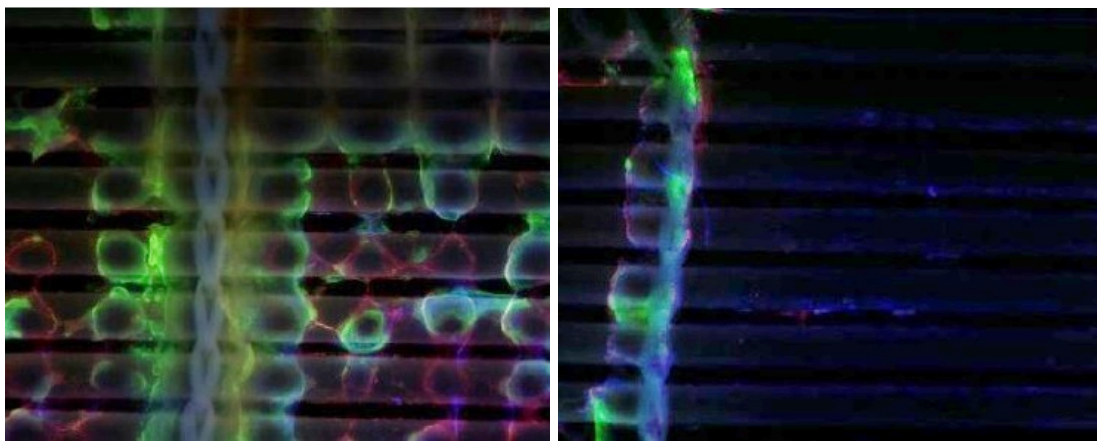


Abbildung 10: Konfiguration eines Kreuzungspunktes. Bild A: 1-4. Pole des Kreuzungspunktes, a. Spiderweb-Monolayer, b. zentrale leere Stelle („Auge“), c. Mantel aus P-Selektin, d. vWF-Saum, e. Gasfaser; grün=P-Selektin, rot=vWF, DAPI in der schematischen Zeichnung aus Übersichtsgründen nicht dargestellt. Bild B: Alle 3 Kanäle nach Merging. Typische zentrale Aussparung: „Auge“. Bild C: Kreuzungspunkt mit vWF-Saum und vWF-Monolayer. Bild D: Kreuzungspunkt mit Mantel aus P-Selektin.

Entweder an Position 2 oder 4 weisen einige KP einen zungenförmigen Ausläufer aus Spiderwebs auf. Ist dieser Ausläufer einschichtig, sodass einzelne Strukturen eindeutig voneinander abgegrenzt werden können, wird dieser als „Monolayer“ bezeichnet.

Das „Auge“ (b) stellt die Kontaktstelle zur darüber liegenden Gasfaser dar. Es wurde dokumentiert, ob dort Zellen oder vWF-Strukturen vorhanden sind. Um das „Auge“ des Kreuzungspunktes wurde häufig ein P-Selektin-positiver Mantel (c) beobachtet. Daran anliegend findet sich häufig ein schmaler vWF-positiver Saum (d).

Die Betrachtung der Kreuzungspunkte erfolgte standardmäßig in 200-facher Vergrößerung, da einige Kreuzungspunkte zu groß waren, um in der 400-fachen Vergrößerung in ihrer Gesamtheit abgebildet zu werden. Die 50-fache Vergrößerung diente lediglich der Übersicht und, um einen Eindruck darüber zu erhalten, wie stark die Besiedelung des Präparates mit vWF, DAPI und P-Selektin war. Als Kriterium für die Dichte der Ablagerungen auf den Gasfasern wurden die Kreuzungspunkte herangezogen. Je nachdem, ob die Kreuzungspunkte einer Gasfaser im Kanal sichtbar waren, galt das Präparat als stark (Wert=1, s. Abb.11a) oder schwach (Wert=0, s. Abb.11b) besiedelt. Da die Menge an Ablagerungen an den Kettfäden immer höher war als in der Mitte der Gasfasern, galt ein Präparat als dicht besiedelt, wenn Kreuzungspunkte in der Mitte zwischen zwei Kettfäden sichtbar waren.



(a) Oxy#5

(b) Oxy#25

Abbildung 11: Repräsentative Übersichten (50x, rot=vWF, blau=DAPI, grün=P-Selektin)

(a) Übersichtsaufnahme einer Probe mit starker Zellbesiedelung

(b) Übersichtsaufnahme einer Probe mit schwacher Zellbesiedelung

Um einen Eindruck davon zu erhalten, wie sich die Morphologie der Kreuzungspunkte innerhalb eines Präparates verhält, wurden exemplarisch 10 Präparate der 2. Auswertung hinsichtlich dem Auftreten von Kreuzungspunkten und deren Aussehen überprüft. Aus den Übersichtsaufnahmen der Oxygenatoren (Typ PLS) war abzuleiten, dass sich

zwischen 2 Kettfäden immer 7 Kreuzungspunkte befinden. Somit ergaben sich pro Präparat über 3 Kettfäden hinweg und jeweils 6 betrachteten Gasfasern pro Präparat $2 * 7 * 6 = 84$ Kreuzungspunkte pro PLS-Präparat. Die Kreuzungspunkte wurden hinsichtlich der Lage des Monolayers (falls vorhanden) klassifiziert. Als gleichgerichtet galten zwei Kreuzungspunkte, sobald sich der Monolayer an der selben Position (z.B. vom selben Pol ausgehend) befand. Die Ergebnisse sind der folgenden Tabelle zu entnehmen (s.Tab.7). Abhängig von der Beladungsdichte konnten zwischen 6 und 74% der möglichen Kreuzungspunkte identifiziert werden ($30 \pm 21\%$). Ursächlich für eine sehr kleine Anzahl sichtbarer Kreuzungspunkte waren z.B. Abrissartefakte. Von den sichtbaren Kreuzungspunkten waren im Mittel $31 \pm 16\%$ (Range 13-64%) gleichgerichtet. Hierfür wurde die Position des Spiderweb Monolayers für jeden Kreuzungspunkt bestimmt (z.B. Position 2). Diejenige Position mit den häufigsten Nennungen wurde als „Hauptausrichtung“ festgelegt. Die nicht-gleichgerichteten Monolayer zeigten entsprechend in die entgegengesetzte Richtung (entsprechend dem oben genannten Beispiel Position 4). Da sich nicht wie erwartet eine eindeutige „Hauptausrichtung“ pro Präparat bestimmen ließ, wurde die Lage der Monolayer und die Orientierung der Kreuzungspunkte nicht weiter verfolgt.

PLS-Oxy	Anzahl der im VWF-Fluoreszenzkanal sichtbaren Kreuzungspunkte (max. 84)	Anzahl der gleichgerichteten Kreuzungspunkte pro Präparat (max. 84)	Anteil der gleichgerichteten Kreuzungspunkte an allen auf dem Präparat sichtbaren Kreuzungspunkten in %
1	30/84; 36%	4	13
2	29/84; 35%	6	21
3	11/84; 13%	7	64
4	20/84; 24%	4	20
5	29/84; 35%	9	31
6	9/84; 11%	2	22
7	6/84; 7%	1	17
8	40/84; 48%	17	43
9	5/84; 6%	2	40
10	62/84; 74%	25	40

Tabelle 7: Ausrichtung der Kreuzungspunkte anhand 10 repräsentativer Oxygenatoren (PLS) der 2. Auswertung

Für die Beurteilung der Kreuzungspunkte lagen insgesamt 249 Bilder von 71 Präparaten vor. Detailaufnahmen wurden 841 mal dokumentiert (s. Tab.8).

Vergrößerung	Nutzbarkeit	Anzahl der Bilder
50x	Übersicht zur Bestimmung der Dichte der Ablagerungen auf den Gasfasermembranen	2
200x	Darstellung der Kreuzungspunkte zwischen den Kettfäden	249
400x	Klassifizierung der vWF-positiven Strukturen	841
Gesamt		1092

Tabelle 8: Zusammensetzung des Bildmaterials der neuen Auswertung aus 71 Präparaten

2.2.5 Bildauswertung der vWF-Strukturen in verblindeten Proben

Die Auswertung der gefärbten Proben erfolgte vor Ort, d. h. ohne vorherige Fotodokumentation und retrospektive Datenerhebung.

Das 5x Objektiv (50x Vergrößerung) wurde verwendet, um den Kreuzungspunkt (KP) anhand einer Akkumulation von vWF-Strukturen, DAPI-positiven Zellkernansammlungen und/oder P-Selektin-Ablagerungen zu identifizieren. Dazu wurden 6 der 10 Gasfasern analysiert.

Das 20x Objektiv (200x Vergrößerung) wurde verwendet, um die KP zwischen den Kettfäden auszuzählen, um die Lage mit der höchsten vWF-Intensität am KP zu beschreiben und, um die Dicke des vWF-Saums um den KP auszumessen.

Das 40x Objektiv (400x Vergrößerung) wurde eingesetzt, um exakte Aussagen zu den vorliegenden vWF-Strukturen, sowie deren Kolokalisation zu DAPI-positiven Zellkernen und P-Selektin-Ablagerungen sowohl am KP, als auch zwischen zwei benachbarten KP, treffen zu können.

Die 400x Vergrößerung wurde mittels Fotos erneut dokumentiert und diente nachträglich dazu den Durchmesser der granulären Strukturen zu bestimmen und die Faserdicke der vWF-Fäden zu messen.

Bei dieser Auswertung gingen die unter 2.1.3 gewonnenen Klassifikationskriterien ein. Jedoch wurden diese noch einmal modifiziert:

1. Granulae (s. Abb.12A)
 - a) extrazytoplasmatisch
 - b) intrazytoplasmatisch
2. Spiderwebs (s. Abb.12B)

- a) mit eingelagerten Thrombozyten/Leukozyten
- b) mit eingelagerten vWF-Granulae („Targets“, s.Abb.12C)

3. Fasern (s. Abb.12D)

- a) ungerichtet
- b) gerichtet

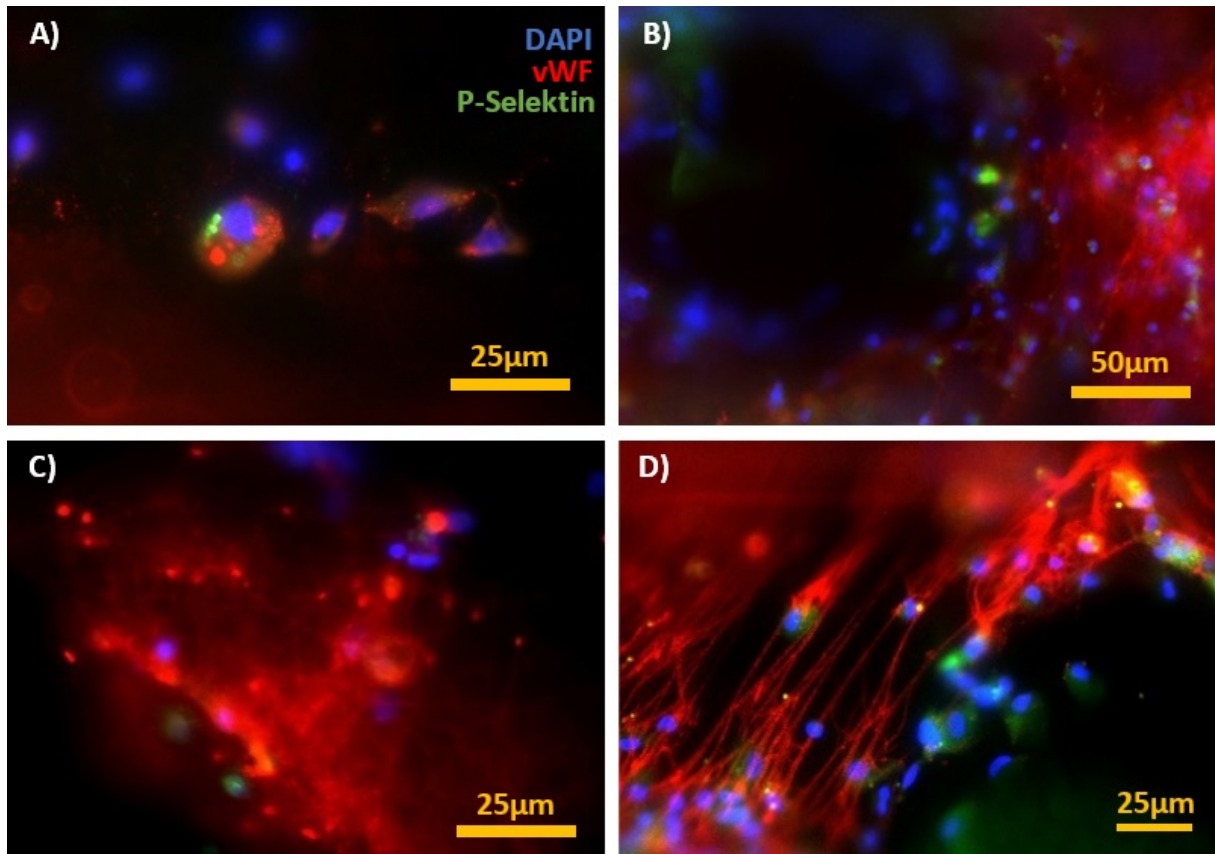


Abbildung 12: Die verschiedenen Erscheinungsformen des vWF der 2. Auswertung. Bild A: Neun Zellkerne, welche gruppiert auf einer Gasfaser liegen. Vier dieser Zellkerne weisen eine diffuse vWF-Verteilung um den Zellkern herum auf (rot), was den Bereich des Zytoplasmas markiert. Eine Zelle weist deutlich konfigurierte vWF-Granulae im Zytoplasma auf, ebenso wie auch P-Selektin-positive Granulae. Bild B: Kreuzungspunkt, zu identifizieren an der Aussparung in der linken Bildhälfte. Am rechten Bildrand beginnt ein weitläufiges Netz aus Spiderwebs, in welches Zellen und vWF-positive Granulae eingelagert sind. Bild C: Spiderwebs mit vWF-Granulae, welche als „Targets“ in das Netz eingearbeitet sind. Bild D: vWF-Fäden, welche vom oberen Pol eines Kreuzungspunktes (Aussparung am rechten Bildrand) zum unteren linken Bildrand ziehen. Die Anordnung ist nahezu parallel und es finden sich vereinzelt Zellkerne den Fäden aufgelagert.

3 Statistik

Eine statistische Auswertung der Daten wurde nicht durchgeführt. Alle erhobenen Werte wurden lediglich vergleichend betrachtet.

4 Ergebnisse: Identifizierung von vWF-positiven Strukturen auf Gasaustauschmembranen von Membranoxygenatoren nach Systemwechsel oder Therapieende

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Identifizierung und Klassifizierung verschiedener vWF-Strukturen auf der Oberfläche von Gasaustauschmembranen, die aus Oxygenatoren von ECMO-Patienten stammen. Die Charakterisierung der vWF-positiven Strukturen erfolgte hinsichtlich ihrer Form, Größe und Vorkommenshäufigkeit. Außerdem lag das Augenmerk auch auf der direkten Umgebung der vWF-positiven Strukturen.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte eine Fotodokumentation aus einer früheren Studie (J. Wilm) auf mögliche vWF-Strukturen hin analysiert werden. Im zweiten Teil der Arbeit wurden erneut Proben auf vWF-Strukturen hin untersucht. Hier wurde die räumliche Beziehung zu Kreuzungspunkten oder Kettfäden der jeweiligen Gasfasermembran bzw. die Kollokalisierung mit aktivierten Thrombozyten berücksichtigt.

Im ersten Teil der Arbeit wurde auf Material aus einer bereits abgeschlossenen Studie zurückgegriffen [69]. Dort wurde die Zellbesiedelung auf Gasaustauschmembranen während und nach ECMO-Therapie mittels Immunfluoreszenztechnik untersucht. Die Fotodokumentation aus dieser Studie wurde verwendet, um verschiedene vWF-positive Strukturen zu identifizieren und zu klassifizieren.

Der Auswertung der Bilder aus der Dissertation von J. Wilm liegen 53 untersuchte Membranoxygenatoren zugrunde. Die Erstellung der Kriterien zur Klassifizierung des vWF beruht auf der Analyse von insgesamt 387 Bildern ($7,3 \pm 3,2$ Bilder pro Oxygenator), welche Aufnahmen von den Gasfasermembranen der Oxygenatoren in 400-facher Vergrößerung zeigen.

4.1 Ergebnisse Teil 1: Klassifizierung von vWF-positiven Strukturen anhand der Bilddokumentation von J. Wilm

Wie in 2.1.3 erwähnt (s. Abb.6), lassen sich auf den Bildern aus der Dokumentation von J. Wilm folgende vWF-positiven Strukturen unterscheiden.

1. Granuläre Strukturen
2. Flächige Netzbildungen - Spiderwebs
3. Fadenartige Strukturen
4. Mischform aus Granulum und Spiderweb - „Targets“

Im Folgenden werden die einzelnen Strukturen genauer beschrieben.

4.1.1 Granuläre Strukturen

Granulae zeigten sich als eindeutig vWF-positive, rundliche, scharf abgegrenzte Strukturen, welche auf Zelloberflächen bzw. im Zytoplasma von Leukozyten oder an vWF-Fasern („Targets“) angelagert sein können, jedoch auch völlig unabhängig von umliegenden Strukturen diffus auf der Gasfasermembran verteilt vorkommen können (s. Abb.13). Als Auswertungskriterium gilt eine solche Struktur als Granulum, wenn es sich um punktförmige vWF-positive Ablagerungen handelt. Diese punktförmigen Strukturen können bis zu 2µm groß sein und in Haufen gruppiert oder einzeln auf den Gasfasern vorliegen.

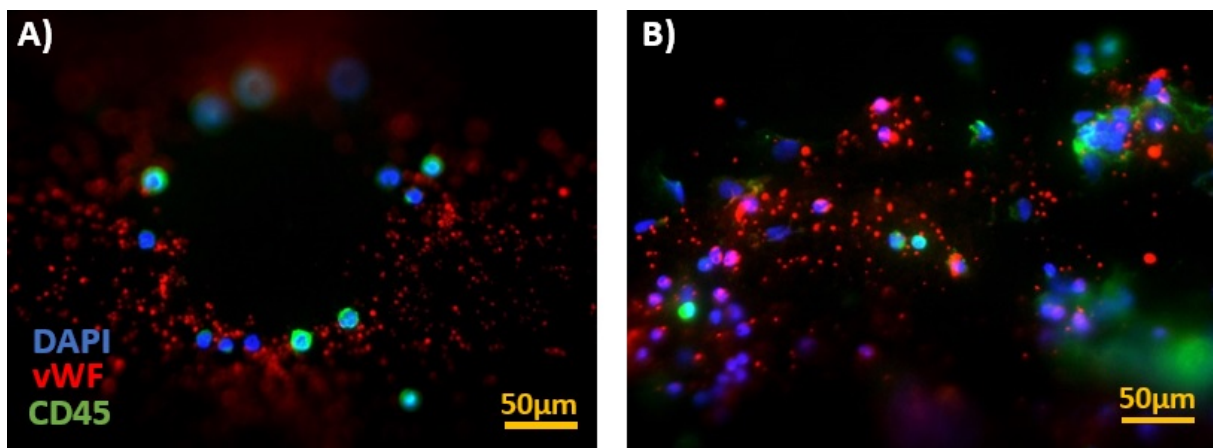


Abbildung 13: Erscheinungsformen Granulae. Bild A: vWF-Granulae, welche zirkulär um einen Kreuzungspunkt (Ausparung Bildmitte) angeordnet sind. Bild B: Granulae zusammen mit einigen Zellen diffus über eine Gasfaser verteilt, ohne Bezug zu Zellkernen oder Kreuzungspunkt.

4.1.2 Flächige Netzbildung - Spiderwebs

Andere Bilder der Auswertung zeigten eine mehr oder weniger flächendeckende, netzartige Struktur aus vWF-positiven Fasern. Die Einzelfasern sind mit einem Durchmesser <1µm sehr fein und untereinander stark quervernetzt. Im Folgenden wird diese Erscheinungsform als „Spiderweb“ bezeichnet. Spiderwebs (SW) definieren sich als flächige, dreidimensionale Netze, in welche auch Zellen eingelagert sein können (s. Abb.14A). Als Maß für die Quervernetzung wurde festgelegt, dass der Abstand zwischen zwei Quervernetzungen nicht größer als 10µm sein darf. An Spiderwebs assoziiert finden sich sowohl zelluläre, als auch granuläre Bestandteile. Letztgenannte finden sich in Form vWF-positiver Granulae in den Spiderwebs (s. Abb.14B). Diese Granulae sind als „Targets“ in die Spiderwebs eingearbeitet und bilden einen zentralen Vernet-

zungspunkt.

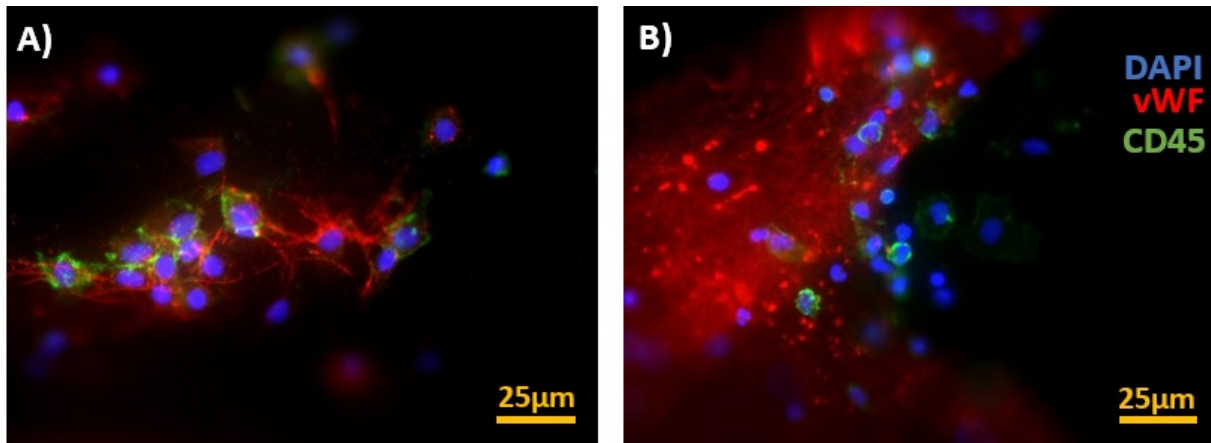


Abbildung 14: Beispiel Spiderwebs. Bild A: Feines Netz aus Spiderwebs, mehrere Zellen eingelagert. Ein dickerer vWF-positiver Faden verbindet die Zellkerne und das Netz zu einem kleinen Konglomerat. Bild B: Am rechten Bildrand eine angeschnittener Kreuzungspunkt. Der Kreuzungspunkt wird nach links hin von einem ausgedehnten Netz an Spiderwebs begrenzt, in welches sowohl Zellen als auch Targets eingelagert sind.

4.1.3 Fadenartige Strukturen

Grundsätzlich ist der Übergang zwischen Spiderweb und Faden fließend. Die Unterscheidung erfolgt am Grad der Quervernetzung der Fäden. Sind Quervernetzungen selten, fehlen gänzlich oder liegen die Fäden eher parallel zueinander und weisen keinen dreidimensionalen, flächigen Charakter auf, wird von einem Faden gesprochen (s. Abb.15B). Die Fäden unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Länge, ihrer Ausrichtung (linear, gewunden), ihrer Beziehung zueinander (sich kreuzend, parallelverlaufend) und ihrem Durchmesser. Aus den Bildern ist nicht ersichtlich, ob dicke Fäden aus einer Zusammenlagerung mehrerer einzelnen Fäden entstehen oder, ob sie durch Dickenwachstum eines einzelnen Fadens zustande kommen (s. Abb.15A). Grundsätzlich sind beide Theorien plausibel. Sobald der Faden einen Durchmesser von 1µm übersteigt, oder über eine Strecke von 50µm oder mehr als intakte Struktur verfolgbar ist, wird hier von einem Faden gesprochen. Fäden können sich unter Umständen gabeln, eine Quervernetzung zwischen zwei Fäden findet man aber in der Regel nicht. Fäden, ebenso wie Spiderwebs, können mit Granulae und mit Zellkernen assoziiert vorliegen.

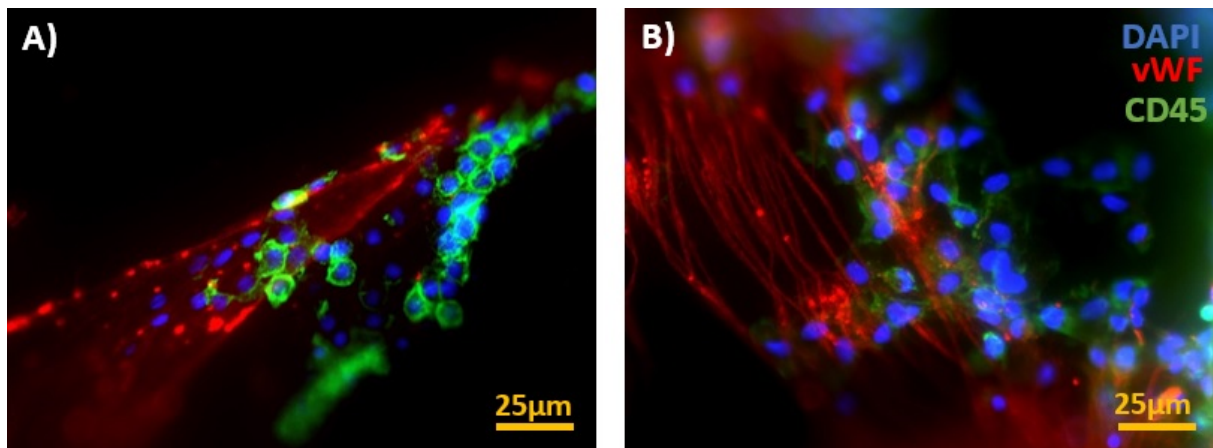


Abbildung 15: Erscheinungsformen Fäden. Bild A: Mehrere parallel verlaufende vWF-Fäden, welche an einem gemeinsamen Punkt am rechten oberen Bildrand entspringen. An die Fäden sind vWF-Granulae und Zellkerne angelagert. Bild B: Parallel verlaufende vWF-Fäden, welche vom seitlichen Pol eines Kreuzungspunktes (rechter oberer Bildrand) entspringen und gemeinsam zum unteren Pol ziehen. Auch hier sind vWF-Granulae und Zellkerne angelagert.

4.1.3.1 Mischform aus Granulum und Faden - Targets

Diese Struktur mit äußerst charakteristischer Erscheinungsform stellt eine Mischung aus Spiderweb und Granulum dar. Im Folgenden werden diese „zielscheibenähnlichen“ Strukturen als „Target“ bezeichnet. „Targets“ sind das regelhaft gleichzeitige Auftreten von einem zentral liegenden, vWF-positiven Granulum $\geq 2\mu\text{m}$ und vWF-Fäden, welche zirkulär 360° um das Granulum herum angeordnet sind und eine Länge $\geq 10\mu\text{m}$ aufweisen (s. Abb.16A). Diese Strukturen können entweder einzeln auftreten oder durch Vernetzung untereinander flächendeckende, dreidimensionale Strukturen ausbilden, sodass sie wieder mehr den klassischen Spiderwebs ähneln (s. Abb.16B).

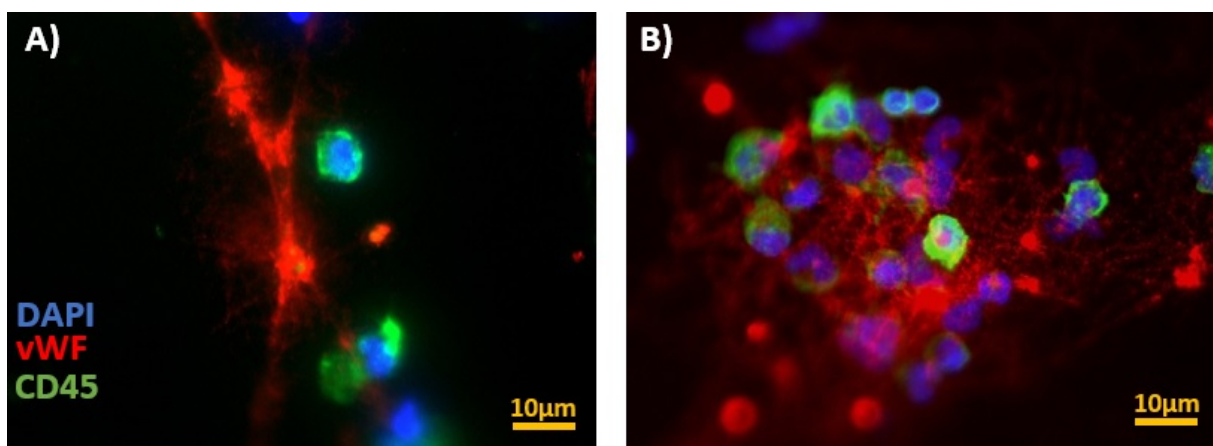


Abbildung 16: Erscheinungsformen Targets. Bild A: Zentral liegendes vWF-Granulum, zirkulär angeordnete, dünne vWF-Fasern. Ein Leukozyt ist dem „Target“ angelagert. Bild B: Verbund aus mehreren „Targets“, welche in einen großen Netz aus Spiderwebs zusammengehalten werden. Kernhaltige Zellen und Leukozyten sind eingewebt.

Die strahlenartige Anordnung der Fäden um das zentrale Granulum bleibt jedoch das Hauptcharakteristikum. Die entsprechenden Daten aus der Auswertung des 1. Teils werden im folgenden Kapitel als Vergleich zur Auswertung des 2. Teils erläutert.

4.2 Entblindung der Präparate

Es wurden 71 Präparate von 57 Oxygenatoren mikroskopiert. Im Zuge der Entblindung war es möglich diejenigen Oxygenatoren zu bestimmen, welche mehrere Proben zur Auswertung beisteuerten. Aus 45 Oxygenatoren wurde jeweils ein Präparat hergestellt, weitere 20 Oxygenatoren lieferten jeweils zwei Präparate und 6 Oxygenatoren lieferten drei Präparate (s. Tab.9).

Mikroskopiergänge	Anzahl Oxygenatoren	Anzahl Präparate
1x	45	45
2x	10	20
3x	2	6
Gesamt	57	71

Tabelle 9: Zusammensetzung des Auswertungsmaterials

In der verblindeten Auswertung fielen einige Präparate auf, welche annähernd identisch aussehende Kreuzungspunkte zeigten. Nach Entblindung stellte sich heraus, dass es sich hierbei um mehrfach mikroskopierte Oxygenatoren handelte, welche sich anhand der Konfiguration ihrer Kreuzungspunkte identifizieren ließen. Anschließend wurden die Kreuzungspunkte der mehrfach mikroskopierten Oxygenatoren miteinander verglichen. In der folgenden Abbildung wurden repräsentativ vier doppelt mikroskopierte Oxygenatoren hinsichtlich der Morphologie der Kreuzungspunkte miteinander verglichen. Die Oxygenatoren waren anhand der Kreuzungspunkte eindeutig zuzuordnen (s. Abb.17).

Um zu prüfen, ob die etablierten Kriterien zur Bestimmung der vWF-Strukturen reproduzierbare Ergebnisse liefern, wurden die mehrfach mikroskopierten Oxygenatoren hinsichtlich der vier Kategorien vWF-Fäden, Spiderwebs, extrazytoplasmatische Granulae (EZP G), intrazytoplasmatische Granulae (IZP G) verglichen (s. Tab.10). Die Auswertung zeigt, dass 5/12 Oxygenatoren identische Ergebnisse nach erneutem Mikroskopieren lieferten. Bei weiteren 6/12 Oxygenatoren wich nur eine Kategorie vom Präparate-Pärchen ab. Lediglich bei einem Oxygenator wichen 2 Kategorien ab. Hierbei handelte es sich aber um ein Präparat, welches dreimalig mikroskopiert wurde und zwei der 3 Präparate stimmten zu 100% überein.

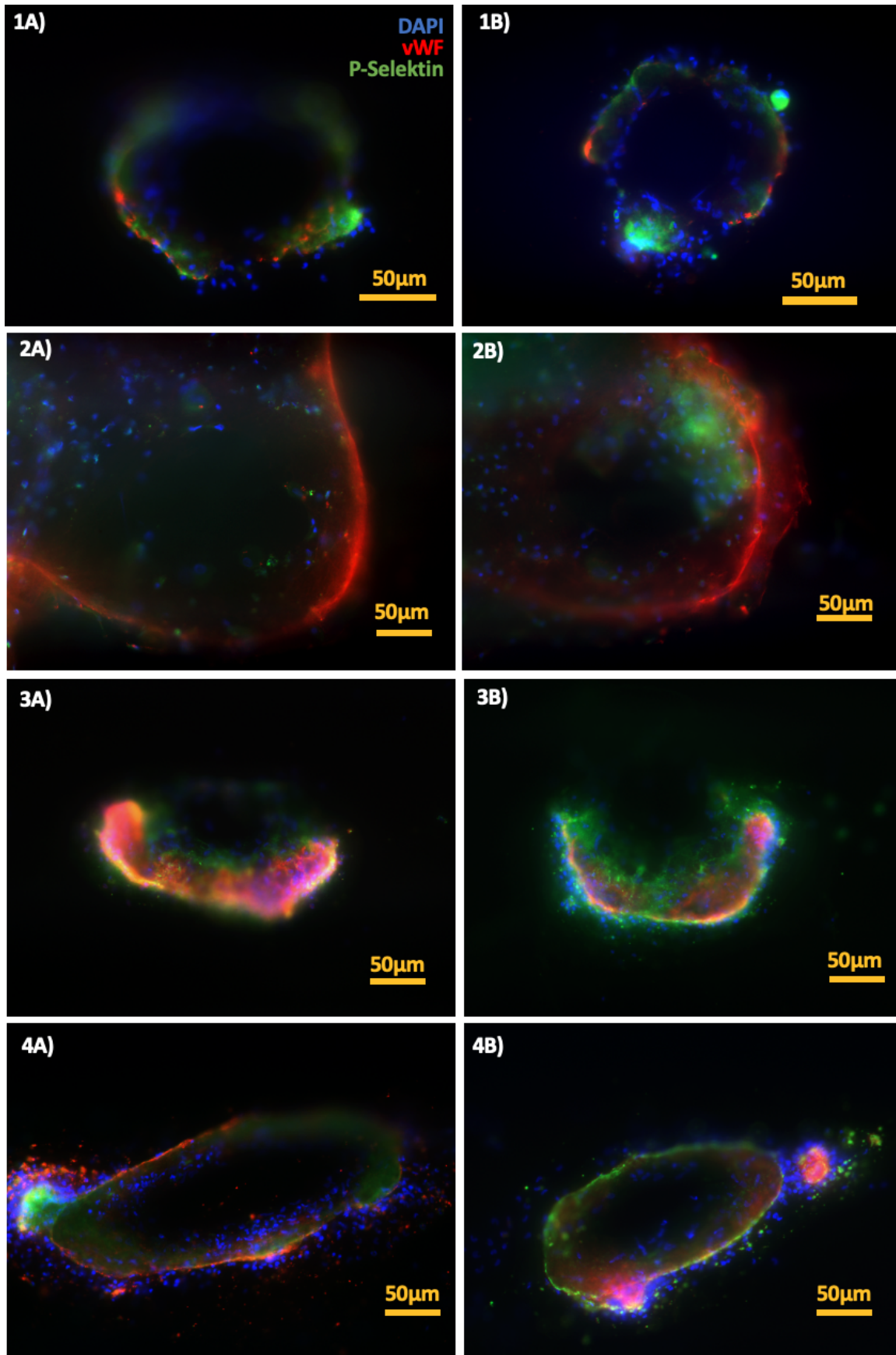


Abbildung 17: Vergleich von jeweils einem Kreuzungspunkt zweier Präparate eines Oxygenators. Die Kreuzungspunkte eines Oxygenators zeigen eine nahezu identische Konfiguration. Ein jedes Bildpaar (A und B) stammte von je zwei verschiedenen Präparaten aus je einem Oxygenator.

Oxy #	Fäden	Spiderwebs	IZP G	EZP G	Übereinstimmende Kategorien (max. 4)
18	0	0	X	X	3/4; 75%
	0	X	X	X	
6	0	X	X	X	3/4; 75%
	0	0	X	X	
	0	X	X	X	
29	0	X	X	X	3/4; 75%
	X	X	X	X	
58	0	0	X	X	4/4; 100%
	0	0	X	X	
8	0	0	X	X	3/4; 75%
	0	X	X	X	
26	0	0	X	X	4/4; 100%
	0	0	X	X	
36	0	0	X	X	3/4; 75%
	0	X	X	X	
9	0	0	X	X	3/4; 75%
	0	0	0	X	
19	0	X	X	X	4/4; 100%
	0	X	X	X	
55	0	0	X	X	4/4; 100%
	0	0	X	X	
41	0	0	X	X	4/4; 100%
	0	0	X	X	
24	0	0	X	X	2/4; 50%
	X	X	X	X	
	0	0	X	X	

Tabelle 10: Analyse der mehrfach mikroskopierten Oxygenatoren. X = die jeweilige vWF-Struktur wurde identifiziert; 0 = die jeweilige vWF-Struktur konnte auf dem Präparat nicht identifiziert werden.

Auch wenn die Morphologie der Kreuzungspunkte innerhalb eines Oxygenators annähernd identisch ist, ist deren Erscheinungsbild von Oxygenator zu Oxygenator äußerst variabel. Einen Überblick über die verschiedenen Varianten von Kreuzungspunkten liefert Abbildung 18. Interessant war hier, dass anhand der Konfiguration der KP teilweise Rückschlüsse auf den Oxygenator-Typ gezogen werden konnten. Da die Gasfasermembranen der zylinderförmigen Oxygenatoren (Hilite7000LT und ECC.O5) schräg gewickelt sind, imponieren auch die KP länglich-schräg (s. Abb.18B). Im Vergleich hier-

zu sind KP aus 90° versetzt gestapelten Gasfasermembranen (PLS, Cardiohelp oder iLA) eher rund (s. Abb.18A,C,D).

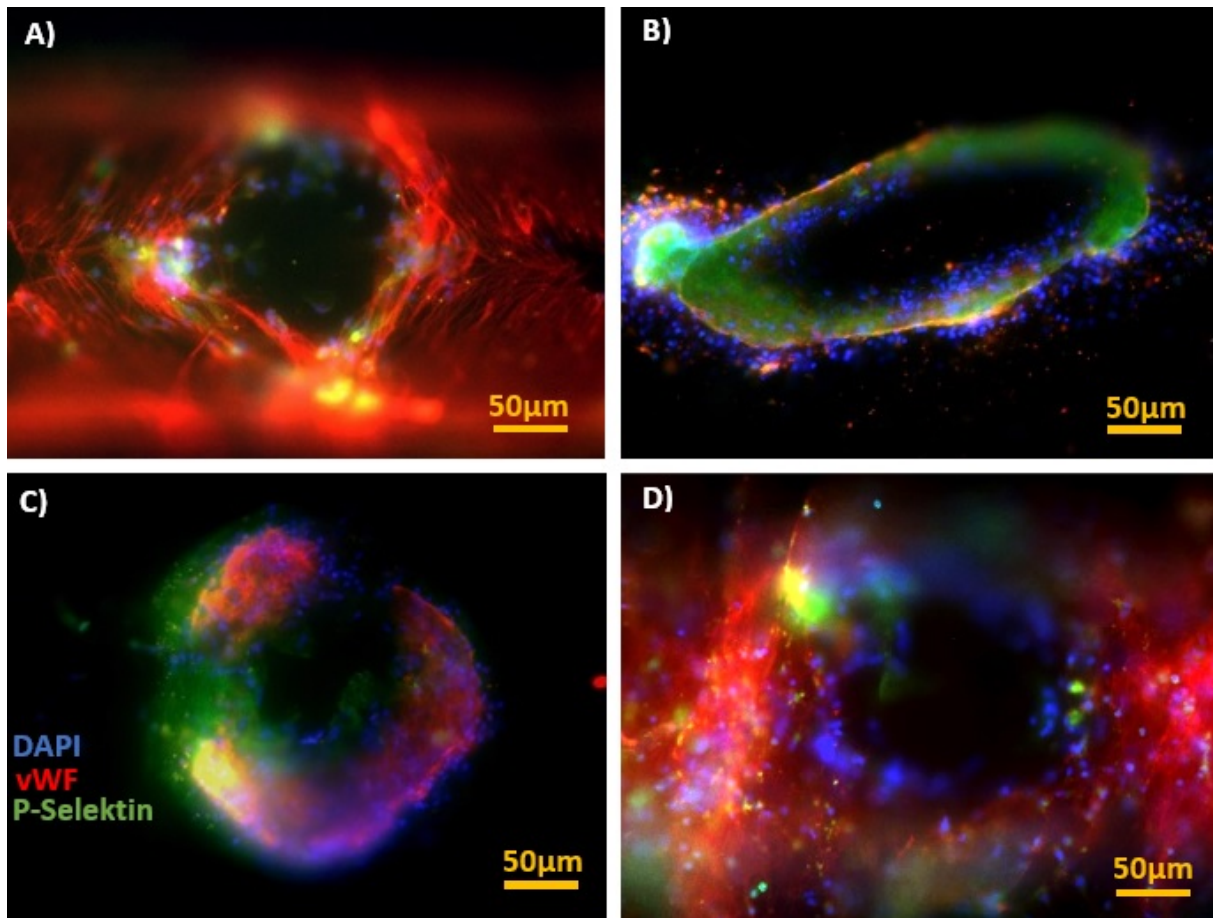


Abbildung 18: Verschiedene Morphologie der Kreuzungspunkte. Bild A: Symmetrisch angeordneter Kreuzungspunkt mit vielen vWF-Fäden. Bild B: Längsovaler Kreuzungspunkt, zentral liegendes „Auge“, gefolgt von einem Saum von Zellkernen, P-Selektin und vWF. Bild C: Symmetrischer Kreuzungspunkt, außerhalb des Kreuzungspunktes ist die restliche Gasfaser im Vergleich zu Bild A oder D kaum besiedelt. P-Selektin, DAPI und vWF sind stark überlagert, sodass einzelne Strukturen nicht auszumachen sind. Bild D: Kreuzungspunkt mit Spiderwebs. Unter Aussparung des Kreuzungspunktes ist die gesamte Gasfaser mit Spiderwebs überzogen. vWF-Granulae und Zellen sind in die Spiderwebs eingelagert.

4.3 Ergebnisse Teil 2: Optimierung der Klassifizierung von vWF-Strukturen auf Gasaustauschmembranen

Für die Auswertung standen 71 Präparate zur Verfügung. Zur Optimierung der Klassifikationskriterien von vWF-Strukturen auf Gasaustauschmembranen wurden erneut Aufnahmen in 400x Vergrößerung herangezogen. Es standen insgesamt 1092 Aufnahmen ($15,6 \pm 7,7$ Bilder pro Präparat, Min/Max = 4/48) aus den 71 Präparaten zur Verfügung. Im Folgenden werden die Ergebnisse wiedergegeben.

Teilt man die vWF-Strukturen in Fäden, Spiderwebs (SW), Granulae und Targets (siehe Kapitel 3.2.1), dann ergibt sich folgende Verteilung (s. Tab.11).

vWF-Struktur	J. Wilm (53 Oxygenatoren)		verblindet (71 Präparate)		entblindet (57 Oxygenatoren)	
	Anzahl der MOs	Anteil in %	Anzahl der Präparate	Anteil in %	Anzahl der MOs	Anteil in %
Fäden	40	75	8	11	8	14
SW	26	49	23	32	20	35
Granulae	51	96	68	96	54	95
Targets	15	28	17	23	16	28

Tabelle 11: Verteilung der vWF-Strukturen vor und nach Entblindung

Durch die Entblindung ergab sich kein wesentlicher Unterschied im Verteilungsmuster der einzelnen vWF-Strukturen. Allerdings ergaben sich deutliche Abweichungen zu den Aufnahmen von J. Wilm. Dies trifft insbesondere für die Bewertung als „vWF-Fäden“ zu. Die Begutachtung der nachgefärbten Proben zeigte, dass die Klassifikationskriterien der vWF-Strukturen aus dem 1. Teil der vorliegenden Studie noch einmal modifiziert werden mussten (siehe Material und Methoden).

4.3.1 vWF-Fäden

Im ersten Teil der Studie erhielten 75% der Oxygenatoren eine Zuordnung zu vWF-Fäden (s. Tab.11). Dagegen waren die vWF-Fäden in den Präparaten aus dem 2. Teil der Studie seltener nachweisbar (8 von 57 Oxygenatoren, 14% nach Entblindung). Der Grund hierfür lag in der Definition von vWF-Fäden, die sich zwischen dem ersten und zweiten Teil der Studie änderte. So galt ursprünglich der Terminus „vWF-Faden“ für eine fadenartige Struktur, welche $>1\mu\text{m}$ im Durchmesser über eine Strecke $>50\mu\text{m}$ verfolgbar war. Es zeigte sich, dass hier die Abgrenzung zu den Spiderwebs nicht scharf genug zu treffen war, sodass der Cut-off bei Fäden mit einem Durchmesser $\geq 2\mu\text{m}$ gezogen wurde. Um die Trennschärfe von Spiderwebs und Fäden zu verbessern, wurden die Einschlusskriterien für „vWF-Fäden“ vor Beginn der zweiten Auswertung neu definiert. Hier wurde festgelegt, dass ein Faden nur dann als solcher zählt, wenn dessen Durchmesser $\geq 2\mu\text{m}$ ist. Nach dieser Definition zeigten nur noch 11 von 53 Oxygenatoren (Bilder von J. Wilm), also 21%, auf ihren Oberflächen vWF-Fäden (s. Tab.12).

	1. Auswertung		2. Auswertung
	Wilm-Fäden	Wilm-Fäden ($\geq 2\mu\text{m}$)	entblindet
Faden positiv	40	11	8
Oxygenatoren gesamt	53	53	57
Anteil in %	75	21	14

Tabelle 12: Vergleich 1. gegen 2. Auswertung, Anteile der Oxygenatoren mit vWF-Fasern

Desweiteren zeigte sich, dass Fäden, welche einen Durchmesser unter $2\mu\text{m}$ aufwiesen auch kürzere Fadenlängen maßen als Fäden mit einem Durchmesser von $2\mu\text{m}$ oder mehr (s. Abb.19). Somit basiert die Diskrepanz von 75% Fadenanteil in den Bildern von J. Wilm zu 14% in der neuen Auswertung auf der Veränderung des Einschlusskriteriums für die Definition „vWF-Fäden“.

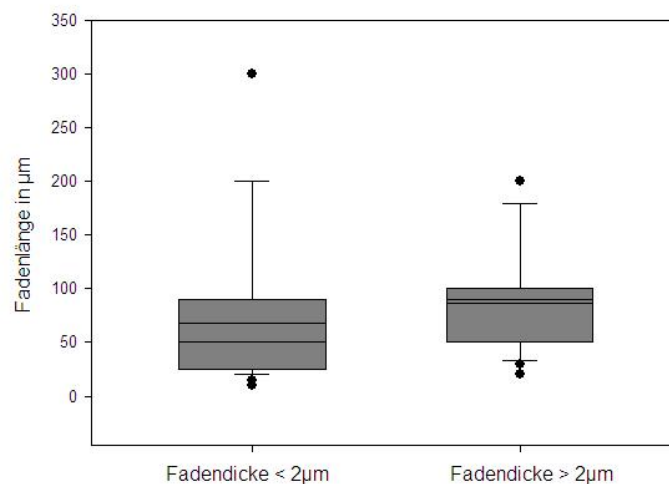


Abbildung 19: Fadenlängen in Abhängigkeit von der Fadendicke. Zugrunde liegen Daten von 40 Oxygenatoren aus der Dissertation von J. Wilm, welche Fäden aufwiesen. Die Dicke der Fäden wurde gemessen und ein Mittelwert für jeden der 40 Oxygenatoren bestimmt. Anschließend wurde die Gruppe geteilt in $<2\mu\text{m}$ und $>2\mu\text{m}$ und jede Gruppe gegenüber der Fadenlänge aufgezeichnet. Optisch zeigt sich, dass dünnere Fäden auch eher kurze Fadenlängen haben.

Fäden finden sich mit besonderer Häufigkeit in der Nähe von Kreuzungspunkten (s. Abb.20B). Möglicherweise wachsen sie jeweils vom Pol des Kreuzungspunktes linear in Strömungsrichtung (s. Abb.20A). Hinzu kommt die Beobachtung, dass sich im „Schatten“ der Kreuzungspunkte (Punkt a. in Abb.10) niemals parallel verlaufende Fäden, sondern allenfalls sich kreuzende und sich überlagernde Fäden zu finden sind (s. Abb.20C). Meist kann man dort nur die feine netzartige Struktur von Spiderwebs ausmachen.

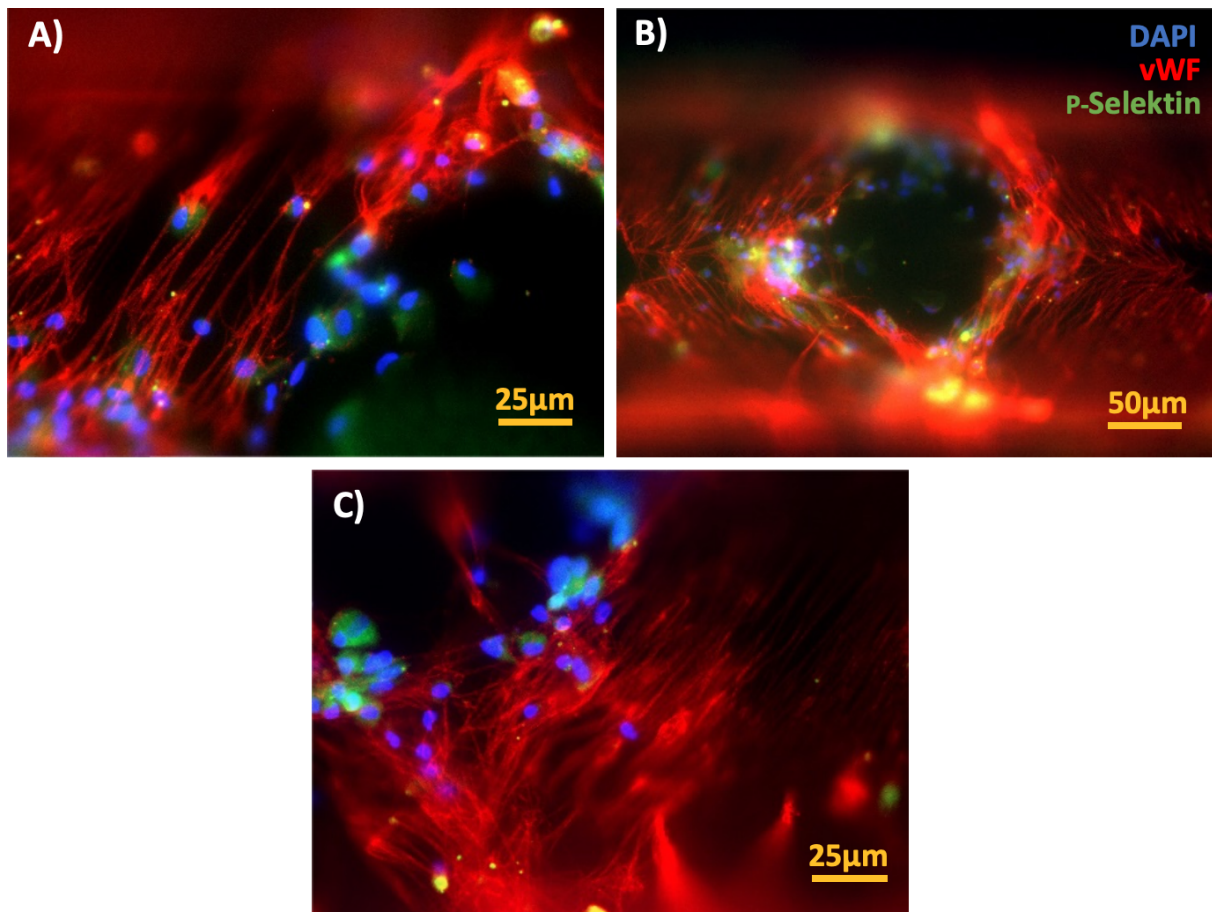


Abbildung 20: Beispiel für vWF-Fäden der 2. Auswertung. Bild A: Rechts unten eine Aussparung durch einen Kreuzungspunkt. Die Fäden verlaufen parallel zwischen dem oberen und linken Pol des Kreuzungspunktes. Bild B: Übersicht über einen Kreuzungspunkt einer Gasfaser mit symmetrisch angeordneten Fäden. Bild C: Fäden am unteren Pol eines Kreuzungspunktes. Übergang von parallel verlaufenden Fäden zu einer ungerichteten Anordnung.

Bei der 2. Auswertung zeigten nur 14% (8 von 57 Oxygenatoren) der untersuchten Oxygenatoren vWF-Fäden auf ihren Gasfasermembranen. Lediglich bei drei Oxygenatoren ließen sich die in der Wilm-Auswertung gefundenen vWF-Fäden in der 2. Auswertung reproduzieren. Dies ist womöglich darauf zurückzuführen, dass in den Wilm-Bilder nicht nach Bildausschnitten mit vWF-Fäden gesucht wurde und somit seltener Fäden auf den Bildern zu sehen waren.

vWF-Fäden kamen in der 2. Auswertung in zwei verschiedenen Erscheinungsformen vor: Entweder ungerichtet (sich gegenseitig überkreuzend, nicht parallel angeordnet, s. Abb.21) oder gerichtet (parallel angeordnet und linearer Struktur, s. Abb.22). Die Definition gerichtet und ungerichtet wird im Folgenden detailliert beschrieben, ebenso die Lokalisation der Fäden auf den Gasfasern und die Einbindung von Zellkernen oder Granulae. Für die Klassifizierung der Präparate wurde das Kriterium gerichtet/ungerichtet jedoch nicht berücksichtigt.

4.3.1.1 Ungerichtete Anordnung von vWF-Fäden auf den Gasaustauschmembranen

Ungerichtete vWF-Fäden fanden sich vor allem in dem in Abbildung 21 mit Pfeilen markierten Bereichen. Abbildung 21A zeigt einen Ausschnitt eines Kreuzungspunktes. In der rechten Bildhälfte erkennt man den Anschnitt eines „Auges“. Von oben und unten laufen jeweils gerichtete Fadenstränge vom Ober- und Unterpole des KP aufeinander zu und treffen sich in der Mitte (Pfeil). Hier kommt es zur Überlagerung der einzelnen Fäden und somit zu einer ungerichteten Konformation. Abbildung 21B zeigt ebenfalls einen Ausschnitt eines Kreuzungspunktes. Links oben befindet sich das „Auge“ eines KP. Dargestellt ist ein gerichteter Fadenstrang, welcher vom rechten oberen Bildrand nach links unten verläuft. Dort, wo der gerichtete Fadenstrang auf den Stang der gegenüberliegenden Seite trifft (nicht dargestellt), kommt es zur Ausbildung ungerichteter Fäden (Pfeil).

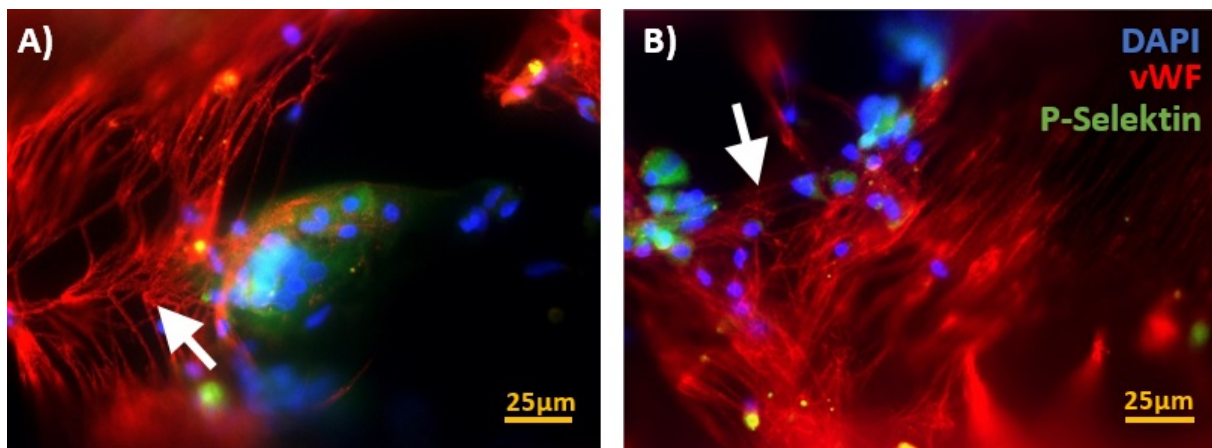


Abbildung 21: Beispiel für ungerichtete vWF-Fäden. Bild A: Kreuzungspunkt rechts im Bild. Fäden laufen vom unteren und oberen Pol zusammen (Pfeil). Bild B: Kreuzungspunkt links oben im Bild angeschnitten. Die Fäden laufen zum unteren Pol und überlagern sich dort (Pfeil).

Ungerichtete vWF-Fäden können im Verbund mit anderen vWF-Fäden oder einzeln bestehen. Außerdem befanden sich häufig Zellkerne in direkter Nähe von ungerichteten vWF-Fäden (s. Abb.21, Pfeilmarkierung).

4.3.1.2 Gerichtete Anordnung von vWF-Fäden auf den Gasaustauschmembranen

Gerichtete vWF-Fäden fanden sich am häufigsten um Kreuzungspunkte herum. Ausgehend von den Polen des KP (s. Abb.10, Markierung 1-4) wachsen die Fäden linear (s. Abb.22). Unabhängig von der Fadendicke befanden sich häufig Zellkerne auf der Fadenoberfläche.

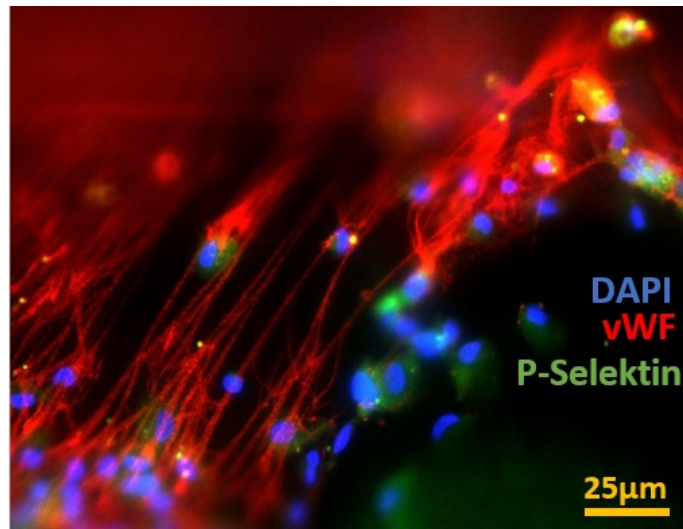


Abbildung 22: Beispiel für gerichtete vWF-Fäden. Parallel laufende Fäden zwischen dem oberen und seitlichen Pol eines Kreuzungspunktes. Anlagerung einzelner Zellkerne.

4.3.1.3 Assoziation der vWF-Fäden mit Zellkernen oder Granulae

Ungeachtet der Orientierung der vWF-Fäden wurde die räumliche Beziehung von vWF-Fäden mit Granulae und Zellkernen untersucht. Grundlage der Daten sind 52 Bilder der 11 Faden-positiven Oxygenatoren der Wilm-Arbeit mit Faserdurchmesser $\geq 2\mu\text{m}$. Es wurde nach Zellen bzw. Granulae gesucht, welche einen räumlichen Bezug zur Fadenoberfläche aufweisen (s. Abb.23). Nur einer der 11 Oxygenatoren wies keine Granulae assoziiert mit Fäden auf (s. Tab.13). 10/11 Oxygenatoren (91%) mit Fäden hatten sowohl Granulae als auch Zellkerne in direkter Nähe der vWF-Fäden. Diese Ergebnisse ließen sich auch in der 2. Auswertung reproduzieren. Hier waren sogar 100% (8/8) der Oxygenatoren mit Fäden mit Granulae vergesellschaftet. Fadenassoziierte Strukturen weisen sehr häufig auch P-Selektin-positive Bereiche auf. So waren bei 5/8 Präparaten die Granulae in Kernnähe auch P-Selektin-positiv.

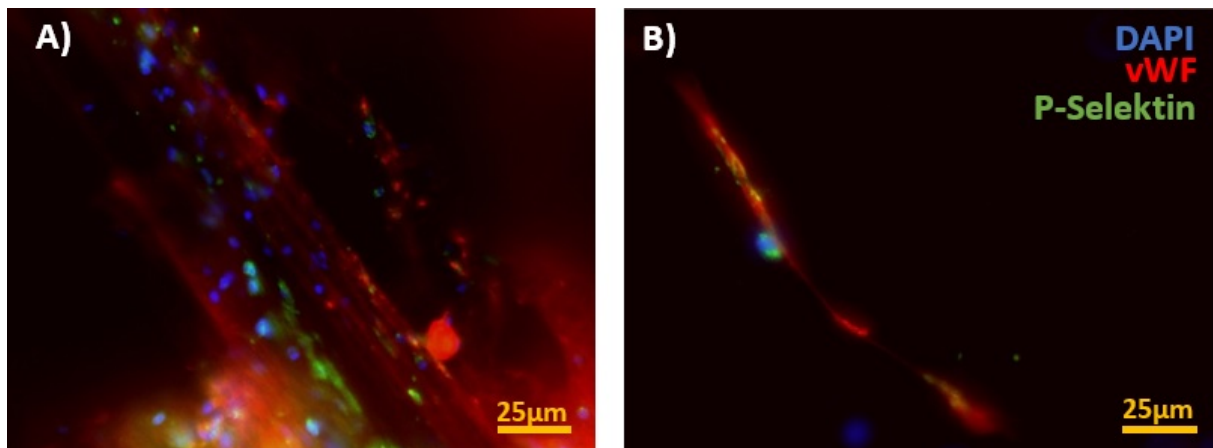


Abbildung 23: vWF-Fäden mit angelagerten Leukozyten. Bild A: Mehrere parallel angeordnete vWF-Fäden mit eingelagerten Zellkernen. Bild B: Einzelner Faden mit aufgelagerten Granulae und einer Zelle.

	1. Auswertung Wilm Oxygenatoren mit Fäden (max. 11)	2. Auswertung Oxygenatoren mit Fäden (max. 8)
Granulae positiv	10	8
Zellkerne positiv	11	8
P-Selektin positiv		5
P-Selektin negativ		0
G+/ ZK+	10	8
G-/ ZK-	0	0
G+/ ZK-	0	0
G-/ ZK+	1	0

Tabelle 13: Räumliche Beziehung von vWF-Fäden mit Granulae (G), Zellkernen (ZK) und P-Selektin. P-Selektin wurde in der 1. Auswertung nicht bestimmt, daher fehlen hier die zugehörigen Werte. +/- für positiv/negativ

4.3.2 Spiderwebs

Spiderwebs wurden bereits bei der ersten Klassifikation beschrieben und waren in etwa einem Drittel (23/71 Präparaten, 20/57 Oxygenatoren) nachweisbar. In der Bildokumentation von J. Wilm waren SW nur in der Hälfte der Oxygenatoren sichtbar. Spiderwebs sind nicht obligat in der Nähe von Kreuzungspunkten ansässig, sondern finden sich auch regelmäßig diffus und ohne Muster über die Gasfasern verteilt. Um die Kreuzungspunkte herum ist die vWF-Fluoreszenz meist sehr intensiv. Um Spiderwebs auch an diesen Stellen nachweisen zu können, müssen Stellen gesucht werden,

an denen der vWF einschichtig liegt (Spiderweb-Monolayer, s. Abb.24A) und nicht von einer hohen Zellpopulation oder anderen vWF-Formen überlagert wird.

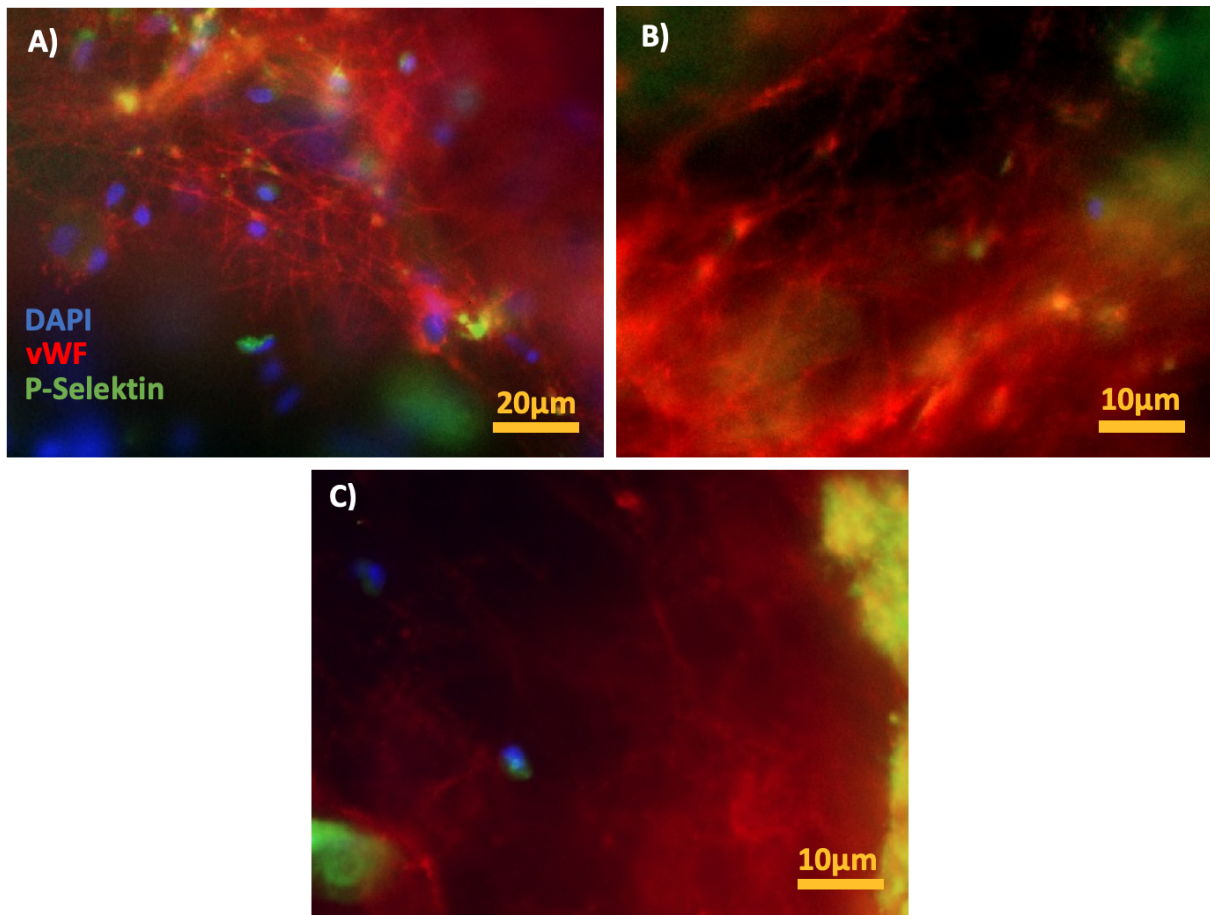


Abbildung 24: Beispiel für Spiderwebs der 2. Auswertung. Bild A: Spiderweb-Monolayer. Bild B: Überlagerung der Spiderwebs verursacht eine diffuse Fluoreszenz. Bild C: Stark fluoreszierender Kettfaden am rechten Bildrand, diffuse Fluoreszenz von vWF bei überlagerten Spiderwebs.

Spiderwebs, welche räumlich mit KP vergesellschaftet sind, bilden einen mehr oder weniger dicken vWF-Saum um den Kreuzungspunkt aus (vgl. Markierung d. in Abb.10) oder einen Monolayer im „Schatten“ des Kreuzungspunkts (s. Markierung a. in Abb.10). Da die Auswertung unter dem Mikroskop nur zweidimensional möglich war, die SW sich aber dreidimensional ausbreiten können, kam es häufig zu Überlagerungen. Eine Abgrenzung von sehr feinen Fasern $<1\mu\text{m}$ fällt bei starker Besiedelung und folglich einer stark fluoreszierenden Umgebung durch Überlagerungen oft schwer (s. Abb.24B,C). Des Weiteren lassen sich die Spiderwebs anhand ihrer assoziierten Strukturen in zwei Untergruppen teilen: Spiderwebs lagern einerseits zelluläre Strukturen (Thrombozyten, Leukozyten) oder azelluläre Strukturen (Granulae) in ihr Netzwerk ein.

4.3.2.1 Spiderwebs mit eingelagerten Thrombozyten/Leukozyten

Vor allem in Spiderwebs, welche mit Kreuzungspunkten kolokalisiert sind, lagern sich eine Vielzahl von Zellkernen in das Netz aus vWF ein. Weist ein Kreuzungspunkt einen SW-Monolayer auf, so finden sich in diesem Monolayer regelhaft eine große Menge eingelagerter Zellkerne. Unter Mitberücksichtigung des grünen Kanals (P-Selektin) zeigt sich, dass das Netzwerk aus Spiderwebs ebenso P-Selektin anreichert. Teilweise ist die Grünfärbung eher diffus (s. Abb.25A). Es finden sich aber auch Bildausschnitte, auf welchen das P-Selektin ohne Zellkerne als klar abgrenzbare Struktur auf den Spiderwebs abgelagert ist (s. Abb. 25B).

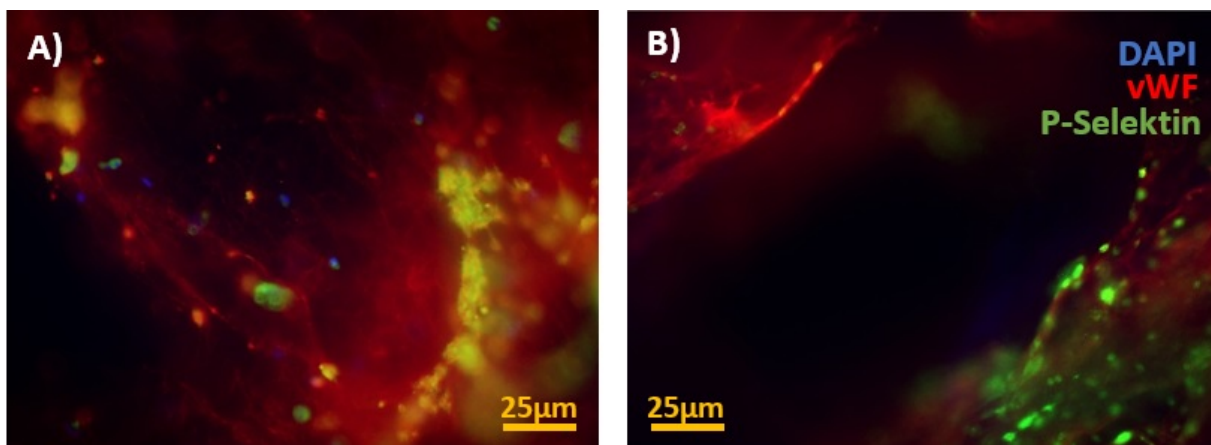


Abbildung 25: Spiderwebs mit eingelagerten Leukozyten und positiver Fluoreszenz für P-Selektin. Bild A: Spiderwebs mit eingelagerten Zellkernen. Eine Überlagerung von vWF-positiven Granulae und P-Selektin-positiven Granulae erscheint hier gelb. Bild B: Aussparung durch einen Kreuzungspunkt. Oben Spiderwebs und vWF-Fäden, unten Spiderwebs mit scharf abgrenzbaren P-Selektin-positiven Granulae.

4.3.2.2 Spiderwebs mit eingelagerten vWF-Granulae („Targets“)

Im Detail handelt es sich hier um, in das Netzwerk der Spiderwebs eingelagerte, granuläre vWF-Strukturen, die vorzugsweise an den Abzweigungen der Quervernetzungen sitzen. Diese vWF-Struktur aus zentralem Granulum und strahlenförmig angeordneten vWF-Fasern wurde unter 3.2.1.4 bereits als „Target“ bezeichnet. Diese Granulae von variablem Durchmesser, jedoch immer größer 2µm, finden sich integriert in das vWF-Netzwerk (s. Abb.26). Aufgrund ihrer Lokalisation in Gabelungen der Spiderwebs wirkt es, als würden sie bei der Quervernetzung der Spinnennetze helfen. Sie sind weder mit DAPI noch mit P-Selektin assoziiert und sind in ihrer Anzahl variabel.

Bei 17 Präparaten (von 23 Präparaten mit SW) wurden intensiv leuchtende Targets identifiziert (74%). Nach Entblindung waren es noch 16 Präparate aus 20 Oxygenatoren (80%). Die anderen Präparate wiesen keinerlei Targets auf (s. Tab.14).

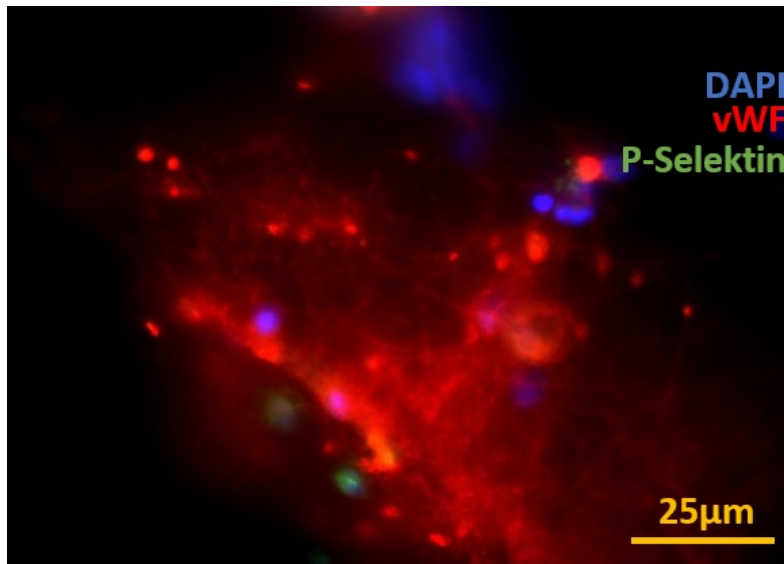


Abbildung 26: Beispiel für Targets der 2. Auswertung. Große Fläche aus Spiderwebs mit mehreren Targets und einigen eingelagerten Zellkernen.

	verblindet (23)	Anteil in %	entblindet (20)	Anteil in %
SW+/ Target+	17	74	16	80
SW+/ Target–	6	26	4	20

Tabelle 14: Häufigkeit von Targets und Spiderwebs in verblindeter und entblindeter Auswertung, +/- für positiv/negativ

4.3.3 Granulae

Granulae zeigten sich als stark fluoreszierende vWF-positive, rundliche, scharf abgegrenzte Strukturen, welche

- auf der Zelloberfläche bzw. im Zytoplasma von Leukozyten (s. Abb.27A,B),
- an vWF-Fasern angelagert, „Targets“ (s.Abb.27C),
- oder kernfern und unabhängig von umliegenden Strukturen diffus auf der Gasfasermembran verteilt vorkommen können (s.Abb.27D).

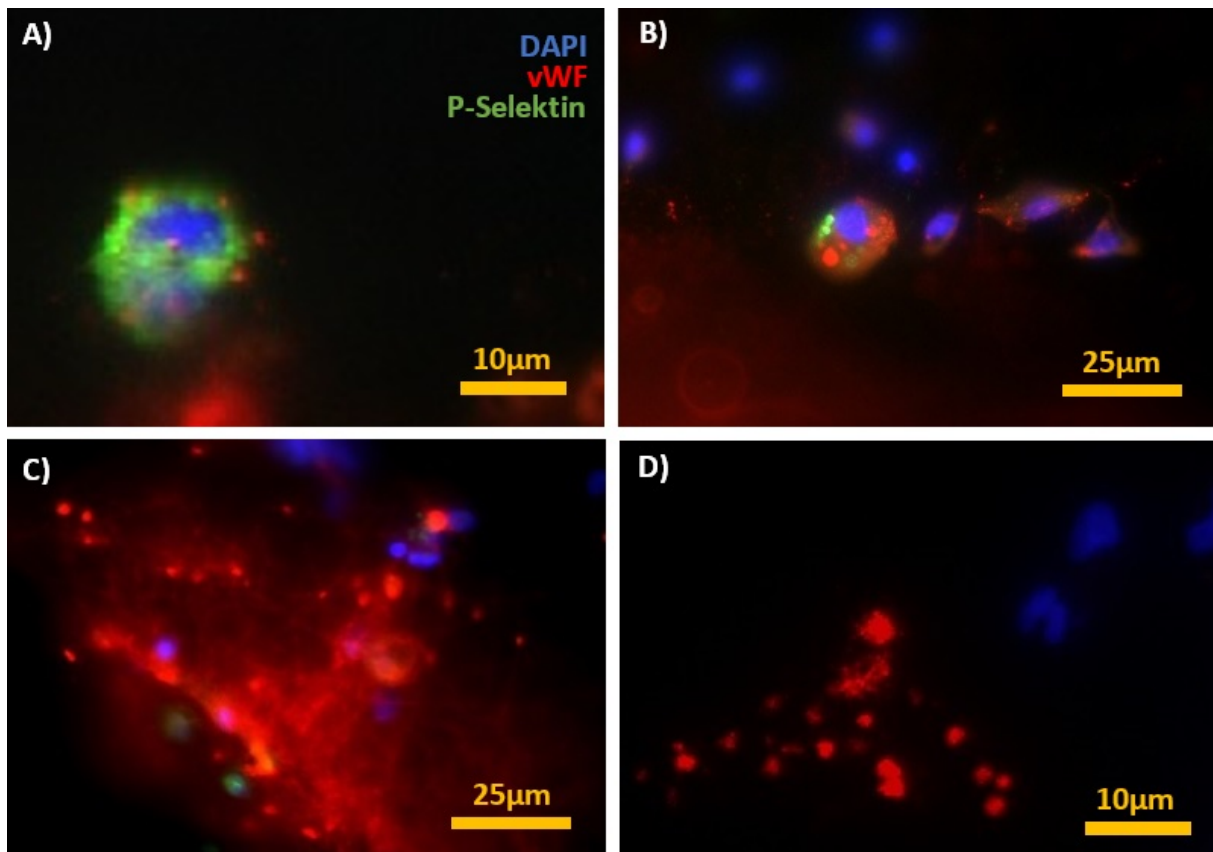


Abbildung 27: Die verschiedenen Erscheinungsformen von vWF-Granulae. Bild A: P-Selektin-positiver Leukozyt mit aufgelagerten vWF-positiven Granulae. Bild B: Im Vordergrund Zelle mit P-Selektin- und vWF-positiven, scharf abgrenzbaren Granulae im Zytoplasma. Bild C: vWF-Granulae als Targets eingelagert in Spiderwebs. Bild D: Extrazytoplasmatische vWF-Granulae im Haufen gruppiert auf einer Gasfaser ohne Bezug zu anderen Strukturen.

Diese vWF-positiven, granulären Ablagerungen (Durchmesser $\leq 2\mu\text{m}$) liegen entweder intrazytoplasmatisch vor oder diffus über die Membran verteilt. Intrazytoplasmatische Granulae werden im Folgenden als IZP G bezeichnet, sowie extrazytoplasmatische Granulae als EZP G.

Die mit 96% (68/71 Präparaten) am häufigsten vorkommende vWF-Struktur auf den Präparaten stellten die granulären Strukturen dar. Nach Entblindung waren noch 54 der 57 Oxygenatoren (95%) mit Granulae besiedelt. Die verbleibenden drei Oxygenatoren waren dicht mit „Pseudomembranen“ besetzt, sodass eine Identifizierung von vWF-Granulae nicht möglich war. vWF-Granulae lagen entweder als IZP G oder EZP G vor, letztere teilweise diffus über die Gasfasermembran verteilt. In den verblindeten Proben wurden IZP G mit einer Häufigkeit von 92% (65/71 Präparaten) und EZP G mit einer Häufigkeit von 90% (64/71 Präparaten) gefunden. Nach Entblindung waren IZP G bzw. EZP G in 52 bzw. 50 von 57 Oxygenatorpräparaten (91% bzw. 88%) sichtbar. Lediglich 3/71 Präparate, bzw. 3/57 Präparate nach Entblindung wiesen weder EZP G noch IZP G auf (s.Tab.15).

	verblindet (71)	Anteil in %	entblindet (57)	Anteil in %
IZP G	65	92	52	91
EZP G	64	90	50	88
ohne Granulae	3	4	3	5

Tabelle 15: Vorkommenshäufigkeit von intra- und extrazytoplasmatischen Granulae

4.3.3.1 Extrazytoplasmatische Granulae (EZP G)

Repräsentative Beispiele für EZP G finden sich in Abbildung 28. 17 von 50 Oxygenatoren mit EZP G waren nach Entblindung mit anderen vWF-Strukturen (Fäden und/oder SW) vergesellschaftet (34%). Der größte Anteil der EZP G (33/50 Oxygenatoren) lag in Haufen gruppiert (s. Abb.28B,C) oder disseminiert (s. Abb.28A) vor. Betrachtet man jedoch die fadenartigen vWF-Strukturen so stellt man fest, dass 7 von 50 Oxygenatoren mit EZP G (14%) mit Fäden assoziiert sind (s. Tab.16).

	verblindet (64)	Anteil in %	entblindet (50)	Anteil in %
EZP G mit Fäden	7	11	7	14
EZP G mit SW	19	31	16	32
EZP G mit Fäden und/oder SW	20	31	17	34

Tabelle 16: Kolo-kalisation von EZP G mit Fäden und/oder Spiderwebs

Gleichzeitig entsprechen diese 7 Oxygenatoren aber 88% von nur insgesamt 8 Oxygenatoren mit Fäden. Geht man von den netzartigen Spiderweb-Strukturen aus, so sind 16 von 50 Oxygenatoren mit EZP G (32%) mit SW assoziiert, was 16 von 20 SW-positiven Oxygenatoren entspricht (80%). Es zeigt sich, dass in 80% der Fälle SW mit EZP G assoziiert sind und sogar 87% der vWF-Fäden mit EZP G assoziiert sind. 75% der Präparate mit EZP G wiesen eine Kolo-kalisation der Granulae mit P-Selektin auf, wohingegen IZP G immer mit P-Selektin vergesellschaftet waren. Bei 25% der Präparate war dagegen kein direkter Bezug zu P-Selektin-positiven Strukturen darstellbar. Nach Entblindung stieg der Anteil der Oxygenatoren mit P-Selektin positiven EZP G von 75 auf 82%.

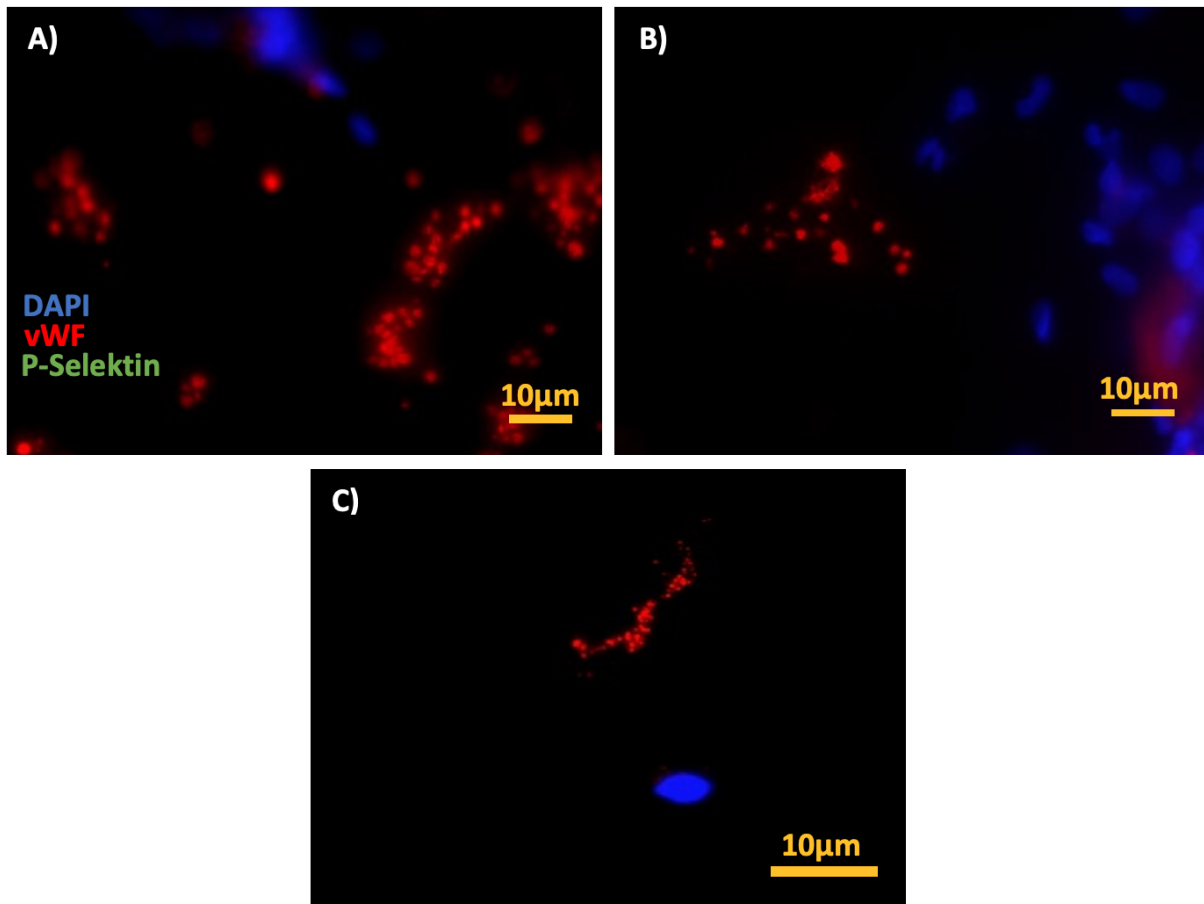


Abbildung 28: Beispiele für extrazytoplasmatische Granulae. Bild A: Mehrere in Gruppen gehäufte vWF-Granulae neben DAPI-positivem Zellkern. Bild B: Gruppierung von EZP-G neben einer Zellgruppe. Bild C: EZP G neben einzelner Zelle.

4.3.3.2 Intrazytoplasmatische Granulae (IZP G)

Ein repräsentatives Beispiel für IZP G findet sich in Abbildung 29. Jedes der 65 Präparate mit IZP G war obligat mit P-Selektin vergesellschaftet. 52 der 57 Oxygenatoren (91%) waren mit IZP G besiedelt. 19 von 52 Oxygenatoren mit IZP G waren nach Entblindung mit anderen vWF-Strukturen (Fäden und/oder SW) assoziiert (37%). Aber nur 8 von 52 Oxygenatoren mit IZP G wiesen gleichzeitig vWF-Fäden auf den Gasfasern auf (15%). Betrachtet man jedoch die Oxygenatoren mit vWF-Fäden, so stellt man fest, dass alle 8 Oxygenatoren, welche vWF-Fäden aufweisen auch IZP G vorweisen. Geht man von den netzartigen Spiderweb-Strukturen aus, so sind 33% der IZP G mit SW assoziiert (17 von 52, s. Tab.17). 17 von 20 SW-positiven Oxygenatoren aber, also 85% waren mit IZP G assoziiert. Somit sind nach Entblindung 85% der SW-positiven Oxygenatoren und 100% der vWF-Faden-positiven Oxygenatoren mit IZP G vergesellschaftet.

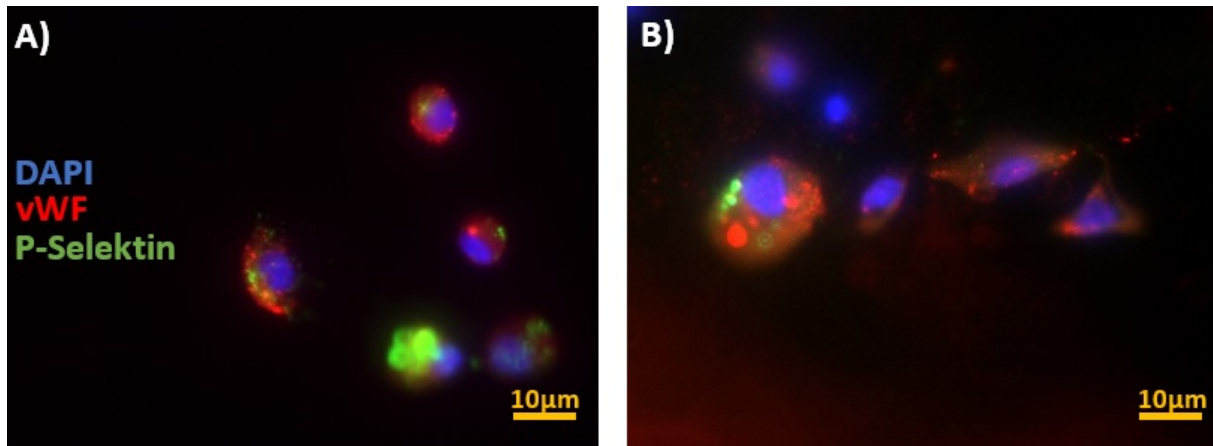


Abbildung 29: Beispiele für intrazytoplasmatische Granulae. Bild A: Zellgruppe mit vWF- und P-Selektin-positiven Granulae im Zytoplasma. Bild B: Zellgruppe, eine Zelle mit deutlich P-Selektin- und vWF-positiven Granulae.

	verblindet (65)	Anteil in %	entblindet (52)	Anteil in %
IZP G mit Fäden	8	12	8	15
IZP G mit SW	20	31	17	33
IZP G mit Fäden und/oder SW	22	34	19	37

Tabelle 17: Kolokalisation von IZP G mit Fäden und/oder Spiderwebs

4.3.3.3 Gleichzeitiges Auftreten von extra- und intrazytoplasmatischen Granulae

Bei der Mehrzahl der Präparate (61 von 71 Oxygenatoren, 86%) lagen sowohl IZP G als auch EZP G vor. In 4% der Präparate (3 von 71) fanden sich jedoch entweder die eine oder die andere Untergruppe. In 6% (4 von 71) fanden sich ausschließlich IZP G, in 6% (4 von 71) fanden sich ausschließlich EZP G. Nach Entblindung wiesen 48 von 57 Oxygenatoren (84%) sowohl IZP G als auch EZP G auf. 3 Oxygenatoren (5%) wiesen keinerlei granuläre Struktur auf. 2 Oxygenatoren (4%) wiesen ausschließlich EZP G auf und 4 Oxygenatoren (7%) nur IZP G (s.Tab.18).

	verblindet (71)	Anteil in%	entblindet (57)	Anteil in%
EZP G+/ IZP G+	61	86	48	84
EZP G-/ IZP G-	3	4	3	5
EZP G+/ IZP G-	3	4	2	4
EZP G-/ IZP G+	4	6	4	7

Tabelle 18: Kolokalisation von EZP G und IZP G, +/- für positiv/negativ

4.3.4 P-Selektin positive Zellen

Vor allem auf Präparaten mit spärlicher Zellbesiedelung und wenig vWF-Strukturen war es möglich, Einzelzellen zu betrachten. Es fiel auf, dass ein Teil der Leukozyten P-Selektin im Zytoplasma anreichterte (s. Abb.30). Die Intensität des P-Selektins im Zytoplasma variierte von einzelnen P-Selektin-positiven Granulae über eine diffus verteilte Anfärbung des gesamten Zytoplasmas bis hin zu einer intensiven Grünfärbung, welche eine Differenzierung einzelner Granulae nicht mehr zuließ. Im Folgenden gilt ein Leukozyt dann als P-Selektin-positiv, wenn er entweder P-Selektin positive Granulae im Zytoplasma aufwies oder das Zytoplasma eine deutliche Grünfärbung zeigte (s. Abb.31A,B). Die Auswertung basiert auf der Auszählung von Zellkernen/Bild aus 57 Oxygenatoren. In Abbildung 30 sind die 57 Oxygenatoren (X-Achse) dargestellt. Der grüne Anteil der Säule entspricht dem prozentualen Anteil an P-Selektin-positiven Zellen an der Gesamtzellzahl. Die Gesamtzellzahl ergibt sich aus allen gezählten Zellkernen aller 400x vergrößerten Bildern eines Oxygenators. Die blaue Säule steht entsprechend für die P-Selektin-negativen Zellkerne. Die grüne und blaue Säule jeweils zusammengenommen ergeben 100% (Y-Achse). P-Selektin-positive Zellkerne fanden sich aber nicht nur disseminiert über die Gasfasern verteilt, wie in Abbildung 31A und B zu sehen, sondern konnten auch im Verbund mit z.B. vWF-Fäden identifiziert werden (s. Abb.31C).

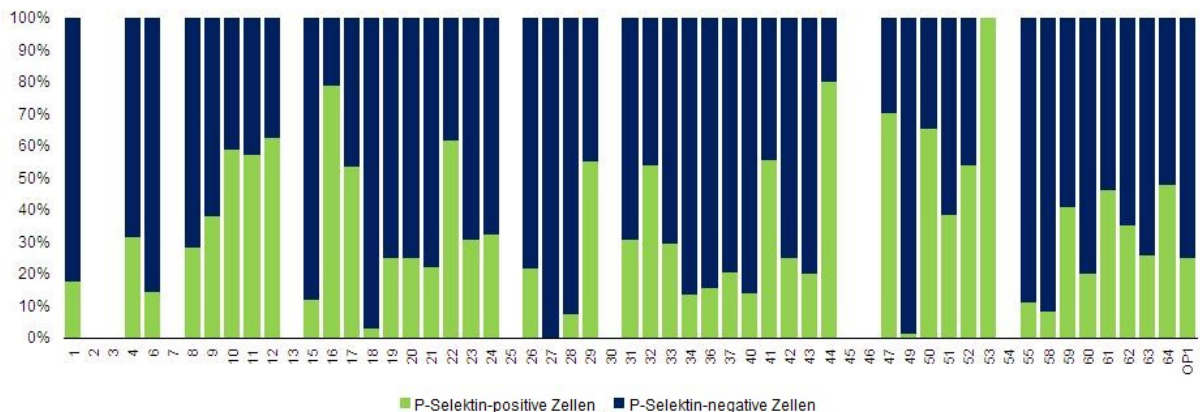


Abbildung 30: Anteil der P-Selektin-positiven Zellen an der Gesamtzellzahl. Auf der X-Achse sind die 57 Oxygenatoren der 2. Auswertung aufgetragen. Die Y-Achse entspricht 100% aller auf den Bildern sichtbaren Zellkernen. Grün = Anteil der P-Selektin-positiven Zellkerne an der Gesamtzellzahl des Oxygenators; Blau = Anteil der P-Selektin-negativen Zellen. Dünn besiedelte Oxygenatoren, welche keine Zellen auf den Gasfasern zeigten, besitzen keinen entsprechenden Y-Wert.

Bei 9 Oxygenatoren (16%) waren keine P-Selektin-positiven Zellen nachweisbar. Es handelte sich um dünn besiedelte Oxygenatoren. Bei den anderen Oxygenatoren konn-

ten P-Selektin-positive Zellen identifiziert und quantifiziert werden. Die Verteilung war sehr variabel. Bei 34/57 Oxygenatoren (60%) waren weniger als 50% der Leukozyten P-Selektin-positiv. Bei den restlichen 25% der Oxygenatoren (14/57) waren mehr als 50% der Zellen mit P-Selektin assoziiert.

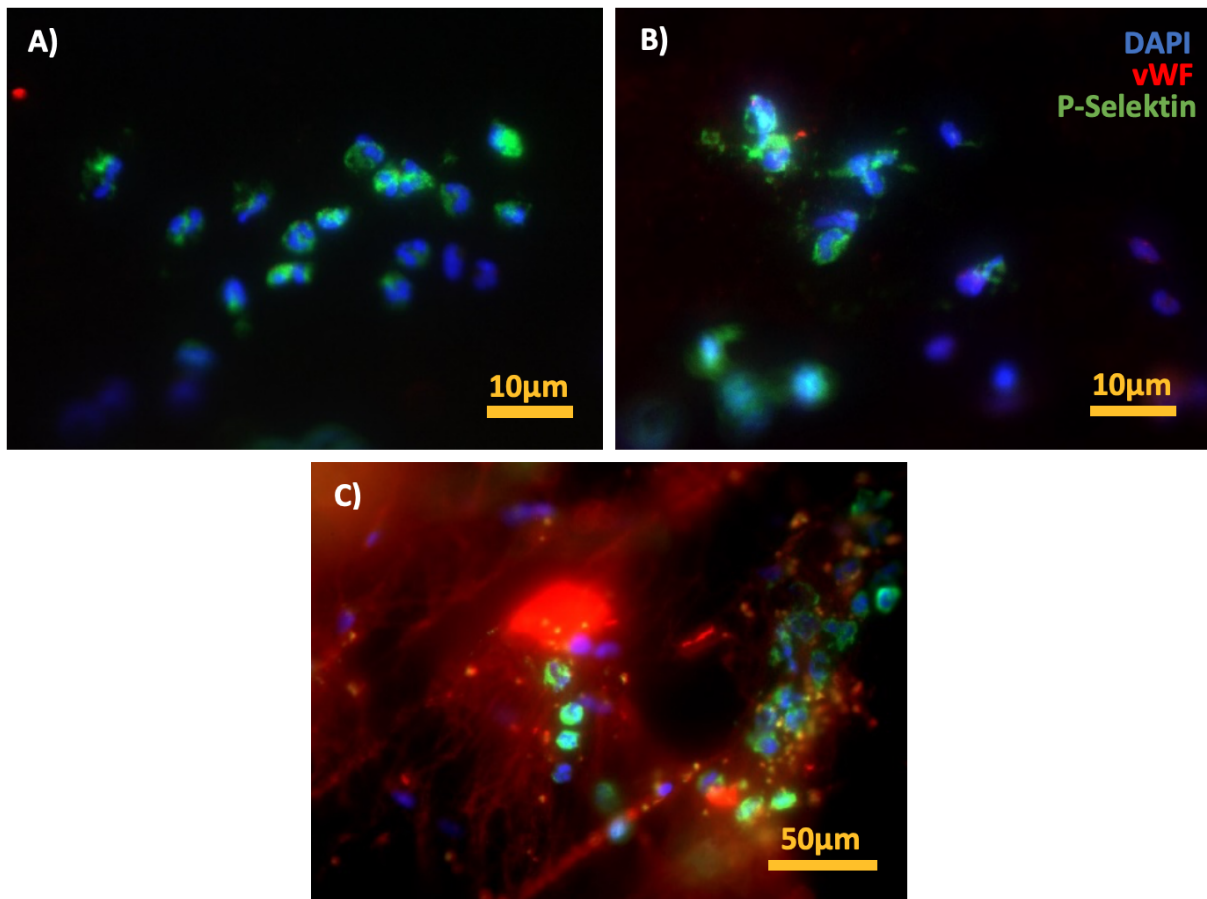


Abbildung 31: Beispiel für P-Selektin-positive Zellen. Bild A: Zellgruppierung von 17 Zellen, 14 davon mit P-Selektin im Zytoplasma. Bild B: Aufsicht auf eine Gruppe Zellen, teilweise P-Selektin-positives Zytoplasma. Bild C: Eingelagerte P-Selektin-positive Zellen in ein Netz aus Spiderwebs.

4.4 Vorkommenshäufigkeit der unterschiedlichen vWF-Strukturen

Nachdem qualitative Kriterien für die Klassifikation des vWF erstellt wurden, wird im Folgenden der Versuch unternommen, die definierten vWF-Strukturen zu quantifizieren. Es soll nach Anhaltspunkten gesucht werden, wie häufig die einzelnen Strukturen vorhanden sind. Tabelle 11 fasst die Häufigkeit von Fäden, Spiderwebs, Granulae und „Targets“ auf den Membranoxygenatoren sowohl auf den Präparaten von J. Wilm, als auch auf denen der 2. Auswertung, zusammen. Auf nahezu allen Präparaten waren Granulae (96% bei J. Wilm, 95% in der 2. Auswertung) nachweisbar. Auf ca. der Hälfte bis einem Drittel der Präparate (49% bei J. Wilm, 35% in der 2. Auswertung) bildeten

sich Spiderwebs aus. Seltener (28% in beiden Auswertungen) waren „Targets“ auszumachen. Fäden mit einem Durchmesser $>2\mu\text{m}$ waren mit 21% bei J. Wilm (s. Tab.12) und 14% in der 2. Auswertung am seltensten zu finden.

Eine weitere Beobachtung war, dass die Beladung der Gasfasern mit zellulären und azellulären Blutbestandteilen stark variierte. Es existierten Präparate, welche dicht mit vWF besiedelt waren. Ebenso stark variierte die Zahl der sichtbaren Zellkerne auf den Gasfasern. Teilweise bildeten sich „Pseudomembranen“ aus. Aus den Daten von J. Wilm geht hervor, dass sich dort in 9% (5/53) der Oxygenatoren „Pseudomembranen“ fanden. Im Rahmen der 2. Auswertung wurden „Pseudomembranen“ auf 23% (13/57) der Oxygenatoren detektiert. Da damals angenommen wurde, dass die Menge des auf den Gasfasern abgelagerten vWF mit einer hohen Zelldichte einhergehen müsse, wurden zur Bestimmung der Beladungsdichte die Grauwerte für DAPI (Zellen) und vWF bestimmt. Wie Grauwerte zu bestimmen waren, wurde in der Dissertation von J. Wilm ausführlich beschrieben [69]. Trägt man die DAPI- gegen die vWF-Grauwerte auf, ergibt sich eine lineare Korrelation (s. Abb.32) zwischen Zellbesiedelung und vWF-Dichte. Präparate mit hoher Zelldichte bilden somit immer auch hohe vWF-Ablagerungen ab.

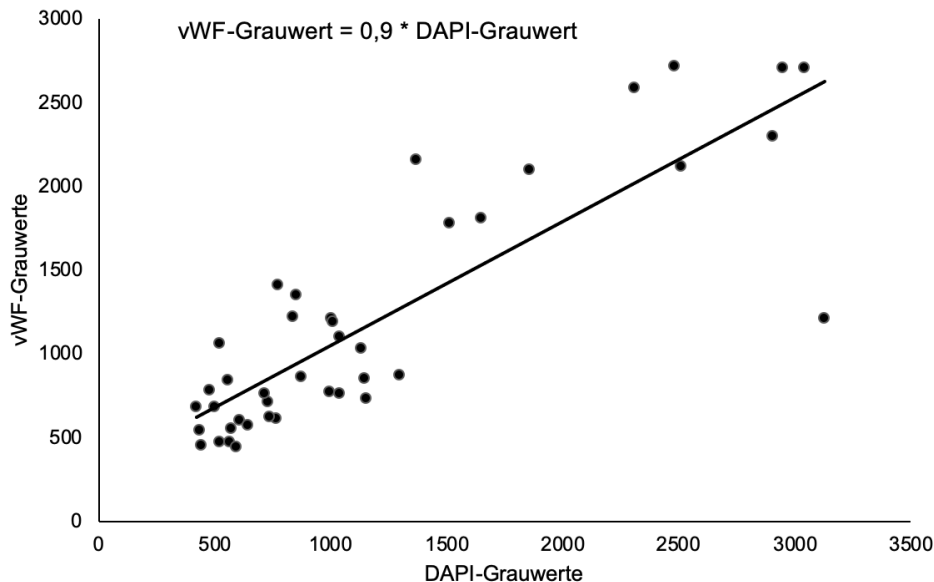


Abbildung 32: Gegenüberstellung von vWF- und DAPI-Grauwerten. Es zeigt sich ein linearer Zusammenhang zwischen beiden Größen. Die Daten wurden in der Dissertation von J. Wilm erhoben.

Auf Grundlage der vWF-Grauwerte von J. Wilm und den Informationen zum Auftreten der vWF-Strukturen auf den Präparaten der 2. Auswertung können nun Rückschlüsse auf den Zusammenhang von vWF-Beladungsdichte und Erscheinungsform

des vWF gezogen werden. Hierzu wurden die vWF-Grauwerte mit dem Vorkommen verschiedener vWF-Strukturen (Granulae, Spiderwebs, „Targets“, Fäden) verglichen (s. Abb.33), um die Verteilungshäufigkeiten der vWF-Strukturen in Abhängigkeit von der vWF-Beladungsdichte der einzelnen Oxygenatoren darzustellen. Aus den analysierten Oxygenatoren von J. Wilm und denen der 2. Auswertung fand sich eine Schnittmenge von 38 Oxygenatoren, zu denen sowohl vWF-Grauwerte, als auch die Informationen zu den einzelnen vWF-Strukturen vorlagen. Die Oxygenatoren wurden separat für jede vWF-Struktur nach aufsteigenden vWF-Grauwerten sortiert. Granuläre vWF-Strukturen fanden sich in 100% (38/38), Spiderwebs in 29% (15/38), „Targets“ in 34% (13/38) und Fäden in 21% (8/38) der betrachteten Oxygenatoren. 13/15 (87%) der Oxygenatoren mit Spiderwebs wiesen ebenfalls „Targets“ auf.

12 Oxygenatoren hatten niedrige vWF-Grauwerte (<750), 18 Oxygenatoren lagen im mittleren Grauwertbereich (750 - 1.750) und 8 Oxygenatoren wiesen hohe Werte für den vWF-Grauwert auf (1.750 - 3.000). Betrachtet man jeweils die Verteilung der vWF-Strukturen im niedrigen, mittleren und hohen vWF-Grauwertbereich, so finden sich Granulae als einzige vWF-Struktur auf allen Oxygenatoren (12/12) im niedrigen vWF-Grauwertbereich. Im mittleren Grauwertbereich befinden sich auf 100% (18/18) der Oxygenatoren Granulae, auf 56% (10/18) Spiderwebs, auf 50% (9/18) „Targets“ und auf 33% (6/18) vWF-Fäden. Im hohen Grauwertbereich besiedeln granulären Strukturen 100% (8/8) der Oxygenatoren, Spiderwebs 63% (5/8), „Targets“ 50% (4/8) und vWF-Fäden 25% (2/8). 75% (6/8) der Oxygenatoren mit vWF-Fäden liegen im mittleren vWF-Grauwertbereich und 25% (2/8) im hohen Grauwertbereich.

Im niedrigen Grauwertbereich (bis 750) waren somit ausschließlich vWF-Granulae auf den Gasfasern zu finden. Spiderwebs, bzw. „Targets“ fanden sich im mittleren und hohen Grauwertbereich (750 - 3.000). vWF-Fäden zeigten sich ausschließlich in Bereichen von 750 - 2.000, was dem mittleren und dem unteren hohen Bereich entspricht. Im sehr hohen Grauwertbereich (2.000 - 3.000) waren nur Spiderwebs, bzw. „Targets“ und Granulae auf den Gasfasern zu erkennen.

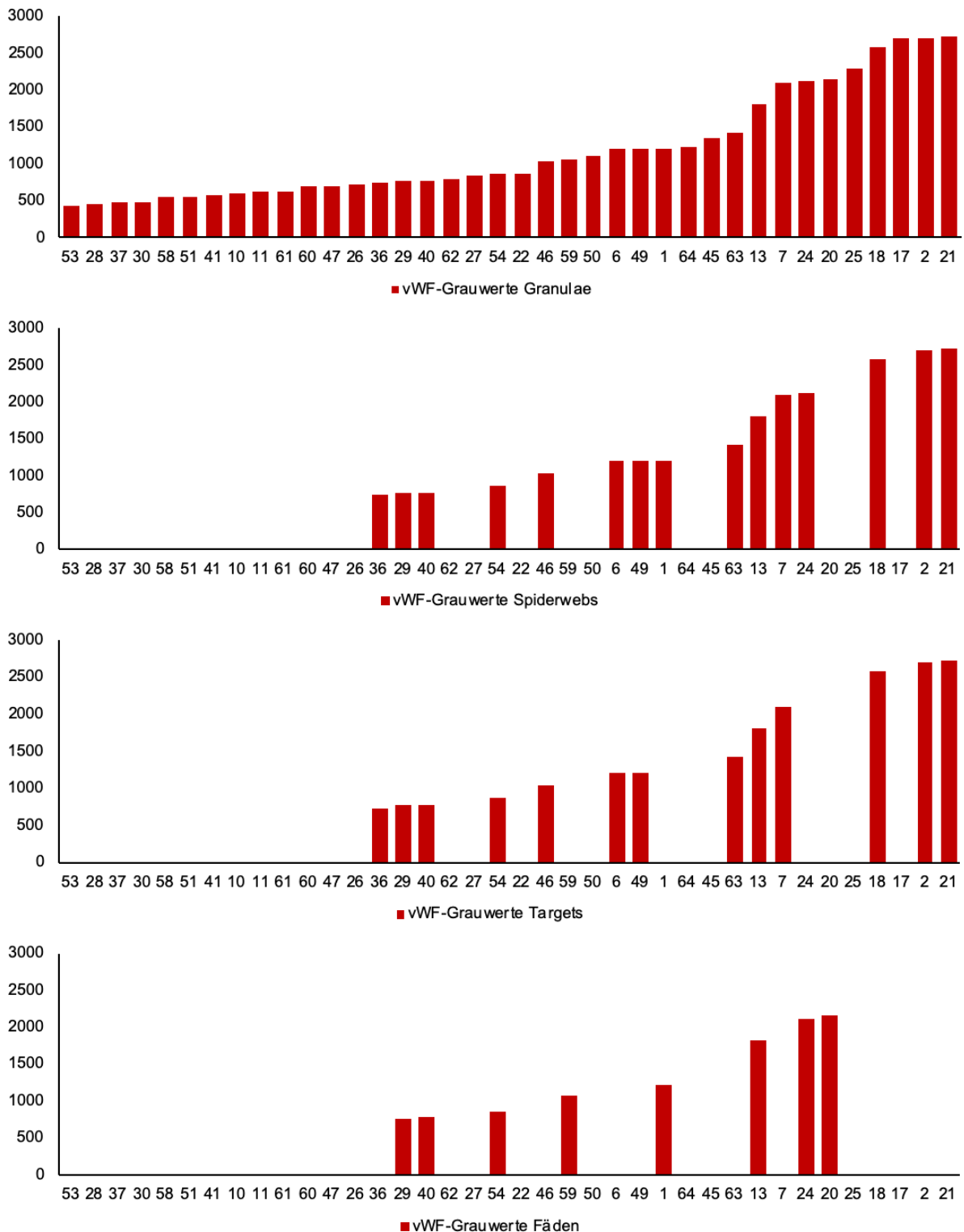


Abbildung 33: Vorkommen der vWF-Strukturen in Abhängigkeit vom vWF-Grauwert. Schnittmenge der Oxygenatoren (n=38) von J. Wilm und der 2. Auswertung, für welche sowohl vWF-Grauwerte, als auch Informationen über die ausgebildeten vWF-Strukturen vorlagen. Auf der Y-Achse sind die vWF-Grauwerte aufgetragen. Auf der X-Achse sind die Oxygenatoren, nach aufsteigenden vWF-Grauwerten sortiert, abgebildet. vWF-Granulae sind bereits bei niedrigen Grauwerten auf den Gasfasern vorhanden (oben). Spiderwebs können von mittleren bis sehr hohen Grauwerten identifiziert werden (2.v.o.). 13/15 Oxygenatoren mit Spiderwebs wiesen ebenfalls Targets auf (2.v.u.). vWF-Fäden fanden sich bei mittleren bis hohen vWF-Grauwerten (unten).

4.5 Versuch: Beschreiben der Strömungsverhältnisse um die KP anhand der Bilder des Oxygenators #20

Eines der 71 betrachteten Präparate wies eine sehr große Menge an vWF-Fäden auf, welche trotz der hohen Dichte gut voneinander zu differenzieren waren und auch die Kreuzungspunkte noch deutlich erkennen ließen. Das Labor für Biofluidmechanik der Ostbayerischen Technischen Hochschule Regensburg unter Leitung von Prof. Dr.-Ing. Lars Krenkel versuchte die Entstehung dieser Strukturen zu simulieren. Es sollten Rückschlüsse auf die Strömungsrichtung des Blutflusses im Membranoxygenator gezogen werden. Da aus vorausgegangenen in-vitro Experimenten von Herbig und Diamond [46] bekannt ist, dass sich das Wachstum von vWF-Fäden an der Strömungsrichtung des Blutflusses orientiert, wurde anhand der Bilder des Oxy #20 versucht, den Blutfluss um zwei übereinander und senkrecht aufeinander stehenden Gasfasern zu simulieren⁵. Dadurch, dass die Gasfasermatten immer um 90° versetzt zueinander übereinandergestapelt werden, kommt es in regelmäßigen Abständen zu Berührungspunkten der Gasfasern zweier benachbarter Lagen. Zudem werden die Gasfasermatten beim Fertigungsprozess verformt. Ein Block aus mehreren hundert Gasfasermatten und Wärmetauschermembranen wird mit einem Stempel komprimiert, bevor er in die Kunststoffschale gegossen wird. Durch diese Druckeinwirkung werden die Gasfasermatten aufeinandergedrückt. An den Auflagepunkten ist kein Blutfluss möglich, das Blut umströmt also die Kontaktpunkte (=Kreuzungspunkte). Die Betrachtung unter dem Mikroskop erfolgt in Aufsicht (vgl. hierfür Abb.34 und 35).

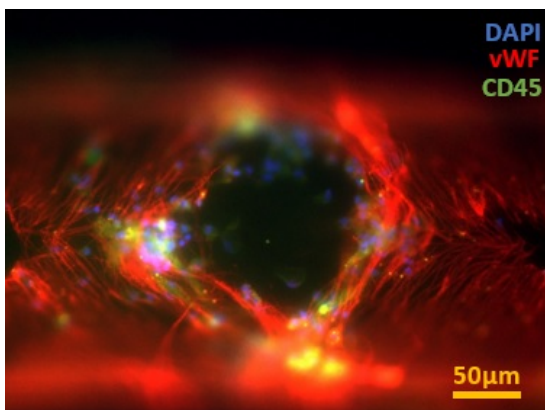


Abbildung 34: Aufsicht auf einen Kreuzungspunkt

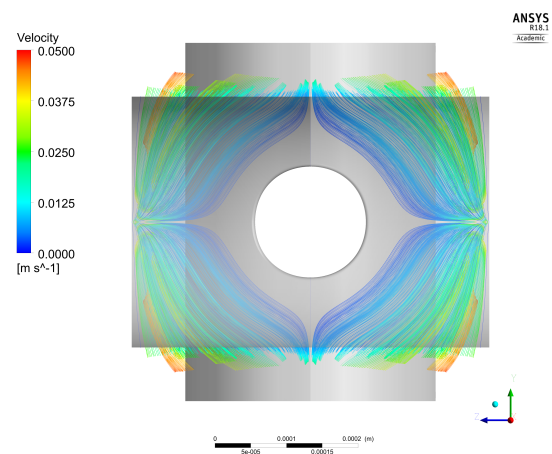


Abbildung 35: Strömungsberechnung in Aufsicht

⁵Die Simulationen (Abbildung 35 und 38) wurden von C. Birkenmaier (Labor für Biofluidmechanik, Ostbayerische Technische Hochschule Regensburg, Regensburg) unter der Leitung von Prof. Dr.-Ing. Lars Krenkel durchgeführt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die Simulation berechnet einen Blutfluss vertikal von oben nach unten durch den Membranoxygenatorblock, also aus der Richtung aus der auch der Betrachter auf das Präparat und auf den Objektträger blickt. Dies orientiert sich an der Blutflussrichtung, wie sie auch tatsächlich in Blockoxygenatoren vom Typ PLS, Cardiohelp oder iLA-active vorherrscht (s. Abb.36 [71]).

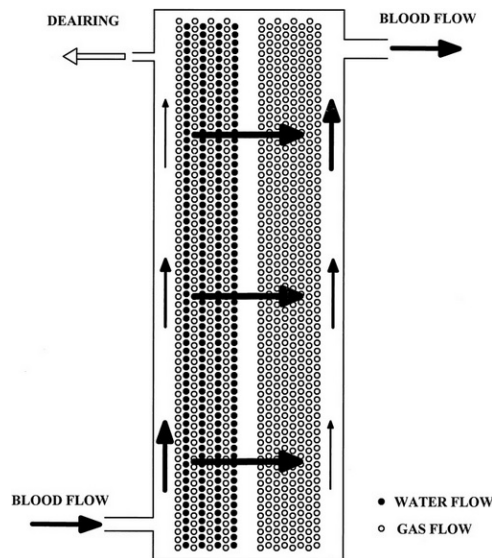


Abbildung 36: Schemazeichnung eines Oxygenators mit angezeichneter Blutflussrichtung, seitliche Ansicht

Beim Mikroskopieren und der anschließenden Bildauswertung zeigten sich Kreuzungspunkte, welche um das „Auge“ herum symmetrisch angeordnet waren (s. Abb.34 und 37). Zudem fand sich häufig genau mittig zwischen zwei Kreuzungspunkten eine leere punktförmige Stelle, welche nicht erklärbar war (s. Abb.37, Pfeilmarkierung). Die höchsten Strömungsgeschwindigkeiten wurden in den Simulationen an den Polstellen der Kreuzungspunkte gemessen. Dort, wo sich die Strömungslinien wieder vereinen, nachdem eine Gasfaser umspült wurde und die Blutsäule auf die daruntergelegene Gasfaser aufprallt (gelbe Bereiche in Abb.38, Pfeilmarkierung), erreichte das Blut eine Strömungsgeschwindigkeit bis zu 0,0375 m/s. Dies entspricht der mit Pfeilen markierten Stelle in Abbildung 37. Vergleicht man diese Zahl mit den Geschwindigkeiten, welche bei Herbig und Diamond [46] notwendig waren, um die vWF-Faserbildung zu induzieren, so zeigte sich, dass die maximal vorherrschenden Geschwindigkeiten in der Simulation nicht ausreichen würden, um die vWF-Faserbildung zu induzieren. Zudem stellte sich die Frage, warum die vWF-Fäden nur in 8 der 53 Oxygenatoren auftraten. Die Simulationsversuche konnten dies aber nicht beantworten.

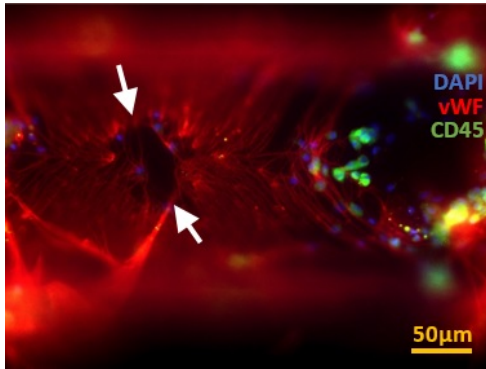


Abbildung 37: Aufsicht mit angeschnittenem Kreuzungspunkt

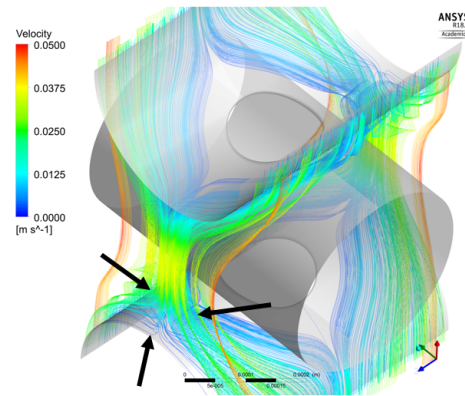


Abbildung 38: Simulation des Blutfluss von seitlich vorne

5 Diskussion

Auf Grundlage der Ergebnisse der vorangehenden Auswertung konnten mehrere Aussagen getroffen werden, welche nun im Folgenden diskutiert werden.

Auf PMP-Membranen bilden sich granuläre, netzartige, sowie fadenartige Strukturen des von Willebrand Faktor aus.

Ursprünglich sollte die vWF-Färbung genutzt werden, um Endothelzellen auf den Gasaustauschmembranen von benutzten Oxygenatoren zu identifizieren [69]. In Endothelzellen findet man den vWF als multimeres Glykoprotein [72] in langgestreckten Vesikeln, den Weibel-Palade-Körperchen [37], gespeichert. Es konnte jedoch keine in-vivo Endothelialisierung nachgewiesen werden [73]. Die Fotodokumentation der Proben wurde nachträglich genutzt, um die vWF-Strukturen auf den Membranen zu klassifizieren. Vorteil hiervon war, dass kein Bias beim Fotografieren der Proben entstehen konnte, da damals nicht nach vWF-Strukturen, sondern nach Endothelzellen gesucht worden war. Die Erscheinungsformen des vWF auf den PMP-Membranen der Membranoxygenatoren ließen sich in drei verschiedene Kategorien einteilen und mit folgender Häufigkeitsverteilung feststellen: 96% aller Oxygenatoren zeigten granuläre Formen des vWF. 49% der Oxygenatoren wiesen netzartige vWF-Strukturen auf und 23% zeigten Fadengebilde aus vWF. Im Rahmen einer erneuten Färbung von neuen Präparaten aus denselben Membranoxygenatoren und einer verblindeten Auswertung ließen sich diese Ergebnisse annähernd reproduzieren (Granulae 95%; SW 35%; Fäden 14%). Die Bildung dieser unterschiedlichen Strukturen wird vor allem in Zusammenhang mit der Bildung von thrombozytenreichen arteriellen Thromben, also unter Einwirkung hoher Scherkräfte, diskutiert [50][52][53][70]. Unphysiologische Flussbedingungen im ECMO-System (Blutpumpe oder Oxygenator) und der Kontakt

des Patientenblutes mit künstlichen Oberflächen [25] sind dafür bekannt die Gerinnungskaskade zu aktivieren und die Thrombusbildung zu initiieren [28][70][74].

Die oben beschriebenen vWF-Strukturen konnten in-vitro von Barg et al. [75] aus löslichen vWF-Multimeren auf verschiedenen Oberflächen produziert werden. Granuläre vWF-Strukturen (Durchmesser <800nm) wurden bei Proteinkonzentrationen von 0,5 - 5µg/mL auf mit Typ-I-Kollagen beschichteten Deckgläsern und Scherkräften von bis zu 35 dyn/cm² nachgewiesen. Ab einer vWF Konzentration von 50µg/mL und Scherkräften von 21 dyn/cm² ließen sich reichlich netzartige Strukturen produzieren. Nach Erhöhung der Scherkräfte von 21 auf 35 dyn/cm² war es möglich Faserbildung auf der Kollagenbeschichtung nachzuweisen. Unabhängig von der Proteinkonzentration ließen sich granuläre Strukturen nur nachweisen, wenn keinerlei Scherkräfte auf das Deckglas wirkten. Bei physiologischen vWF-Konzentrationen eines gesunden Erwachsenen von 10-20µg/mL würde man also keine thrombogenen vWF-Fasern erwarten.

Im Oxygenator finden sich jedoch keine kollagenbeschichteten Oberflächen, sondern ein hydrophober Kunststoff. Trotz der Beschichtung mit Heparin wurden auf diesen Oberflächen Plasmaproteine nachgewiesen – v.a. Fibrinogen, aber auch Fibronectin, Vitronectin und vWF [76][77], welche die nachfolgende Zelladhäsion (von Thrombozyten und Leukozyten) fördern [25]. Im in-vitro Modell von Barg et al. [75] wurde der oben beschriebene Versuchsaufbau sowohl mit Kollagen-beschichteten, als auch unbeschichteten Objektträgern, bzw. silanisierten Objektträgern durchgeführt. Durch die Silanisierung entstand eine hydrophobe Objektträgeroberfläche, welche im Experiment die Proteinadhäsion begünstigen sollte [75]. Es zeigte sich jedoch, dass trotz sehr hoher vWF-Konzentrationen von bis zu 500µg/mL und Scherkräften von 35 dyn/cm² nur noch Granulae auf den Deckgläsern gebildet wurden und es nicht mehr zur Faserausbildung kam. Auf unbeschichtetem Glas konnte keinerlei Anhaftung von vWF festgestellt werden. Da in der vorliegenden Studie allerdings sowohl Granulae, als auch Netze und Fäden auf den hydrophoben PMP-Membranen detektiert worden sind, muss es neben der Oberflächenbeschaffenheit des Fremdmaterials noch andere Ursachen für die vWF-Adhäsion geben. Da die verschiedenen vWF-Strukturen auch gleichzeitig auf den Gasfasern gefunden wurden, lag die Vermutung nahe, dass sich der Blutstrom im Membranoxygenator nicht konstant gleichförmig ausbreitet, sondern im Oxygenator Bereiche mit sehr hohen sowie auch sehr geringen Scherraten zu finden sind. Genaue Angaben zu den lokal vorherrschenden Strömungsverhältnissen fehlen bislang. Dazu kommt noch, dass schon kleinste thrombotische Ablagerungen auf den Gasfasern die Flusseigenschaften verändern können. Weiterhin wird in der Literatur auch eine von der Oberflächenbeschaffenheit unabhängige vWF-Faden-Bildung beschrieben [46]. Die Forschungsgruppe um Herbig und Diamond verwendete Stege in einer

Mikroflussskammer, um bei pathologischen Scherraten von 5.000-10.000/s die Bildung von vWF-Fasern zu verfolgen. Dort wurde postuliert, dass v. a. in Gefäßen, die fast schon verschlossen sind, pathologisch erhöhte Scherraten an den Verschlussstellen auftreten und die ULvWF-Multimere entfaltet werden.

Desweiteren zeigten die vWF-Fasern im in-vitro Experiment von Barg et al. [75] die Fähigkeit Thrombozyten anzulagern. Diese Plättchenadhäsion ließ sich dort außerdem durch Blockade des GPIIb/IIIa-Rezeptors verhindern. Aus den Beobachtungen der vorliegenden Studie geht hervor, dass 71% der vWF-Fäden mit Granulae assoziiert waren, sowie 80% der detektierten Spiderweb-Netze zusätzlich eingelagerte Granulae („Targets“) aufwiesen. Im Rahmen des Versuchsaufbaus der vorliegenden Studie war es nicht möglich, diese vWF-positiven Granulae eindeutig als Thrombozyten zu identifizieren. Jedoch liegt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um Thrombozyten handelt, da einige der Granulae zusätzlich auch als P-Selektin-positiv identifiziert werden konnten.

Die Verteilung der vWF-Strukturen ist sehr variabel.

Aus Tabelle 4 geht hervor, dass die Beladungsdichte der Membranoxygenatoren stark variierte. 12 Oxygenatoren mit vWF-Grauwerten bis 750 wiesen sowohl in der 1. als auch der 2. Auswertung ausschließlich Granulae auf den Gasfasern auf (vgl. Abb.33). Im Gegensatz hierzu fanden sich bei fünf Oxygenatoren in der 1. Auswertung und 13 Oxygenatoren in der 2. Auswertung „Pseudomembranen“. Die Tatsache, dass im Rahmen der 2. Auswertung häufiger „Pseudomembranen“ zu sehen waren als in der Auswertung von J. Wilm könnte technisch begründet werden. Bei der Präparateherstellung müssen einzelne Gasfasern aus dem Verbund des Membranoxygenators gelöst werden. Befindet sich die abzulösende Gasfaser in einem Bereich des Oxygenators mit besonders ausgeprägten Ablagerungen, kann es hier zu Abrissartefakten kommen. Ebenso kann ein unzureichend aufgetauter Oxygenatorblock ursächlich für solche Abrissartefakte sein. Hinzu kommt, dass weder bei der Auswertung von J. Wilm noch in der 2. Auswertung Informationen darüber bekannt waren, aus welchem Teil des Membranoxygenators die Probe stammt. Wie in der Dissertation von J. Wilm beschrieben [69], wurden die gefrorenen Membranoxygenatoren in mehrere Blöcke geschnitten. Im Nachhinein war es aber nicht mehr möglich nachzuvollziehen, welcher Block welchen Bereich im MO repräsentiert. Wie bei Dornia et al. beschrieben [54], gibt es innerhalb des Oxygenators Bereiche, welche häufiger thrombotisches Material enthalten. Wies bei J. Wilm ein Präparat „Pseudomembranen“ auf und in der 2. Auswertung fanden sich diese nicht, so wäre denkbar, dass das Präparat der 1. Auswertung aus einem dicht besiedelten Bereich des Oxygenators kam und das Präparat der 2. Auswertung aus einem anderen Block desselben Oxygenators stammte. Desweiteren ist die Definition

„Pseudomembran“ nicht immer leicht zu treffen, sodass auch ein personenbezogener Auswertungsfehler ursächlich für die Diskrepanz von 8 Oxygenatoren mit „Pseudomembranen“ zwischen 1. und 2. Auswertung sein kann.

In den meisten Fällen jedoch ließen sich die Befunde der 1. Auswertung in der 2. Auswertung reproduzieren, sodass dies die Frage aufwarf, welche Ursache es dafür gibt, dass einige Oxygenatoren nur spärlich und andere deutlich dichter besiedelt waren. In der Dissertation von Julius Wilm wurde versucht einen Zusammenhang zwischen Zelldichte auf der Oberfläche der Gasfasern und der Beladungsdichte mit vWF herzustellen [69]. Hier zeigte sich, dass Oxygenatoren, welche einen hohen Grauwert für DAPI aufwiesen (1.500 - 2.500) ebenfalls hohe Grauwerte für vWF (1.000 - 2.000) aufwiesen. Abbildung 32 beweist den linearen Zusammenhang beider Größen. Einem Zusammenhang zwischen vWF-Grauwerten und einzelnen vWF-Strukturen wurde in der Dissertation von J. Wilm nicht nachgegangen [69]. Daher wurde im Rahmen der 2. Auswertung versucht sich diesem Sachverhalt nochmals zu nähern. Hierfür wurden die vWF-Grauwerte aus der Dissertation von J. Wilm (sofern für die Oxygenatoren der 2. Auswertung vorhanden) für die jeweilige vWF-Struktur aufgetragen. Betrachtet wurden vWF-Granulae, Spiderwebs, „Targets“ und vWF-Fäden (s. Abb.32). Besonders hervorzuheben ist hierbei, dass bei sehr niedrigen vWF-Grauwerten (bis 750) ausschließlich Granulae auf den Gasfasern zu finden waren und die granuläre Struktur des vWF bei vWF-Grauwerten <1.500 mit 100% die in diesem Grauwertbereich am häufigsten identifizierte vWF-Struktur darstellt. Es stellte sich also die Frage, was die Ursache für die granulären Ablagerungen auf den Gasfasern der Membranoxygenatoren sein könnte. In der Literatur wird eine Ablagerung von Plasmaproteinen auf Fremdoberflächen beschrieben [22][76][77]. Desweiteren wird postuliert, dass diese Ablagerungen die Thrombozytenaggregation fördern sollen [25]. Es besteht die Möglichkeit, dass sich der vWF in granulärer Form gemeinsam mit den Plasmaproteinen auf den Gasfasern ablagert und deshalb Oxygenatoren existieren, welche außer granulärem vWF kaum Ablagerungen aufweisen. Somit wäre ein zeitlicher Zusammenhang zwischen Oxygenatorlaufzeit und dem Auftreten von granulären vWF-Ablagerungen auf den Gasfasern denkbar. Unter Miteinbeziehung patientenbezogener Daten wäre zu prüfen, ob die granulären Ablagerungen auf den Gasfasern der Membranoxygenatoren auf eine kurze Laufzeit am Patienten zurückzuführen ist.

Neben der zeitlichen Determinante spielt die Antikoagulation eine große Rolle bei Patienten unter ECMO-Therapie [78]. Aufgrund der Einbringung von körperfremdem Material in den Kreislauf des Patienten wird die Gerinnungskaskade aktiviert [25]. Ohne gerinnungshemmende Therapie würde das ECMO-System sofort thrombosieren [54]. Ex-vivo-Experimente mit Vollblut benötigen ebenfalls den Einsatz von Antikoagulanzen, um einen Blutfluss ohne Gerinnselbildung zu ermöglichen [79][80][81]. Die Appli-

kation eines Antikoagulanzen oder eines Thrombozytenaggregationshemmers nehmen jedoch Einfluss auf die Fähigkeit des vWF beispielsweise Fäden zu bilden [75][82]. Somit muss auch erwogen werden, dass den unterschiedlichen Erscheinungsformen des vWF eine unterschiedliche gerinnungshemmende Therapie des Patienten zugrunde liegen könnte. So zeigte sich im ex-vivo Modell von Jahn et al. [82], dass der Einsatz von Clopidogrel Einfluss auf die Thrombusgröße nimmt. Desweiteren postulierte Goertz et al. [83], dass Heparine im Rahmen neoplastischer Erkrankungen die Ausbildung von vWF-Fäden blockieren können. Da bisher noch keine Patientendaten in die Auswertung eingeflossen sind, lässt sich aktuell nicht feststellen, welche Medikamente die Patienten der vorliegenden Studie zur Gerinnungshemmung erhalten haben. Auch lässt sich noch keine Aussage über die zugrundeliegende Erkrankung der ECMO-Patienten treffen.

In Abbildung 33 fiel auf, dass vWF-Fäden nur in mittleren bis hohen Grauwertbereichen zu finden waren, Spiderwebs hingegen auch bei sehr hohen Grauwerten noch vorhanden waren. Zu erwarten war, dass „Targets“ mit Spiderwebs assoziiert sind, was sich in Abbildung 33 bestätigt. 13/15 Oxygenatoren (87%) mit Spiderwebs hatten „Targets“ in das Netzwerk eingelagert. Bei besonders dichten Beladungen der Gasfasern war es teilweise schwer möglich einzelne Strukturen voneinander abzugrenzen. Aufgrund ihrer großen Oberfläche haben Spiderwebs eine stärkere Fluoreszenz und entsprechend auch höhere Grauwerte als ein vWF-Faden. Der vWF-Grauwert beschreibt lediglich die Fläche eines Bildausschnittes, welche im jeweiligen Fluoreszenzkanal ein Signal gibt. Eine qualitative Analytik der vWF-positiven Flächen ist nicht möglich. Somit sind die höchsten Grauwerte für vWF bei Präparaten zu finden, welche stark mit vWF beladen sind. Sehr häufig handelt es sich hierbei um ausgedehnte Spiderwebs, bzw. „Pseudomembranen“. Hierbei ist nicht auszuschließen, dass sich in diesem dichten Verbund aus vWF auch vWF-Fäden verbergen, lediglich abgrenzen lassen sie sich nicht.

Ist ein gerichteter Blutfluss im Oxygenator die Ursache für die Morphologie der Kreuzungspunkte? Diskussion der Windschattenhypothese

Wie in 2.2.4 beschrieben galten Kreuzungspunkte als sensible Stellen im Membran-oxygenator. Nach den ersten Betrachtungen der Bilder aus der Dissertation von Julius Wilm zeigte sich, dass sich der Monolayer um die Kreuzungspunkte herum immer entweder an Position 2 oder Position 4 (vgl. Abb.10) befand. Es wurde daher postuliert, dass ein gerichteter Blutstrom im Oxygenator parallel zu den Gasfasern verlaufen müsse. In diesem Fall entspräche der Kreuzungspunkt einem Hindernis im Strom, sodass es hinter einem Kreuzungspunkt zu Verwirbelungen kommt und sich so ein Konvolut aus Spiderwebs und ungerichteten vWF-Fäden auf der dem Blutstrom abgewandten Seite bildet. Dieses Phänomen wurde unter dem Begriff der „Windschattenhypothese“ zusammengefasst. Jedoch ergaben sich mehrere Hinweise darauf, dass diese

Theorie nicht haltbar ist. Durch die Mechanik des Membranoxygenators erfolgt der Blutfluss nicht parallel zu den Gasfasermatten, sondern senkrecht dazu [71]. Somit liefert dies keine Erklärung für die asymmetrische Anordnung der Spiderweb-Monolayer. Desweiteren zeigte sich bei der genauen Auswertung der Morphologie der Kreuzungspunkte, dass deren Ausrichtung nicht wie zuerst angenommen über eine Probe hinweg gleichgerichtet ist (vgl. Tab.7). In der Betrachtung von 10 repräsentativen PLS-Oxygenatoren waren nur 13-64% der als solche auf dem Präparat erkennbaren Kreuzungspunkte identisch ausgerichtet. Somit kann die „Windschattenhypothese“ nicht bestätigt werden. Was in den Simulationen allerdings nicht berücksichtigt werden konnte, war zum einem die Tatsache, dass aufgrund des Fertigungsmechanismus (Zusammenpressen des Gasfaserblocks im Gehäuse) des Oxygenators nicht gewährleistet ist, dass alle Gasfasern gleichmäßig gerundet sind. Da es, wie beschrieben, zur Ausbildung von Kreuzungspunkten mit einem zentral liegenden „Auge“ kommt, muss davon ausgegangen werden, dass die Gasfasern aufeinandergepresst werden und sich verformen. Dies, und die Tatsache, dass kleine Thromben ebenfalls den gerichteten Blutstrom im Oxygenator beeinflussen, könnte eine Erklärung dafür sein, weshalb der Spiderweb-Monolayer nicht auf beiden Seiten eines Kreuzungspunktes entsteht.

Kreuzungspunkte repräsentieren eine sensible Stelle im Membranoxygenator mit hohem Potential zur Ablagerung und Anhaftung von vWF, P-Selektin und Zellkernen.

Aus den Beobachtungen der vorliegenden Studie geht hervor, dass es auf den Gasfasern Punkte gibt, an welchen die Ablagerungsdichte aus Zellkernen, vWF und P-Selektin im Vergleich zum Rest der Gasfaser besonders hoch ist. Aus der Bauweise der Oxygenatoren lässt sich ableiten, dass es sich bei diesen Stellen um die Kontaktpunkte benachbarter Gasfasermatten handelt. Der Aufbau dieser Kreuzungspunkte wurde weiter oben bereits beschrieben. vWF-Fäden fanden sich am häufigsten um die Kreuzungspunkte herum, sodass anzunehmen war, dass Letztgenannte einen Anhaftungspunkt für den vWF darstellen und notwendig sind, um das Längenwachstum von Fäden zu ermöglichen [46].

Wie in den Strömungskammern von Herbig und Diamond [46] beschrieben, haftet der vWF an einer geeigneten Oberfläche an und wächst dann unter Einfluss ausreichender Scherkräfte linear in Flussrichtung. Um die Kreuzungspunkte herum fanden sich netzartige vWF-Strukturen, sowie gerichtete als auch ungerichtete Fäden. Es wurde versucht, anhand der Ausbreitungsrichtung der Fäden Rückschlüsse auf die Richtung des Blutstroms im Oxygenator zu ziehen. Limitiert wurde dieser Versuch dadurch, dass nicht ausreichend Oxygenatoren vorhanden waren, welche über eine entsprechende Dichte an gerichteten vWF-Fäden verfügt hätten. Unter Zuhilfenahme des Verlaufsmusters der vWF-Fäden im Oxygenator Nr. 20 wurde von einem Kooperationspartner,

Herrn Prof. Dr.-Ing. Lars Krenkel und seinem Mitarbeiter Herrn Clemens Birkenmaier (Regensburg Center of Biomedical Engineering, Ostbayerische Technische Hochschule Regensburg) versucht, den wahrscheinlichen Blutstrom um einen Kreuzungspunkt zu simulieren. Jedoch konnten diese Ergebnisse nicht ausreichend durch das vorliegende Material bestätigt werden. Zwar finden sich bei den ausreichend dicht besiedelten Präparaten auch ungerichtete vWF-Fäden, welche ein Korrelat für die Verwirbelungen auf der Rückseite eines Kreuzungspunktes darstellen könnten, jedoch deckt sich dies weder mit den Berechnungen, noch mit der Auswertung aller Kreuzungspunkte eines Präparates.

Die Tatsache, dass vWF-Fäden nur an Kreuzungspunkten gefunden wurden, ebenso wie die Beobachtung, dass vWF-Fäden dort sowohl gerichtet als auch ungerichtet vorkommen, lässt vermuten, dass dort zum einen sehr hohe Scherkräfte wirken müssen (vWF-Fadenbildung), sowie eine ausreichend hohe Proteinkonzentration vorhanden sein muss (hohe Dichte an vWF). Desweiteren finden sich am Kreuzungspunkt sowohl lineare Strömungen (gerichtete vWF-Fäden) als auch Verwirbelungen (ungerichtete vWF-Fäden). Eine hohe Scherrate begünstigt einen unphysiologischen Blutfluss und ist ursächlich für eine überschießende Aktivierung von Thrombozyten [51][53][70]. Ein Korrelat für diese übermäßige Aktivierung von Thrombozyten auf den Präparaten stellt neben der hohen Dichte von vWF am Kreuzungspunkt auch die hohe Fluoreszenzintensität von P-Selektin dar. Thrombotische Ablagerungen auf den Gasfasern schränken zunehmend den Gasaustausch über die Membran ein und behindern den Fluss im blutführenden Teil des Oxygenators. Der veränderte Blutfluss begünstigt pathologische Flussgeschwindigkeiten und hohe Scherraten, was wieder Thrombozyten aktiviert. Es entsteht ein *circulus vitiosus* (s. Abb.39).

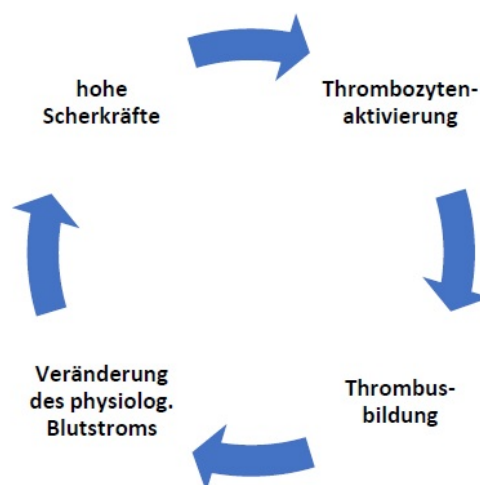


Abbildung 39: Gegenseitige Beeinflussung von Blutfluss und Thrombusbildung

Endprodukt all dieser Prozesse ist eine Verschlechterung der Oxygenierung des Patienten und Eliminierung von CO₂, was einen Wechsel des gesamten Systems notwendig macht. Offen bleibt die Frage, warum nicht in allen Präparaten vWF-Fasern oder –Netze zu finden waren. Es gibt tatsächlich Oxygenatoren, die keine ausgedehnten vWF-Strukturen um die Kreuzungspunkte herum aufwiesen (s. oben).

Extrazytoplasmatische Granulae sind die vorherrschende vWF-Struktur auf den Gasfasermembranen.

Diejenige vWF-Struktur, die am häufigsten auf den Gasfasern zu finden war, war die granuläre Form (95%). 91% der Oxygenatoren zeigten intrazelluläre Granulae (IZP G), 88% wiesen extrazytoplasmatische Granulae (EZP G) auf. Obwohl Granulae auch gemeinsam mit anderen vWF-Strukturen auf den Membranen vorkamen, wurde nach Auswertung der Wilm-Bilder die Hypothese aufgestellt, dass der Ursprung aller vWF-Strukturen das Granulum sein könnte. Außerdem wurde angenommen, dass sich der vWF primär als Granulum auf den Gasfasern ablagert, bevor andere vWF-Strukturen entstehen. Diese Theorie, dass sich die Netze und Fäden aus den Granulae ausbilden, ließe sich durch die Beobachtungen von Barg et al. [75] stützen. Dort waren granuläre Strukturen entweder Folge sehr niedriger vWF-Konzentrationen oder Folge fehlender Scherkräfte. Da sich vWF-Fäden aber ausbildeten sobald Scherkräfte vorhanden waren, ist davon auszugehen, dass sich zuerst der vWF als Granulum auf die Oberfläche ablagert.

Der vWF ist neben Fibrinogen, Fibronectin und Vitronectin eines der Plasmaproteine, die sich auch auf der Oberfläche von heparinbeschichteten Oxygenatormembranen ablagern [26]. Ein Prozess, der innerhalb von Sekunden und noch vor der Ablagerung zellulärer Bestandteile abläuft [25]. Durch Ablagerung dieser Proteine, insbesondere aber Fibrinogen, wird dann die Thrombozytenadhäsion an synthetische Oberflächen vermittelt [84]. Jedoch lieferten weder Gorbet und Sefton, Niimi et al. oder Tsai et al. eine Aussage über die dreidimensionale Form und die Molekülgröße der vWF-Ablagerung.

ECMO-Patienten (VA und VV) entwickeln ein erworbenes von Willebrand Syndrom (*acquired von willebrand syndrome, AVWS*) verbunden mit einer Thrombozytendysfunktion [85][86][87]. Die hohen Scherkräfte verursachen offensichtlich eine Entfaltung der globulären HMWvWF-Multimere, wodurch es zu einer erhöhten Spaltungsaktivität durch die ADAMTS-13 kommt, bzw. mehr Bindungsstellen für das thrombozytäre GPIIb geschaffen werden [51][88]. Das AVWS zeichnet sich durch den Verlust der HMWvWF-Multimere aus. Es wurde aber keine Zunahme der vWF-Konzentration im Plasma nachgewiesen. Lediglich die Aktivität des vWF war signifikant erniedrigt [31][85]. Über die Adhäsionseigenschaften der deutlich weniger gerinnungsaktiven, prozessierten vWF-

Moleküle an die synthetischen Oberflächen ist bislang nichts bekannt. Ob es sich bei den vWF-positiven Granulae um adsorbierte globuläre HMWvWF-Multimere, oder die Akkumulation der kleineren vWF-Moleküle handelt, bleibt offen. Unter Umständen ist die Länge der vWF-Moleküle auch ausreichend, um sich an den Kreuzungspunkten unter dem Einfluss hoher Scherkräfte zu verlängern [46].

Es wäre aber durchaus auch denkbar, dass es sich bei diesen granulären Strukturen um kleinere Thrombozytenaggregate handelt, da der vWF auch in den α -Granulae der Thrombozyten gespeichert wird. Eine Anbindung über oberflächengebundenes Fibrinogen (siehe oben) wäre denkbar. Der vWF vermittelt zudem die Thrombozyten-Thrombozyten-Bindung [89].

Intrazytoplasmatische Granulae sind regelhaft mit P-Selektin vergesellschaftet – Endothelzellen oder Platelet-Leukocyte-Aggregates (PLAs)?

Bei der Betrachtung der vWF-Strukturen fiel auf, dass neben den granulären, netz- bzw. fadenartigen Strukturen auch granulärer vWF in enger Beziehung zu DAPI gefärbten Zellkernen vorkam. Aufgrund der unmittelbaren Kernnähe wurde angenommen, dass sich diese vWF Granulae intrazellulär (im Folgenden IZP G) im Zytoplasma dieser zellkernhaltigen Blutbestandteile befinden. Auffallend war, dass alle identifizierten IZP G mit P-Selektin assoziiert waren, wohingegen nur 85% der extrazellulär liegenden Granulae (EZP G) P-Selektin-positiv waren.

Aufgrund der kernnahen Lokalisation lag der Verdacht nahe, dass es sich hierbei um Endothelzellen handeln könnte. Der vWF wird in den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen [37] als multimeres Glykoprotein gespeichert [72] und nach Stimulation freigesetzt [90]. Diese großen Moleküle können sowohl an die Proteine der subendothelialen Matrix (z.B. Kollagen) als auch an den vWF-Rezeptor (GPIb/IX) auf der Oberfläche der Thrombozyten binden und sind somit maßgeblich an der primären Hämostase beteiligt. Eine Endothelialisierung der mit Heparin oder Albumin beschichteten PMP-Gasfasern ist prinzipiell möglich, wie es von Wiegmann et al [91] unter in-vitro Bedingungen gezeigt wurde. Allerdings fehlen Belege für eine in-vivo Endothelialisierung im Menschen. Die PMP-Fasern aus ausgebauten Oxygenatoren von ECMO-Patienten (nach Therapieende oder Wechsel) waren zwar mit kernhaltigen Zellen besiedelt [9], allerdings handelt es sich hierbei nicht um Endothelzellen, sondern um CD45-positive Leukozyten [73].

Leukozyten enthalten per se keinen vWF. Allerdings fungieren diese Immunzellen als „Fresszellen“. So können aktivierte Neutrophile unter anderem Erreger, apoptotische Zellen, Zellfragmente und sonstige Bestandteile phagozytieren [92]. Somit wäre z.B. vorstellbar, dass Leukozyten auch Mikropartikel, an die der vWF gebunden ist, phagozytieren [93]. Weiterhin ist auch die Phagozytose von Thrombozyten, in deren α -

Granulae der vWF gespeichert ist [94], im peripheren Blut von Patienten mit akutem Myokardinfarkt (AMI), Polycythaemia vera (PV) und Thrombozythämie beschrieben [95] [96]. Insbesondere bei den AMI-Patienten wurden phagozytierte Thrombozyten auch im koronaren Thrombus gefunden [97].

Thrombozyten weisen eine Vielzahl an Oberflächenrezeptoren auf, die ihnen Interaktionsmöglichkeiten mit anderen Blutbestandteilen und dem Endothel ermöglichen. Glykoproteine auf der Thrombozytenoberfläche induzieren sowohl eine Plättchen-Plättchen Interaktion (über GPIIb/IIIa) als auch eine Anhaftung an das Endothel (GPIb α), was vor allem eine Rolle bei der primären Hämostase spielt. Neben den Rezeptoren zur Induktion der Blutgerinnung gibt es aber noch eine Vielzahl an Oberflächenrezeptoren, die an der immunologischen Erregerabwehr beteiligt sind und bei Entzündungsprozessen aktiviert werden. Maßgeblich an der immunologischen Abwehr beteiligt sind die Bindung zwischen P-Selektin auf den Thrombozyten und PSGL-1 (P-Selektin Glykoprotein Ligand-1) auf Leukozyten sowie Mac-1 Rezeptoren, welche die Apoptose der Abwehrzellen inhibieren, den Leukotrienmetabolismus steigern und so den Entzündungsprozess induzieren [42]. Der Toll-like-Rezeptor 4 (TLR-4) ist an der Ausbildung von PLAs hauptsächlich in der Leber beteiligt, was im Zuge eines Multiorganversagens (MOV) auch bei ECMO-Patienten von Bedeutung ist [42]. Über das Oberflächenmolekül HMGB1 wird die Aktivierung neutrophiler Granulozyten durch Thrombozyten induziert, was den ersten Schritt des NET-Forming (*engl. neutrophil extracellular traps*) darstellt [97]. NETs, oder neutrophile extrazelluläre Fallen werden Fäden aus DNA von neutrophilen Granulozyten genannt, welche freigesetzt werden und Krankheitserreger oder -erregerpartikel binden können und so an der Immunabwehr beteiligt sind. PLAs wurden nachgewiesen bei kardiovaskulären Erkrankungen (CVD), bei akuten Lungenerkrankungen (ALI), sowie der Rheumatoiden Arthritis (RA), chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED), ischämischen Schlaganfällen sowie Glomerulonephritiden [42]. Da insbesondere die CVD und ALI zu den Hauptindikationen für die Anlage einer ECMO zählen, ist davon auszugehen, dass PLAs auf den Gasfasermembranen nachweisbar sind.

Da in der vorliegenden Arbeit eine Zellmembranpermeabilisierung (Triton X-100) vorgenommen wurde, um auch intrazellulär liegende Proteine detektieren zu können, konnte nicht unterschieden werden, ob die Fluoreszenzfärbung Strukturen auf der Membranoberfläche oder im Zytoplasma (Phagozytose) anfärbt. Letztendlich lässt sich nur sagen, dass sich die betrachtete Struktur in absoluter Nähe zum Zellkern befindet. Daher ist ebenso denkbar, dass die als IZP G bezeichneten vWF Strukturen in Wahrheit nur der Zellmembran aufgelagert sind. Wäre dies der Fall, müsste in Erwägung gezogen werden, dass es sich bei den IZP G um PLAs handelt, also um Koaggregate aus aktivierten Thrombozyten und Leukozyten. Monozyten und Neutrophile bilden mit den Thrombozyten heterotypische Aggregate, primär über die Bindung von thrombo-

zytärem P-Selektin an den entsprechenden leukozytären Rezeptor (PSGL-1) gefolgt von intrazellulären Signalwegen [98][99].

Um eine endgültige Aussage darüber treffen zu können, worum es sich bei den IZP G tatsächlich handelt, ob es Thrombozyt-Leukozyt-Koaggregate sind, ob es sich um phagozytierte Partikel in neutrophilen Granulozyten handelt, oder ob es sich zumindest bei ein paar wenigen dieser Zellen doch um Endothelzellen handelt, müssen weitere Untersuchungen mit spezifischeren Immunfluoreszenzantikörpern durchgeführt werden.

6 Zusammenfassung

Die Thrombusbildung in Membranoxygenatoren von ECMO-Systemen stellt nach wie vor eine schwere Komplikation der ECMO-Therapie dar. Maßgeblich an der Thrombusbildung beteiligt scheint der von Willebrand Faktor. Die Detektion dieses Proteins auf den Gasfasern von Membranoxygenatoren könnte auf unphysiologische Blutflüsse bzw. lokal erhöhte Scherkräfte auf die Blutbestandteile im Oxygenator hinweisen. Ebenfalls muss an eine überschießende Fremdkörperreaktion angesichts der großen Oberfläche an Fremdmaterial durch den Membranoxygenator und das Schlauchsystem gedacht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden Gasfaserproben aus 57 Membranoxygenatoren mit spezifischen Antikörpern (vWF, P-Selektin) gefärbt, mit dem Kernfarbstoff DAPI gegengefärbt und anschließend beurteilt. Es wurde zwischen granulären Ablagerungen, sowie spinnennetz- und fadenartigen vWF-Strukturen unterschieden und die Wechselwirkungen mit Leukozyten (DAPI-positiv) und aktivierten Thrombozyten (P-Selektin) betrachtet. Die Beladungsdichte der Gasfasern der verschiedenen Oxygenatoren mit kernhaltigen Zellen variierte stark. Bei spärlicher Besiedelung zeigten sich ausschließlich vWF-Granulae, wohingegen sich bei hoher Zelldichte ausgedehnte, netzartige vWF-Strukturen (auch in Form von „Pseudomembranen“) abbildeten. An den Kreuzungspunkten benachbarter Gasfasern wurden außerdem vWF-Fäden identifiziert - allerdings nur bei 14% der Oxygenatoren. Nahezu alle netz- und fadenartigen vWF-Strukturen sind mit Zellkernen bzw. Granulae assoziiert. vWF-positive Granulae waren häufig auch P-Selektin-positiv. Auffallend war die Anwesenheit von vWF-positiven Granulae im Zytoplasma von Leukozyten, die insbesondere bei geringer Zellbesiedelung identifizierbar waren. Zudem waren die Granulae meist auch P-Selektin-positiv. Die Anwesenheit von netz- und fadenartigen vWF-Strukturen könnte auf unphysiologische Blutflüsse im Oxygenator hinweisen, allerdings traten diese Strukturen nicht bei allen Oxygenatoren auf. Auch die Kreuzungspunkte zeigten eine unterschiedliche Beladung mit Zellen und vWF-Ablagerungen, sodass auch hier eine flussabhängige Aussage un-

möglich war. Einzig die granulären Strukturen in Kolokalisation mit Kernen könnte auf die Beteiligung von Thrombozyt-Leukozyt-Aggregaten bei der Fremdkörperreaktion im Oxygenator hinweisen. In einer weiteren Untersuchung müssen die Patientencharakteristika berücksichtigt werden.

7 Anhang

7.1 Manuskript und Poster

Es folgen eine Publikation und ein Präsentationsposter, welche in Zusammenhang mit der vorliegenden Dissertation stehen. Das Manuskript wurde am 13.06.2019 erfolgreich in dem Journal 'Artificial Organs' veröffentlicht. Impact factor: 2.379; DOI: 10.1111/aor.13513; PMID: 31192471.

Das Poster wurde beim EuroELSO Kongress in Prag im Mai 2018 mit einem Audience Award in der Kategorie 'best adult poster' ausgezeichnet.

Accumulations of von Willebrand factor within ECMO oxygenators: Potential indicator of coagulation abnormalities in critically ill patients?

Tamara Steiger¹ | Maik Foltan¹  | Alois Philipp¹ | Thomas Mueller² | Michael Gruber³  | Andre Bredthauer³  | Lars Krenkel⁴ | Clemens Birkenmaier⁴  | Karla Lehle¹ 

¹Department of Cardiothoracic Surgery, University Medical Center Regensburg, Regensburg, Germany

²Department of Internal Medicine II, University Medical Center Regensburg, Regensburg, Germany

³Department of Anesthesiology, University Medical Center Regensburg, Regensburg, Germany

⁴Regensburg Center of Biomedical Engineering, Ostbayerische Technische Hochschule, Regensburg, Germany

Correspondence

Karla Lehle, Department of Cardiothoracic Surgery, University Medical Center Regensburg, Franz-Josef-Strauss-Allee 11, Regensburg 93042, Germany.
Email: karla.lehle@ukr.de

Abstract

Clot formation within membrane oxygenators (MOs) remains a critical problem during extracorporeal membrane oxygenation (ECMO). The composition of the clots—in particular, the presence of von Willebrand factor (vWF)—may be an indicator for prevalent nonphysiological flow conditions, foreign body reactions, or coagulation abnormalities in critically ill patients. Mats of interwoven gas exchange fibers from randomly collected MOs (PLS, Maquet, Rastatt, Germany) of 21 patients were stained with antibodies (anti-vWF and anti-P-selectin) and counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole. The extent of vWF-loading was correlated with patient and technical data. While 12 MOs showed low vWF-loadings, 9 MOs showed high vWF-loading with highest accumulations close to crossing points of adjacent gas fibers. The presence and the extent of vWF-fibers/“cobwebs,” leukocytes, platelet–leukocyte aggregates (PLAs), and P-selectin-positive platelet aggregates were independent of the extent of vWF-loading. However, the highly loaded MOs were obtained from patients with a significantly elevated SOFA score, severe thrombocytopenia, and persistent liver dysfunction. The coagulation abnormalities of these critically ill patients may cause an accumulation of the highly thrombogenic and elongated high-molecular-weight vWF multimers in the plasma which will be trapped in the MOs during the ECMO therapy.

KEYWORDS

extracorporeal membrane oxygenation, liver dysfunction, shear stress, SOFA score, thrombogenesis, von Willebrand factor

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2019 The Authors. *Artificial Organs* published by Wiley Periodicals, Inc. on behalf of International Center for Artificial Organ and Transplantation (ICAOT)



1 | INTRODUCTION

Adult venovenous extracorporeal membrane oxygenation (VV-ECMO) is now a well-established therapy for respiratory failure. Increasing experience, broader indications, fewer contraindications, improved technology, and individually adapted anticoagulation regimens did not prevent clot formation within the circuit. Clotting remains a threatening complication with serious consequences for the patient.^{1,2} The incidence of ECMO-induced thrombosis is reported to be up to 30%³ with multifactorial underlying mechanisms. Crucial factors for clot formation and device failure are long-lasting constant contact of blood with artificial surfaces, high shear forces caused by the ECMO device, or coagulation abnormalities in the critically ill patients.⁴

The analysis of thrombus specimens provides useful information regarding the pathophysiological process leading to thrombosis.⁵ The clots in membrane oxygenators (MOs) were comprised of fibrin strands, platelet-rich aggregates, and trapped red blood cells^{6,7} as well as leukocytes and von Willebrand factor (vWF) accumulations.^{8,9} The crucial role of vWF in hemostasis and thrombosis during ECMO is of particular interest.^{10–12} However, the significance of this protein during the ECMO therapy is controversial. Its plasma concentration is highly variable depending on the coagulation and septic status of the patients.¹³ Furthermore, elongated vWF and platelets were found in arterial thrombi and indicate high-shear thrombosis that is distinct from low-shear coagulation and platelet adhesion.¹⁴ Finally, high shear stress produced in particular within mechanical devices such as ECMO circuits or ventricular assist devices (VAD) is responsible for the development of an acquired von Willebrand syndrome (AVWS).^{10,11} High shear stress results in a conformational change of the high-molecular-weight vWF (HMWvWF) multimers predisposing it to proteolytic cleavage by ADAMTS13 (a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13) and/or allows the binding to platelet glycoprotein GPIb by exposing the vWF-A1-domain.^{15–17} The precise mechanisms remain unknown. Therefore, prognosis of bleeding or thromboembolic events during ECMO support is still prevented.⁴

In this study, we analyzed randomly selected MOs from VV-ECMO patients with regard to the topographic prominence of vWF accumulations. Different vWF-structures and their colocalization to leukocytes, platelets, or its aggregates were identified on the surface of the gas exchange fibers. Finally, MOs with low and high extent of vWF-loadings were related to clinical and technical parameters.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Study design

Bioline-coated polymethylpentene (PMP) MOs (PLS, Maquet Cardiopulmonary, Rastatt, Germany) were removed

from 21 randomly selected patients with respiratory failure that required VV-ECMO support (Table 1). MOs were collected after termination of ECMO support (successful weaning, $n = 13$; death, $n = 2$) or after replacement of the MOs during therapy ($n = 6$).³ ECMO patients included in this study were treated as described earlier.³ During the ECMO therapy, patients were anticoagulated with unfractionated heparin ($n = 12$) or argatroban ($n = 9$) (1/9 additionally with aspirin). Coagulation testing including activated partial thromboplastin time (aPTT), international normalized ratio (INR), and platelet count was employed for coagulation monitoring and therapy guidance.

2.2 | Preparation of MOs

The preparation of MOs was already described earlier.¹⁰ Briefly, removed MOs were rinsed with physiologic saline, fixed with 4% paraformaldehyde which was subsequently substituted with saccharose (increasing concentrations, 10%, 20%, and 30%), frozen at -20°C , and stored at -80°C . The frozen MOs were then segmented into nine blocks without thawing. From these cutout blocks consisting of stacked mats of interwoven gas exchange fibers, one randomly selected single mat was removed, trimmed to a sample size of 0.5 cm \times 1.3 cm (referred as “sample”), and rehydrated in phosphate-buffered saline (PBS).

2.3 | Immunofluorescence

Each sample was washed in PBST (PBS plus 0.1% TritonX100; room temperature, RT) and blocked with donkey serum (10% in PBST; 30 min, RT). Specific monoclonal antibodies [mouse anti-human P-selectin (1:200); rabbit anti-human vWF (1:50); DAKO, Cambridgeshire, UK], were used to incubate the samples overnight at 4°C . Samples were washed with PBST, stained with secondary antibodies for 90 minutes at RT [1:1000; donkey anti-mouse IgG-fluorescein isothiocyanate (FITC); donkey anti-rabbit IgG-Texas Red; DAKO], and counterstained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole-dihydrochloride; 0.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in PBST; Vector Laboratories, Peterborough, UK) (30 min, RT). The samples were placed on a microscope slide, embedded in Fluoromount-G (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA), covered with a coverslip and imaged using a Leica DMRBE fluorescence microscope (Leica Microsystems, Bensheim, Germany). To estimate the extent of cellular deposits and vWF accumulations, the central gas capillary of the stained sample was selected and photographed using a Spot2000 camera (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA) under software control (Visiview (R), Visitron Systems GmbH, Puchheim, Germany) resulting in micrographs with a resolution of 1600 \times 1200 pixels. For quantification of cellular coverage (DAPI) and vWF

**TABLE 1** Patient characteristics and selected laboratory parameters before ECMO implantation

	All	Extent of vWF-loadings		P value
		Low	High	
N	21	12	9	
Male gender (n; %)	18; 86	11; 92	7; 78	0.553
Age (years)	56 (33-68)	60 (53-71)	37 (29-57)	0.070
BMI (kg/m ²)	27.5 (25.9-32.7)	27.6 (25.7-30.7)	27.5 (25.9-36.2)	0.859
SOFA score	13 (12-18)	13 (12-14)	18 (14-19)	0.025
LIS	3.7 (3.3-3.7)	3.7 (3.4-3.7)	3.3 (3.3-3.7)	0.249
Days on ventilation	1.0 (0.0-6.0)	1.5 (0.0-16.0)	1.0 (0.0-3.0)	0.379
Heparin/argatroban (n)	12/9	6/6	6/3	0.611
Acute renal failure (n; %)	5; 24	2; 17	3; 33	0.611
Blood group 0 (n; %)	6; 29	3; 25	3; 33	1.000
Pulm./extrapulm. ALF (n)	17/4	10/2	7/2	1.000
Sepsis (n; %)	12; 57	6; 50	6; 67	0.660
aPTT (seconds)	44 (40-65)	43 (38-62)	44 (40-72)	0.522
Antithrombin III (%)	51.0 (34.0-71.0)	60.5 (41.8-71.0)	35.0 (24.0-51.5)	0.054
INR	1.3 (1.2-1.7)	1.3 (1.1-1.5)	1.4 (1.3-1.7)	0.094
D-dimers (mg/L)	5.0 (3.5-9.5)	6.5 (5.0-16.3)	5.0 (1.5-8.0)	0.162
Fibrinogen (g/L)	512 (225-750)	574 (403-815)	410 (202-629)	0.456
Platelets (× 10 ⁹ /L)	176 (41-265)	223 (160-438)	56 (21-188)	0.036
Free hemoglobin (mg/L)	43 (29-110)	41 (28-110)	48 (30-111)	0.815
LDH (U/L)	462 (288-624)	480 (269-728)	400 (303-566)	0.749
PaO ₂ /FiO ₂ (mm Hg)	72 (59-93)	85 (59-93)	62 (59-86)	0.337
AST (U/L)	65 (50-163)	63 (38-126)	134 (53-297)	0.118
Bilirubin (mg/dL)	1.1 (0.5-2.6)	0.8 (0.3-1.9)	1.6 (0.7-3.3)	0.269
Norepinephrine (µg/kg/min)	0.28 (0.14-0.58)	0.22 (0.12-0.53)	0.33 (0.14-1.01)	0.500
Epinephrine (µg/kg/min)	0.00 (0.00-0.00)	0.00 (0.00-0.00)	0.00 (0.00-0.17) ^a	0.015
Hemoglobin (g/dL)	9.9 (8.0-11.7)	11.0 (8.2-12.0)	8.9 (7.7-10.6)	0.270
Creatinine (mg/dL)	1.2 (1.1-1.6)	1.2 (0.9-1.4)	1.5 (1.2-2.7)	0.042
White blood cells (×10 ⁹ /L)	15.8(8.4-21.4)	15.5 (8.7-18.2)	15.8 (6.1-21.2)	0.831
C-reactive protein (mg/L)	190 (58-248)	198 (58-248)	154 (41-262)	0.671

Note: Data show median (IQR) or absolute number.

Abbreviations: ALF, acute lung failure; aPTT, activated partial thromboplastin time; AST, aspartate aminotransferase; BMI, body mass index; INR, international normalized ratio; LDH, lactate dehydrogenase; LIS, lung injury score; PaO₂/FiO₂, ratio of partial pressure of arterial oxygen and fraction of inspired oxygen; SOFA, sequential organ failure assessment.

^aFour patients of the high vWF-group were treated with epinephrine.

accumulations, 12 nonoverlapping images of the central capillary were obtained with each fluorescence channel (20× lens; resolution, 0.375 µm/pixel). Details of representative cells and vWF-structures were documented (40× lens; resolution, 0.187 µm/pixel).

2.4 | Estimation of cellular depositions and vWF accumulation using fluorescence intensity

DAPI-staining of nuclei was used to visualize the colonization of PMP capillaries by nucleated cells. Anti-human

vWF-staining and P-selectin staining were engaged to document accumulations of vWF-structures and platelet deposits on the gas exchange fibers, respectively. Quantitative measurement of the fluorescence intensity of DAPI and vWF was accomplished as described earlier.¹⁰ The samples were divided into two groups depending on the extent of vWF accumulations. A representative sample for each of the two groups (high/low vWF) is shown in Figure 1A. Figure 1B shows the evaluation of the chosen threshold on fluorescence intensity, distinguishing between low and high vWF-loadings.

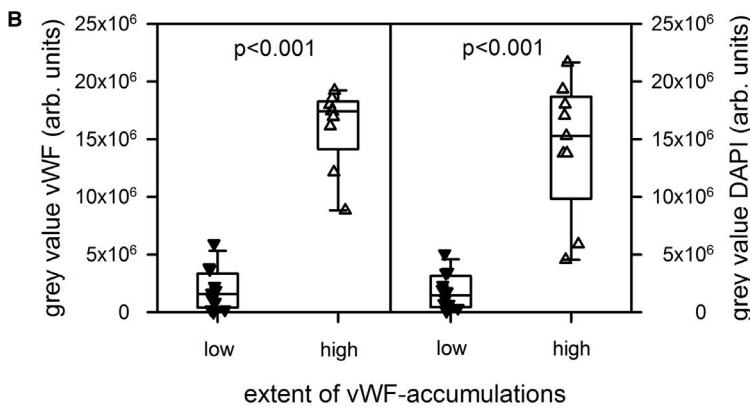
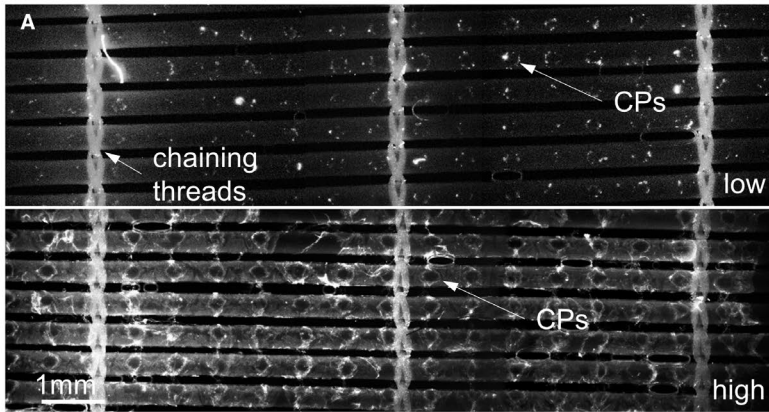
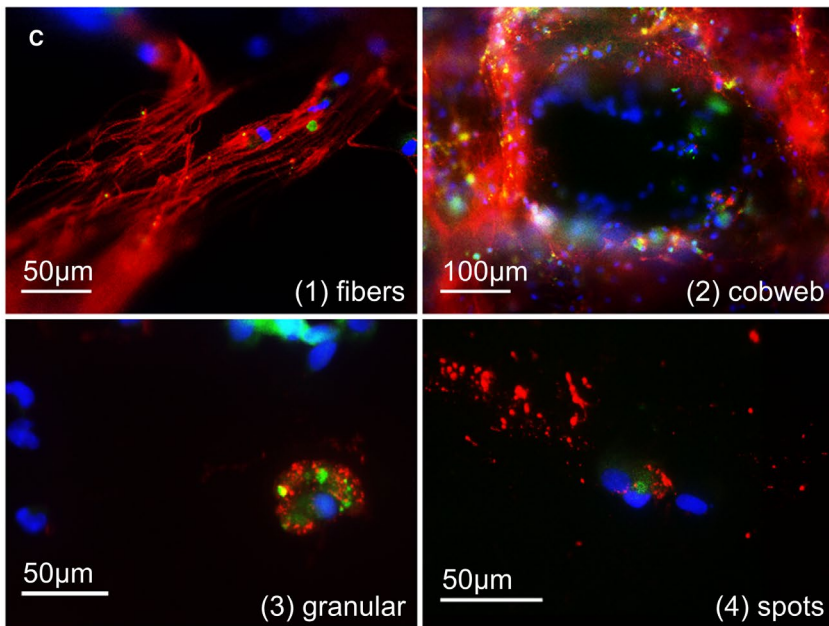


FIGURE 1 vWF structures were accumulated on the gas exchange fibers within used membrane oxygenators to a different extent. A, Overview of 5-6 gas fibers between three chaining threads. While low vWF-loadings (upper part) presented small local deposits around the crossing points (CPs), high loadings (lower part) were detected all over the gas fibers with high density around the CPs and the threads. B, 9 oxygenators were loaded with high vWF accumulation and high density of nucleated (DAPI stained) cells. C, The gas exchange fibers were covered with different vWF-structures: long vWF-fibers, cobweb-like vWF-structures, cytoplasmic granular structures close to DAPI-stained nuclei, and extracellular vWF-spots distant from a nucleus. DAPI, blue; vWF, red; P-selectin, green [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]



2.5 | Data collection and statistical analysis

Data were collected prospectively (Regensburg ECMO database) and blinded. The study was approved by the Ethics Committee of the University of Regensburg (vote # 106-336-104).

Data from groups with low and high vWF-loadings are reported as median and interquartile ranges (IQR). The nonparametric Mann-Whitney *U* test was used to

identify significant differences between groups for scalar parameters. For comparing proportions between the nominal groups with low and high vWF-loadings (eg, gender ratio and discharge from hospital) the Fisher's exact test was employed. Two-way analysis of variance was used to compare the mean differences between the study groups (low and high loadings) regarding the daily measurements before system removal (eg, pressure drop across the MOs, dpMO; blood flow, BF; D-dimers, fibrinogen, and platelet counts).



If there is a statistical difference in the experimental groups a post hoc test (Bonferroni) was carried out for a multiple comparison procedure. A P value ≤ 0.05 was considered statistically significant. The software package IBM SPSS Statistics 20.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) was used for the statistical evaluation.

3 | RESULTS

3.1 | Classification of the MOs according to the topographic prominence of vWF accumulation on gas exchange fibers

Figure 1A shows representative examples of gas exchange fibers with low (upper row) and high (lower row) accumulations of vWF-structures. Highest staining intensity was found around the crossing points (CPs) of adjacent gas fibers (long arrows) and close to the chaining threads (short arrow). Nine samples (43%) presented high vWF-loadings with significantly higher gray values for the vWF-stained structures compared to the low vWF-loading group (Figure 1B, left side, $P < 0.001$).

Double staining of the samples with vWF and DAPI revealed colocalization of high vWF-loading with high accumulation of nucleated cells. The intensity of DAPI-stained nuclei (DAPI gray value) from samples with high vWF-loading was significantly higher compared to the low vWF-loading group (Figure 1B, right side, $P < 0.001$).

3.2 | Identification of different vWF-structures on the gas exchange fibers

The surfaces of the gas exchange fibers were searched for different vWF-structures. Detailed top views (magnification, 400 \times) of the gas exchange fibers uncovered four recurring vWF-structures (Figure 1C):

1. Fiber-like structures (vWF-fibers; length 10-100 μm ; diameter $> 1 \mu\text{m}$),
2. Cobweb-like structures with thin and branching threads (diameter $< 1 \mu\text{m}$),
3. Cytoplasmic granular structures close to a DAPI-positive nucleus (defined as platelet-leukocyte aggregates, PLAs),
4. Extracellular vWF-spots (distant from a DAPI-positive nucleus).

As shown in Table 2, there was no difference in the frequency of the different vWF-structures comparing gas exchange fibers with high and low vWF-loadings from different MOs. vWF-fibers were localized in six MOs. The vWF-fibers presented a median (IQR) length of 90 (50-100) μm and a median diameter of 3 (3-5) μm .

TABLE 2 Detection of different vWF-structures on the surface of gas exchange fibers

	Extent of vWF-loadings		P value
	Low	High	
N	12	9	
vWF-fibers (n ; %)	3; 25	3; 33	1.000
Cobweb-like structures (n ; %)	3; 25	6; 67	0.175
Cytoplasmic granula (n ; %)	11; 92	8; 89	0.450
Extracellular spots (n ; %)	10; 83	5; 56	0.127

Note: Statistics used Fisher's exact test.

3.3 | Localization of activated platelets on the gas exchange fibers

Samples with high vWF-loading presented highest density of vWF as well as nuclei annularly around the CPs (Figure 1A). The direct catchment area around the cell/protein-free CP gathered nucleated cells and P-selectin-positive structures surrounded by a seam of vWF-positive structures and formed a circular arrangement with a radius of about 200 μm (Figure 2). The border area consisted of nucleated cells, PLAs, and extracellular vWF-spots. Samples with low vWF-loading showed adhesion of isolated nuclei, PLAs, and extracellular vWF-spots within a radius $< 100 \mu\text{m}$ around CPs (Figure 3). Due to the low cell density, it was possible to represent even the isolated localization of P-selectin in the cytoplasm of nucleated cells (Figure 3).

To get additional information about the spatial arrangement of the different cell/protein layers in depth, stacked samples were embedded in paraffin, cut perpendicular to the gas exchange fibers, and stained with DAPI (blue) and antibodies (vWF, red; P-selectin, green). Different areas of cells/proteins were identified, starting from the surface of gas exchange fibers reaching into the blood-filled space between a longitudinal and two cross-sliced gas exchange fibers (Figures 4 and 5). MOs with high vWF-loading presented uniformly distributed nucleated cells within the thrombotic deposits, while vWF-staining was observed at a mean distance of $20 \pm 15 \mu\text{m}$ to the surface of cross-sliced gas exchange fibers. Activated platelets were colocalized with the vWF-structures. The composition of deposits around the CPs was heterogeneous consisting mostly of extended vWF-positive areas with incorporated nuclei and P-selectin-positive areas. In contrast, MOs with low vWF-loading showed single nuclei in close contact to vWF- and P-selectin-positive spots (PLAs) next to the surfaces of the gas exchange fibers or attached to the threads connecting neighboring gas exchange fibers (Figure 5). These triple-stained PLAs were detected in top view micrographs as well as in the cross sections. About one-third of the adherent cells were PLAs. PLAs were detected on

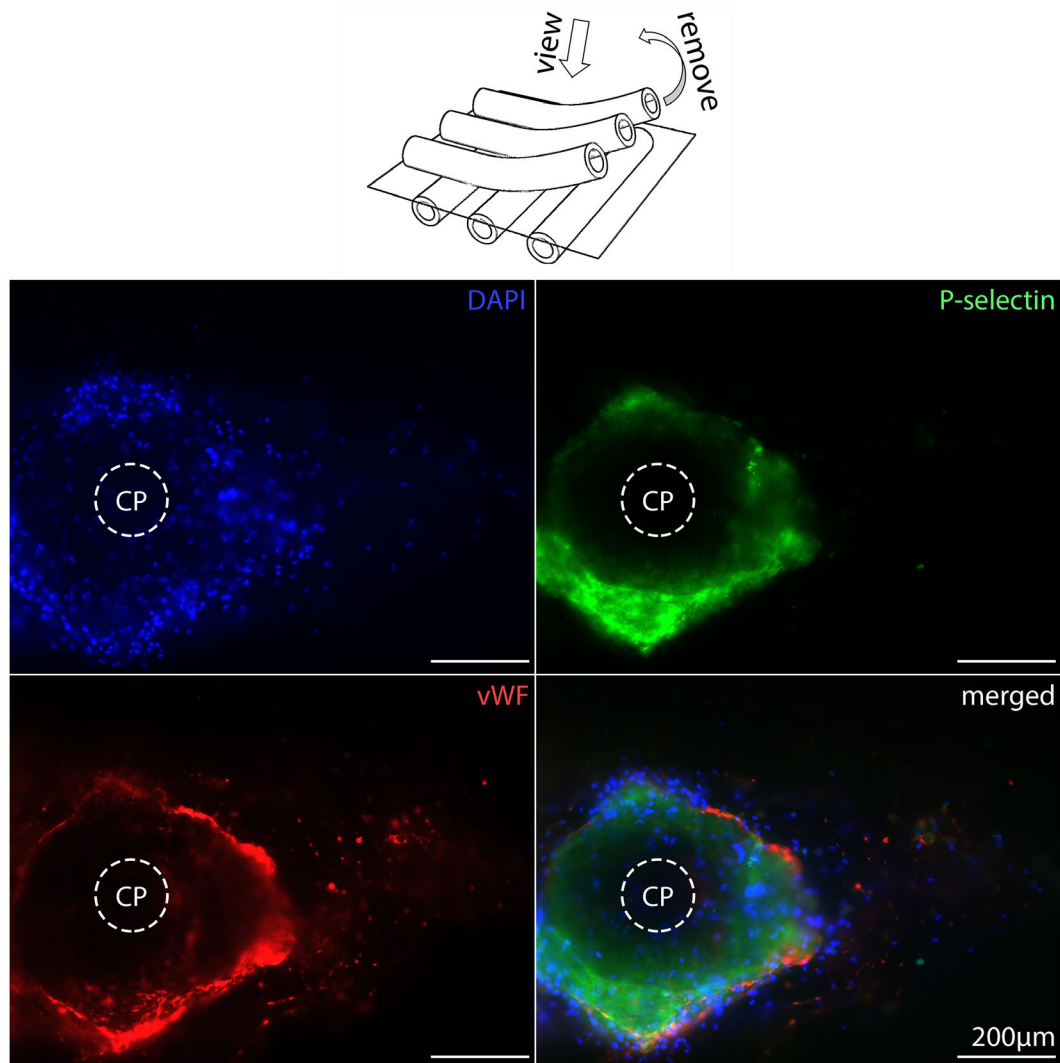


FIGURE 2 Crossing points (CPs) from high vWF-loaded gas exchange fibers. The center of the CPs is empty while the nucleated cells (DAPI, blue), activated platelets (P-selectin, green), and high extent of vWF (red) accumulated around the CPs [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

all samples without regard to the extent of their vWF-loading. The quantity of detected PLAs was lower on densely populated gas exchange fibers. However, the high vWF-loading may mask the presence of the triple-stained PLAs.

3.4 | Correlation of high vWF-loading on gas exchange fibers with clinical and ECMO data

Differences in patient characteristics and ECMO data from groups of patients with low and high vWF-loading within their MOs are presented in Tables 1 (before ECMO) and 3 (during ECMO). Statistical analysis of patient's characteristics revealed that high vWF-loading are associated with elevated SOFA scores ($P = 0.025$), increased creatinine ($P = 0.042$), and severe thrombocytopenia ($P = 0.036$). Twelve patients were supported with ECMO to treat acute lung failure (ALF) secondary to a septic disease pattern. The distribution was the same for both groups

(low vWF, 6/12; high vWF, 6/9; $P = 0.660$). There was no difference in the distribution of the blood group 0 to others (A, AB, and B) (each group, $n = 3$, not different), nor between pulmonary and extra-pulmonary ALF (low/high vWF-loading, 10/2 vs. 7/2, not significant). All patients were invasively ventilated before ECMO support. Other patient data and initial coagulation and inflammatory parameters showed no differences (Table 1).

The analyzed MOs were collected after termination of ECMO (high vWF, $n = 8$; low vWF, $n = 7$) or after removal of the MOs during therapy (exchange) (high vWF, $n = 1$; low vWF, $n = 5$) (Table 3). The reasons for the MO exchange during therapy were (a) systemic thrombosis after restricted heparinization (extended bleeding after surgical chest intervention) (high vWF, $n = 1$), (b) imminent coagulation disorder (high levels of D-dimers, low concentrations of fibrinogen, and low numbers of platelets) (low vWF, $n = 3$), (c) indication of a severe septic event (low vWF, $n = 1$), and (d) acute MO thrombosis with a sudden increase in dpMO (low vWF, $n = 1$).³

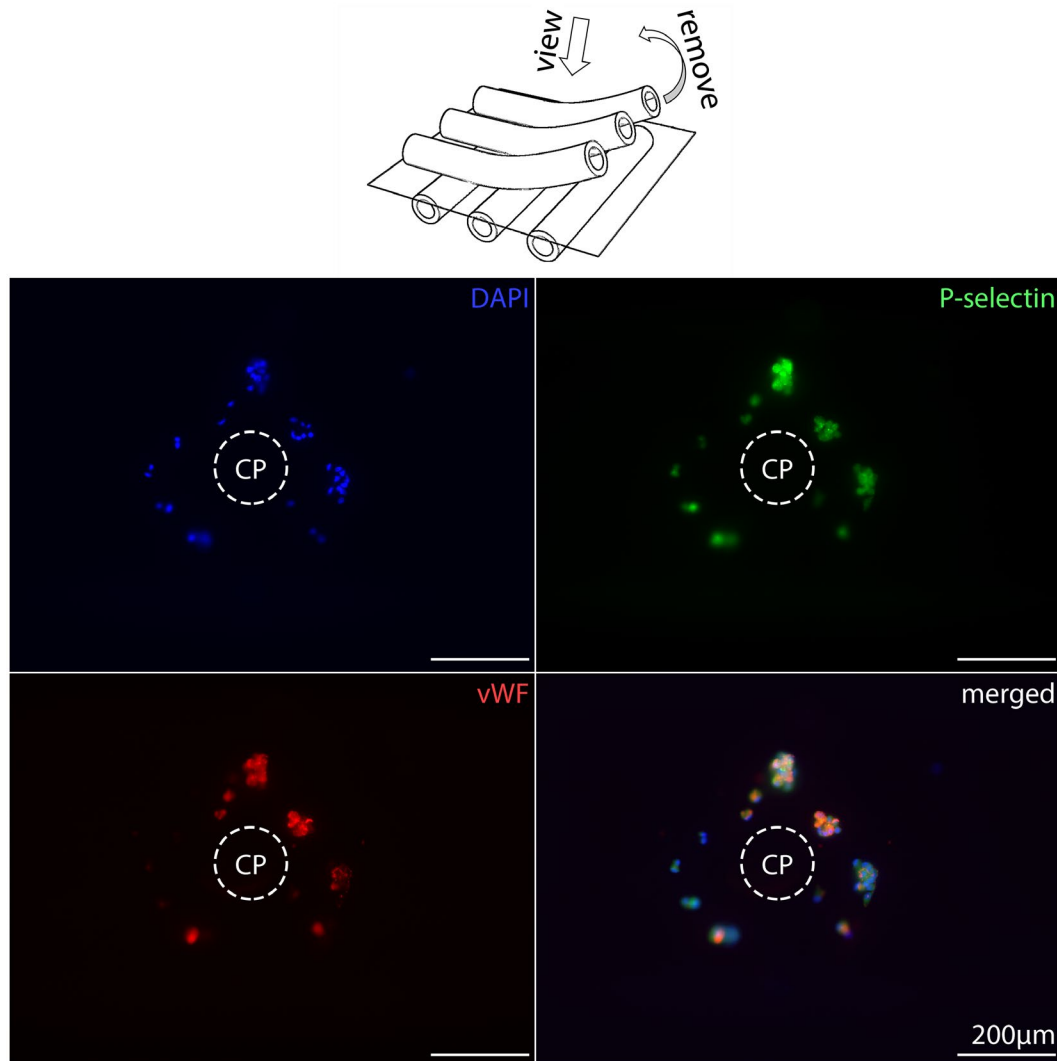


FIGURE 3 Crossing points (CPs) from low vWF-loaded gas exchange fibers. The center of the CPs is empty but decorated with small aggregates consisting of a few nucleated cells (DAPI, blue), with P-selectin-positive (green) platelets in their cytoplasm (PLAs, platelet–leukocyte aggregates) as well as cytoplasmic and extracellular vWF-spots (red) [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

As shown in Figure 6, blood flow was downregulated within 3 days before MO removal ($P = 0.002$). The extent of vWF-loading had no effect. dpMO remained unchanged ($P = 0.392$). The O_2 and CO_2 transfer values decreased within 3 days before MO removal ($P = 0.134$ and $P < 0.001$, respectively). In particular, the CO_2 transfer on the day of removal was significantly higher for the low vWF-group ($P = 0.031$). Within the considered time frame of 3 days before MO removal, the concentrations of D-dimers ($P = 0.885$) and fibrinogen ($P = 0.925$), the number of platelets ($P = 0.995$), aPTT ($P = 0.979$), and INR ($P = 0.879$) were unremarkable and not different between the two study groups. Furthermore, there was no severe hemolysis ($P = 0.869$). Leukocytes and CRP were also not different regarding both groups ($P = 0.342$ and $P = 0.510$, respectively). However, the levels of liver enzymes (AST, aspartate transaminase; bilirubin) were significantly higher in the high vWF-group compared to the low vWF-group ($P = 0.002$; $P = 0.011$, respectively).

The extent of vWF-loadings did not affect the MO life span ($P = 0.830$), the time to MO removal ($P = 0.915$), or the total ECMO time ($P = 0.593$). In addition, there was no difference in the supplied transfusion of blood products (Table 3).

4 | DISCUSSION

In this study of patients requiring ECMO support, we found a heterogeneous vWF-loading on the gas exchange fibers within used MOs. vWF-fibers were detected in 6/21 MOs independently of the overall extent of vWF-loading. Nine of 21 MOs were covered with extended and gas fiber-spanning vWF-deposits. These MOs originated from patients with a significantly higher initial SOFA score and severe thrombocytopenia. Extended vWF-loading reduced the CO_2 transfer capacity of the MOs, but there was no effect on dpMO, the life span of the MO, and the risk of a system exchange. Nevertheless,

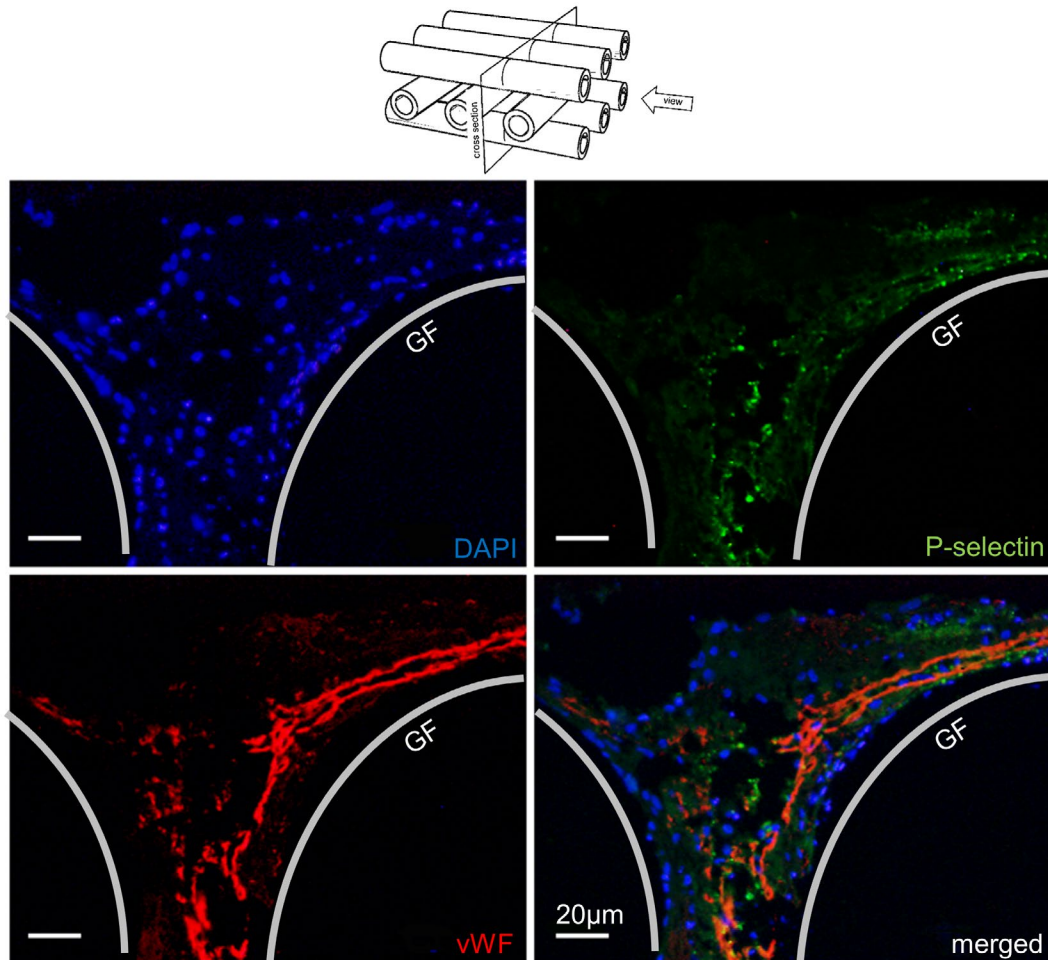


FIGURE 4 Cross section of a blood ducting area from high vWF-loaded gas exchange fibers. The area (between two cross and one lengthwise sliced gas fibers, GF) presented equally distributed nuclei (DAPI, blue), embedded into P-selectin-positive (green) platelets, and extended vWF-structures (red) consisting of extended vWF-fibers, cobweb-like structures, and granular deposits [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

patients with highly loaded gas exchange fibers presented aggravated liver dysfunction during ECMO support.

Although vWF and cellular deposits were found in every analyzed MO, the allocation was heterogeneous as well within a single MO as across the MOs from different patients. The surface of the gas exchange fibers of all analyzed MOs was covered with different vWF-structures. First, interactions between blood and artificial surfaces trigger adsorption of plasma adhesion proteins which then are capable of mediating platelet and/or leukocyte adhesion.^{18,19} The vWF only plays a subordinate role in primary protein adsorption.²⁰ As vWF is stored in the alpha-granules of platelets, the detected extracellular vWF-spots are most likely vWF-positive platelet aggregates. These vWF-spots were always P-selectin-negative and therefore, represent nonactivated platelet aggregates (Figure 1C). Additionally, the detected small granular structures in the vicinity of nucleated cells represent either endothelial cells that stored vWF within the Weibel-Palade bodies, or PLAs. However, *in vivo* endothelialization

of PMP-gas exchange fibers during the ECMO therapy was excluded.^{9,21} Therefore, these structures represent PLAs consisting of platelets either cell membrane bound on or phagocytosed by leukocytes. Mostly, not only vWF but also P-selectin was found close to nuclei. PLAs were considered as a sensitive marker of platelet activation²² and play an important role in the pathogenesis of thrombotic conditions.²³ Crucial for the PLA-formation is the interaction between platelet P-selectin and its receptor on leukocytes (PSGL-1, P-selectin glycoprotein ligand-1). Platelet–leukocyte interaction starts a signaling cascade, resulting in the activation of the beta-2 integrin Mac-1 and in the firm adhesion between the two cell types.²³ Elevated PLA counts are associated with a range of acute and chronic thrombo-inflammatory conditions such as cardiovascular diseases, acute lung injury, rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disease, stroke, and glomerulonephritis.^{24–30} Elevated PLAs additively were not only detected in blood during the early stage of acute myocardial infarction (AMI), but also in the core region of coronary thrombi.³¹

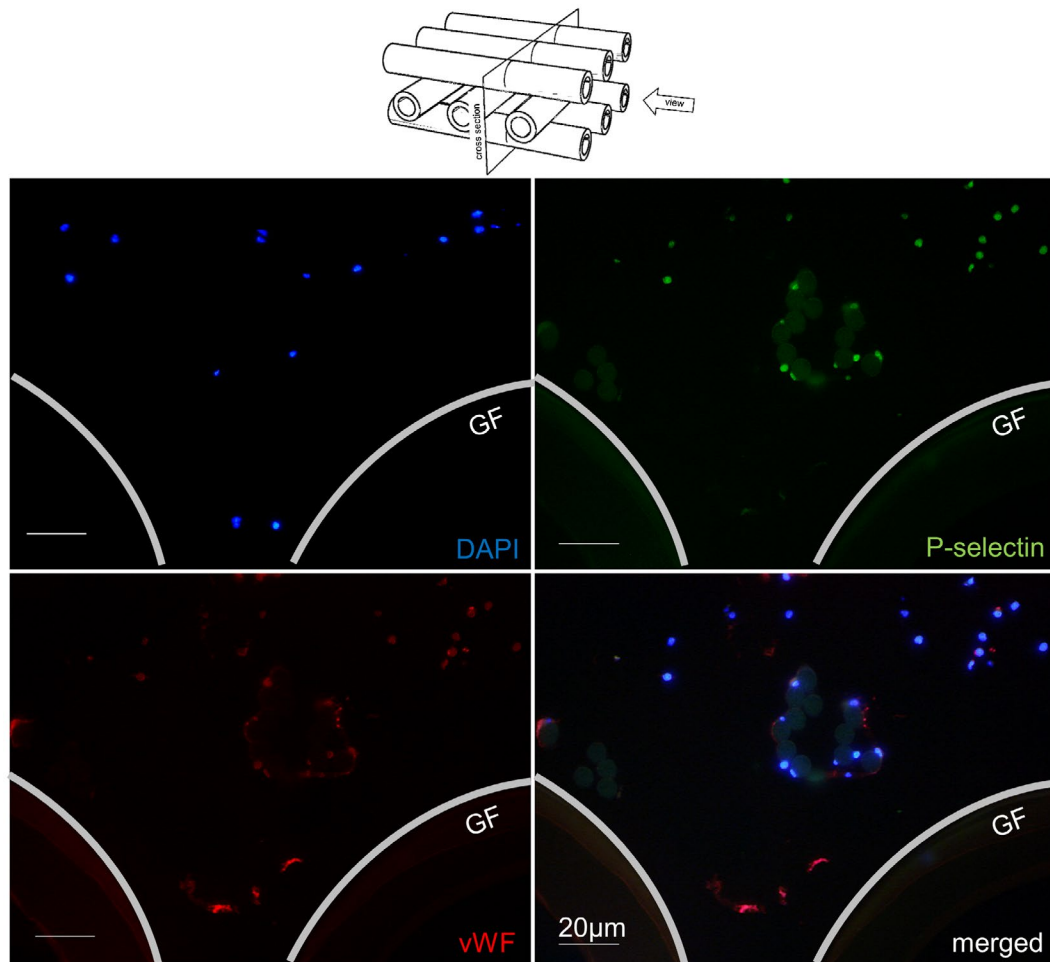


FIGURE 5 Cross section of a blood ducting area from low vWF-loaded gas exchange fibers. The area (between two cross and one lengthwise sliced gas fibers, GF) presented only a few nuclei (DAPI, blue), P-selectin (green), and vWF (red) double-stained platelet aggregates as well as some PLAs. The round structures (faintly green) in the middle of the sample are crosscut chaining threads with adherent leukocytes, PLAs, and small vWF-positive platelet aggregates [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

In this study, the samples with vWF-positive, highly branched and gossamer threads as well as bundles of elongated fibers being mainly arranged around the CPs interspersed with high density of nucleated cells and activated platelets are of special interest (Figures 1C and 2). Such vWF structures are indicators for a vWF-mediated high-shear clotting mechanism within MOs.¹⁴ The additional localization of P-selectin-positive regions close to the vWF-structures indicates platelet accumulations due to pathologically high shear rates ($>5000 \text{ s}^{-1}$).^{14,32,33} Shear stress induced a conformational change from a compacted, globular state to a stretched, elongated conformation of the vWF multimers.³⁴ The formation of long vWF-fibers ($>20 \mu\text{m}$) or -nets in platelet-free plasma under pathologically high shear rates was demonstrated under in vitro conditions using collagen-coated as well as in collagen-free micropost-impingement microfluidic devices. This exposes the binding sites (vWF-A1-domain) for the platelets (GPIIb and GPIIb/IIIa).^{32,35} Additionally, the elongation contributes to the formation of vWF nets, creating thousands of

bonds which are required to capture circulating platelets at very high shear rates.³⁶ The use of one ECMO system (PLS) consisting of one MO type and one type of centrifugal pump guarantees comparable flow regimes (Figure 6), but then the vWF-fibers/nets should be identifiable in all MOs. However, in the present study, the vWF-fibers/nets were only detectable in 6/21 MOs (29%). Crucial parts are missing in this puzzle.

Since we expected that high accumulations of vWF and leukocytes increase the diffusion path of the gas exchange fibers⁹ and worsen the performance of the MOs, we focused on the comparison of high versus low vWF-loaded MOs. However, high vWF-loading did not aggravate O_2 and CO_2 transfer capacities of the MOs, nor resulted in an increase of dpMO or alteration of coagulation and inflammatory factors.³ Furthermore, the life span of the analyzed MOs that may allow the accumulation of less or high deposits was also comparable. There was no difference in the consumption of blood products in particular not of FFP that contains high levels of coagulation factors such as vWF. The only conspicuous features of this vWF-phenomenon

**TABLE 3** Selected data during ECMO support

	Extent of vWF-loading		<i>P</i> value
	Low	High	
<i>N</i>	12	9	
Indication MO removal (<i>n</i> ; %)			0.081
Weaning (end of therapy)	5; 42	8; 89	
Death (end of therapy)	2; 16	0; 0	
Exchange (during therapy)	5; 42	1; 11	
MO life span (days)	9 (6-14)	8 (6-18)	0.830
Time to MO removal (days)	11 (7-20)	8 (6-22)	0.915
Total ECMO time (days)	13 (8-21)	8 (6-25)	0.593
Transfusion of ^a			
RBC per day (U)	0.55 (0.29-1.17)	0.38 (0.17-0.90)	0.477
FFP per day (U)	0.36 (0.00-1.40)	0.36 (0.00-0.71)	0.884
PC per day (U)	0.01 (0.00-0.26)	0.38 (0.00-0.88)	0.328

Note: Data show median (IQR) or absolute number.

^aTransfusion requirements of RBC and red blood cell concentrate; PC, platelet concentrate; 1 U = 300 mL; FFP, fresh frozen plasma, 1 U = 200 mL; MOs, membrane oxygenators.

were a high SOFA score and severe thrombocytopenia of the patients with high vWF-loading. These critically ill patients also presented persistent liver dysfunction until the time of MO removal³⁷ destabilizing thromboregulation.³⁸ The accumulation

of plasmatic HMWvWF multimers and ADAMTS13 deficiency is another consequence of liver dysfunction.³⁸ Claus et al. confirmed that critically ill patients with a SOFA score ≥ 10 showed a significantly lower ADAMTS13 activity.³⁹ ADAMTS13 is a metalloproteinase, produced in hepatic stellate cells, and specifically cleaves HMWvWF.³⁸ ADAMTS13 deficiency (due to consumption and/or decreased production) results in high levels of plasmatic HMWvWF multimers, in turn inducing platelet aggregation or thrombus formation under high shear stress, followed by thromboembolic complications and thrombocytopenia. This is simply due to the increased number of presented binding domains accompanied by stronger mechanical forces applied to the domains resulting from larger molecules.³³ Low concentrations of ADAMTS13 are also associated with an increased risk of arterial thrombosis⁴⁰ including myocardial infarction⁴¹ and cerebrovascular disease.^{42,43} In the present study, due to the lack of laboratory measurements of vWF and ADAMTS13 levels/activities in plasma no correlations with the extent of vWF deposits on the gas exchange fibers can be drawn.

Obviously, organ dysfunction—in particular of the liver—increases the imbalance between the concentrations of HMWvWF multimers and its size-regulating protease ADAMTS13. The following mechanism is conceivable: blood components (plasma proteins, HMWvWF multimers, platelets, leukocytes, etc.) are transported by blood flow to geometrical features in the MO,

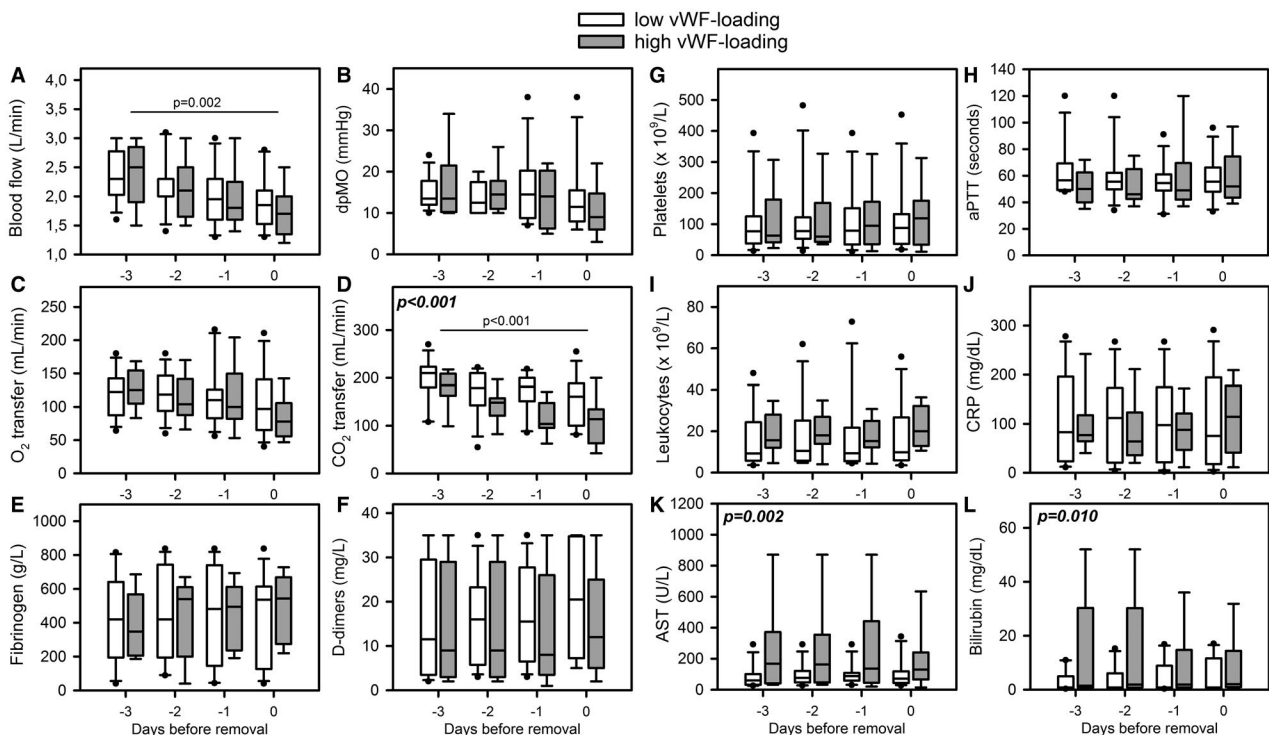


FIGURE 6 Time period of ECMO and laboratory data before oxygenator removal. Specific data from patients of the low vWF-loading ($n = 12$, white boxes) and the high vWF-loading ($n = 9$, gray boxes) were presented as median (IQR). Data included A, blood flow; B, pressure drop across the MO (dpMO); C, oxygen transfer (O_2 transfer); D, carbon dioxide transfer (CO_2 transfer); E, fibrinogen; F, D-dimer levels; G, platelet counts; H, activated partial thromboplastin time (aPTT); I, leukocyte count; J, C-reactive protein (CRP); K, aspartate transferase (AST); and L, bilirubin. Statistics comparing differences between low and high vWF-loading groups were presented in bold and cursive letters. Time dependent decreases of blood flow and CO_2 transfer were presented with a line



where deposition and accumulation is likely (eg, gas exchange fiber contact areas or chaining threads), since prevalent flow velocity and shear are relatively low in these regions. The flow around the gas exchange fibers can be divided into different zones in terms of velocity and shear rate. However, since blood is a heterogeneous suspension and shows complex non-Newtonian behavior of so far unknown extent, distinct statements are difficult. Regarding shear rates, $<1000 \text{ s}^{-1}$ could be perceived as low, $>5000 \text{ s}^{-1}$ as high, and in between somehow ambivalent. Flow velocity can be classified by means of the local Reynolds number (Re) and based on the hydraulic diameter (approx. $75 \mu\text{m}$). In this study, $\text{Re} < 1$ is considered to be “low flow,” that is, the velocities range from 0 to 8 mm/s. The flow velocity in the MO is about 2 m/s, which corresponds to a Re of 30. Thus, the flow is laminar and flow separation may occur. The deposited constituents bind to vWF, any by chance activated (ie, elongated) HMWvWF multimer that is transported toward this area will be tethered to that deposition. Due to the size of HMWvWF multimers, even in a (re-)coiled state, the flow around the gas exchange fibers is able to exert forces high enough to elongate the HMWvWF multimers ($>50 \text{ Pa}$) and thus, expose the binding domains permanently. This shear-induced extension of vWF multimers is a function of the applied forces.³³ Originating from the initial depositions in low flow/low shear areas (eg, the contact region of two crossing gas exchange fibers), the attached HMWvWF multimers protrude into the high flow/high shear regions in the narrow gap between two neighboring gas exchange fibers (Figure 4). Therefore, the majority of platelets or freely floating vWF is likely to get in the vicinity and bind to this initially tethered vWF-structure. In the beginning, this is a self-supporting mechanism, as the local flow (and shear rate) in this area is still high enough to activate (ie, elongate) vWF multimers. When the deposition on the surface of the gas exchange fibers starts to grow into the blood ducting area, the flow velocity and shear stress will decrease due to the increasing resistance around this particular gas exchange fiber. This gives already captured and only reversibly bound platelets the time to bind irreversibly to vWF and form a stable clot.^{9,44}

5 | CONCLUSION AND OUTLOOK

Membrane oxygenators from ECMO patients are loaded with vWF structures, PLAs, activated platelets, and leukocytes. Thrombosis, potentially induced by high shear stress, was only observed in a subgroup of ECMO patients with a high SOFA score, thrombocytopenia, and liver dysfunction. In particular, liver dysfunction causes ADAMTS13 deficiency or loss of activity that prevents the cleavage of HMWvWF multimers. This imbalance may promote a potential shear-induced mechanism for clot initiation and progression in MOs. These patients require special anticoagulation therapy. The proposed interplay mechanism between flow and clot formation in MOs needs further investigation.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was in-house funded. The authors gratefully thank Katrin Bielenberg for excellent technical assistance.

CONFLICT OF INTEREST

The authors state that they have no conflict of interest.

ORCID

Maik Foltan  <https://orcid.org/0000-0001-9350-3368>

Michael Gruber  <https://orcid.org/0000-0002-5509-9760>

Andre Bredthauer  <https://orcid.org/0000-0002-5779-7714>

Clemens Birkenmaier  <https://orcid.org/0000-0002-8036-7173>

Karla Lehle  <https://orcid.org/0000-0001-8856-4094>

REFERENCES

- Zangrillo A, Landoni G, Biondi-Zoccai G, Greco M, Greco T, Frati G, et al. A meta-analysis of complications and mortality of extracorporeal membrane oxygenation. *Crit Care Resusc.* 2013;15:172–8.
- Murphy DA, Hockings LE, Andrews RK, Aubron C, Gardiner EE, Pellegrino VA, et al. Extracorporeal membrane oxygenation-hemostatic complications. *Transfus Med Rev.* 2015;29:90–101.
- Lubnow M, Philipp A, Foltan M, Bull Enger T, Lunz D, Bein T, et al. Technical complications during veno-venous extracorporeal membrane oxygenation and their relevance predicting a system-exchange—retrospective analysis of 265 cases. *PLoS ONE.* 2014;9:e112316.
- Thomas J, Kostousov V, Teruya J. Bleeding and thrombotic complications in the use of extracorporeal membrane oxygenation. *Semin Thromb Hemost.* 2018;44:20–9.
- Riegger J, Byrne RA, Joner M, Chandraratne S, Gershlick AH, ten Berg JM, et al. Prevention of Late Stent Thrombosis by an Interdisciplinary Global European Effort (PRESTIGE) Investigators. Histopathological evaluation of thrombus in patients presenting with stent thrombosis. A multicenter European study: a report of the prevention of late stent thrombosis by an interdisciplinary global European effort consortium. *Eur Heart J.* 2016;37:1538–49.
- Philipp A, Müller T, Bein T, Foltan M, Schmid F-X, Birnbaum D, et al. Inhibition of thrombocyte aggregation during extracorporeal lung assist: a case report. *Perfusion.* 2007;22:293–7.
- Beely BM, Campbell JE, Meyer A, Langer T, Negaard K, Chung KK, et al. Electron microscopy as a tool for assessment of anticoagulation strategies during extracorporeal life support: the proof is on the membrane. *ASAIO J.* 2016;62:525–32.
- Lehle K, Philipp A, Gleich O, Holzamer A, Müller T, Bein T, et al. Efficiency in extracorporeal membrane oxygenation-cellular deposits on polymethylpentene membranes increase resistance to blood flow and reduce gas exchange capacity. *ASAIO J.* 2008;54:612–7.
- Wilm J, Philipp A, Müller T, Bredthauer A, Gleich O, Schmid C, et al. Leukocyte adhesion as an indicator of oxygenator thrombosis during extracorporeal membrane oxygenation therapy? *ASAIO J.* 2018;64:24–30.
- Tauber H, Ott H, Streif W, Weigel G, Loacker L, Fritz J, et al. Extracorporeal membrane oxygenation induces short-term loss of high-molecular-weight von Willebrand factor multimers. *Anesth Analg.* 2015;120:730–6.



11. Kalbhenn J, Schlagenhauf A, Rosenfelder S, Schmutz A, Zieger B. Acquired von Willebrand syndrome and impaired platelet function during venovenous extracorporeal membrane oxygenation: rapid onset and fast recovery. *J Heart Lung Transplant*. 2018;37:985–91.
12. Proudfoot AG, Davidson SJ, Strueber M. von Willebrand factor disruption and continuous-flow circulatory devices. *J Heart Lung Transplant*. 2017;36:1155–63.
13. Kawecki C, Lenting PJ, Denis CV. von Willebrand factor and inflammation. *Thromb Haemost*. 2017;15:1285–94.
14. Casa L, Ku DN. Thrombus formation at high shear rates. *Annu Rev Biomed Eng*. 2017;19:415–33.
15. Shankaran H, Alexandridis P, Neelamegham S. Aspects of hydrodynamic shear regulating shear-induced platelet activation and self-association of von Willebrand factor in suspension. *Blood*. 2003;101:2637–45.
16. Nascimbene A, Neelamegham S, Frazier OH, Moake JL, Dong JF. Acquired von Willebrand syndrome associated with left ventricular assist device. *Blood*. 2016;127:3133–41.
17. Baumann Kreuziger L, Slaughter MS, Sundareswaran K, Mast AE. Clinical relevance of histopathologic analysis of HeartMate II thrombi. *ASAIO J*. 2018;64:754–9.
18. Gorbet MB, Sefton MV. Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. *Biomaterials*. 2004;25:5681–703.
19. Jaffer IH, Fredenburgh JC, Hirsh J, Weitz JI. Medical device-induced thrombosis: what causes it and how can we prevent it? *J Thromb Haemost*. 2015;13 Suppl 1:S72–81.
20. Tsai WB, Grunkemeier JM, McFarland CD, Horbett TA. Platelet adhesion to polystyrene-based surfaces preadsorbed with plasmas selectively depleted in fibrinogen, fibronectin, vitronectin, or von Willebrand's factor. *J Biomed Mater Res*. 2002;60:348–59.
21. Lehle K, Friedl L, Wilm J, Philipp A, Müller T, Lubnow M, et al. Accumulation of multipotent progenitor cells on polymethylpentene membranes during extracorporeal membrane oxygenation. *Artif Organs*. 2016;40:577–85.
22. Nagasawa A, Matsuno K, Tamura S, Hayasaka K, Shimizu C, Moriyama T. The basis examination of leukocyte-platelet aggregates with CD45 gating as a novel platelet activation marker. *Int J Lab Hematol*. 2013;35:534–41.
23. Cerletti C, Tamburrelli C, Izzi B, Gianfagna F, de Gaetano G. Platelet-leukocyte interactions in thrombosis. *Thromb Res*. 2012;129:263–6.
24. Zarbock A, Singbartl K, Ley K. Complete reversal of acid-induced acute lung injury by blocking of platelet-neutrophil aggregation. *J Clin Invest*. 2006;116:3211–9.
25. Bunesco A, Seideman P, Lenkei R, Levin K, Egberg N. Enhanced Fcγ receptor I, αMβ2 integrin receptor expression by monocytes and neutrophils in rheumatoid arthritis: interaction with platelets. *J Rheumatol*. 2004;31:2347–55.
26. Arber N, Berliner S, Pras E, Arber L, Fishelson Z, Kahn Y, et al. Heterotypic leukocyte aggregation in the peripheral blood of patients with leukemia, inflammation and stress. *Nouv Rev Fr Hematol*. 1991;33:251–5.
27. Irving PM, Macey MG, Feakins RM, Knowles CH, Frye JN, Liyanage SH, et al. Platelet-leucocyte aggregates form in the mesenteric vasculature in patients with ulcerative colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2008;20:283–9.
28. Setianto BY, Hartopo AB, Gharini PP, Anggrahini DW, Irawan B. Circulating soluble CD40 ligand mediates the interaction between neutrophils and platelets in acute coronary syndrome. *Heart Vessels*. 2010;25:282–7.
29. Zachem CR, Alpers CE, Way W, Shankland SJ, Couser WG, Johnson RJ. A role for P-selectin in neutrophil and platelet infiltration in immune complex glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*. 1997;8:1838–44.
30. Kuligowski MP, Kitching AR, Hickey MJ. Leukocyte recruitment to the inflamed glomerulus: a critical role for platelet-derived P-selectin in the absence of rolling. *J Immunol*. 2006;176:6991–9.
31. Maugeri N, Campana L, Gavina M, Covino C, De Metrio M, Panciroli C, et al. Activated platelets present high mobility group box 1 to neutrophils, inducing autophagy and promoting the extrusion of neutrophil extracellular traps. *J Thromb Haemost*. 2014;12:2074–88.
32. Herbig BA, Diamond SL. Pathological von Willebrand factor fibers resist tissue plasminogen activator and ADAMTS13 while promoting the contact pathway and shear-induced platelet activation. *J Thromb Haemost*. 2015;13:1699–708.
33. Fu H, Jiang Y, Yang D, Scheiflinger F, Wong WP, Springer TA. Flow-induced elongation of von Willebrand factor precedes tension-dependent activation. *Nat Commun*. 2017;8:324.
34. Siedlecki CA, Lestini BJ, Kottke-Marchant KK, Eppell SJ, Wilson DL, Marchant RE. Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor. *Blood*. 1996;88:2939–50.
35. Colace TV, Diamond SL. Direct observation of von Willebrand factor elongation and fiber formation on collagen during acute whole blood exposure to pathological flow. *Arterioscler Thromb Vasc Bio*. 2013;33:105–13.
36. Wellings PJ, Ku DN. Mechanisms of platelet capture under very high shear. *Cardiovasc Eng Tech*. 2012;3:161–70.
37. Roch A, Hraiech S, Masson E, Grisoli D, Forel J-M, Boucekine M, et al. Outcome of acute respiratory distress syndrome patients treated with extracorporeal membrane oxygenation and brought to a referral center. *Intensive Care Med*. 2014;40:74–83.
38. Uemura M, Fujimura Y, Ko S, Matsumoto M, Nakajima Y, Fukui H. Pivotal role of ADAMTS13 function in liver diseases. *Int J Hematol*. 2010;91:20–9.
39. Claus R, Bockmeyer C, Budde U, Kentouche K, Sossdorf M, Hilberg T, et al. Variations in the ratio between von Willebrand factor and its cleaving protease during systemic inflammation and association with severity and prognosis of organ failure. *Thromb Haemost*. 2009;101:239–47.
40. Sonneveld MA, de Maat MP, Leebeek FW. Von Willebrand factor and ADAMTS13 in arterial thrombosis: a systematic review and meta-analysis. *Blood Rev*. 2014;28:167–78.
41. Maino A, Siegerink B, Lotta LA, Crawley JTB, le Cessie S, Leebeek FWG, et al. Plasma ADAMTS-13 levels and the risk of myocardial infarction: an individual patient data meta-analysis. *J Thromb Haemost*. 2015;13:1396–404.
42. Sonneveld MAH, de Maat MPM, Portegies MLP, Kavousi M, Hofman A, Turecek PL, et al. Low ADAMTS13 activity is associated with an increased risk of ischemic stroke. *Blood*. 2015;126:2739–46.
43. Denorme F, Kraft P, Pareyn I, Drechsler C, Deckmyn H, Vanhoorelbeke K, et al. Reduced ADAMTS13 levels in patients with acute and chronic cerebrovascular disease. *PLoS ONE*. 2017;12:e0179258.
44. Casa LD, Deaton DH, Ku DN. Role of high shear rate in thrombosis. *J Vasc Surg*. 2015;61:1068–80.

How to cite this article: Steiger T, Foltan M, Philipp A, et al. Accumulations of von Willebrand factor within ECMO oxygenators: Potential indicator of coagulation abnormalities in critically ill patients? *Artif Organs*. 2019;00:1–12. <https://doi.org/10.1111/aor.13513>

Flow-induced accumulation of von-Willebrand-Factor on gas exchange surfaces during ECMO – An indicator for coagulation disorder?



Steiger T.¹, Foltan M.¹, Philipp A.¹, Müller T.² Gruber M.³, Krenkel L.⁴, Lehle K.¹

Departments of ¹Cardiothoracic Surgery; ²Internal Medicine II, ³Anaesthesiology, University Medical Center Regensburg, Regensburg, Germany, ⁴Ostbayerische Technische Hochschule, Center of Biomedical Engineering, Regensburg, Germany

Background and Aims

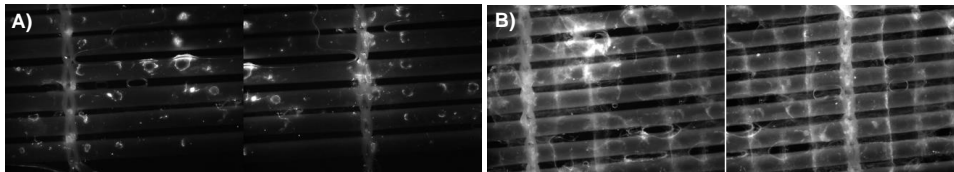
Foreign surfaces favour cellular adhesion and clot formation in tubes and on gas exchange membranes (GEMs) within membrane oxygenators (MO) which may be a reason for hemorrhagic diathesis in patients undergoing ECMO treatment. The aim was to identify von-Willebrand-Factor (vWF) -structures on GEMs as an indicator for shear-induced vWF-mediated clot formation [1].

Methods

A total of 41 polymethylpentene (PMP) MOs were removed when clinically indicated. Samples of GEMs were stained with fluorescent-labelled monoclonal **anti-vWF** and **anti-P-selectin** antibodies, counterstained with **DAPI** and visualized using an immunofluorescence microscope.

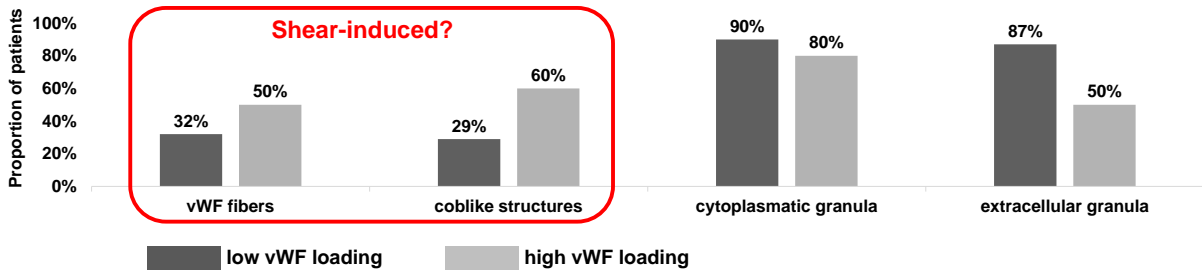
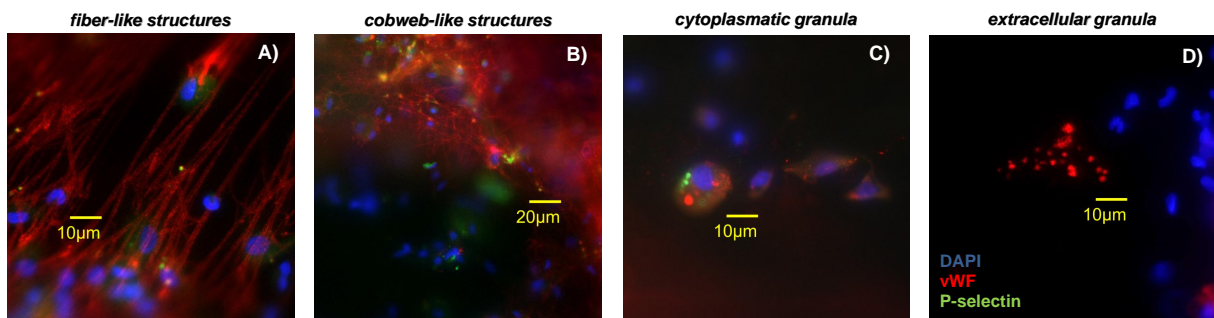
Results

GEMs from different MOs were loaded with low (A) and high (B) amount of vWF accumulation:

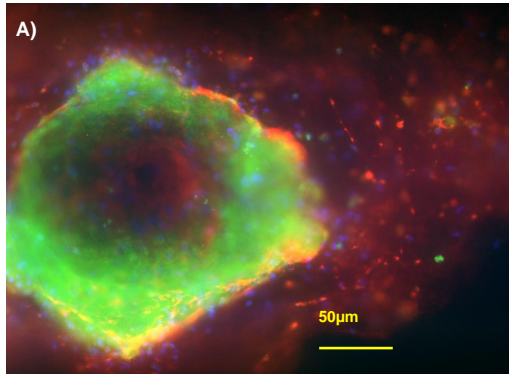


vWF-loading	n (%)
Low	31 (76)
High	10 (24)

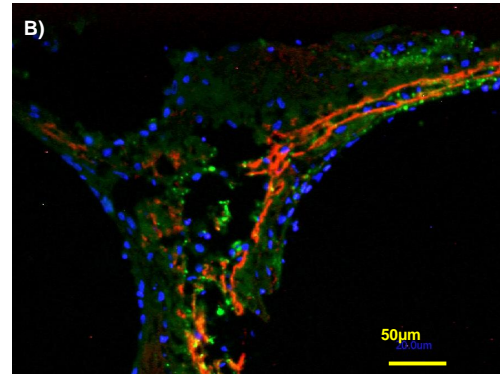
Different types of vWF structures were identified on the surface of GEMs:



Crossing points (CP) of adjacent GEMs showed high potential for vWF adhesion and platelet activation:



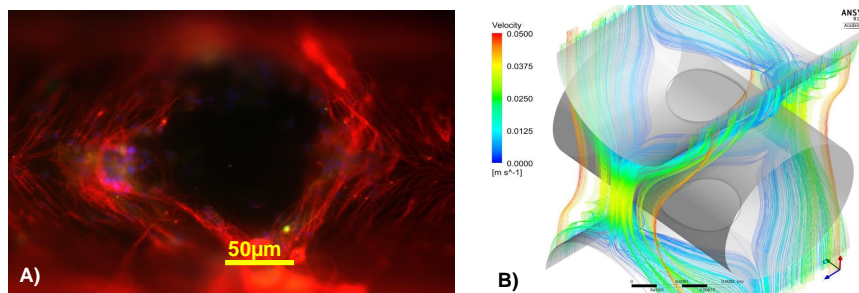
Top view of a CP on GEMs with high vWF-loading



Cross section of two cross-cut GEMs with high vWF-loading

- No staining in the center of CPs; colocalization of **P-selectin** with **nucleated cells** surrounded by a small **vWF-border** (A).
- **vWF-fibers** originate at the CP. **Leukocytes** are evenly distributed, conspicuously close to the GEM surface. **P-selectin** is colocalized with **vWF-fibers** (B).

Simulation of blood flow around CPs of adjacent GEMs (B) according to immunofluorescence data (A)



According to the vWF fiber alignment in one representative oxygenator we calculated a simulation of the presumable blood flow around the CPs of adjacent GEMs. But the assumption that adjacent CPs' vWF distribution must be similar had to be rejected. Based on CP configuration it was not possible to make a binding statement on the direction of the blood flow over the GEMs.

Conclusions

- Clot formation within the MO begins with adhesion of leukocytes to the foreign surface followed by vWF-mediated platelet adhesion/activation.
- Coaggregates may also induce thrombogenesis.
- We speculated that non-physiological flow conditions within the MO may be responsible for heterogeneous accumulation of vWF and leukocytes.
- Clot localization using micro-CT analysis and identification of clot components should provide insight into the complex mechanism of clot formation.

[1] Herbig & Diamond. J. Thromb. Haemost. 13, 1699–1708 (2015).

7.2 Material

7.2.1 Hilfsmittel und Analysegeräte

Produkt	Hersteller	Ort
Fluoreszenzmikroskop Leica DM RBE	Leica	Wetzlar, D
Leica DM RBE Kamera- system	Visitron Systems	Puchheim, D
Adobe Photoshop CS5	Adobe Inc.	San José, CA, USA
Autoclav Varioclav Dampfsterilisator	H+P Labortechnik	Oberschleißheim, D
Vortex Genie	Heidolph	Schwabach, D
Multipette Plus (Stepper)	Eppendorf	Wesseling-Berzdorf, D
Reference Pipette	Eppendorf	Wesseling-Berzdorf, D
Arbeitsplatzcomputer	Dell	Frankfurt a. Main, D
Milli Q-Anlage (Dest)	Millipore	Schwabach, D
Kühlschrank Liebherr Comfort	Liebherr	Ochsenhausen, D
Labor Abzug	Waldner	Wangen, D
Lab-pH-Meter, HI 2213	Hanna-Instruments	Vöhringen, D
Eisschrank -80 °C, HERA freeze	Thermo Scientific	Dreieich, D
Präparierbesteck (Pinzet- ten, Scheren)	FST Instruments	Heidelberg, D

7.2.2 Einwegmaterialien

Produkt	Hersteller	Ort
Combitips 2,5-10mL	Eppendorf	Wesseling-Berzdorf, D
Pipettenspitzen	GreinerBioOne	Frickenhausen, D
Deckgläser	VWR	Ismaning, D
Einmalhandschuhe Nitrile	Ansell	Brüssel, D
Eppendorfreaktionsgefäße 0,5 - 5mL	VWR	München, D
Petrischale	Nunc	Wiesbaden, D

7.2.3 Puffer

PBS-Puffer (Stammlösung 10x)	80g NaCl
	11,5g Na ₂ HPO ₄
	2g KCl
	2g KH ₂ PO ₄
PBST-Puffer (1x mit 0,1% Triton)	1mL Triton
	100mL PBS (10x)
	ad 1000mL Aqua bidest

Die Puffer wurden im Labor selbst hergestellt. Alle Materialien stammen von der Firma Roth, Karlsruhe, D. Alle Pufferlösungen wurden mit HCl bzw. NaOH auf einen pH- Wert von 7,4 eingestellt. Anschließend wurden die Lösungen autoklaviert.

7.2.4 Antikörper

Name	anti-vWF (Primärantikörper)	anti-CD62P, fitc-konjugiert	anti-rabbit AlexaFluor 594 rot (Sekundärantikörper)
Hersteller	Dako Agilent	Novus BioTech- neGmbH	Dianova
Ort	Santa Clara, CA, USA	Wiesbaden, D	Hamburg, D
Artikelnummer	A0082	NBP1-22046	711-585-152
Typ	polyclonal rabbit anti-human	monoclonal mou- se anti-human	donkey anti-rabbit
Verdünnung	1:500	1:100	1:300

7.2.5 Weitere Reagenzien/Chemikalien/Farbstoffe

Name	Artikelnummer	Hersteller	Ort
DAPI, 0,5µg/mL	D9542	Sigma-Aldrich	St. Louis, Mo, USA
Triton X100	# X100	Sigma	Madison, Wi, USA
Fluoromount-G® mit DAPI/ ohne DAPI	CO-4958-02	ThermoFisher	Darmstadt, D
Normal Donkey Serum	D9663	Sigma	München, D

7.3 Protokolle zur Probenvorbereitung

1. Vorbereitung der Oxygenatoren

- a) Die Oxygenatoren werden direkt nach Entnahme in Formaldehyd fixiert und mit Glucoselösung versetzt, in 9 identische Blöcke gesägt und bei -80°C eingefroren
- b) Für die Färbung der Gasfasern wird einer der Blöcke aufgetaut, sodass sich die Gasfasermembranen, ohne großen traumatischen Schaden an den Zellen anzurichten, leicht voneinander ablösen lassen.
- c) 4 Membranen verwerfen. 5. Membran verwenden.
- d) Auf einer Petrischale mit PBS wird die Gasfaser zugeschnitten. Breite: 3 Kettfäden, Länge 10 Gasfasern
- e) Die zugeschnittenen Membranen werden in 500µL Eppendorfgefäße überführt und mit PBS überschichtet
- f) Dreimaliges Waschen mit PBS bis die Glucose abgespült ist
- g) 30min blocken mit 10% Normal-Donkey-Serum in PBS-T 0,01%

2. Färbung Primärantikörper

vWF: polyclonal rabbit anti-human vWF, Dako

CD62P: monoclonal mouse anti-human CD62P, Novus

DAPI: 0,5µg/mL, D9542, Sigma-Aldrich

- a) Anti-vWF 1:500 und Anti-CD62P 1:100 in 0,01% PBS-T ansetzen, über 1h30min bei Raumtemperatur und im Dunklen färben
- b) 1x 5min in PBS-T 0,01% waschen
- c) 4x 5min in PBS waschen

- d) DAPI in Endkonzentration 0,5µg/mL in PBS weitere 30min bei Raumtemperatur und im Dunklen färben
 - e) 2x 5min in PBS waschen
3. Färbung Sekundärantikörper
- a) vWF: donkey anti-rabbit, Dianova, 1:300, 1h bei Raumtemperatur, dunkel
 - b) CD62P: fitc-konjugiert, kein Sekundärantikörper nötig
 - c) DAPI: interkaliert mit DNA, kein Sekundärantikörper nötig
4. Aufbringen auf Objektträger
- a) Auf einem 60mm Deckglas mit Fettstift 2 gleich große Felder umranden, beschriften
 - b) Je ein Tropfen Fluoromount ins Feld geben
 - c) Probe gerade und glatt einlegen
 - d) Mit einem zweiten Deckglas überdeckeln
 - e) Aushärtung des Kunststoffes bei 4 °C über Nacht

7.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

1	Anordnung der Gasfasern im Membranoxygenator der Modelle PLS, Cardiohelp oder iLA-active	10
2	Anordnung der Gasfasern im Membranoxygenator der Modelle Hilite7000LT oder ECC.O5	10
3	Blutfluss um die Gasfasern	10
4	Proteinstruktur des vWF mit Bindungsstellen und Angriffspunkt für die spezifische Protease ADAMTS13	13
5	Konformationsänderung des vWF von der geknäulten zur linearisierten Struktur	14

6	<p>Übersicht über die vWF-Strukturen der Bilddokumentation von J. Wilm. Bild A: Kreuzungspunkt mit typischer Aussparung in der Mitte. Herum sind granuläre vWF-Strukturen (rot) angeordnet, vermischt mit einzelnen Zellkernen (blau), von denen einige als Leukozyten (grün) identifiziert werden können. Bild B: Flächige, vWF-positive Struktur (rot), welche ähnlich einem Spinnennetz quervernetzt ist und Zellen in diese dreidimensionale Struktur einlagert. Bild C: Kreuzungspunkt angeschnitten, identifizierbar durch die Aussparung am rechten oberen Bildrand. Vom linken Pol des Kreuzungspunktes ziehen vWF-positive fadenartige Strukturen parallelverlaufend nach unten. Auch hier sind Zellkerne angelagert. Bild D: Netzartiger vWF wie in Bild B mit zusätzlichen vWF-Granulae, „Target“</p>	20
7	<p>Beispiel für einzelne Kanäle und „Merging“. Bild A: Alle drei Fluoreszenzkanäle nach Merging. Eine detaillierte Analyse der einzelnen Strukturen ist aber so aufgrund der Überlagerungen der Kanäle nicht möglich. Der Monolayer aus Spiderwebs ist in Bild A kaum zu erkennen, wohingegen er in Bild C sehr gut darzustellen ist. Ebenso zeigt sich der vWF-Saum besser in Bild C als in Bild A. Zum Auffinden des Kreuzungspunktes eignet sich auch besonders gut der DAPI-Kanal (Bild B), da Zellkerne besonders deutlich einen Kreuzungspunkt markieren. Die in den Spiderweb-Monolayer eingelagerten Zellkerne sind aber ebenfalls besser in Bild B als Bild A zu erkennen. Der fluoreszenzintensive grüne Kanal (P-Selektin) überstrahlt häufig die anderen beiden Kanäle und lässt sich daher auch besser gesondert betrachten (Bild D).</p>	23
8	Beispiele für Proben	24
9	Beispielhafte Oxygenatorenmodelle	24
10	<p>Konfiguration eines Kreuzungspunktes. Bild A: 1-4. Pole des Kreuzungspunktes, a. Spiderweb-Monolayer, b. zentrale leere Stelle („Auge“), c. Mantel aus P-Selektin, d. vWF-Saum, e. Gasfaser; grün=P-Selektin, rot=vWF, DAPI in der schematischen Zeichnung aus Übersichtsgründen nicht dargestellt. Bild B: Alle 3 Kanäle nach Merging. Typische zentrale Aussparung: „Auge“. Bild C: Kreuzungspunkt mit vWF-Saum und vWF-Monolayer. Bild D: Kreuzungspunkt mit Mantel aus P-Selektin.</p>	25
11	<p>Repräsentative Übersichten (50x, rot=vWF, blau=DAPI, grün=P-Selektin) (a) Übersichtsaufnahme einer Probe mit starker Zellbesiedelung (b) Übersichtsaufnahme einer Probe mit schwacher Zellbesiedelung</p>	26

- 12 **Die verschiedenen Erscheinungsformen des vWF der 2. Auswertung.** Bild A: Neun Zellkerne, welche gruppiert auf einer Gasfaser liegen. Vier dieser Zellkerne weisen eine diffuse vWF-Verteilung um den Zellkern herum auf (rot), was den Bereich des Zytoplasmas markiert. Eine Zelle weist deutlich konfigurierte vWF-Granulae im Zytoplasma auf, ebenso wie auch P-Selektin-positive Granulae. Bild B: Kreuzungspunkt, zu identifizieren an der Aussparung in der linken Bildhälfte. Am rechten Bildrand beginnt ein weitläufiges Netz aus Spiderwebs, in welches Zellen und vWF-positive Granulae eingelagert sind. Bild C: Spiderwebs mit vWF-Granulae, welche als „Targets“ in das Netz eingearbeitet sind. Bild D: vWF-Fäden, welche vom oberen Pol eines Kreuzungspunktes (Aussparung am rechten Bildrand) zum unteren linken Bildrand ziehen. Die Anordnung ist nahezu parallel und es finden sich vereinzelt Zellkerne den Fäden aufgelagert. 29
- 13 **Erscheinungsformen Granulae.** Bild A: vWF-Granulae, welche zirkulär um einen Kreuzungspunkt (Aussparung Bildmitte) angeordnet sind. Bild B: Granulae zusammen mit einigen Zellen diffus über eine Gasfaser verteilt, ohne Bezug zu Zellkernen oder Kreuzungspunkt. 31
- 14 **Beispiel Spiderwebs.** Bild A: Feines Netz aus Spiderwebs, mehrere Zellen eingelagert. Ein dickerer vWF-positiver Faden verbindet die Zellkerne und das Netz zu einem kleinen Konglomerat. Bild B: Am rechten Bildrand eine angeschnittener Kreuzungspunkt. Der Kreuzungspunkt wird nach links hin von einem ausgedehnten Netz an Spiderwebs begrenzt, in welches sowohl Zellen als auch Targets eingelagert sind. 32
- 15 **Erscheinungsformen Fäden.** Bild A: Mehrere parallel verlaufende vWF-Fäden, welche an einem gemeinsamen Punkt am rechten oberen Bildrand entspringen. An die Fäden sind vWF-Granulae und Zellkerne angelagert. Bild B: Parallel verlaufende vWF-Fäden, welche vom seitlichen Pol eines Kreuzungspunktes (rechter oberer Bildrand) entspringen und gemeinsam zum unteren Pol ziehen. Auch hier sind vWF-Granulae und Zellkerne angelagert. 33
- 16 **Erscheinungsformen Targets.** Bild A: Zentral liegendes vWF-Granulum, zirkulär angeordnete, dünne vWF-Fasern. Ein Leukozyt ist dem „Target“ angelagert. Bild B: Verbund aus mehreren „Targets“, welche in einen großen Netz aus Spiderwebs zusammengehalten werden. Kernhaltige Zellen und Leukozyten sind eingewebt. 33

17	Vergleich von jeweils einem Kreuzungspunkt zweier Präparate eines Oxygenators. Die Kreuzungspunkte eines Oxygenators zeigen eine nahezu identische Konfiguration. Ein jedes Bildpaar (A und B) stammte von je zwei verschiedenen Präparaten aus je einem Oxygenator. . . .	35
18	Verschiedene Morphologie der Kreuzungspunkte. Bild A: Symmetrisch angeordneter Kreuzungspunkt mit vielen vWF-Fäden. Bild B: Längsovaler Kreuzungspunkt, zentral liegendes „Auge“, gefolgt von einem Saum von Zellkernen, P-Selektin und vWF. Bild C: Symmetrischer Kreuzungspunkt, außerhalb des Kreuzungspunktes ist die restliche Gasfaser im Vergleich zu Bild A oder D kaum besiedelt. P-Selektin, DAPI und vWF sind stark überlagert, sodass einzelne Strukturen nicht auszumachen sind. Bild D: Kreuzungspunkt mit Spiderwebs. Unter Aussparung des Kreuzungspunktes ist die gesamte Gasfaser mit Spiderwebs überzogen. vWF-Granulae und Zellen sind in die Spiderwebs eingelagert.	37
19	Fadenlängen in Abhängigkeit von der Fadendicke. Zugrunde liegen Daten von 40 Oxygenatoren aus der Dissertation von J. Wilm, welche Fäden aufwies. Die Dicke der Fäden wurde gemessen und ein Mittelwert für jeden der 40 Oxygenatoren bestimmt. Anschließend wurde die Gruppe geteilt in $<2\mu\text{m}$ und $>2\mu\text{m}$ und jede Gruppe gegenüber der Fadenlänge aufgezeichnet. Optisch zeigt sich, dass dünnere Fäden auch eher kurze Fadenlängen haben.	39
20	Beispiel für vWF-Fäden der 2. Auswertung. Bild A: Rechts unten eine Aussparung durch einen Kreuzungspunkt. Die Fäden verlaufen parallel zwischen dem oberen und linken Pol des Kreuzungspunktes. Bild B: Übersicht über einen Kreuzungspunkt einer Gasfaser mit symmetrisch angeordneten Fäden. Bild C: Fäden am unteren Pol eines Kreuzungspunktes. Übergang von parallel verlaufenden Fäden zu einer ungerichteten Anordnung.	40
21	Beispiel für ungerichtete vWF-Fäden. Bild A: Kreuzungspunkt rechts im Bild. Fäden laufen vom unteren und oberen Pol zusammen (Pfeil). Bild B: Kreuzungspunkt links oben im Bild angeschnitten. Die Fäden laufen zum unteren Pol und überlagern sich dort (Pfeil).	41
22	Beispiel für gerichtete vWF-Fäden. Parallel laufende Fäden zwischen dem oberen und seitlichen Pol eines Kreuzungspunktes. Anlagerung einzelner Zellkerne.	42
23	vWF-Fäden mit angelagerten Leukozyten. Bild A: Mehrere parallel angeordnete vWF-Fäden mit eingelagerten Zellkernen. Bild B: Einzelner Faden mit aufgelagerten Granulae und einer Zelle.	43

24	Beispiel für Spiderwebs der 2. Auswertung. Bild A: Spiderweb-Monolayer. Bild B: Überlagerung der Spiderwebs verursacht eine diffuse Fluoreszenz. Bild C: Stark fluoreszierender Kettfaden am rechten Bildrand, diffuse Fluoreszenz von vWF bei überlagerten Spiderwebs.	44
25	Spiderwebs mit eingelagerten Leukozyten und positiver Fluoreszenz für P-Selektin. Bild A: Spiderwebs mit eingelagerten Zellkernen. Eine Überlagerung von vWF-positiven Granulae und P-Selektin-positiven Granulae erscheint hier gelb. Bild B: Aussparung durch einen Kreuzungspunkt. Oben Spiderwebs und vWF-Fäden, unten Spiderwebs mit scharf abgrenzbaren P-Selektin-positiven Granulae.	45
26	Beispiel für Targets der 2. Auswertung. Große Fläche aus Spiderwebs mit mehreren Targets und einigen eingelagerten Zellkernen.	46
27	Die verschiedenen Erscheinungsformen von vWF-Granulae. Bild A: P-Selektin-positiver Leukozyt mit aufgelagerten vWF-positiven Granulae. Bild B: Im Vordergrund Zelle mit P-Selektin- und vWF-positiven, scharf abgrenzbaren Granulae im Zytoplasma. Bild C: vWF-Granulae als Targets eingelagert in Spiderwebs. Bild D: Extrazytoplasmatische vWF-Granulae im Haufen gruppiert auf einer Gasfaser ohne Bezug zu anderen Strukturen.	47
28	Beispiele für extrazytoplasmatische Granulae. Bild A: Mehrere in Gruppen gehäufte vWF-Granulae neben DAPI-positivem Zellkern. Bild B: Gruppierung von EZP-G neben einer Zellgruppe. Bild C: EZP G neben einzelner Zelle.	49
29	Beispiele für intrazytoplasmatische Granulae. Bild A: Zellgruppe mit vWF- und P-Selektin-positiven Granulae im Zytoplasma. Bild B: Zellgruppe, eine Zelle mit deutlich P-Selektin- und vWF-positiven Granulae.	50
30	Anteil der P-Selektin-positiven Zellen an der Gesamtzellzahl. Auf der X-Achse sind die 57 Oxygenatoren der 2. Auswertung aufgetragen. Die Y-Achse entspricht 100% aller auf den Bildern sichtbaren Zellkernen. Grün = Anteil der P-Selektin-positiven Zellkerne an der Gesamtzellzahl des Oxygenators; Blau = Anteil der P-Selektin-negativen Zellen. Dünn besiedelte Oxygenatoren, welche keine Zellen auf den Gasfasern zeigten, besitzen keinen entsprechenden Y-Wert.	51
31	Beispiel für P-Selektin-positive Zellen. Bild A: Zellgruppierung von 17 Zellen, 14 davon mit P-Selektin im Zytoplasma. Bild B: Aufsicht auf eine Gruppe Zellen, teilweise P-Selektin-positives Zytoplasma. Bild C: Eingelagerte P-Selektin-positive Zellen in ein Netz aus Spiderwebs.	52

32	Gegenüberstellung von vWF- und DAPI-Grauwerten. Es zeigt sich ein linearer Zusammenhang zwischen beiden Größen. Die Daten wurden in der Dissertation von J. Wilm erhoben.	53
33	Vorkommen der vWF-Strukturen in Abhängigkeit vom vWF-Grauwert. Schnittmenge der Oxygenatoren (n=38) von J. Wilm und der 2. Auswertung, für welche sowohl vWF-Grauwerte, als auch Informationen über die ausgebildeten vWF-Strukturen vorlagen. Auf der Y-Achse sind die vWF-Grauwerte aufgetragen. Auf der X-Achse sind die Oxygenatoren, nach aufsteigenden vWF-Grauwerten sortiert, abgebildet. vWF-Granulae sind bereits bei niedrigen Grauwerten auf den Gasfasern vorhanden (oben). Spiderwebs können von mittleren bis sehr hohen Grauwerten identifiziert werden (2.v.o.). 13/15 Oxygenatoren mit Spiderwebs wiesen ebenfalls Targets auf (2.v.u.). vWF-Fäden fanden sich bei mittleren bis hohen vWF-Grauwerten (unten).	55
34	Aufsicht auf einen Kreuzungspunkt	56
35	Strömungsberechnung in Aufsicht	56
36	Schemazeichnung eines Oxygenators mit angezeichneter Blutflussrichtung, seitliche Ansicht	57
37	Aufsicht mit angeschnittenem Kreuzungspunkt	58
38	Simulation des Blutfluss von seitlich vorne	58
39	Gegenseitige Beeinflussung von Blutfluss und Thrombusbildung	64

7.5 Tabellenverzeichnis

Tabellenverzeichnis

1	ECMO-Systeme und Pumpen der vorliegenden Studie	9
2	Fotodokumentation von J. Wilm	17
3	Objektive des Mikroskops und Bildmaße	17
4	Übersichtsaufnahmen (DAPI-Färbung) dreier Präparate (50x Vergrößerung) und zugehörige Berechnung der Zelldichte in den 400x vergrößerten Bildausschnitten des entsprechenden Präparates. Die Besiedelung der Gasfasermatten mit Zellkernen variiert. Oben: Starke Besiedelung mit Ausbildung von Pseudomembranen (bei 5/53 Oxygenatoren), Kreuzungspunkt ausgespart. Mitte: Moderate Besiedelungsdichte, Kreuzungspunkte sind noch erkennbar. Unten: Spärliche oder fehlenden Besiedelung, Kreuzungspunkte nicht mehr erkennbar.	18
5	Übersicht über die verwendeten Antikörper	21
6	Beschreibung der drei Fluoreszenzkanäle	22

7	Ausrichtung der Kreuzungspunkte anhand 10 repräsentativer Oxygenatoren (PLS) der 2. Auswertung	27
8	Zusammensetzung des Bildmaterials der neuen Auswertung aus 71 Präparaten	28
9	Zusammensetzung des Auswertungsmaterials	34
10	Analyse der mehrfach mikroskopierten Oxygenatoren. X = die jeweilige vWF-Struktur wurde identifiziert; 0 = die jeweilige vWF-Struktur konnte auf dem Präparat nicht identifiziert werden.	36
11	Verteilung der vWF-Strukturen vor und nach Entblindung	38
12	Vergleich 1. gegen 2. Auswertung, Anteile der Oxygenatoren mit vWF-Fasern	39
13	Räumliche Beziehung von vWF-Fäden mit Granulae (G), Zellkernen (ZK) und P-Selektin. P-Selektin wurde in der 1. Auswertung nicht bestimmt, daher fehlen hier die zugehörigen Werte. +/- für positiv/negativ	43
14	Häufigkeit von Targets und Spiderwebs in verblindeter und entblindeter Auswertung, +/- für positiv/negativ	46
15	Vorkommenshäufigkeit von intra- und extrazytoplasmatischen Granulae	48
16	Kolokalisation von EZP G mit Fäden und/oder Spiderwebs	48
17	Kolokalisation von IZP G mit Fäden und/oder Spiderwebs	50
18	Kolokalisation von EZP G und IZP G, +/- für positiv/negativ	50

8 Literaturverzeichnis

Literatur

- [1] Giles J. Peek, Miranda Mugford, Ravindranath Tiruvoipati, Andrew Wilson, Elizabeth Allen, Mariamma M. Thalanany, Clare L. Hibbert, Ann Truesdale, Felicity Clemens, Nicola Cooper, Richard K. Firmin, and Diana Elbourne. Efficacy and economic assessment of conventional ventilatory support versus extracorporeal membrane oxygenation for severe adult respiratory failure (cesar): a multicentre randomised controlled trial. Lancet (London, England), 374(9698):1351–1363, 2009.
- [2] Laura W. Lund and William J. Federspiel. Removing extra co2 in copd patients. Current respiratory care reports, 2:131–138, 2013.
- [3] Wei Xia, Hongyang Xu, Wenjun Mao, and Jingyu Chen. Extracorporeal membrane oxygenation as a bridge to lung transplantation. Zhonghua wei zhong bing ji jiu yi xue, 30(12):1167–1172, 2018.

- [4] M. S. Zinter, B. D. Barrows, P. C. Ursell, K. Kowalek, K. Kalantar, N. Cambroner, J. L. DeRisi, P. Oishi, and C. C. Dvorak. Extracorporeal life support survival in a pediatric hematopoietic cellular transplant recipient with presumed gvhd-related fulminant myocarditis. Bone marrow transplantation, 52(9):1330–1333, 2017.
- [5] Hyungtae Kim, Sang-Hyun Lim, Joonhwa Hong, You-Sun Hong, Cheol Joo Lee, Joon-Ho Jung, and Saehwan Yu. Efficacy of veno-arterial extracorporeal membrane oxygenation in acute myocardial infarction with cardiogenic shock. Resuscitation, 83(8):971–975, 2012.
- [6] Paul Maggio, Mark Hemmila, Jonathan Haft, and Robert Bartlett. Extracorporeal life support for massive pulmonary embolism. The Journal of trauma, 62(3):570–576, 2007.
- [7] Christian A. Bermudez, Rodolfo V. Rocha, Yoshiya Toyoda, Diana Zaldonis, Penny L. Sappington, Suresh Mulukutla, Oscar C. Marroquin, Catalin Toma, Jay K. Bhama, and Robert L. Kormos. Extracorporeal membrane oxygenation for advanced refractory shock in acute and chronic cardiomyopathy. The Annals of thoracic surgery, 92(6):2125–2131, 2011.
- [8] George Makdisi and I-Wen Wang. Extra corporeal membrane oxygenation (ecmo) review of a lifesaving technology. Journal of thoracic disease, 7(7):E166–76, 2015.
- [9] Karla Lehle, Alois Philipp, Otto Gleich, Andreas Holzamer, Thomas Müller, Thomas Bein, and Christof Schmid. Efficiency in extracorporeal membrane oxygenation-cellular deposits on polymethylpentene membranes increase resistance to blood flow and reduce gas exchange capacity. ASAIO journal (American Society for Artificial Internal Organs : 1992), 54(6):612–617, 2008.
- [10] Karla Lehle, Alois Philipp, Thomas Müller, Frank Schettler, Thomas Bein, Christof Schmid, and Matthias Lubnow. Flow dynamics of different adult ecmo systems: a clinical evaluation. Artificial organs, 38(5):391–398, 2014.
- [11] Graeme MacLaren, Alain Combes, and Robert H. Bartlett. Contemporary extracorporeal membrane oxygenation for adult respiratory failure: life support in the new era. Intensive care medicine, 38(2):210–220, 2012.
- [12] Alain Combes, David Hajage, Gilles Capellier, Alexandre Demoule, Sylvain Lavoué, Christophe Guervilly, Daniel Da Silva, Lara Zafrani, Patrice Tirot, Benoit Veber, Eric Maury, Bruno Levy, Yves Cohen, Christian Richard, Pierre Kalfon, Lila Bouadma, Hossein Mehdaoui, Gaëtan Beduneau, Guillaume Lebreton, Laurent Brochard, Niall D. Ferguson, Eddy Fan, Arthur S. Slutsky, Daniel Brodie, and Alain Mercat. Extracorporeal membrane oxygenation for severe acute respiratory

- distress syndrome. The New England journal of medicine, 378(21):1965–1975, 2018.
- [13] Lorenzo Del Sorbo, Marcelo Cypel, and Eddy Fan. Extracorporeal life support for adults with severe acute respiratory failure. The Lancet. Respiratory medicine, 2(2):154–164, 2014.
- [14] Thomas V. Brogan, Laurance Lequier, Roberto Lorusso, Graeme MacLaren, and G. J. Peek. Extracorporeal life support: The ELSO red book. Extracorporeal Life Support Organization, Ann Arbor, Michigan, 5th edition edition, 2017.
- [15] Kevin R. Riggs, Lance B. Becker, and Jeremy Sugarman. Ethics in the use of extracorporeal cardiopulmonary resuscitation in adults. Resuscitation, 91:73–75, 2015.
- [16] Darryl C. Abrams, Kenneth Prager, Craig D. Blinderman, Kristin M. Burkart, and Daniel Brodie. Ethical dilemmas encountered with the use of extracorporeal membrane oxygenation in adults. Chest, 145(4):876–882, 2014.
- [17] Alois Philipp, Filip de Somer, Maik Foltan, Andre Bredthauer, Lars Krenkel, Florian Zeman, and Karla Lehle. Life span of different extracorporeal membrane systems for severe respiratory failure in the clinical practice. PloS one, 13(6):e0198392, 2018.
- [18] Jan O. Wenger. Ein neues miniaturisiertes System für die extrakorporale Membranoxygenierung beim akuten schweren Lungenversagen des Erwachsenen. Dissertation.
- [19] Simon Augustin, Alison Horton, Warwick Butt, Martin Bennett, and Stephen Horton. Centrifugal pump inlet pressure site affects measurement. Perfusion, 25(5):313–320, 2010.
- [20] Thomas Müller, Thomas Bein, Alois Philipp, Bernhard Graf, Christof Schmid, and Günter Riegger. Extracorporeal pulmonary support in severe pulmonary failure in adults: a treatment rediscovered. Deutsches Arzteblatt international, 110(10):159–166, 2013.
- [21] Karla Lehle, Alois Philipp, Florian Zeman, Dirk Lunz, Matthias Lubnow, Hans-Peter Wendel, Laszlo Göbölös, Christof Schmid, and Thomas Müller. Technical-induced hemolysis in patients with respiratory failure supported with veno-venous ecmo - prevalence and risk factors. PloS one, 10(11):e0143527, 2015.
- [22] Thomas A. Horbett. Principles underlying the role of adsorbed plasma proteins in blood interactions with foreign materials. Cardiovasc Pathol, (2):137–148, 1993.

- [23] Marbod Weber, Heidrun Steinle, Sonia Golombek, Ludmilla Hann, Christian Schlensak, Hans P. Wendel, and Meltem Avci-Adali. Blood-contacting biomaterials: In vitro evaluation of the hemocompatibility. Frontiers in bioengineering and biotechnology, 6:99, 2018.
- [24] Angela Paul, Andreas Straub, Norbert Weber, Gerhard Ziemer, and Hans Peter Wendel. Cd41 western blotting: a new method to detect platelet adhesion to artificial surfaces used in extracorporeal circulation procedures. Journal of materials science. Materials in medicine, 20(1):373–378, 2009.
- [25] Maud B. Gorbet and Michael V. Sefton. Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. Biomaterials, 25(26):5681–5703, 2004.
- [26] Y. Niimi, F. Ichinose, Y. Ishiguro, K. Terui, S. Uezono, S. Morita, and S. Yamane. The effects of heparin coating of oxygenator fibers on platelet adhesion and protein adsorption. Anesthesia and analgesia, 89(3):573–579, 1999.
- [27] Henri H. Versteeg, Johan W. M. Heemskerk, Marcel Levi, and Pieter H. Reitsma. New fundamentals in hemostasis. Physiological reviews, 93(1):327–358, 2013.
- [28] Peter N. Walsh. Platelet coagulation-protein interactions. Seminars in thrombosis and hemostasis, 30(4):461–471, 2004.
- [29] F. A. Ofofu. The blood platelet as a model for regulating blood coagulation on cell surfaces and its consequences. Biochemistry. Biokhimiia, 67(1):47–55, 2002.
- [30] Johannes Kalbhenn, Rene Schmidt, Lea Nakamura, Johannes Schelling, Simone Rosenfelder, and Barbara Zieger. Early diagnosis of acquired von willebrand syndrome (avws) is elementary for clinical practice in patients treated with ECMO therapy. Journal of atherosclerosis and thrombosis, 22(3):265–271, 2015.
- [31] Helmuth Tauber, Helmut Ott, Werner Streif, Guenter Weigel, Lorin Loacker, Josef Fritz, Anneliese Heinz, and Corinna Velik-Salchner. Extracorporeal membrane oxygenation induces short-term loss of high-molecular-weight von willebrand factor multimers. Anesthesia and analgesia, 120(4):730–736, 2015.
- [32] Michael Mazzeffi, Shaheer Hasan, Ezeldeen Abuelkasem, Michael Meyer, Kristopher Deatrick, Bradley Taylor, Zachary Kon, Daniel Herr, and Kenichi Tanaka. Von willebrand factor-gp1ba interactions in venoarterial extracorporeal membrane oxygenation patients. Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia, 33(8):2125–2132, 2019.

- [33] John C. Chapin and Katherine A. Hajjar. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. Blood reviews, 29(1):17–24, 2015.
- [34] P. J. Lenting, C. Casari, O. D. Christophe, and C. V. Denis. von willebrand factor: the old, the new and the unknown. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH, 10(12):2428–2437, 2012.
- [35] Z. M. Ruggeri and J. Ware. von willebrand factor. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 7(2):308–316, 1993.
- [36] Peter J. Lenting, Olivier D. Christophe, and Cécile V. Denis. von willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: connecting the far ends. Blood, 125(13):2019–2028, 2015.
- [37] E. R. WEIBEL and G. E. PALADE. New cytoplasmic components in arterial endothelia. The Journal of cell biology, 23:101–112, 1964.
- [38] D. D. Wagner, J. B. Olmsted, and V. J. Marder. Immunolocalization of von willebrand protein in weibel-palade bodies of human endothelial cells. The Journal of cell biology, 95(1):355–360, 1982.
- [39] W. L. Nichols, M. B. Hultin, A. H. James, M. J. Manco-Johnson, R. R. Montgomery, T. L. Ortel, M. E. Rick, J. E. Sadler, M. Weinstein, and B. P. Yawn. von willebrand disease (vwd): evidence-based diagnosis and management guidelines, the national heart, lung, and blood institute (nhlbi) expert panel report (usa). Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia, 14(2):171–232, 2008.
- [40] S. Kanaji, S. A. Fahs, Q. Shi, S. L. Haberichter, and R. R. Montgomery. Contribution of platelet vs. endothelial vwf to platelet adhesion and hemostasis. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH, 10(8):1646–1652, 2012.
- [41] Janina Jamasbi, Keng Ayabe, Shinya Goto, Bernhard Nieswandt, Karlheinz Peter, and Wolfgang Siess. Platelet receptors as therapeutic targets: Past, present and future. Thrombosis and haemostasis, 117(7):1249–1257, 2017.
- [42] Michaela Finsterbusch, Waltraud C. Schrottmaier, Julia B. Kral-Pointner, Manuel Salzmann, and Alice Assinger. Measuring and interpreting platelet-leukocyte aggregates. Platelets, pages 1–9, 2018.
- [43] Aubrey Bernardo, Chalmette Ball, Leticia Nolasco, Joel F. Moake, and Jing-fei Dong. Effects of inflammatory cytokines on the release and cleavage of the endothelial cell-derived ultralarge von willebrand factor multimers under flow. Blood, 104(1):100–106, 2004.

- [44] Alberto Zangrillo, Giovanni Landoni, Giuseppe Biondi-Zoccai, Massimiliano Greco, Teresa Greco, Giacomo Frati, Nicolò Patroniti, Massimo Antonelli, Antonio Pesi, and Federico Pappalardo. A meta-analysis of complications and mortality of extracorporeal membrane oxygenation. Critical care and resuscitation : journal of the Australasian Academy of Critical Care Medicine, 15(3):172–178, 2013.
- [45] Jonathan E. Millar, Jonathon P. Fanning, Charles I. McDonald, Daniel F. McAuley, and John F. Fraser. The inflammatory response to extracorporeal membrane oxygenation (ecmo): a review of the pathophysiology. Critical care (London, England), 20(1):387, 2016.
- [46] B. A. Herbig and S. L. Diamond. Pathological von willebrand factor fibers resist tissue plasminogen activator and adamts13 while promoting the contact pathway and shear-induced platelet activation. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH, 13(9):1699–1708, 2015.
- [47] Alexej Barg, Rainer Ossig, Tobias Goerge, Matthias Schneider, Hermann Schillers, Hans Oberleithner, and Stefan Schneider. Soluble plasma-derived von willebrand factor assembles to a haemostatically active filamentous network. Thrombosis and Haemostasis, 97(04):514–526, 2017.
- [48] Thomas V. Colace and Scott L. Diamond. Direct observation of von willebrand factor elongation and fiber formation on collagen during acute whole blood exposure to pathological flow. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 33(1):105–113, 2013.
- [49] Shu Zhu, Bradley A. Herbig, Ruizhi Li, Thomas V. Colace, Ryan W. Muthard, Keith B. Neeves, and Scott L. Diamond. In microfluidico: Recreating in vivo hemodynamics using miniaturized devices. Biorheology, 52(5-6):303–318, 2015.
- [50] Shobhit Gogia and Sriram Neelamegham. Role of fluid shear stress in regulating vwf structure, function and related blood disorders. Biorheology, 52(5-6):319–335, 2015.
- [51] Harish Shankaran, Paschalis Alexandridis, and Sriram Neelamegham. Aspects of hydrodynamic shear regulating shear-induced platelet activation and self-association of von willebrand factor in suspension. Blood, 101(7):2637–2645, 2003.
- [52] Svenja Lippok, Matthias Radtke, Tobias Obser, Lars Kleemeier, Reinhard Schneppenheim, Ulrich Budde, Roland R. Netz, and Joachim O. Rädler. Shear-induced unfolding and enzymatic cleavage of full-length vwf multimers. Biophysical journal, 110(3):545–554, 2016.

- [53] Hiroki Kamada, Yohsuke Imai, Masanori Nakamura, Takuji Ishikawa, and Takami Yamaguchi. Shear-induced platelet aggregation and distribution of thrombogenesis at stenotic vessels. Microcirculation (New York, N.Y. : 1994), 24(4), 2017.
- [54] Christian Dornia, Alois Philipp, Stefan Bauer, Matthias Lubnow, Thomas Müller, Karla Lehle, Christof Schmid, René Müller-Wille, Philipp Wiggermann, Christian Stroszczynski, and Andreas G. Schreyer. Analysis of thrombotic deposits in extracorporeal membrane oxygenators by multidetector computed tomography. ASAIO journal (American Society for Artificial Internal Organs : 1992), 60(6):652–656, 2014.
- [55] Victor Babich, Laura Knipe, Lindsay Hewlett, Athinoula Meli, John Dempster, Matthew J. Hannah, and Tom Carter. Differential effect of extracellular acidosis on the release and dispersal of soluble and membrane proteins secreted from the weibel-palade body. The Journal of biological chemistry, 284(18):12459–12468, 2009.
- [56] M. Erent, A. Meli, N. Moiso, V. Babich, M. J. Hannah, P. Skehel, L. Knipe, G. Zupancic, D. Ogden, and T. Carter. Rate, extent and concentration dependence of histamine-evoked weibel-palade body exocytosis determined from individual fusion events in human endothelial cells. The Journal of physiology, 583(Pt 1):195–212, 2007.
- [57] Volker Huck, Matthias F. Schneider, Christian Gorzelanny, and Stefan W. Schneider. The various states of von willebrand factor and their function in physiology and pathophysiology. Thrombosis and haemostasis, 111(4):598–609, 2014.
- [58] Virginie Terraube, Isabelle Marx, and Cécile V. Denis. Role of von willebrand factor in tumor metastasis. Thrombosis research, 120 Suppl 2:S64–70, 2007.
- [59] Teresa A. Doggett, Gaurav Girdhar, Avril Lawshé, David W. Schmidtke, Ian J. Laurenzi, Scott L. Diamond, and Thomas G. Diacovo. Selectin-like kinetics and biomechanics promote rapid platelet adhesion in flow: the gpib(alpha)-vwf tether bond. Biophysical journal, 83(1):194–205, 2002.
- [60] David Lillicrap. von willebrand disease: advances in pathogenetic understanding, diagnosis, and therapy. Blood, 122(23):3735–3740, 2013.
- [61] B. Savage, E. Saldívar, and Z. M. Ruggeri. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von willebrand factor. Cell, 84(2):289–297, 1996.
- [62] Minyun Zhou, Xianchi Dong, Carsten Baldauf, Hua Chen, Yanfeng Zhou, Timothy A. Springer, Xinping Luo, Chen Zhong, Frauke Gräter, and Jianping Ding. A

- novel calcium-binding site of von willebrand factor a2 domain regulates its cleavage by adamts13. Blood, 117(17):4623–4631, 2011.
- [63] Qing Zhang, Yan-Feng Zhou, Cheng-Zhong Zhang, Xiaohui Zhang, Chafen Lu, and Timothy A. Springer. Structural specializations of a2, a force-sensing domain in the ultralarge vascular protein von willebrand factor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106(23):9226–9231, 2009.
- [64] Christopher J. Lynch, David A. Lane, and Brenda M. Luken. Control of vwf a2 domain stability and adamts13 access to the scissile bond of full-length vwf. Blood, 123(16):2585–2592, 2014.
- [65] Jing Huang, Robyn Roth, John E. Heuser, and J. Evan Sadler. Integrin alpha(v)beta(3) on human endothelial cells binds von willebrand factor strings under fluid shear stress. Blood, 113(7):1589–1597, 2009.
- [66] S. W. Schneider, S. Nuschele, A. Wixforth, C. Gorzelanny, A. Alexander-Katz, R. R. Netz, and M. F. Schneider. Shear-induced unfolding triggers adhesion of von willebrand factor fibers. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104(19):7899–7903, 2007.
- [67] Hailong Yuan, Ning Deng, Songmei Zhang, Yange Cao, Qiong Wang, Xin Liu, and Qing Zhang. The unfolded von willebrand factor response in bloodstream: the self-association perspective. Journal of hematology & oncology, 5:65, 2012.
- [68] C. Casari, P. J. Lenting, N. Wohner, O. D. Christophe, and C. V. Denis. Clearance of von willebrand factor. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH, 11 Suppl 1:202–211, 2013.
- [69] Julius Wilm. Charakterisierung zellulärer Ablagerungen auf Polymethylpenten-Gaskapillaren nach extrakorporaler Membranoxygenierung bei akutem Lungen- oder Herzversagen. Dissertation.
- [70] Lauren D. C. Casa and David N. Ku. Thrombus formation at high shear rates. Annual review of biomedical engineering, 19:415–433, 2017.
- [71] X. M. Mueller, B. Marty, H. T. Tevaearai, P. Tozzi, D. Jegger, and L. K. von Segesser. A siliconized hollow fiber membrane oxygenator. ASAIO journal (American Society for Artificial Internal Organs : 1992), 46(1):38–41, 2000.
- [72] J. E. Sadler. Biochemistry and genetics of von willebrand factor. Annual review of biochemistry, 67:395–424, 1998.

- [73] Julius Wilm, Alois Philipp, Thomas Müller, Andre Bredthauer, Otto Gleich, Christof Schmid, and Karla Lehle. Leukocyte adhesion as an indicator of oxygenator thrombosis during extracorporeal membrane oxygenation therapy? ASAIO journal (American Society for Artificial Internal Organs : 1992), 64(1):24–30, 2018.
- [74] Imke C. A. Munnix, Cosemans, Judith M E M, Jocelyn M. Auger, and Johan W. M. Heemskerk. Platelet response heterogeneity in thrombus formation. Thrombosis and haemostasis, 102(6):1149–1156, 2009.
- [75] Alexej Barg, Rainer Ossig, Tobias Goerge, Matthias F. Schneider, Hermann Schillers, Hans Oberleithner, and Stefan W. Schneider. Soluble plasma-derived von willebrand factor assembles to a haemostatically active filamentous network. Thrombosis and haemostasis, 97(4):514–526, 2007.
- [76] L. C. Hsu. Heparin-coated cardiopulmonary bypass circuits: current status. Perfusion, 16(5):417–428, 2001.
- [77] Anja K. Zimmermann, Norbert Weber, Hermann Aebert, Gerhard Ziemer, and Hans P. Wendel. Effect of biopassive and bioactive surface-coatings on the hemocompatibility of membrane oxygenators. Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials, 80(2):433–439, 2007.
- [78] William C. Oliver. Anticoagulation and coagulation management for ECMO. Seminars in cardiothoracic and vascular anesthesia, 13(3):154–175, 2009.
- [79] Annika Ferkau, Silke Ecklebe, Kira Jahn, Simone Calmer, Gregor Theilmeier, and Reinhard Mischke. A dynamic flow-chamber-based adhesion assay to assess canine platelet-matrix interactions in vitro. Veterinary clinical pathology, 42(2):150–156, 2013.
- [80] Eunseop Yeom, Hye Mi Kim, Jun Hong Park, Woorak Choi, Junsang Doh, and Sang Joon Lee. Microfluidic system for monitoring temporal variations of hemorheological properties and platelet adhesion in Ips-injected rats. Scientific reports, 7(1):1801, 2017.
- [81] Masaaki Doi, Mitsuhiro Sugimoto, Hideto Matsui, Yasunori Matsunari, and Midori Shima. Coagulation potential of immobilised factor VIII in flow-dependent fibrin generation on platelet surfaces. Thrombosis and haemostasis, 110(2):316–322, 2013.
- [82] Kira Jahn, Klaudiusz Suchodolski, Andreas Schäfer, Bianca Sahlmann, Uwe Küster, Frank Echtermeyer, Simone Calmer, Gregor Theilmeier, and Kai Johanning.

- Effect of clopidogrel on thrombus formation in an ex vivo parallel plate flow chamber model cannot be reversed by addition of platelet concentrates or vwf concentrate. Anesthesia and analgesia, 124(4):1091–1098, 2017.
- [83] Lukas Goertz, Stefan Werner Schneider, Anna Desch, Frank Thomas Mayer, Julian Koett, Kai Nowak, Ioannis Karampinis, Michael K. Bohlmann, Viktor Umansky, and Alexander Thomas Bauer. Heparins that block vegf-a-mediated von willebrand factor fiber generation are potent inhibitors of hematogenous but not lymphatic metastasis. Oncotarget, 7(42):68527–68545, 2016.
- [84] Wei-Bor Tsai, John M. Grunkemeier, Clive D. McFarland, and Thomas A. Horbett. Platelet adhesion to polystyrene-based surfaces preadsorbed with plasmas selectively depleted in fibrinogen, fibronectin, vitronectin, or von willebrand's factor. Journal of biomedical materials research, 60(3):348–359, 2002.
- [85] Claudia Heilmann, Ulrich Geisen, Friedhelm Beyersdorf, Lea Nakamura, Christoph Benk, Georg Trummer, Michael Berchtold-Herz, Christian Schlensak, and Barbara Zieger. Acquired von willebrand syndrome in patients with extracorporeal life support (ecls). Intensive care medicine, 38(1):62–68, 2012.
- [86] Johannes Kalbhenn, Axel Schlagenhaut, Simone Rosenfelder, Axel Schmutz, and Barbara Zieger. Acquired von willebrand syndrome and impaired platelet function during venovenous extracorporeal membrane oxygenation: Rapid onset and fast recovery. The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation, 2018.
- [87] M. V. Malfertheiner, L. P. Pimenta, V. von Bahr, J. E. Millar, N. G. Obonyo, J. Y. Suen, V. Pellegrino, and J. F. Fraser. Acquired von willebrand syndrome in respiratory extracorporeal life support: a systematic review of the literature. Critical care and resuscitation : journal of the Australasian Academy of Critical Care Medicine, 19(Suppl 1):45–52, 2017.
- [88] Tao Wu, Jiangguo Lin, Miguel A. Cruz, Jing-fei Dong, and Cheng Zhu. Force-induced cleavage of single vwfa1a2a3 tridomains by adamts-13. Blood, 115(2):370–378, 2010.
- [89] Y. Ikeda, M. Handa, K. Kawano, T. Kamata, M. Murata, Y. Araki, H. Anbo, Y. Kawai, K. Watanabe, and I. Itagaki. The role of von willebrand factor and fibrinogen in platelet aggregation under varying shear stress. The Journal of clinical investigation, 87(4):1234–1240, 1991.
- [90] L. A. Sporn, V. J. Marder, and D. D. Wagner. Inducible secretion of large, biologically potent von willebrand factor multimers. Cell, 46(2):185–190, 1986.

- [91] Bettina Wiegmann, Heide von Seggern, Klaus Höffler, Sotirios Korossis, Daniele Dipresa, Michael Pflaum, Sabrina Schmeckeber, Jörg Seume, and Axel Have-rich. Developing a biohybrid lung - sufficient endothelialization of poly-4-methyl-1-pentene gas exchange hollow-fiber membranes. Journal of the mechanical behavior of biomedical materials, 60:301–311, 2016.
- [92] Lars Esmann, Christian Idel, Arup Sarkar, Lars Hellberg, Martina Behnen, Sonja Möller, Ger van Zandbergen, Matthias Klinger, Jörg Köhl, Uta Bussmeyer, Werner Solbach, and Tamás Laskay. Phagocytosis of apoptotic cells by neutrophil granulocytes: diminished proinflammatory neutrophil functions in the presence of apoptotic cells. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 184(1):391–400, 2010.
- [93] A. Trummer, B. Haarmeijer, S. Werwitzke, C. Wermes, A. Ganser, U. Budde, and A. Tiede. Increased amounts of von willebrand factor are bound to microparticles after infusion of desmopressin. Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia, 19(2):236–241, 2013.
- [94] Minoos Shahidi. Thrombosis and von willebrand factor. Advances in experimental medicine and biology, 906:285–306, 2017.
- [95] Norma Maugeri, Patrizia Rovere-Querini, Virgilio Evangelista, Cesare Covino, Annalisa Capobianco, Maria T. S. Bertilaccio, Antonio Piccoli, Licia Totani, Domenico Cianflone, Attilio Maseri, and Angelo A. Manfredi. Neutrophils phagocytose activated platelets in vivo: a phosphatidylserine, p-selectin, and beta2 integrin-dependent cell clearance program. Blood, 113(21):5254–5265, 2009.
- [96] Norma Maugeri, Simona Malato, Eti A. Femia, Mariateresa Pugliano, Lara Campana, Francesca Lunghi, Patrizia Rovere-Querini, Federico Lussana, Gianmarco Podda, Marco Cattaneo, Fabio Ciceri, and Angelo A. Manfredi. Clearance of circulating activated platelets in polycythemia vera and essential thrombocythemia. Blood, 118(12):3359–3366, 2011.
- [97] N. Maugeri, L. Campana, M. Gavina, C. Covino, M. de Metrio, C. Panciroli, L. Maiuri, A. Maseri, A. D'Angelo, M. E. Bianchi, P. Rovere-Querini, and A. A. Manfredi. Activated platelets present high mobility group box 1 to neutrophils, inducing autophagy and promoting the extrusion of neutrophil extracellular traps. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH, 12(12):2074–2088, 2014.
- [98] Marc R. Barnard, Lori A. Krueger, A. L. Frelinger, Mark I. Furman, and Alan D. Michelson. Whole blood analysis of leukocyte-platelet aggregates. Current protocols in cytometry, Chapter 6:Unit 6.15, 2003.

- [99] Rodger P. McEver. P-selectin/psgl-1 and other interactions between platelets, leukocytes, and endothelium. In Alan D. Michelson, editor, Platelets, pages 231–249. Academic Press/Elsevier, Amsterdam and Boston, 2007.

Danksagung

Zuallererst bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Christof Schmid für die Möglichkeit meine Promotion in seiner Klinik für Herz-, Thorax- und herznahe Gefäßchirurgie erarbeiten zu können und meinen Platz im Team der Herz-Thorax-Chirurgie zu finden.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Karla Lehle für die intensive Betreuung meiner Arbeit, die Vermittlung von wertvollen Fähigkeiten und Kenntnissen des wissenschaftlichen Arbeitens und ein kollegiales Miteinander.

Frau Katrin Bielenberg möchte ich für die Unterstützung und Anleitung bei Methodik und Durchführung, sowie für die Vermittlung praktischer Kenntnisse danken.

Außerdem geht mein Dank an Herrn Prof. Dr.-Ing. Lars Krenkel und Herrn Clemens Birkenmaier der Fakultät Maschinenbau an der Ostbayerischen Technischen Hochschule Regensburg für die erfolgreiche Zusammenarbeit und die Erlaubnis Bildmaterial aus den Simulationen in dieser Arbeit verwenden zu dürfen.

Herr Dr. rer. nat. Michael Gruber stellte den Kontakt zur Herz-, Thorax- und herznahen Gefäßchirurgie her und hat mir so diese Dissertation ermöglicht. Er war mir immer ein Mentor und mentale Stütze und dafür danke ich ihm von ganzem Herzen.

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 Vermittlungs- 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.

Tamara Rebecca Steiger
Regensburg, August 2019