

Aus dem Lehrstuhl für Herz-, Thorax- und
herznahe Gefäßchirurgie
Prof. Dr. med. Christof Schmid
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

Untersuchungen zur strömungsinduzierten
Thrombusbildung an einer Polymethylpenten-Gasfaser in
einem *ex vivo*-Perfusionsmodell

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

**der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg**

**vorgelegt von
Annika Martina Elisabeth Spychalski**

2023

Aus dem Lehrstuhl für Herz-, Thorax- und
herznahe Gefäßchirurgie
Prof. Dr. med. Christof Schmid
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

Untersuchungen zur strömungsinduzierten
Thrombusbildung an einer Polymethylpenten-Gasfaser in
einem *ex vivo*-Perfusionsmodell

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

**der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg**

**vorgelegt von
Annika Martina Elisabeth Spychalski**

2023

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Karla Lehle
2. Berichterstatter: PD Dr. Martin Kieninger
Datum der mündlichen Prüfung: 23.05.2023

Inhalt

1	Einleitung	8
1.1	Problematik	8
1.1.1	Technische Komplikationen der ECMO-Behandlung	9
1.1.2	Fremdmaterialassoziierte Problematiken der ECMO-Behandlung	10
1.1.2.1	Gerinnungsspezifische Fremdmaterialreaktionen	10
1.1.2.2	Zelluläre Fremdmaterialreaktionen	12
1.2	Strömungsmechanische Hintergründe	12
1.2.1	Laminare und turbulente Strömung	13
1.2.2	Scherrate und Schubspannung	13
1.3	Die Rolle des vWF bei der strömungsinduzierten Thrombenbildung	14
1.4	Mikropartikel	16
1.5	Die Bedeutung von <i>ex vivo</i> -Modellen	18
1.6	Studienplan	20
2	Material und Methoden	21
2.1	Definition und Differenzierung der für Aggregate verwendeten Begrifflichkeiten	21
2.2	Ethische Aspekte bezüglich Proband:innenproben	21
2.3	Aufbau und Vorbereitung des Perfusionsmodells	22
2.3.1	Modifizierung der <i>Ibidi-Slides</i>	22
2.3.2	Aufbau	22
2.3.3	Priming des Systems	26
2.3.4	Temperaturoptimierung	26
2.3.4.1	Konstruktion einer Wärmekammer	26
2.3.4.2	Isolation des Schlauchsystems	27
2.3.4.3	Temperaturmessungen an einzelnen Modellkomponenten	28
2.3.5	Kalibrierung des Flusssensors	28
2.4	Vorbereitung von Proband:innenmaterial für Versuche mit Blutplasma	28
2.4.1	Plasmaherstellung	29
2.4.1.1	Gewinnung von PFP aus Vollblut	30
2.4.1.2	Zytospinanalyse der Plasmaproben	30
2.4.1.3	Durchflusszytometrische Analyse der Plasmaproben	31

2.4.2	Probenfiltrierung nach erfolgter Zentrifugation	31
2.5	Untersuchungen zur Klottbildung mit Plasma am ECMO-Modell	31
2.5.1	Druckabhängige Untersuchungen mit PFP	31
2.5.1.1	Untersuchungen bei variablem Pumpendruck	32
2.5.1.2	Untersuchungen bei konstantem Pumpendruck	32
2.5.2	Wirksamkeit verschiedener Antikoagulanzen unter Flussbedingungen ..	32
2.5.2.1	Untersuchung einer zusätzlichen Heparinisierung von bereits antikoaguliertem Plasma	32
2.5.2.2	Untersuchung des Einflusses einer Heparinspülung des Systems auf das Flussverhalten von doppelt Heparin-antikoaguliertem Plasma.....	33
2.5.3	Untersuchung des Klots	33
2.5.3.1	Histologische Untersuchung der Klots nach Perfusion.....	33
2.5.3.2	Klotaufschluss mit Gewebeplasminogenaktivator (<i>tissue plasminogen activator</i> , tPA) und Trypsin	33
2.5.4	Untersuchungen zum Einfluss von Oberflächenbeschaffenheit und Strömungsphysiologie im Perfusionssystem.....	34
2.5.4.1	Einfluss der Materialbeschaffenheit des Systems	34
2.5.4.2	Einfluss des Ibidi- <i>Slides</i>	34
2.5.4.3	Einfluss der Luer-Konnektoren	35
2.5.5	Untersuchung des pH-Wertes als Einflussfaktor auf die Klottbildung	35
2.6	Untersuchungen zur Klottbildung am ECMO-Modell mit Serum.....	35
2.6.1	Vorbereitung von Probenmaterial für Versuche mit Blutserum.....	36
2.6.2	Versuchsdurchführung mit Serum	36
2.6.2.1	Untersuchungen bei variablem Pumpendruck ohne Zugabe weiterer Faktoren	36
2.6.2.2	Untersuchungen bei variablem Pumpendruck unter Zugabe von vWF ..	37
2.6.2.3	Untersuchungen bei konstantem Pumpendruck unter Zugabe von vWF	37
2.7	Perfusionsversuch mit Albumin	37
3	Ergebnisse	38
3.1	Allgemeiner Überblick.....	38
3.2	Effekte der Optimierungsmaßnahmen am Perfusionsmodell	41
3.2.1	Einfluss der Verwendung einer Wärmekammer auf die Temperatur des Mediums.....	41
3.2.2	Effekte der Isolation des Schlauchsystems bei verschiedenen Pumpendrücken	42

3.2.3	Ermittlung eines Umrechnungsfaktors für verschiedenen Medien durch Kalibrierung des Flusssensors.....	43
3.3	Ergebnisse der Versuche zur Plasmavorbereitung und –herstellung	44
3.3.1	Untersuchung von PPP auf Fraktionierung.....	44
3.3.2	Auswertung und Vergleich verschiedener Protokolle zur Plasmaherstellung mittels Durchflusszytometrie und Histologie	44
3.3.3	Vergleich der Perfusion mit filtriertem Plasma mit der Perfusion mit nativem Plasma.....	55
3.4	Plasmaversuche	56
3.4.1	Phasenkontrastmikroskopische Darstellung einer Klotbildung bei Perfusion mit PFP bei variablem Pumpendruck.....	56
3.4.2	Phasenkontrastmikroskopische Darstellung einer Klotbildung bei Perfusion mit PFP bei konstantem Pumpendruck.....	58
3.4.3	Effekte verschiedener Antikoagulanzen auf die Klotbildung	60
3.4.4	Klotbildung bei der Perfusion nach einer zusätzlichen Heparinisierung von bereits mit Heparin antikoaguliertem Plasma	60
3.4.5	Klotbildung bei einer Heparinspülung des Systems und der Verwendung von doppelt Heparin-antikoaguliertem Plasma.....	61
3.4.6	Untersuchung eines ausgefallenen Klots.....	61
3.4.6.1	Untersuchung der Klotzusammensetzung mittels Immunfluoreszenz	61
3.4.6.2	Ergebnisse des Klotauflusses mit tPA und Trypsin	64
3.4.7	Die Materialbeschaffenheit des Systems als Einflussfaktor auf die Klotbildung	64
3.4.7.1	Klotbildung im Standversuch mit einzelnen Modellkomponenten.....	64
3.4.7.2	Klotbildung bei der Perfusion ohne Strömungskammer	65
3.4.7.3	Strömungsmechanische Evaluation eines Eckkonnektors und Vergleich der Perfusion mit geraden Luer-Konnektoren	65
3.4.8	pH-Wertänderungen als Einflussfaktor auf die Klotbildung	67
3.5	Serumversuche	68
3.5.1	Phasenkontrastmikroskopische Darstellung einer Klotbildung bei Perfusion mit Proband:innen- und Humanserum bei variablem Pumpendruck	68
3.5.2	Fluoreszenzmikroskopische Darstellung einer Klotbildung bei Perfusion mit Proband:innenserum bei konstanten Pumpendrücken	69
3.5.3	VWF-Fadenbildung bei der Perfusion mit Proband:innen- und Humanserum.....	70
3.6	Albuminversuche	73

3.6.1	Klotbildung bei der Perfusion mit Albumin bei 5mbar und 100mbar	73
3.6.2	Fluoreszenzmikroskopischer Albumin-Antikörpernachweis bei der Perfusion mit Serum	74
4	Diskussion	74
4.1	Bedeutung eines <i>ex vivo</i> -Perfusionsmodells	75
4.2	Thrombogene Mikropartikel als mögliche Auslöser für die Klotbildung im Perfusionsmodell	79
4.3	Strömungsmechanische Aspekte der Klotbildung in Plasma	82
4.4	Ausbildung von vWF-Fäden in Serum	86
5	Zusammenfassung	88
6	Ausblick	89
7	Anhang	90
7.1	Materialien	90
7.1.1	Geräte	90
7.1.2	Software	92
7.1.3	Chemikalien	92
7.1.4	Sonstige Materialien	93
7.2	Protokolle zur Vorbereitung	93
7.2.1	Protokoll zur Präparatvorbereitung im Rahmen der Zytospinanalyse	93
7.2.2	Protokoll zur Probenvorbereitung im Rahmen der durchflusszytometrischen Analyse	94
7.2.3	Protokoll zur Präparatvorbereitung im Rahmen einer histologischen Klotanalyse nach Perfusion	95
7.3	Einverständniserklärung zur Verwendung von Bildmaterial	97
7.4	Abbildungsverzeichnis	98
7.5	Diagrammverzeichnis	103
7.6	Formelverzeichnis	104
7.7	Tabellenverzeichnis	104
7.8	Literaturverzeichnis	105
8	Danksagung	113

Abkürzungsverzeichnis

ADAMTS-13	<i>a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin-1-like domains 13</i>
AVWS	<i>Acquired von-Willebrand Syndrome</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT	Computertomographie
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ECMO	extrakorporale Membranoxygenierung
FFP	<i>fresh frozen plasma</i>
FVIII	Blutgerinnungsfaktor VIII
IQR	<i>interquartile range</i>
PBS/BSA	phosphatgepufferter Salzlösung
PFP	<i>platelet free plasma</i>
PMP	<i>platelet microparticles</i>
PPP	<i>platelet poor plasma</i>
PRP	<i>platelet rich plasma</i>
RT	Raumtemperatur
TBS	<i>TRIS-buffered saline</i>
TLR4	TOLL-like Rezeptor 4
tPA	<i>tissue plasminogen activator</i>
UKR	Universitätsklinikum Regensburg
ULvWF	<i>Ultra-Large-von-Willebrand-Faktor-Multimers</i>
VA ECMO	venoarterielle extrakorporale Membranoxygenierung
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
VV ECMO	venösenöse extrakorporale Membranoxygenierung
vWF	von-Willebrand-Faktor

1 Einleitung

1.1 Problematik

Die extrakorporale Membranoxygenierung (ECMO) beschreibt das Verfahren der Sauerstoffanreicherung von und Kohlendioxideliminierung aus Patient:innenblut unter Verwendung einer künstlichen Lunge (Polymethylpenten-Gasfasermembranen) und von Blutpumpen. Der so erreichte Gasaustausch soll Herz- und/oder Lunge entlasten, bzw. deren Funktion ersetzen. Das Verfahren wird in der Intensivmedizin eingesetzt.

Je nachdem, ob ein kardiales oder pulmonales Versorgungsproblem im Vordergrund steht, kann die ECMO-Unterstützung venoarteriell (VA ECMO) oder venovenös (VV ECMO) erfolgen (1). Die VV ECMO wird auch als „respiratorische“ ECMO bezeichnet. Sie kommt bei pulmonalem Versagen zum Einsatz. Auf die Anwendung einer VA-ECMO wird bei einer kombinierten kardio-pulmonalen Problematik, sowie bei einer Rechtsherzinsuffizienz mit oder ohne kardiale Beteiligung zurückgegriffen (2).

Jedes ECMO-System setzt sich aus einem Pumpsystem, einem Schlauchsystem, einem Membranoxygenator und zwei Kanülen für die Drainage und Rückführung des Blutes zusammen (3).

Diese extrakorporalen Pumpsysteme arbeiten mit einem nicht-pulsatilen Pumpvorgang, bei welchem das Blut durch integrierte Transportpumpen bewegt wird. Neonatologische Systeme werden meist mit Rollerpumpen betrieben, bei adulten Patient:innen kommen Zentrifugalpumpen zum Einsatz (4). Membranoxygenatoren aus Polymethylpenten bestehen aus aneinandergelegten Gaskapillaren. Abhängig vom Hersteller liegen die Gaskapillaren in verschiedenen Winkeln zueinander (5,6). Die Polymethylpenten-Fasern werden zusätzlich in Polycarbonat und Polymethylenmethacrylat-Matten eingebettet, um die Form der Gaskapillaren zu erhalten (7). Für die Oxygenatoren von *Maquet* und *Novalung* werden die wie oben beschrieben entstandenen Matten übereinander gelegt. Bei den Oxygenatoren von *Medos* dagegen werden die Matten aufgewickelt. Zusätzlich werden häufig Wärmeaustauscher verbaut (5,6).

Das Atemgas gelangt bei Verwendung der Membranoxygenatoren in die Gaskapillaren, während diese vom Blut der Patientin bzw. des Patienten umströmt werden (5,6). Hier kommt es zum Gasaustausch, der durch Diffusion getrieben ist.

Die für Drainage und Rückführung benötigten Kanülen werden, abhängig vom ECMO-Verfahren, in ein geeignetes, ausreichend großlumiges Gefäß gelegt. Im Falle der VA ECMO werden meist *A. und V. femoralis* gewählt (1). Im Falle einer VV ECMO wird eine Drainage aus der *V. femoralis* und eine Rückführung in die rechte *V. jugularis externa* bevorzugt (1,4).

1.1.1 Technische Komplikationen der ECMO-Behandlung

Trotz Optimierung der ECMO-Systeme (z. B. Verwendung von Zentrifugalpumpen, antithrombogene Beschichtungen (Heparin, Phosphorylcholin), Doppellumen-Kanülen), bleibt die Komplikationsrate hoch (8).

Als ECMO-spezifische Komplikationen wurden von Seiten des ECMO-Zentrums des Universitätsklinikums Regensburg (UKR) sowohl *Clotting*, als auch Blutungen beschrieben. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind ungeklärt, zumal die Komplikationen nicht bei jeder ECMO-Anwendung auftreten.

Insbesondere thrombotische Ablagerungen stellen ein bisher nur unzureichend geklärtes Problem dar. In einem Patient:innenkollektiv von 265 Patient:innen, die eine VV ECMO am UKR erhielten, mussten 83 (31%) der Patient:innen sukzessiv mit mehr als einem System versorgt werden (8). 29 (78%) der akut notwendigen Systemwechsel (n = 37) waren auf spontane Thrombenbildung zurückzuführen. Bei den untersuchten elektiven Systemwechseln (n = 46) zeigten 42 (91%) der Patient:innen eine Thrombenbildung (8). In früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe um Prof. Lehle konnte gezeigt werden, dass in jedem Oxygenator Thromben nachweisbar sind (9–11). Diese thrombotischen Ablagerungen auf den Oxygenatormembranen erhöhen den Strömungswiderstand und reduzieren die Gasaustauschleistung durch eine Verlängerung der Diffusionsstrecken (12).

Ausgebaute Oxygenatormembranen zeigten faserartige Strukturen mit eingelagerten Thrombozyten und Erythrozyten (12). Insbesondere für Polymethylpentenmembranen wurden von-Willebrand-Faktor (vWF)-Adhäsionen nachgewiesen, welche granuläre, netzartige und fadenartige Strukturen ausbildeten (6).

Trotz Maßnahmen wie Heparinbeschichtung der Systemkomponenten und kontinuierlicher niedrigdosierter Antikoagulation mit Heparin bilden sich thrombotische Aggregate auf den Membranen (12). Heparinbeschichtungen verringern die Thrombozytenadhäsion der Oxygenatoren, die Fibronektinadhäsion verstärkt sich hingegen (13).

1.1.2 Fremdmaterialassoziierte Problematiken der ECMO-Behandlung

Im Zusammenhang mit Gefäßtransplantaten, künstlichen Herzklappen und Kreislaufunterstützungssystemen wurden fremdmaterialassoziierte Komplikationen festgestellt. Dazu gehörten unzureichende Hämokompatibilität, systemische Inflammationsreaktionen, Thrombenbildung und Blutungen (12,14,15).

1.1.2.1 Gerinnungsspezifische Fremdmaterialreaktionen

Obwohl die Methodik der ECMO-Behandlung in der Intensivmedizin bereits seit den 70er Jahren Einsatz findet, bringt sie nach wie vor Komplikationen mit sich. Dazu gehören vor allem immunologische Reaktionen, Blutungen und *Clotting*. Diese Problematiken sind mit Fremdmaterialreaktionen in Verbindung gebracht worden. Fremdmaterialassoziiert kann es zu einer Aktivierung der Gerinnungskaskade kommen (12). Dabei interagieren Plasmaproteinen mit den nicht-endothelialen Oberflächen des ECMO-Systems (14,16).

Im Falle einer solchen materialassoziierten Gerinnungsaktivierung kommt es zunächst zu einer Adsorption von Plasmaproteinen wie Fibrinogen, Fibronektin, Vitronektin und vWF an das Fremdmaterial (14). Durch Interaktion mit dem thrombozytären GPIIb-Rezeptor wird über den vWF die Thrombozytenadhäsion eingeleitet (14,17). Im weiteren Verlauf kommt es zur Aktivierung der Thrombozyten (14,17). Diese setzen Mediatorstoffe frei. Über einen positiven Rückkopplungsmechanismus werden weitere Thrombozyten aktiviert (17). Die Aktivierung bewirkt eine Konformationsänderung des Fibrinogenrezeptors GPIIb/IIIa, wodurch es zur Thrombozytenaggregation kommt (17).

Außerdem wird der intrinsische Weg der Blutgerinnung aktiviert (Abbildung 1). Dabei spielt das Kallikrein-Kinin-System eine wichtige Rolle (14). Durch den Kontakt mit negativ geladenen Oberflächen (beispielweise freigelegtes Kollagen bei Verletzung

von Körpergewebe im Rahmen einer ECMO-Kanülierung), aber auch fremdmaterialassoziiert (bei Kontakt mit Silikon) wird der Faktor XII aktiviert (14).

Infolge der Aktivierung von Faktor XII wird der intrinsische Pfad der Gerinnungskaskade durchlaufen (grün in Abbildung 1) (14,17). Im letzten Schritt des gemeinsamen Ablaufes von intrinsischer und extrinsischer (blau in Abbildung 1) Gerinnungskaskade wird das thrombenbildende Fibrin gebildet (14).

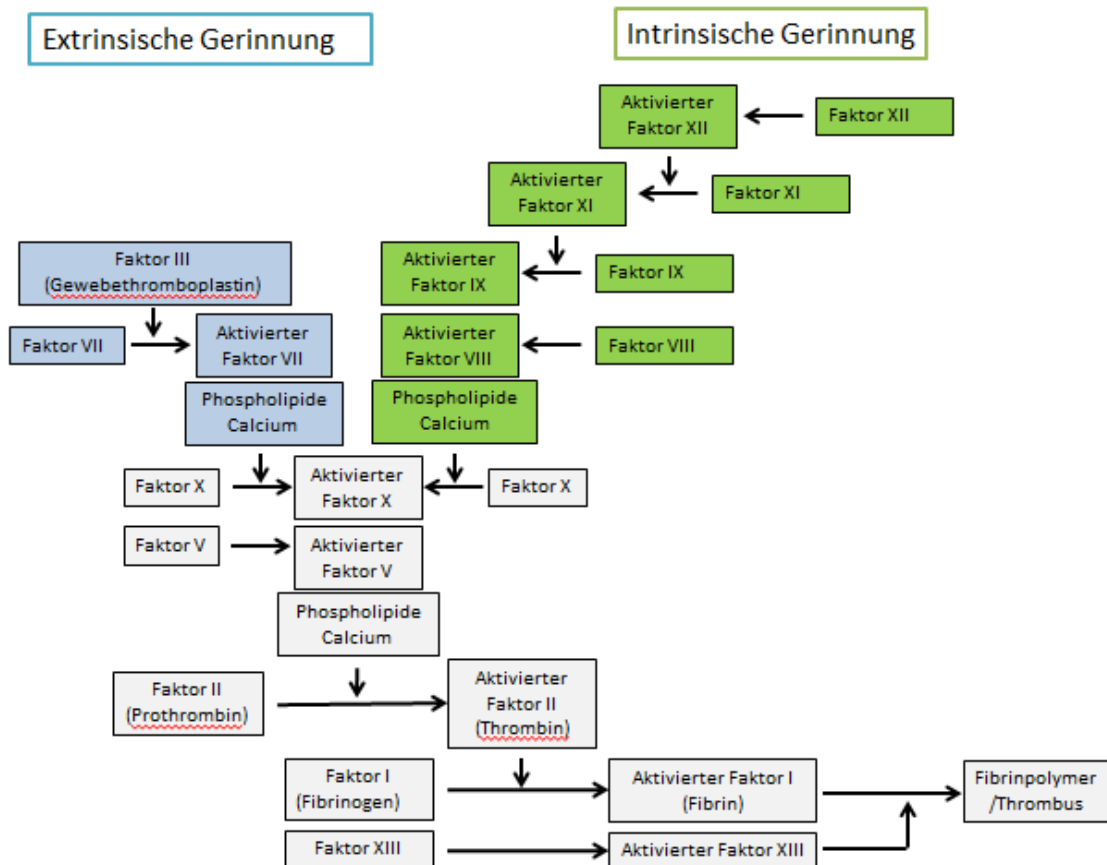


Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der Gerinnungskaskade. Die dargestellten Abläufe sind Teil der sekundären Hämostase. Die extrinsische (blau) und intrinsische Gerinnung (grün) unterscheiden sich dabei in ihrer Auslösung. Bei der intrinsischen Gerinnung besteht ein endogener Auslöser. Unter exogenen Einflüssen kommt es zur Aktivierung des extrinsischen Weges. Beide Wege münden schließlich in die Ausbildung eines Fibrinpolymers (grau). Modifiziert nach Silbernagl et al. (17).

Infolge der Thrombenbildung kann es zur Okklusion des ECMO-Systems kommen (12). Die aus dem erhöhten Strömungswiderstand resultierende Erhöhung der treibenden Druckdifferenz hat eine erhöhte mechanische Beanspruchung der Blutbestandteile zur Folge. Dies führt zur weiteren Aktivierung der Gerinnungskaskade (12,17).

1.1.2.2 Zelluläre Fremdmaterialreaktionen

Thrombozyten spielen in der Hämostase, aber auch in der Immunabwehr eine wichtige Rolle (26). Fremdmaterialassoziiert und resultierend aus einer Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion kann es zu einer Aktivierung von Leukozyten und zu einem oxidativen Burst kommen (14,18). In diesem Fall sind reaktive Sauerstoffspezies wie Wasserstoffperoxid, Hydroxylradikale, molekularer Sauerstoff und Polymorphonuklear-Elastase nachweisbar (14,18,19).

Wie zuvor beschrieben, kommt es im Rahmen einer fremdmaterialassoziierten Hämostase zur Aktivierung des Kallikrein-Kinin-Systems mit Kallikrein und Bradykinin (vergleiche 1.1.2.1). Während für Bradykinin die Freisetzung von Stickoxiden bekannt ist, wurde hinsichtlich Kallikrein die Fähigkeit beschrieben, neutrophile Granulozyten zu aktivieren (14). Im Rahmen viraler Infektionen, bei welchen eine ECMO-Behandlung durchaus Anwendung findet, wurde die Ausbildung von Thrombozyten-Neutrophilen-Aggregaten nachgewiesen (18,20). Diese Aggregate sind ein Ausdruck einer missregulierten Interaktion zwischen dem thrombozytären Protein HMGB1 und dem TOLL-like-Rezeptor 4 (TLR4) der neutrophilen Granulozyten, wodurch es zur Ausbildung von neutrophilen extrazellulären Fallen kommt (14,18,19). Diese bestehen aus Chromatin, daran adhärierenden Histonen und antimikrobiell wirksamen Proteinen (14,14,19). Diese Histone rufen wiederum die Aktivierung von Thrombozyten hervor. Es kommt zur Aggregation von vWF. Außerdem wird die Produktion von Thrombin unabhängig von Faktor XII gefördert. Histone reduzieren dosisabhängig die Zeit bis zur Thrombusbildung (19).

1.2 Strömungsmechanische Hintergründe

Relevant für die Einordnung der Strömungsbedingungen in ECMO-Systemen sind, neben der Kenntnis verschiedener Strömungsmuster, strömungsmechanische Größen, welche in den folgenden Kapiteln erläutert werden.

1.2.1 Laminare und turbulente Strömung

Definierend für den laminaren Fluss sind die parallel zur Gefäßachse verlaufenden Stromlinien. Dabei handelt es sich um Flüssigkeitsschichten, die mit ortsabhängigen Geschwindigkeiten übereinander gleiten. In Abhängigkeit vom Gefäßradius ergibt sich ein parabelförmiges Strömungsprofil (21,22).

Bei stark erhöhter Strömungsgeschwindigkeit oder stenotischen Gefäßveränderungen treten turbulente Strömungen auf (7,17,21). Die Strömung zeigt ein unregelmäßiges Fließverhalten in axialer und lateraler Richtung. Verwirbelungen und daraus resultierend erhöhte Strömungswiderstände gelten als typisches Phänomen bei turbulenten Strömungen (21).

Der Übergang von laminaren in turbulente Strömungen erfolgt mit Erreichen der kritischen Reynoldszahl. Diese liegt für ein glattwandiges Gefäß bei 2000-2200 (21,22). Die dimensionslose Reynoldszahl ist definiert als das Verhältnis aus der Dichte und der Viskosität des Blutes multipliziert mit dem mittleren Gefäßradius und der mittleren Strömungsgeschwindigkeit (21).

Turbulente Strömungen treten vermehrt bei großen Gefäßradien, hohen Strömungsgeschwindigkeiten (z.B. in stenotischen Gefäßen) und erniedrigter Blutviskosität (z.B. bei Anämie) auf. Klinisch kann sich dies in peripheren Gefäßen in Form von auskultierbaren Strömungsgeräuschen äußern (22).

1.2.2 Scherrate und Schubspannung

Die Scherrate ist definiert als das Verhältnis der Geschwindigkeitsdifferenz zweier Punkte und der Distanz zwischen diesen Punkten (Formel 1) (23). An der Gefäßwand ist die Flussgeschwindigkeit 0m/s. Mit zunehmendem Abstand zur Gefäßwand steigt die Flussgeschwindigkeit an, bis sie nahe der Gefäßmitte ihr Maximum erreicht. Daraus folgend ist die Scherrate in der Gefäßmitte am niedrigsten. An der Gefäßwand ist die Scherrate am höchsten (23).

$$\gamma = \frac{dv}{dx} = \frac{v_2 - v_1}{x}$$

γ = Scherrate [1/s]

v_n = lokale Strömungsgeschwindigkeit [m/s]

x = Distanz zwischen zwei Punkten mit definierter Strömungsgeschwindigkeit [m]

Formel 1: Scherrate (23)

Die Schubspannung bezeichnet die auf die Fläche normierte Reibungskraft zwischen Grenzschichten in einer laminaren Strömung (vergleiche 1.2.1). Die Scherrate bezeichnet einen Geschwindigkeitsgradienten. Über die Viskosität sind Schubspannung und Scherrate verknüpft (23).

Tabelle 1 zeigt Schubspannungen und Scherraten von Vollblut für arterielle und venöse Gefäße.

Gefäßart	Durchschnittliche Scherraten [1/s]	Durchschnittliche Schubspannungen [Pa]
Große Arterien (z.B. A. femoralis)	300 - 800	1,35 - 3,60
Venen	15 - 200	0,70 - 9,00
Stenotische Gefäße (venös und arteriell)	800 - 10000	3,60 - 45,00

Tabelle 1: Scherraten und Schubspannungen in Gefäßen (7,23–25)

In Zusammenhang mit Vollblut wird von der sogenannten apparenten oder scheinbaren Viskosität gesprochen, da die Blutviskosität neben Faktoren wie dem Hämatokrit stark von Schubspannungen abhängig ist (17). Leukozyten und Thrombozyten haben, anders als Erythrozyten, keinen bestimmenden Einfluss auf die apparente Viskosität des Blutes (23).

Bei Scherraten unter 50-100/s verhält sich Vollblut wie eine nicht-newtonsche Flüssigkeit. Die apparente Viskosität sinkt dann mit ansteigenden Scherraten (23,24). Außerdem kommt es bei hohen Scherraten zu einer Deformierung und Axialmigration der Erythrozyten. Dadurch werden Reibungseffekte verringert, sodass sich die apparente Viskosität einem konstanten Wert annähert (17,23).

1.3 Die Rolle des vWF bei der strömungsinduzierten Thrombenbildung

Bei ECMO-Patient:innen mit einem hohen *Sequential Organ Failure Score*, schwerer Thrombozytopenie und einer persistierenden Leberdysfunktion wurden ausgedehnte vWF-Ablagerungen in den Oxygenatoren gefunden (9). Neben Fibrin, Thrombozyten und Erythrozyten scheint der vWF an der strömungsinduzierten Thrombusbildung auf Oxygenatormembranen maßgeblich beteiligt zu sein (16). In Immunfluoreszenz basierten Analysen von Ablagerungen auf Oxygenatormembranen nach Anwendung an Patient:innen wurden Leukozyten, Erythrozyten, vWF und weitere Plasmaproteine gefunden (26–28).

Der vWF ist ein für die Hämostase wichtiges Glykoprotein. Er ist bereits mit scherkraftabhängiger Thrombenbildung in Verbindung gebracht worden (6,29). Im menschlichen Körper findet sich vWF in den Weibel-Palade-Körpern der Endothelzellen (16,30–32), in den Megakaryozyten (16,32,33) und den α -Granulae der Thrombozyten (16,34). Der vWF liegt im Blut in verschiedenen Multimeren vor. Zusätzlich ist er in den Endothelzellen und Thrombozyten als langes vWF-Multimer (*Ultra-Large-von-Willebrand-Faktor-Multimers*, ULvWF) gespeichert (30,34). Die ULvWF wirken gerinnungsfördernd, indem sie, auch unter dem Einfluss von Scherkräften, die Thrombozytenadhäsion, sowie -aggregation begünstigen (35).

Bei thrombogenen oder inflammatorischen Stimuli, sowie bei Gefäßschädigung wird vWF ins Blut freigesetzt (24,36). Mögliche Stimuli sind Adrenalin, Adenosindiphosphat, Kollagen, Fibrin, Histamin, Reperfusionen, Thrombin, Tumor-Nekrose-Faktor- α , Tumorzellen und das Vasopressinanalogen Desmopressin (24,37). Bei Auftreten dieser Stimuli wird der vWF aus den sauren Weibel-Palade-Körpern abgegeben. Die Veränderung des pH-Wertes, ebenso wie erhöhte Scherbedingungen, führen zu einer Konformationsänderung des vWF. Durch die Spaltung von Disulfidbrücken nimmt der vWF eine elongierte Form an. In diesem aktivierten Zustand werden die Bindedomänen des vWF zugänglich (37). Er bleibt über $\alpha(v)\beta$ -Integrin, P-Selektin oder die Weibel-Palade-Körper an das Endothel gebunden.

Mit der Spaltung der ULvWF durch die *a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin-1-like domains 13* (ADAMTS-13)-Protease wird ihre prokoagulatorische Wirkung aufgehoben. Folge für die Patient:innen ist ein erhöhtes Blutungsrisiko (38–42). In früheren Studien konnte in Herzunterstützungssystemen, in Systemen zur mechanischen Kreislaufunterstützung und in extrakorporalen Lebenserhaltungssystemen ein Abfall der ULvWF nachgewiesen werden (27,28,43,44). Man spricht von einem *Acquired von-Willebrand Syndrome* (AVWS). Im Rahmen des AVWS kommt es zu einer scherkraftbedingten, vermehrten Proteolyse der ULvWFs (28). Sowohl für ECMOs als auch für Herzunterstützungssysteme wurde das Auftreten von AVWS in Kombination mit vermehrten Blutungen beschrieben (45–47). Es kommt aber nicht bei allen Patient:innen, die ein AVWS entwickeln, vermehrt zu Blutungen. Die Ursachen hierfür sind ungeklärt (28).

Der vWF kann strömungsabhängig fadenartige Strukturen ausbilden, an denen Thrombozyten binden können (7,25,48). *In vitro* konnte eine vWF-Fadenbildung sowohl an kollagenbeschichteten Oberflächen, als auch in mit Mikropfosten versehenen Flusskammern nachgewiesen werden (49). Herbig und Diamond gelang die Erzeugung von mehr als 100µm langen vWF-Fasern bei Scherraten von 5000 – 10000/s. Die Faserdicke stieg mit zunehmenden Scherraten. Außerdem konnte mit dem Nachweis einer sichtbaren Retraktionsfähigkeit und einem Elastizitätsmodul von ~50Pa eine Ähnlichkeit zu Fibrinfäden festgestellt werden (25). Tabelle 2 zeigt das Verhalten des vWF bei verschiedenen Scherraten und Schubspannungen. VWF-Fäden bilden sich ausschließlich unter dem Einfluss hoher Scherkräfte (26,50).

Scherraten [1/s]	Schubspannung [Pa]	Verhalten des vWF
3000	3	Der vWF liegt nur zu einem Anteil von 10-15% entfaltet vor
5000	4-5	Entfaltung des vWF auf Längen von bis zu 10µm
>6000	>6	Selbstassoziation mit axialer und lateraler Ausbreitung

Tabelle 2: Verhalten des vWF bei verschiedenen Strömungsbedingungen (25,35,51–53)

Entsprechende Bedingungen sind im Rahmen von stenotischen Gefäßveränderungen gegeben (siehe Tabelle 1). Die von Herbig und Diamond definierten Scherraten für eine vWF-Fadenbildung konnten bisher lediglich für stark stenosierte Gefäße nachgewiesen werden (25). Es ist davon auszugehen, dass in den Komponenten der ECMO-Systeme hohe Scherkräfte auftreten (16,54).

1.4 Mikropartikel

Mikropartikel sind Membranpartikel, die von Zellen als extrazelluläre Vesikel unter physiologischen oder pathologischen Bedingungen freigesetzt werden (55). Sie sind Mediatoren bei Immunregulation, Koagulation und Inflammationsprozessen (55,56). Sie erfüllen in erster Linie hämostatische Funktionen. Erst bei pathologisch gesteigerter Freisetzung von Mikropartikeln besteht klinisch eine Thrombosegefahr (55,57).

Definitionsgemäß sind Mikropartikel <1µm groß (56,58). Sie bestehen aus zytoplasmatischen Komponenten und Phospholipiden (56). Die Zusammensetzung der Mikropartikel ist ebenso wie ihre Konzentration in der Körperflüssigkeit abhängig von Zelltyp, Stimulus und Individuum (55). Plasmatische Mikropartikel können von allen zirkulierenden Blutzellen und dem Endothel durch Exozytose erzeugt werden

(55,56,58). Scherkräfteinwirkung ist hierbei ein wichtiger Stimulus für die Freisetzung von Mikropartikeln (55).

An der Außenseite der Vesikel befinden sich Gewebethromboplastin sowie adhäsionsfähige Oberflächenstrukturen. Über diese können Mikropartikel an Endothel, Blutzellen oder Matrixbestandteile binden (55). Außerdem finden sich membranständig das anionische Phospholipid Phosphatidylserin und Membranantigene. Über diese können Rückschlüsse auf den zellulären Ursprung der Mikropartikel gezogen werden (Tabelle 3) (56).

Ursprungzelltyp der Mikropartikel	Durchschnittlicher Anteil [%]
Thrombozyten	87,5
Leukozyten	7,1
Erythrozyten	4,9
Endothelzellen	0,5

Tabelle 3: Darstellung des zellulären Ursprungs der Mikropartikel im Blut (56–58)

Thrombozytäre Mikropartikel (*platelet microparticles*, PMP) haben eine Mediatorenfunktion zwischen Thrombozyten und subendothelialen Strukturen. Es wird die primäre Hämostase gefördert (55,57,58).

Mikropartikel fördern neben der Thrombozytenaggregation und –adhäsion auch die Fibrinbildung (56,57). In *in vitro*-Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass Mikropartikel eine stimulatorische Rolle im Koagulationsprozess einnehmen (57) und mit einer Thrombenbildung in Verbindung gebracht werden können (59). Die katalytische Oberfläche der Mikropartikel führt zur An- und Zusammenhaftung prokoagulatorischer Proteine und damit zur Koagulation und Thrombinproduktion (55).

Hohe Scherspannungen auf Vollblutproben induzieren die Freisetzung von Mikropartikeln (55). Eine Studie von Kim et al. aus dem Jahr 2019 beschreibt Prozesse der Thrombenbildung im Rahmen der arteriellen Thrombose (29). Die dort beschriebenen Klots erschienen anders als typische Gerinnungsthromben hell. Dies wurde mit dem Fehlen von Erythrozyten in den Plasmaproben erklärt. Die Klots bestanden den histologischen Untersuchungen zufolge zu 50-80% aus Thrombozyten (29).

1.5 Die Bedeutung von *ex vivo*-Modellen

Die Untersuchung der Thrombenbildung und des Adhäsionsverhaltens von Proteinen an Oxygenatormembranen ist bisher nicht *in vivo* realisierbar. Um Erkenntnisse bezüglich Scher- sowie Flussbedingungen an den Membranen zu gewinnen, können jedoch *ex vivo*-Perfusionsmodelle herangezogen werden.

Mithilfe von Mikrofluidiksystemen wurden bereits definierte und kontrollierte Untersuchungsbedingungen hinsichtlich Antikoagulation, Oberflächenbeschaffenheit, Flussbedingungen und Visualisierung geschaffen (49). In *in vitro*-Modellen kann zusätzlich die Hämkompatibilität von Biomaterialien untersucht werden (14). Im Vergleich zu *in vivo*-Tiermodellen sind dabei Blutfluss, Antikoagulation und Störfaktoren kontrollierbarer, wobei aufgrund der geringen Größe nur geringe Probenvolumina benötigt werden (14).

In Mikrofluidiksystemen können Thrombozyten- und Gerinnungsaktivierung zeitgleich untersucht werden. Dabei ist es möglich, die Prozesse unter dem Einfluss physiologischer und pathologischer Scherraten zu beobachten (14). Zudem besteht die Möglichkeit eines Live-Monitorings von Thrombozyten-Leukozyten-Interaktionen (14,18). Mithilfe von *CellTrackern* oder Antikörperfärbungen ist eine Visualisierung der Zellaktion möglich (18). Es konnte gezeigt werden, dass durch die Ausbildung von neutrophilen extrazellulären Fallen von HMGB1-aktivierten neutrophilen Granulozyten die Thrombusbildung gefördert wurde. Neutrophile Granulozyten stellen in zellulärer Hinsicht die Hauptkomponente koronarer Thromben dar (19).

Flusskammern werden als offenes System zur Beobachtung der Thrombozytenadhäsion an immobilisiertem vWF verwendet. Außerdem werden sie zur Untersuchung der thrombozytären Thrombusbildung an Substraten wie Kollagen eingesetzt. Flusskammern bestehen häufig aus transparentem Polymethylsiloxan (24). Die Wandschubspannung in Flusskammern variiert: In der Mitte wird ein Maximum an Schubspannung erreicht, während sie sich an den Seiten der Kammer an null annähert (vergleiche 1.2.2) (24).

Andere Arbeitsgruppen etablierten bereits in der Vergangenheit Perfusionsmodelle, um *ex vivo* die Auswirkungen von Scherspannungen in stenotisch veränderten Gefäßen nachzustellen (25,49). Es wurden Stenosemodelle etabliert, welche mit Engstellen versehen sind, durch welche sich veränderte Strömungsbedingungen

ergeben (25). Das Modell von Herbig und Diamond ist, in Analogie zu dem in dieser Arbeit etablierten Perfusionsmodell, mit einem Mikropfosten versehen, an welchem vWF-Fäden adhären können (25). Außerdem wurden Flusskammern mit verschiedenen Beschichtungen wie Kollagen und immobilisiertem vWF (53,60) eingesetzt. Herbig und Diamond konnten jedoch zeigen, dass es auch ohne Beschichtung des Perfusionssystems zur Entfaltung des vWF kommen kann (25). Diese Konformationsänderung des vWF war mit zunehmender Schubspannung vermehrt nachweisbar (52). Außerdem wurde eine vermehrte vWF-abhängige Thrombozytenadhäsion und -aggregation unter hohen Scherbedingungen beobachtet (54). In Gegenwart von Kollagen tritt eine gesteigerte Proteinadsorption bei unveränderten Scherraten auf. Bei Versuchen ohne den Einfluss von Schubspannungen konnte keine gesteigerte Proteinadhäsion beobachtet werden. Außerdem wurde eine scherkraftinduzierte Aggregation beziehungsweise Selbstassoziation des vWF beschrieben (51–53). Durch Zugabe von ADAMTS-13 konnte die vWF-Aggregation verringert werden (53).

Es lässt sich abschließend feststellen, dass die Verwendung eines Oxygenatormodells gegenüber der direkten Untersuchung von Oxygenatormembranen folgende Vorteile bietet:

Untersuchung von Einzelfaktoren

Es können isoliert einzelne Komponenten verändert und Faktoren untersucht werden (z.B. ADAMTS-13, vWF, verschiedene Medien, Granulozytenkonzentrate, Thrombozytenkonzentrate, Antikoagulantien, Xenobiotika).

Untersuchung von Schereinflüssen

Ein integrierter Flusssensor ermöglicht es, Volumenströme und daraus errechnete Scherraten zu ermitteln.

Untersuchung fremdmaterialassoziierter Reaktionen

Ein *ex vivo*-Perfusionsmodell bietet die Möglichkeit, den Einfluss verschiedener Kunststoffe zu untersuchen. Eine in der Materialbeschaffenheit begründete Aggregatbildung kann durch separate Betrachtung der einzelnen Modellkomponenten untersucht werden. Des Weiteren können im *ex vivo*-Perfusionsmodell verschiedene Kunststoffbeschichtungen (Heparin, Phosphorylcholin, uvm.) in Bezug auf deren Hämokompatibilität getestet werden.

1.6 Studienplan

In Vorarbeiten von I. Heim (noch nicht publizierte Dissertation) wurden erste Erfahrungen mit einem Perfusionssystem gemacht. Unter maximaler Flussrate gelang erstmals die Darstellung fadenartiger Strukturen an einer Polymethylpenten-Gasfaser mittels *Live Imaging* am Mikroskop. Diese Strukturen waren vWF-positiv. Problematisch war die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist die Etablierung/Validierung eines miniaturisierten ECMO-Perfusionsmodells mit konstanten Fluss- und Temperaturverhältnissen gefordert. Mithilfe von Flusskammern, welche mit senkrecht zur Flussrichtung stehenden Gasfasern versehen wurden, soll mit diesem Modell eine Aggregat- beziehungsweise vWF-Fadenbildung unter Zuhilfenahme von Fluoreszenzmikroskopie und unter kontrollierten Bedingungen (Scherkräfte, Umgebung) sichtbar gemacht werden. Abbildung 2 ist eine schematische Darstellung des Studienplanes dieser Arbeit. Detaillierte Beschreibungen finden sich in den folgenden Kapiteln.

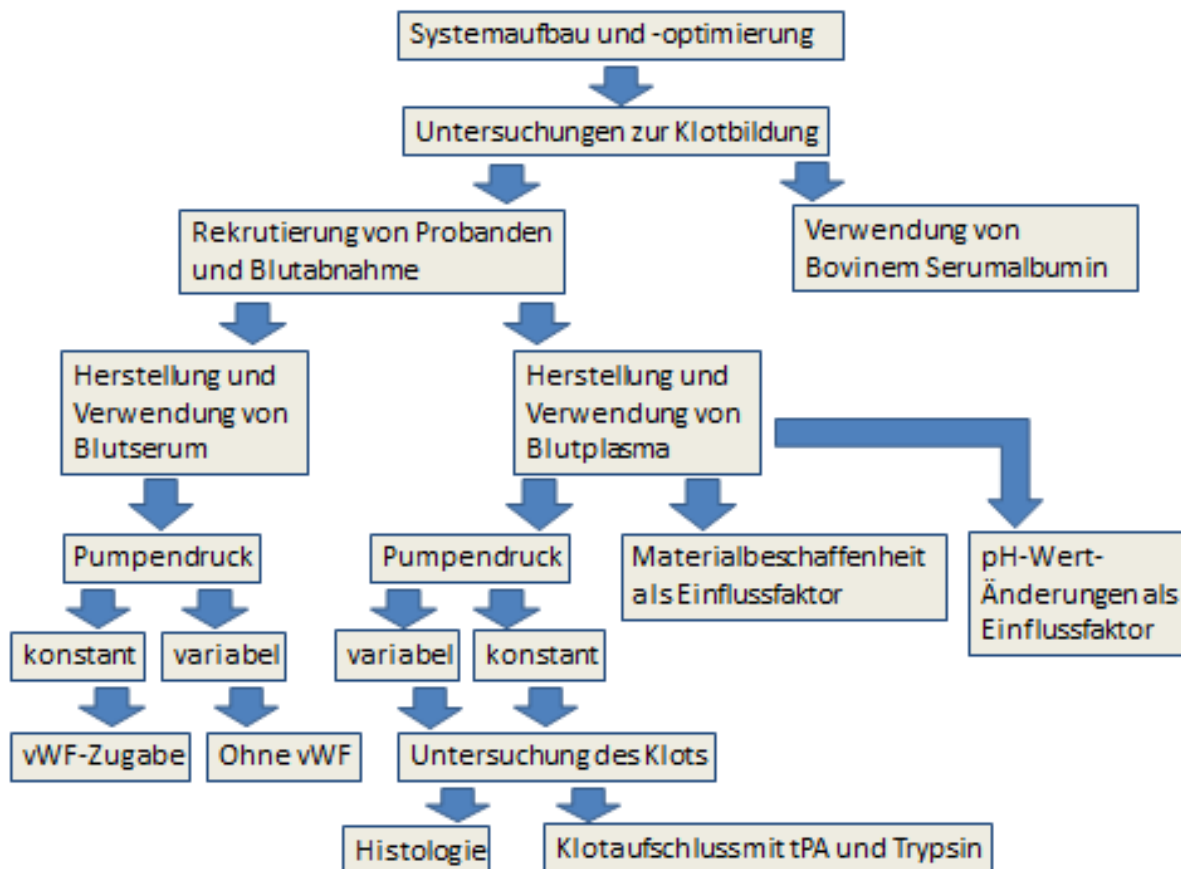


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Bestandteile der vorliegenden Arbeit

2 Material und Methoden

Nachfolgend werden die angewendeten Methoden erläutert. Die verwendeten Materialien sind im Anhang aufgeführt.

2.1 Definition und Differenzierung der für Aggregate verwendeten Begrifflichkeiten

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Unterscheidung zwischen Thromben und Klots basierend auf der Zusammensetzung der Aggregate getroffen. Nachfolgend werden Aggregate bezüglich des *ex vivo*-Modells als Klots und Aggregate bezüglich an Patient:innen benutzten Oxygenatormembranen als Thromben bezeichnet.

2.2 Ethische Aspekte bezüglich Proband:innenproben

Bezüglich der Verwendung von Blutproben von Proband:innen liegt für diese Arbeit ein positives Ethikvotum des Universitätsklinikums Regensburg vor (# 16-101-0322). Die Proband:innen wurden über den Inhalt der Studie sowie über ihr Recht, von dieser zurückzutreten aufgeklärt. Weiterhin wurden die Proband:innen über mögliche Nebenwirkungen und Risiken der Blutentnahme mit einer Flügelkanüle aufgeklärt. Die Einverständniserklärung und die Aufklärungsbestätigung erfolgten schriftlich.

Es handelte sich um gesunde Proband:innen beider Geschlechter, die nicht unter dem Einfluss von Antikoagulanzen standen. Die nachfolgende Tabelle (Tabelle 4) zeigt eine Übersicht der Proband:innenparameter.

	Gesamt	Plasmaversuche	Serumversuche	P-Wert
Proband:innen (n)				-
- Gesamt	11	8	6	
- Einmalige Spende	8	5	3	
- Mehrfache Spende	3	3	3	
Alter in Jahren (IQR)	24 (22-26)	24 (22-27)	22 (22-23)	
Männlich (n; %)	3; 27	3; 38	1; 17	0,391
Body-Mass-Index (BMI) [kg/m²] (IQR)	22,4 (21,1-22,6)	22,4 (21,5-22,6)	22,4 (22,0-22,5)	0,500
Blutgruppe (n; %)				0,053
- A	4; 36	4; 50	4; 50	
- B	1; 9	0; 0	0; 0	
- 0	3; 27	1; 13	1; 13	
- AB	0; 0	0; 0	0; 0	
- unbekannt	3; 27	3; 38	3; 38	
Rhesus Typ (n; %)				0,053
- Rh(D) +	5; 45	4; 50	4; 67	
- Rh(D) -	3; 27	1; 13	2; 33	
- unbekannt	3; 27	3; 38	0; 0	

Tabelle 4: Übersicht über die Proband:innenparameter: Die Tabelle zeigt die Zahlen für Proband:innen aufgeschlüsselt nach Art des Perfusionsversuches (Serumversuch oder Plasmaversuch) und, ob es sich bei den Proband:innen um einmalige oder mehrfache Spender:innen handelte. Alter und BMI sind in Form von Median und Interquartilsabständen (IQR) angegeben, Geschlecht, Blutgruppe und Rhesus-Typ wurden sowohl in Absolutwerten, als auch in Prozentwerten dargestellt. Die tabellarische Zusammenstellung entstand in Zusammenarbeit mit Dr. Tamara Steiger.

2.3 Aufbau und Vorbereitung des Perfusionsmodells

Erste Versuche mit dem Perfusionsmodell wurden im Zeitraum von April 2019 bis September 2019 von der Doktorandin I. Heim unternommen. Das Modell wurde weitgehend übernommen und lediglich einige in den folgenden Absätzen beschriebene Optimierungen vorgenommen.

2.3.1 Modifizierung der Ibidi-Slides

Eine Mikroflussskammer (μ -Slide, Ibidi), welche in einen Objektträger eingebettet ist, wurde mit einer einzelnen, nativen Gasfaser bestückt (Abbildung 3).

Die Modifizierung der, für die vorliegende Versuchsreihe verwendeten, Ibidi-Slides erfolgte durch Herrn Prof. Dr.-Ing. Lars Krenkel (Zentrum für Biofluidmechanik, Ostbayerische Technische Hochschule Regensburg, Regensburg) im Rahmen einer Forschungs Kooperation.

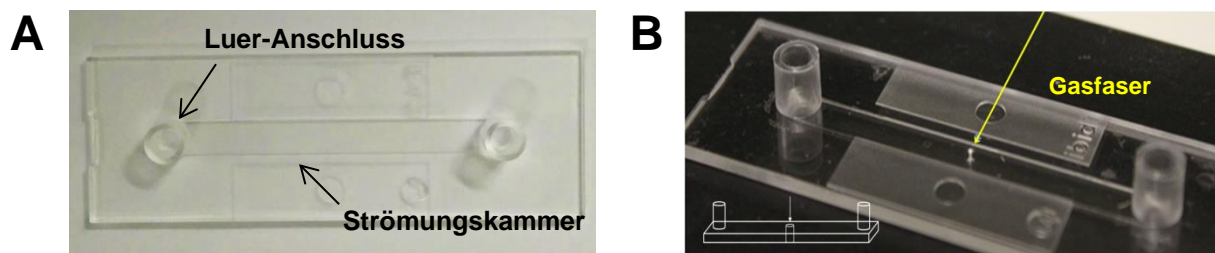


Abbildung 3: Darstellung eines nicht-präparierten Ibidi-Slides (A) und eines präparierten Ibidi-Slides (B). A: Natives Ibidi-Slide ohne Gasfaser. Die Strömungskammer mündet zu beiden Seiten in einen Luer-Anschluss. An diesen werden bei Einbau ins System über Konnektoren die Silikonschläuche befestigt. Mittig ist die belassene Strömungskammer zu erkennen. B: Ibidi-Slide mit eingeborhter Gasfaser. Mit einem Mikrobohrer wird die Strömungskammer mit einem Loch versehen. In dieses Loch wird die Polymethylpenten-Faser hineingeklebt. Aufgrund der Gefahr von Mikrorissen in der Strömungskammer durch den Prozess der Slide-Modifizierung, sind die Strömungskammern vor Gebrauch auf Dichtigkeit zu prüfen.

2.3.2 Aufbau

Kernelement des Perfusionsmodells stellte das Pumpensystem von Ibidi dar (*Ibidi pump system*, Gräfelfing, Deutschland). Das System setzte sich aus einer Luftdruckpumpe mit dazugehöriger Steuerungssoftware (*PumpControl*) und einem Perfusionssystem (*Fluidic Unit*) zusammen (Abbildung 4).

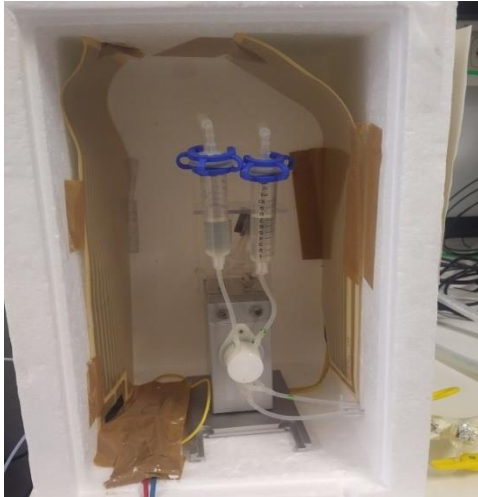
A**B**

Abbildung 4: Bestandteile des Pumpensystems. A: *Fluidic Unit* des Pumpensystems. Die Spritzen sind idealerweise je mit 5-7mL Medium gefüllt. Die Spritzen münden in Silikonschläuche, die in ein Ventilsystem eingespannt werden. Über koordiniertes Öffnen und Schließen der Ventile soll ein kontinuierlicher Fluss erzeugt werden. B: Luftpumpe des Pumpensystems. Der elektronische Teil der Pumpe wird über eine Computersoftware (*PumpControl*, Ibidi) angesteuert. Außerdem ist die Luftpumpe mit der *Fluidic Unit* (Bild A), sowie mit einer Silicagelflasche verbunden.



Abbildung 5: Schlauchsystem. Das Schlauchsystem setzt sich aus Silikonschläuchen variierbarer Längen zusammen. Die einzelnen Schläuche werden über Konnektoren miteinander verbunden, wodurch sich Schnittstellen ergeben. An diesen Schnittstellen können Sensoren eingebaut werden.

Die Pumpe wurde über Silikonschläuche mit einer Druckluft- und Kohlendioxid- (CO₂) Versorgung verbunden, welche über einen Gasmischer (Trajan) reguliert und über einen Atemgasmonitor für Narkosegase überwacht wurde. Über eine zwischen Trajan und Pumpe angeschlossene Silicagelflasche wurde sichergestellt, dass die zugeführte Luft die Pumpe ausreichend entfeuchtet erreichte.

Mittels Verbindungsschläuchen aus Silikon wurden die Flüssigkeitsreservoirs der *Fluidic Unit* zu einem geschlossenen Kreislauf verbunden (Abbildung 5). Zusätzlich wurden Luer-Anschlüsse in den Kreislauf eingebracht, um Messsensoren für Volumenstrom, Temperatur und CO₂-Partialdruck (letztere beide in Abbildung 6) zwischenzuschließen.

Die Sensoren wurden über Lichtleiter mit einem Steuerungselement verbunden, welches sich über eine USB-Verbindung an einen Computer anschließen ließ. In

diesem Fall wurde die zugehörige Software auf demselben Laptop wie die Steuerungssoftware der Pumpe installiert.

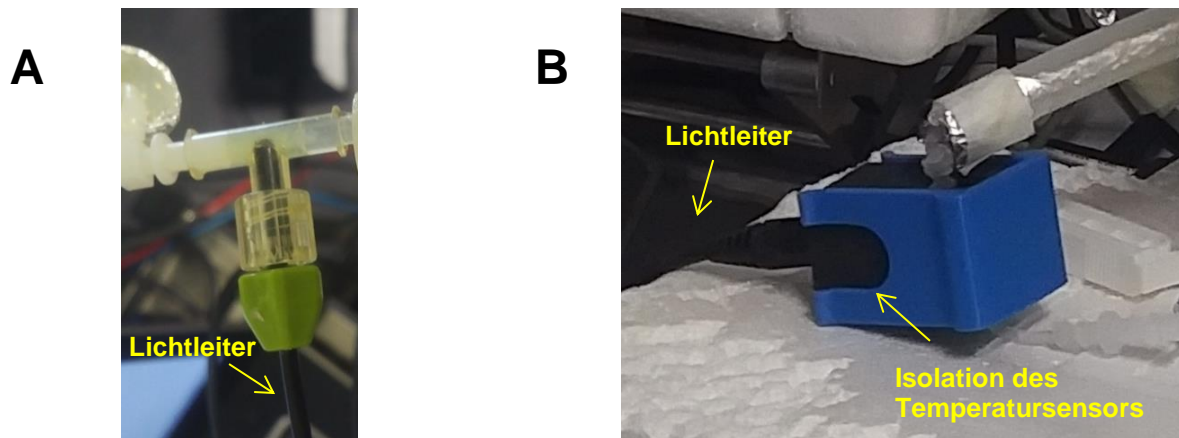


Abbildung 6: Sensoren der Firma PreSens. A: CO₂-Durchflusszelle. Die Zelle ist über einen Lichtleiter (schwarz unten im Bild) mit der dazugehörigen Software (PreSens Measurement Studio, PreSens) verbunden. B: Der Temperatursensor ist eine Durchflusszelle, die über Lichtleiter mit der zugehörigen Steuerungssoftware (PreSens Measurement Studio, PreSens) verbunden ist. Um Messfehler durch Wärmeverluste am Sensor selber zu vermeiden, wurde der Temperatursensor mit Schaumstoff isoliert und die Isolationsschicht mit einer Klammer (blau im Bild) gesichert.

Bei dem Flusssensor (Abbildung 7) handelte es sich um das Modell SLS_1500 Liquid Flow Meter der Firma Sensirion (Stäfa, Schweiz). Der Funktion des Sensors liegt ein thermisches Messprinzip zugrunde. Auf die Anschlüsse des Flusssensors ließen sich die Silikonschläuche direkt aufschieben. Der Sensor war über ein USB-Kabel mit einem weiteren Laptop verbunden, auf welchem sich die entsprechenden Steuerungsprogramme (Pump Control, Ibidi; PreSens Measurement Studio, PreSens; USB/RS485 Sensor Viewer, Sensirion) befanden.

Der Objektträger mit Mikrokanal und eingesetzter Gasfaser (μ -Slide) wurde in die Klimakammer des Fluoreszenzmikroskops (vergleiche Abbildung 8) (Mikroskop DMi8 IRB, Leica) eingesetzt und diese verschlossen.



Abbildung 7: Flusssensor der Firma Sensirion. Der Flusssensor besitzt zwei Anschlüsse (blau) für die Silikonschläuche des Perfusionssystems. Links oben ist der Anschluss für das Verbindungskabel zur Steuerungssoftware (USB/RS485 Sensor Viewer, Sensirion) dargestellt. Der Sensor bedient sich eines thermischen Messprinzips.

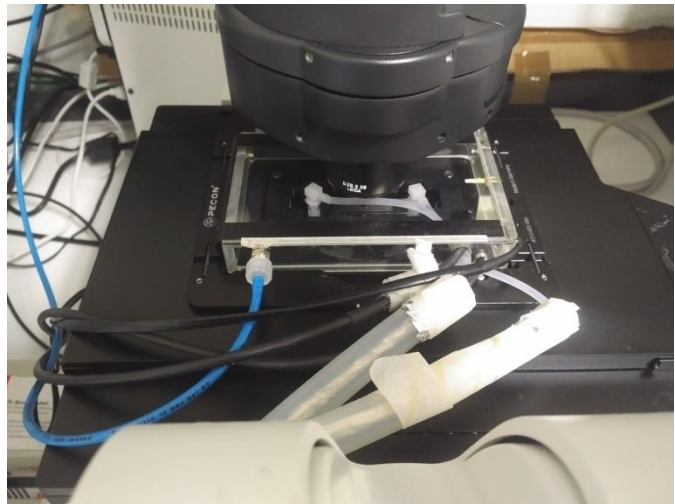
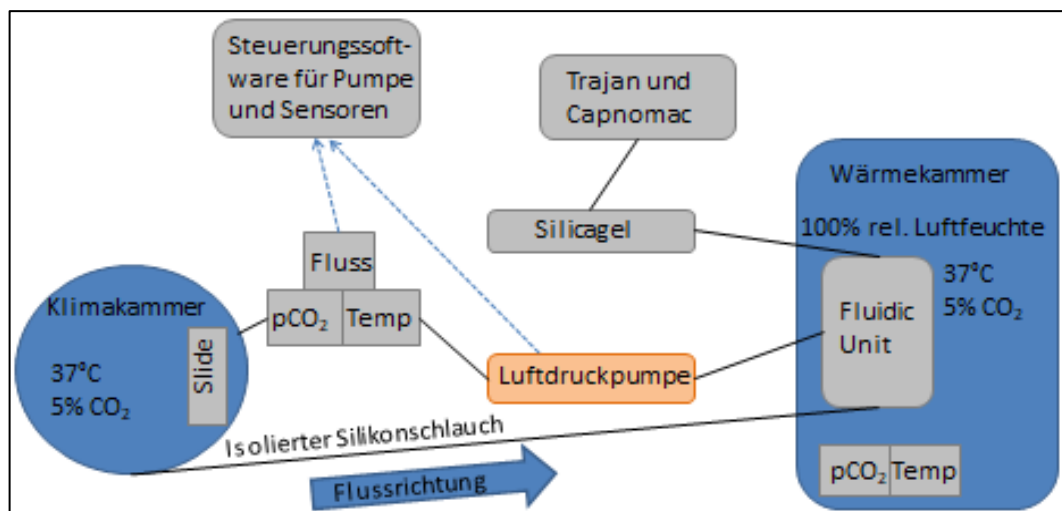
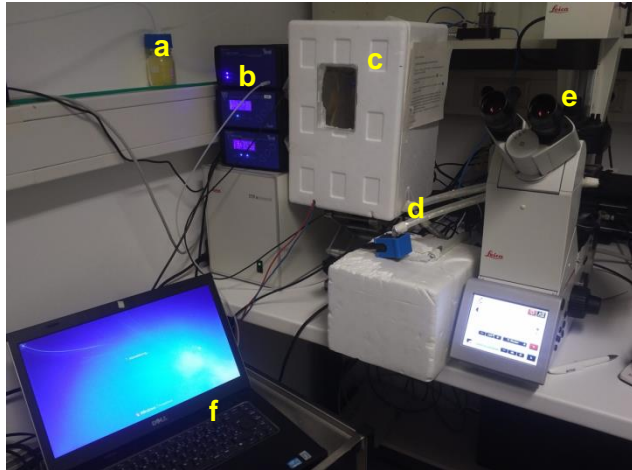


Abbildung 8: Blick von oben auf die Klimakammer des Mikroskops. Rechts führen die Silikonschläuche des Perfusionssystems in die Klimakammer, zusammen mit einem CO₂-Sensor. Mittig in der Klimakammer sieht man die an die Strömungskammer angeschlossenen Silikonschläuche. Da es sich um ein inverses Mikroskop handelt, befindet sich die Leuchte über dem Objektisch.

Abbildung 9 zeigt eine schematische Darstellung des Versuchsaufbaus (A) und eine Darstellung des Gesamtaufbaus im Labor (B).

A



B**Abbildungslegende:**

- a) Silicagel
- b) Luftdruckpumpe
- c) Wärmekammer mit *Fluidic Unit*
- d) Isoliertes Schlauchsystem mit Sensoren
- e) Mikroskop mit Klimakammer und Slide
- f) Computer mit Steuerungssoftware

Abbildung 9: Versuchsaufbau. A: Schematische Darstellung. Die Klimakammer des Mikroskops enthält die mit einer Polymethylpenten-Gasfaser bestückte Strömungskammer. Über Silikonschläuche ist diese mit Fluss-, Temperatur- und CO₂-Sensoren, sowie einer Luftdruckpumpe verbunden. Außerdem besteht Verbindung zu der *Fluidic Unit* des Pumpensystems, welche sich in einer Wärmekammer befindet. In der Wärmekammer herrschen idealerweise kontrollierte Temperatur- und CO₂-Bedingungen. An den Kreislauf angeschlossen sind außerdem eine Silicagelflasche zur Luftentfeuchtung, sowie eine Narkosegasgerät (Trajan) und ein Atemgasmonitor (Capnomac) zur Überwachung und Einstellung der CO₂-Zufuhr. Die Sensoren und die Luftdruckpumpe werden mittels entsprechender Software von einem Computer angesteuert. B: Darstellung im Labor mit Legende. Der Übersichtlichkeit halber wurden die Modellkomponenten mit Buchstaben gekennzeichnet und die Bedeutung in der nebenstehenden Legende erläutert.

2.3.3 Priming des Systems

Das System und auch der μ -Slide wurden mehrfach verwendet. Vor jedem Perfusionsversuch wurde das Schlauchsystem mit 0,9%-iger Kochsalzlösung gespült. Das Schlauchsystem beinhaltet ein Volumen von 4mL, das Spritzenpaar wurde mit einem Volumen von je 7mL befüllt. Der Inhalt des Gesamtsystems wird über eine externe Schnittstelle im Schlauchsystem bis auf das sich in den Schläuchen befindende Volumen (ca. 4mL) abgelassen. Ein Volumenanteil Kochsalzlösung wurde mit 10 Volumenanteilen Plasma aufgefüllt.

2.3.4 Temperaturoptimierung

Zur Temperaturstabilisierung im System wurden verschiedene Maßnahmen ergriffen:

2.3.4.1 Konstruktion einer Wärmekammer

In eine Styroporkiste wurde in den Deckel ein Rechteck geschnitten und ein durchsichtiger Einsatz eingebaut, um ein Sichtfenster zu konstruieren. Auf der gegenüberliegenden Seite wurden zwei Löcher für den Durchtritt der Kabel des Pumpensystems gebohrt. Die Seitenwand wurde mit weiteren zwei Durchtrittsstellen für die Schläuche des Pumpensystems versehen. Zusätzlich wurde die Kammer durch einliegende Heizfolien gewärmt. Die Temperaturkontrolle in der Kammer erfolgte

manuell. Die *Fluidic Unit* des Pumpsystems wurde inklusive eines Perfusionssystems in die Wärmekammer eingebaut.

Wärmeverluste durch Öffnen der Wärmekammer bei Änderungen des Flussmediums sollen vermieden werden. Daher erfolgten die Befüllung und Entleerung über die extern gelegenen Schnittstellen der Sensoren unter Zuhilfenahme von Einwegspritzen.

2.3.4.2 Isolation des Schlauchsystems

Aufgrund der zwischengeschalteten Messeinheiten ließ sich der Schlauchanteil außerhalb von Wärme- und Klimakammer nur teilweise reduzieren. Diese Anteile wurden unter Aussparung der Schnittstellen für die Sensoren mit handelsüblicher Aluminiumfolie umwickelt. Dabei wurde zur optimalen Ausnutzung der Reflexion der Wärmestrahlung die glänzende Seite der Folie nach innen gewandt. Anschließend wurden die auf diese Weise präparierten Schläuche abschnittsweise in Silikonschläuche mit größerem Durchmesser geschoben. Die offenen Schlauchenden der größeren Silikonschläuche wurden mit Zuschnitten aus Aluminiumfolie und Klebeband verschlossen (Abbildung 10).

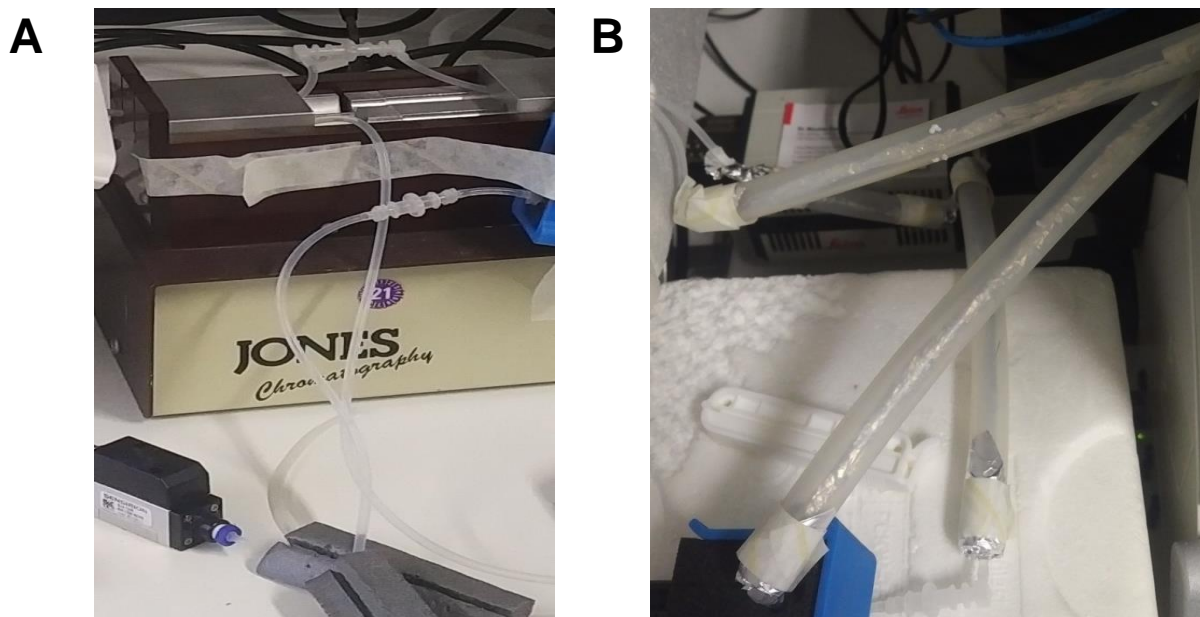


Abbildung 10: Isolation des Schlauchsystems. A: Schlauchsystem ohne Isolation. Die Silikonschläuche haben einen Innendurchmesser von 1,6mm. B: Schlauchsystem mit Isolation. Die Silikonschläuche wurden mit Alufolie umwickelt und anschließend in Silikonschläuche größeren Durchmessers gebracht. Die äußeren Schläuche wurden an den offenen Enden mit Alufolie und Klebeband verschlossen. Das Bild zeigt die Isolation drei einzelner Schlauchabschnitte unter Aussparung der Sensorschnittstellen.

2.3.4.3 Temperaturmessungen an einzelnen Modellkomponenten

Um die erfolgreiche Wärmeisolation des Systems zu prüfen, wurden Messungen an Ein- und Austrittspunkten der Wärmekammer, in der Klimakammer des Mikroskops, sowie an verschiedenen Stellen der Verbindungsschläuche durchgeführt. Zu diesem Zwecke wurden ein Handthermometer, sowie ein Temperatursensor herangezogen. Als Messmedium diente vollentsalztes Wasser. Das Thermometer wurde über eine entsprechende Öffnung in die Wärmekammer eingeführt und die Temperatur kontinuierlich überwacht. Analog hierzu wurden ebenfalls Messungen in der Klimakammer durchgeführt. Ein möglicher Temperaturverlust über das Schlauchsystem konnte mittels eines zwischengeschalteten Temperatursensors über die Steuerungssoftware verfolgt werden.

Im Rahmen der Weiterführung des Projektes nach Abschluss dieser Arbeit wurden zudem Temperaturmessungen mit einem Handthermometer bezüglich Plasma und Serum in der *Fluidic Unit* während der zeitgleichen Verwendung des Wärmeschrankes durchgeführt.

2.3.5 Kalibrierung des Flusssensors

Eine entsprechende Kalibrierung an Proband:innenplasma wurde mit dem Ziel, einen Umrechnungsfaktor zu erhalten, durchgeführt. Unter Zuhilfenahme einer Spritzenpumpe wurden Flussmessungen durchgeführt. Die Kalibrierung erfolgte mit 14mL Humanserum und 14mL gefrorenem Frischplasma (*fresh frozen plasma*, FFP). Die durch den Sensor ermittelten Flusswerte wurden den durch die Spritzenpumpe erzeugten Flussgeschwindigkeiten gegenübergestellt.

Es wurden medienspezifisch Mittelwerte der durch den Flusssensor ermittelten Flussgeschwindigkeiten bestimmt. Die Umrechnungsfaktoren ergaben sich aus dem Verhältnis des an der Spritzenpumpe eingestellten realen Flussgeschwindigkeiten und der entsprechenden Mittelwerte.

2.4 Vorbereitung von Proband:innenmaterial für Versuche mit Blutplasma

Im vorliegenden Versuchsaufbau wurde humanes Plasma eingesetzt. In einem ersten Ansatz wurde Spender:innenplasma aus FFP aus der Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Regensburg verwendet (vergleiche noch nicht publizierte

Dissertation von I. Heim). Für nachfolgende Versuche wurde das Plasma aus Vollblutproben gesunder Spender:innen gewonnen. Einige Versuche wurden zudem mit filtriertem Plasma aus Vollblutproben durchgeführt.

2.4.1 Plasmaherstellung

Die Blutabnahme erfolgte über die Venenpunktion mit einer Flügelkanüle. Es wurde darauf geachtet, dass die Monovetten vollständig gefüllt und Schaumbildung vermieden wurde. Außerdem wurde eine geringe und kurze Stauung angestrebt. Die Monovetten wurden nach Abnahme gemischt und zur Vermeidung von Thrombozytenaktivierung durch Kühlung bei Raumtemperatur (RT) weiterbearbeitet.

Im Vorfeld der Perfusionsversuche wurden verschiedene Zentrifugationsmodelle (siehe Tabelle 5) zur möglichst schonenden Gewinnung von thrombozytenfreiem Plasma (*platelet free plasma*, PFP) durchgeführt. Die Reinheit der hergestellten Plasmaproben wurde mittels Zytospin und Durchflusszytometrie überprüft und das Herstellungsprotokoll angepasst. Das Ausgangsprotokoll basierte auf der Beschreibung der PFP-Herstellung in einer Arbeit von B.A. Herbig und S.L. Diamond (25). Mit Zentrifugation 1 wurden, neben der in der erwähnten Literatur benannten Option, weitere Möglichkeiten der Herstellung von thrombozytenreichem Plasma (*platelet rich plasma*, PRP) eruiert. Es handelt sich dabei einerseits um die empfohlene Zentrifugationsgeschwindigkeit zur Gewinnung von thrombozytenarmem Plasma (*platelet poor plasma*, PPP) (61). Andererseits wurde eine geringere Zentrifugationsgeschwindigkeit gewählt, um der initialen Destruktion von Zellen entgegenzuwirken. Basierend auf den Untersuchungsergebnissen der jeweils vorausgehenden Zentrifugation, wurde der Zentrifugationsablauf hinsichtlich Zentrifugationsgeschwindigkeit in g (entspricht 9,81m/s) und Zentrifugationsdauer in Minuten (min) verändert.

Zentri- fugation	Modell 1	Modell 2				Modell 3					
1	1500g 15min	190g 10min				300g 10min (3.0)					
2	-	4000 g 10min				10000g 5min (3.1)		4000g 10min (3.2)		4000g 30min (3.3)	
3	-	10000g 5min (2.1)	20000g 5min (2.2)	10000g 5min (3.4)	20000g 5min (3.5)	4000g 10min (3.6)		10000g 5min (3.7)	20000g 5min (3.8)	-	
4	-	-	-	-	-	4000g 10min (3.9)	6000g 10min (3.10)	10000g 5min (3.11)	10000g 5min (3.12)	-	

Tabelle 5: Zentrifugationsbedingungen zur Plasmaherstellung. Die Zentrifugationsmodelle wurden ausgehend von einer Arbeit von B.A.Herbig und S.L. Diamond (25) erstellt und modifiziert. Die Untersuchung der jeweiligen Zentrifugationsstufen erfolgte mittels Zytopspinanalytik und Durchflusszytometrie. In Form von einer Nummerierung der Proben in runden Klammern erfolgt eine Zuordnung der Proben zu den in den Ergebnissen (Kapitel 3) aufgeführten Untersuchungsergebnissen.

2.4.1.1 Gewinnung von PFP aus Vollblut

Pro Versuch wird ein Mindestvolumen von 14mL PFP benötigt. Daher musste im Vorfeld der Anteil an PFP aus einer Vollblutprobe bestimmt werden. Hierfür wurde repräsentativ ein vollständig befülltes Heparin-Blutentnahmeröhrchen für 15min bei 1500g bei RT zentrifugiert. Im Bereich des Überstandes wurden jeweils im Abstand von 1mL Markierungen angebracht. Anschließend wurde je eine Plasmaprobe von 200 μ L aus jedem Markierungsbereich entnommen. Der Thrombozytengehalt der Proben wurde anschließend durchflusszytometrisch bestimmt.

Hierzu wurden die Proben mit jeweils 100 μ L 1% Paraformaldehyd fixiert. Nach einer Inkubation von 30min bei RT wurden die Proben mit jeweils 0,5mL bovinem Serumalbumin in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS/BSA) 0,5% gewaschen. An diesen Reinigungsschritt schloss sich ein Befüllen aller verwendeten Mikroreaktionsgefäße mit 2mL PBS/BSA 0,5% an. Es folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 520g bei 22°C. Der Überstand wurde abgekippt und auf Zellstoff abgetropft.

Dem Pellet wurden je 5 μ L CD61-Antikörper und 1 μ L eines Maus-anti-human CD62p-Antikörpers zugefügt. Anschließend wurden die Proben im Dunklen bei RT für 45min verwahrt. Die anschließende Reinigung erfolgte wie zuvor mit PBS/BSA 0,5%. Zur Resuspension wurden je 500 μ L PBS/BSA 0,5% verwendet. Die Analyse erfolgte mittels eines BD FACSCalibur Durchflusszytometers (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA). Das *Gate* wurde auf 10000 Ereignisse/Sekunde gesetzt. Die quantitative Auswertung erfolgte in Form von *Dotplots* mittels der Software FlowJo_V10 (FlowJo LLC, Ashland, USA).

2.4.1.2 Zytopspinanalyse der Plasmaproben

Für die Zytopspinanalyse wurde nach jedem Zentrifugationsschritt ein Aliquot von 300 μ L entnommen. Das Protokoll zur weiteren Probenvorbereitung und -verarbeitung im Hinblick auf eine Zytopspinanalyse ist im Anhang unter 7.2.1 detailliert aufgeführt.

2.4.1.3 Durchflusszytometrische Analyse der Plasmaproben

Für die durchflusszytometrische Analyse wurde ein Aliquot jeder Probe (200µL) entnommen und gesplittet, um zu jeder Positivprobe (mit Antikörpern) eine ungefärbte Referenzprobe (ohne Antikörper) zu erhalten.

Das Protokoll zur weiteren Probenvorbereitung und –verarbeitung ist dem Anhang unter 7.2.2 zu entnehmen. Die Analyse erfolgte mittels eines BD FACSCalibur Durchflusszytometers.

2.4.2 Probenfiltrierung nach erfolgter Zentrifugation

Ein weiterer Aufreinigungsschritt war eine abschließende Filtration der Plasmaproben durch einen 0,2µm Spritzenfilter.

Das filtrierte Plasma wurde anschließend in einigen Perfusionsversuchen verwendet.

2.5 Untersuchungen zur Klotbildung mit Plasma am ECMO-Modell

Es wurden Untersuchungen zur Klotbildung mit Plasma durchgeführt. Plasmaproben wurden modifiziert eingesetzt (siehe unten). Dazu gehörte auch die Perfusion mit filtrierte Plasma.

2.5.1 Druckabhängige Untersuchungen mit PFP

Vollblutproben zur PFP-Gewinnung wurden am Morgen des jeweiligen Versuchstages von freiwilligen Proband:innen wahlweise mit EDTA-, Citrat- oder heparinbeschichteten Monovetten entnommen und anschließend in mehreren Zentrifugationsschritten weiterverarbeitet. Die hierbei verwendete Zentrifugationsmethode war nach den Ergebnissen der Plasmaherstellungsversuche (vergleiche Kapitel 3.3) ausgewählt worden. Es handelte sich demnach um folgendes Zentrifugationsschema: 300g für 10min, Abnahme des Überstandes und Zentrifugation bei 4000g für 10min, Abnahme des Überstandes und Zentrifugation bei 4000g für 10min, Abnahme des Überstandes und Zentrifugation bei 4000g für 10min. Das Zentrifugationsschema wurde unabhängig von der gewählten Antikoagulation beibehalten. Die Wahl des gewählten Antikoagulans belief sich aus logistischen Gründen zunächst auf EDTA und Citrat. Im weiteren Verlauf erfolgte ein Wechsel zu Heparin, um eine Monoantikoagulation zu gewährleisten. Die Ergebnisse der Versuche mit unterschiedlichen Antikoagulanzen wurden untereinander

verglichen, um gegebenenfalls einen antikoagulansspezifischen Effekt zu berücksichtigen.

2.5.1.1 Untersuchungen bei variablem Pumpendruck

Der Perfusionsversuch wurde bei maximalem Pumpendruck, 100mbar, begonnen und die Aufnahme mit Phasenkontrast am Mikroskop gestartet. Nach fünf Zyklen (ein Zyklus entspricht einer Ventilumschaltung der Pumpe) wurde der Druck um 5mbar erniedrigt. Temperaturstabilität und Konstanz der Flussgeschwindigkeit wurden durchgehend überwacht. Der Versuch wurde mit Citrat-Plasma und EDTA-Plasma durchgeführt.

Aus den ermittelten Daten wurden Berechnungen bezüglich Scherspannungen angestellt und eine Abschätzung der Volumen-Strömungsverhältnisse unter der Annahme laminarer Strömungsbedingungen durchgeführt.

2.5.1.2 Untersuchungen bei konstantem Pumpendruck

Um nähere Informationen über das Klotverhalten bei hohen, mittleren und hohen Flussraten zu erhalten, sowie um eine zeitliche Abhängigkeit zu berücksichtigen, wurden mehrstündige Versuche bei 100mbar, 50mbar und 5mbar durchgeführt. Der Druck wurde jeweils unverändert gehalten und in 30-minütigen Zeitintervallen Temperatur und Flussrate überprüft und tabellarisch festgehalten. Die Versuche wurden jeweils mit dem Plasma einer anderen Probandin bzw. eines anderen Probanden erneut durchgeführt.

2.5.2 Wirksamkeit verschiedener Antikoagulanzen unter Flussbedingungen

Um zu überprüfen, inwiefern die Wahl des Antikoagulans Einfluss auf die Klotbildung an der Gasfaser hat, wurden verschiedene Substanzen im Versuchsaufbau getestet.

2.5.2.1 Untersuchung einer zusätzlichen Heparinisierung von bereits antikoaguliertem Plasma

Aufgrund von Aggregatbildungen, sowohl im Citrat-Plasma, als auch im heparinisierten Plasma, während der Perfusionsversuche, wurden weitere Versuche mit heparinisiertem Plasma durchgeführt und die Heparinkonzentration erhöht. Der Wechsel auf heparinisiertes Plasma erfolgte an dieser Stelle, um eine

Monoantikoagulation zu gewährleisten. Unter der Annahme, dass, nach mehrmaligem Zentrifugieren der mit Heparin antikoagulierten Vollblutprobe, die Konzentration des Antikoagulans nicht mehr ausreichend hoch war, wurden dem hergestellten PFP zusätzlich weitere 100IE Heparin zugesetzt. Die Probe wurde unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors 1:11 (vergleiche 2.3.3). in das Perfusionssystem eingebracht. Der Versuch wurde bei einem Druck von 5mbar über eine Zeitspanne von zwei Stunden durchgeführt.

2.5.2.2 Untersuchung des Einflusses einer Heparinspülung des Systems auf das Flussverhalten von doppelt Heparin-antikoaguliertem Plasma

Wie unter 2.5.2.1 beschrieben, wurde das Proband:innenplasma mit 100IE Heparin versetzt. Zusätzlich wurde das Perfusionsmodell vorab für 60min mit einer 10%-igen Heparinlösung gespült.

2.5.3 Untersuchung des Klots

Nach durchgeführten Perfusionsversuchen mit Plasma wurden Klots mithilfe eines Spatels aus dem ECMO-Modell in ein Reaktionsgefäß überführt und analysiert.

2.5.3.1 Histologische Untersuchung der Klots nach Perfusion

Es wurden Paraffinschnitte für die Lichtmikroskopie, sowie für die Fluoreszenz-Mikroskopie angefertigt. Für das ausführliche Protokoll zur Probenvorbereitung und -verarbeitung, sowie zur Antikörperfärbung wird auf den Anhang unter 7.2.3 verwiesen.

2.5.3.2 Klotauflösung mit Gewebeplasminogenaktivator (*tissue plasminogen activator*, tPA) und Trypsin

Eine etwa 100mg schwere Klotprobe wurde einem Lyseversuch mit tPA unterzogen. Es wurde mit tPA in einer Konzentration von 2mg/mL gearbeitet. Die benetzte Probe wurde bei 37°C für 18 Stunden bewegt gelagert. Anschließend wurde die Probe mit einer unveränderten Klotprobe makroskopisch und hinsichtlich der Feuchtmasse verglichen.

Zusätzlich wurde die Auflösbarkeit des Klots mit Trypsin untersucht. Der beschriebenen Klotprobe wurde mit Filterpapier die Flüssigkeit entzogen und die

Feuchtmasse bestimmt. Die Probe wurde mit Trypsin vollständig bedeckt. Die Probe wurde bei 37°C bewegt gelagert. Nach drei Stunden wurde der Probe erneut mit Filterpapier die Flüssigkeit entzogen und die neue Feuchtmasse bestimmt.

2.5.4 Untersuchungen zum Einfluss von Oberflächenbeschaffenheit und Strömungsphysiologie im Perfusionssystem

Eine Problematik beim Arbeiten mit Plasma im Perfusionsmodell war die zunehmende Trübung bis hin zur Okklusion des gesamten Systems (vergleiche Kapitel 3.4). Um die Systembeschaffenheit als Ursache für eine materialinduzierte Klotbildung ausschließen zu können, wurden die Bestandteile des Systems hinsichtlich einer Klotbildung untersucht.

2.5.4.1 Einfluss der Materialbeschaffenheit des Systems

Das ECMO-Modell setzt sich aus verschiedenartigen Materialien zusammen. Neben Silikon sind vor allem synthetische Polymere (Polystyrol, Polyethylen, Polymethylpenten) verbaut. Der Einfluss der Materialbeschaffenheit wurde in einem Standversuch untersucht.

Eine Spritze des Pumpsystems, ein Silikonschlauchstück und ein gasfaserfreier Ibidi-*Slide* wurden mit Plasma befüllt und für 180min im Brutschrank bei 37°C gelagert. Die Flüssigkeitssäule wurde hierbei nicht bewegt. Vor Beginn und nach Beendigung des Versuches wurde der pH-Wert des Plasmas mit Indikatorpapier ermittelt. Der Versuch wurde sowohl mit heparinisiertem Plasma, als auch mit Citrat-Plasma von gesunden Proband:innen durchgeführt.

2.5.4.2 Einfluss des Ibidi-Slides

Um eine Klotinduktion durch den *Slide* selbst zu untersuchen, wurden Perfusionsversuche im Schlauchsystem ohne *Slide* durchgeführt. Der *Slide* wurde durch ein Verbindungsstück (*Female Luer Lock Coupler*) ersetzt, während die Eck-Konnektoren im System belassen wurden. Darüber hinaus wurde das Perfusionsmodell gegenüber den Versuchen mit eingebautem Ibidi-*Slide* unverändert gelassen. Es wurden Pumpversuche mit einer Dauer von 90min bei einer Ausgangstemperatur von 37°C und physiologischem pCO₂ (35-45mmHg) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden den Ergebnissen der Versuche mit eingebautem Ibidi-*Slide* vergleichend gegenübergestellt.

2.5.4.3 Einfluss der Luer-Konnektoren

Das Perfusionssystem beinhaltet an zwei Sensorschnittstellen, sowie an den Einlässen des Ibidi-Slides Eck-Konnektoren (*Elbow Luer Connector Male*). Aufgrund möglicher ungünstiger Strömungseigenschaften wurde ein Eck-Konnektor zur näheren Untersuchung einem Computertomographie(CT)-Scan unterzogen. Darauf basierend wurden strömungsmechanische Berechnungen angestellt.

Weiterhin wurden vergleichende Perfusionsversuche mit und ohne Verwendung von Eck-Konnektoren durchgeführt. Dazu wurde lediglich eine Sensorschnittstelle im Perfusionsmodell belassen. In einem ersten Versuchsdurchlauf wurde diese aus zwei Eck-Konnektoren und einem Verbindungsstück zusammengesetzt, in einem zweiten Versuch aus zwei geraden Konnektoren und einem Verbindungsstück. Alle Sensoren wurden aus dem System ausgebaut.

Der Versuch wurde sowohl mit Serumproben als auch mit Plasmaproben durchgeführt. Die Plasmaproben wurden in einem Versuchsablauf filtriert (siehe 22.4.2) und in einem anderen Versuchsablauf ohne Filtration verwendet.

Die Versuchsdauer belief sich jeweils auf 90min.

Im Anschluss an die Versuche mit Plasma wurden Aliquots der jeweiligen Proben in Eppendorf-Kapsel bei 17000g für 20min zentrifugiert. Vergleichend wurde das Überstand-Bodensatz-Verhältnis bestimmt.

2.5.5 Untersuchung des pH-Wertes als Einflussfaktor auf die Klotbildung

In mehreren Versuchen wurden pH-Wert-Bestimmungen mit Indikatorpapier vorgenommen. Die Bestimmungen erfolgten vor dem Einfüllen des Plasmas in das Perfusionssystem und nach der Entnahme nach Beendigung des Versuches.

2.6 Untersuchungen zur Klotbildung am ECMO-Modell mit Serum

Es wurden Untersuchungen zur Klotbildung mit Serum durchgeführt. Serum diente zunächst als Negativkontrolle zu den Plasmaproben. Aufgrund fehlender Gerinnungsfaktoren sollte keine Gerinnung stattfinden. Die Versuche wurden mit Serum und handelsüblichem aufgereinigtem vWF/Faktor VIII (FVIII) durchgeführt.

2.6.1 Vorbereitung von Probenmaterial für Versuche mit Blutserum

Im vorliegenden Versuchsaufbau wurden einige Versuche mit humanem Proband:innenserum durchgeführt. Hierfür wurde Vollblut in Serum-Monovetten mit Gerinnungsaktivator überführt und koaguliert. Anschließend wurde die Probe bei 3023g für 10min zentrifugiert. Die Serumproben wurden nach erfolgter Zentrifugation nicht filtriert.

Weitere Versuche wurden unter Verwendung von bereits fertig aufbereitetem Humanserum durchgeführt (Human Serum, Sigma-Aldrich).

2.6.2 Versuchsdurchführung mit Serum

Serum diente als stabiles Basismedium unter Zugabe eines handelsüblichen FVIII-konjugierten vWF (Fahndi; Grifols) zum Nachweis der vWF-Fadenbildung in der Perfusionsanlage. Der FVIII-konjugierte vWF wird nachfolgend als vWF/FVIII-Kombipräparat bezeichnet. Frisch präpariertes Serum wurde mit einer Pipette abgenommen und vor der Applikation in das Perfusionsmodell in ein 12mL-Röhrchen überführt und mit 6mL des vWF/FVIII-Kombipräparates versetzt. Anschließend wurde die Probe mit einer Einmalspritze in die Perfusionsanlage gegeben.

2.6.2.1 Untersuchungen bei variablem Pumpendruck ohne Zugabe weiterer Faktoren

Das System wurde anfänglich mit Kochsalzlösung auf 37°C geheizt. Die Temperatur-, CO₂- und Flusskontrolle erfolgten über in das System integrierte Sensoren.

Gemäß der unter 2.3.3 beschriebenen Systematik wurde die, sich im Modell befindende, Menge an Kochsalzlösung reduziert und das Serum hinzugegeben.

Mit der Inbetriebnahme des Pumpsystems wurde zeitgleich die Aufzeichnung am Mikroskop begonnen. Im Laufe des Versuches wurde der Pumpendruck von 100mbar in Fünfer- bis Zehnerschritten auf 5mbar gesenkt. Im Anschluss wurde der Druck binnen 0,5min wieder hochgestellt auf 100mbar.

Die Laufdauer des Versuchs belief sich auf circa drei Stunden.

Nachfolgend wurde der Versuch mit gepooltem Humanserum unter den gleichen Bedingungen durchgeführt.

2.6.2.2 Untersuchungen bei variablem Pumpendruck unter Zugabe von vWF

Mit dem vWF/FVIII-Kombipräparat wurde dem Serum das zu untersuchende Protein zugeführt. Dem Serum wurden 6mL des vWF/FVIII-Kombipräparates zugesetzt. Gemäß der unter 2.3.3 beschriebenen Systematik wurde die sich im Modell befindende Menge an Kochsalzlösung reduziert und die Probe hinzugegeben.

Mit der Inbetriebnahme des Pumpsystems wurde zeitgleich die Aufzeichnung am Mikroskop begonnen. Der Versuch wurde bei einem Pumpendruck von 20mbar gestartet. Nach einer halben Stunde wurde der Fluss auf 55mbar erhöht. Anschließend wurde in Zeitabständen von einer Stunde der Fluss auf 85mbar, dann auf das Maximum von 100mbar gesteigert.

Der Versuch wurde dreimal durchgeführt. Zweimal erfolgte die Durchführung mit Proband:innenserum, einmal mit gepooltem Humanserum. Die Versuchsdauer belief sich auf jeweils viereinhalb Stunden.

2.6.2.3 Untersuchungen bei konstantem Pumpendruck unter Zugabe von vWF

Dem Serum wurden 6mL des vWF/FVIII-Kombipräparates zugesetzt. Gemäß der unter 2.3.3 beschriebenen Systematik wurde die sich im Modell befindende Menge an Kochsalzlösung reduziert und die Probe hinzugegeben.

Der Versuch wurde bei einem Pumpendruck von 85mbar und einem maximalen Pumpendruck von 100mbar durchgeführt.

Sobald die Bildung von fadenartigen Strukturen beobachtet werden konnte, wurde die Bildaufnahme am Fluoreszenzmikroskop gestartet und ein vWF-Antikörper über einen Port in das Perfusionsmodell eingebracht, ohne den kontinuierlichen Fluss zu unterbrechen.

Der Versuch wurde siebenmal durchgeführt. Neben Proband:innenserum (n=5) wurde ebenfalls gepooltes Humanserum (n=2) (Human Serum, Sigma-Aldrich) eingesetzt.

2.7 Perfusionsversuch mit Albumin

Albumin spielt eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks und gilt als das Protein mit der höchsten Konzentration im Blut. Es erfolgte eine Untersuchung des Albumins als Komponente bei der Klotbildung.

Das gereinigte Perfusionsmodell wurde mit 16mL 7,5% bovinem Serumalbumin (*bovine serum albumin*, BSA) befüllt und der Pumpvorgang gestartet. Basierend auf Beobachtungen vorheriger Versuche wurde der Versuch bei einem Pumpendruck von 5mbar durchgeführt.

Der Versuch wurde über zwei Stunden unter kontinuierlicher Überwachung von Flussgeschwindigkeit und Temperaturstabilität durchgeführt.

Nach zwei Stunden wurde der Pumpendruck ohne das Medium auszutauschen auf 100mbar erhöht.

Der Versuch wurde erneut über einen Zeitraum von zwei Stunden unter Überwachung von Flussgeschwindigkeit und Temperaturstabilität durchgeführt.

In Analogie zum früheren Verfahren des *Primings* von Silikon-Membranoxygenatoren mit Humanalbumin erfolgte anschließend die Durchführung eines Plasmaperfusionsversuches bei 5mbar.

Zudem wurde ein Serumversuch mit Proband:innenserum unter Zugabe eines vWF/FVIII-Kombipräparates wie unter 2.6.2.3 beschrieben bei hohen Pumpendrücken durchgeführt. Bei Präzipitatbildung wurde ein Albumin-Antikörper hinzugegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Allgemeiner Überblick

Die nachfolgende Tabelle (Tabelle 6) gibt einen Überblick über die aus den zuvor beschriebenen Untersuchungen gewonnenen Ergebnisse. Die Gliederung der Tabelle ist dabei an die Projektskizze (vergleiche Kapitel 1.6) angelehnt und folgt dem gleichen Aufbau wie das vorangegangene Kapitel 2 (Material und Methoden). Die Tabelle fasst neben einem groben Überblick über die einzelnen Versuche, deren Bedingungen, sowie Ergebnisse zusammen. Für detaillierte Ergebnisdarstellungen wird in der letzten Spalte auf die entsprechenden Ausführungen in den nachfolgenden Abschnitten verwiesen.

	Versuch	Bedingungen	Beobachtung/Ergebnis	Kapitel
Systemaufbau und -optimierung	Konstruktion einer Wärmekammer	Siehe 2.3.4.1	Erhitzen der <i>Fluidic Unit</i> und der sich darin befindenden Flüssigkeit	3.2.1
	Isolation von Schlauchstücken	Siehe 2.3.4.2	In den vermessenen Systemabschnitten kann Temperaturstabilität bei physiologischen Werten gewährleistet werden	3.2.2
	Kalibrierung des Flusssensors	Einstellen eines definierten Perfusorflusses, Abgleich mit den angezeigten Sensorflüssen und rechnerische Bestimmung eines Korrekturfaktors	Es wurden für FFP und Humanserum spezifische Korrekturfaktoren ermittelt	3.2.3
Herstellung und Verwendung von Blutplasma	Gewinnung von PFP aus Vollblut	Zentrifugation einer Vollblutprobe bei 1500g/10min, Abnahme von Plasmaproben in Abständen von 1mL, FACS-Analyse	Keine Schichtung der Thrombozytendichte im Zentrifugat nachweisbar	3.3.1
	Testung verschiedener Zentrifugationsbedingungen zur Plasmaherstellung	Vergleiche Tabelle 5	Das zell- und debrisärmste Ergebnis liefert die Plasmaherstellung mit: 1) 300g/10min 2) 4000g/10min 3) 4000g/10min 4) 4000g/10min	3.3.2
	Plasmafiltrierung	Filtrierung der Proben mit 2µm Spritzenfiltern	Eintrübung der Plasmaprobe, eine Klotbildung bleibt aus	3.3.3
	Untersuchungen bei variablem Pumpendruck	Variation des Flusses über Drücke zwischen 5mbar und 100mbar	Bei hohen Drücken Klotbildung an der Gasfaser	3.4.1
	Untersuchungen bei konstantem Pumpendruck	Versuche bei Pumpendrücken von 100mbar 50mbar 5mbar	100mbar: strömungsgerichtete Klotbildung an der Gasfaser 50mbar: strömungsgerichtete Klotbildung beobachtet 5mbar: Temperatur und Fluss sinken, massive Klotbildung unabhängig von der Gasfaser	3.4.2
Testung verschiedener Antikoagulanzen	Antikoagulation der Vollblutprobe mit 1) EDTA, 2) Citrat, 3) Heparin, Perfusionsversuche mit PFP	Klotbildung tritt unabhängig vom gewählten Antikoagulanz auf	3.4.3	
Untersuchung einer zusätzlichen Heparinisierung von bereits mit Heparin antikoagulierte Plasma	Zusatz von 20 -100IE Heparin zu bereits mit Heparin antikoagulierte Plasma	Temperatur- und Flussabfall, Obstruktion des Systems, Klotbildung zu beobachten	3.4.4	
Untersuchung des Einflusses einer Heparinspülung des Systems auf das Flussverhalten von doppelt Heparin-antikoagulierte Plasma	Zusatz von 100IE Heparin zu bereits mit Heparin antikoagulierte Plasma und Spülen des Perfusionsmodells mit Heparin	Nach 30min: Eintrübung des Plasmas Nach 60min: Fluss von 0,0mL/min, Klotbildung beobachtet	3.4.5	

	Versuch	Bedingungen	Beobachtung/Ergebnis	Kapitel
Herstellung und Verwendung von Blutplasma – Untersuchung eines Klots	Histologische Untersuchung	Erstellen eines Paraffinschnitts Färbungen: vWF, CD42, Fibrin, Fibrinogen	Der Klot besteht aus Fibrinogen, vWF und Thrombozyten	3.4.6.1
	Klotaufschluss mit <i>tissue Plasminogen Activator</i> (tPA)	Versetzen des Klots mit tPA (2mg/mL) und bewegte Lagerung für 18 Stunden bei 37°C	Der Klot lässt sich nicht mit tPA auflösen	3.4.6.2
	Klotaufschluss mit Trypsin	Versetzen des Klots mit Trypsin und bewegte Lagerung für 3 Stunden bei 37°C, vorher und nachher wiegen	Der Klot hat sich im Gewicht halbiert und wirkt makroskopisch strukturell instabil	3.4.6.2
Herstellung und Verwendung von Blutplasma – Die Materialbeschaffenheit als Einflussfaktor auf die Klotbildung	Standversuch mit einzelnen Modellkomponenten	Separate Standversuche in Schlauchsystem, Pumpenspritzen und Mikroskopslide bei 37°C mit 1) Citrat-Plasma, 2) heparinisierem Plasma	Unabhängig von der Antikoagulation ist in keiner Modellkomponente Klotbildung oder Eintrübung zu beobachten	3.4.7.1
	Perfusion bei konstanten Pumpendrücken ohne Slide	Proband:innenplasma (PPF) Versuche bei Pumpendrücken von 5 mbar	Ab 30min zunehmende Eintrübung des Plasmas, Klotbildung	3.4.7.2
	Untersuchung der Luer-Konnektoren	1) Mikro-CT-Scan und strömungsmechanische Berechnungen 2) Vergleichende Versuche mit und ohne Eck-Konnektoren mit a) Plasma und b) Serum	1) Der Eckkonnektor liefert hohe Scherraten 2) a) Plasma: unter Verwendung gerader Konnektoren verzögert sich die Klotbildung b) Serum: unter Verwendung gerader Konnektoren findet die Aggregatbildung nur an der Gasfaser statt	3.4.7.3
Herstellung und Verwendung von Blutplasma – pH-Wertänderungen als Einflussfaktor	Bestimmung des pH-Werts im Medium	Vor und nach Perfusionsversuchen pH-Wert-Bestimmung mittels Indikatorpapier	Der pH-Wert bleibt unabhängig von der Perfusionsdauer konstant bei 7,4	3.4.8
Herstellung und Verwendung von Blutserum	Untersuchungen bei variablem Pumpendruck	1) Proband:innenserum 2) Proband:innenserum mit vWF/FVIII-Kombipräparat, Nachweis mittels vWF-Antikörper	1) Keine Aggregatbildung feststellbar 2) Bildung vWF-positiver Aggregate bei hohen Pumpendrücken	3.5.1
	Untersuchungen bei konstanten Pumpendrücken	1) Proband:innenserum mit vWF/F VIII-Kombipräparat, Nachweis mittels vWF-Antikörper 2) Humanserum mit vWF/FVIII-Kombipräparat, Nachweis mittels vWF-Antikörper	1) Ausbildung fadenartiger, vWF-positiver Strukturen 2) Ausbildung fadenartiger vWF-positiver Strukturen	3.5.2
Verwendung von Bovinem Serumalbumin	Perfusionsversuch mit Rinderserumalbumin	Pumpversuch mit 16mL 7,5% BSA	Keine Klotbildung oder Eintrübung zu beobachten	3.6.1
	Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Albumin	Proband:innenserum mit vWF/FVIII-Kombipräparat, Nachweis mittels Albumin-Antikörper	Kein Albumin-Nachweis mittels Antikörper-Fluoreszenz	3.6.2

Tabelle 6: Allgemeiner Überblick über die Ergebnisse der Arbeit. Neben der Art des Versuches wurden zusammenfassend die Versuchsbedingungen und die entsprechenden Ergebnisse, sowie Verweise auf die detaillierte Ergebnisdarstellung aufgeführt

3.2 Effekte der Optimierungsmaßnahmen am Perfusionsmodell

Nachfolgend werden die Ergebnisse der Systemoptimierung am Perfusionsmodell dargestellt.

3.2.1 Einfluss der Verwendung einer Wärmekammer auf die Temperatur des Mediums

Im Anschluss an die Konstruktion wurde die Temperatur in der Wärmekammer gemessen und in Relation zu den Messwerten, welche der Temperatursensor in der Flüssigkeit aufzeichnete, gesetzt (Tabelle 7). Der Temperatursensor wurde, abweichend von der Anordnung in den folgenden Versuchen, direkt außerhalb der Wärmekammer angebracht. Die Messungen erfolgten bei einem Pumpendruck von 100mbar.

Zeit [min]	Temperatur in der Wärmekammer [°C]	Temperatur im Medium [°C]
0	38,8	37,8
10	45,6	37,6
20	45,8	37,6
30	46,9	37,7

Tabelle 7: Darstellung der Temperatur im Wärmeschrank und im Medium zu verschiedenen Messzeiten

Die Temperatur im Wärmeschrank stieg über 40°C an. Die Temperatur des den Wärmeschrank verlassenden Mediums wurde durch den Einbau des Temperatursensors unmittelbar nach Austritt des Schlauchsystems aus dem Wärmeschrank gemessen und überschritt über die Dauer der Messung den Wert von 38°C nicht.

Im Rahmen der Weiterführung des Projektes nach Abschluss dieser Arbeit wurden Temperaturmessungen des Serums bzw. des Plasmas in der *Fluidic Unit* bei zeitgleicher Verwendung des Wärmeschrankes durchgeführt. Hierbei wurden in den Medien Temperaturen von über 40°C festgestellt, während die Temperatur bei Verlassen des Wärmeschrankes weiterhin unter 40°C betrug. Diese Ergebnisse entstammen einer persönlichen Korrespondenz mit Simon Tümmler und werden daher mit seinem Einverständnis und ohne konkrete Zahlenwerte genannt.

3.2.2 Effekte der Isolation des Schlauchsystems bei verschiedenen Pumpendrücken

Wird das Perfusionsmodell ohne Schlauchisolierung mit Wasser oder einem anderen Medium betrieben, kühlt die Temperatur im Schlauchsystem ab auf circa 22°C. Mit dem Ziel, Perfusionsversuche bei physiologischen Temperaturen durchführen zu können, wurden die freiliegenden Schlauchabschnitte isoliert.

Die folgenden Tabellen zeigen die Temperaturwerte in der mikroskopeigenen Klimakammer, sowie im Schlauchsystem. Parallel dazu wurde jeweils die Flussgeschwindigkeit des Mediums bestimmt. Die Messungen wurden nacheinander bei Pumpendrücken von 100mbar (Tabelle 8), 50mbar (Tabelle 9) und 20mbar (Tabelle 10) durchgeführt.

Zeit [min]	Temperatur Klimakammer [°C]	Temperatur laut Sensor [°C]	Flussgeschwindigkeit [mL/min]
0	37,9	37,7	24,0
10	37,8	37,4	24,0
20	37,8	37,4	30,0
30	37,8	37,4	30,0

Tabelle 8: Vergleichende temperaturbezogene Untersuchungen bei 100mbar

Zeit [min]	Temperatur Klimakammer [°C]	Temperatur laut Sensor [°C]	Flussgeschwindigkeit [mL/min]
0	37,6	35,8	15,0
10	37,4	35,9	15,0
20	37,4	36,1	15,0
30	37,6	36,3	15,0

Tabelle 9: Vergleichende temperaturbezogene Untersuchungen bei 50mbar

Zeit [min]	Temperatur Klimakammer [°C]	Temperatur laut Sensor [°C]	Flussgeschwindigkeit [mL/min]
0	37,5	35,0	6,0
10	37,6	35,3	6,0
20	37,5	35,5	6,6
30	37,8	35,5	6,0

Tabelle 10: Vergleichende temperaturbezogene Untersuchungen bei 20mbar

Der bereits unter 3.2.1 bezüglich der Wärmekammer beschriebene Effekt, dass die Umgebungstemperatur höher ist als die Temperatur des Perfusionsmediums, wird erneut beobachtet.

Außerdem zeigt sich eine Abhängigkeit der Temperatur und der Flussgeschwindigkeit des Mediums vom angelegten Pumpendruck. Höhere Pumpendrücke gehen mit höheren Temperaturen und höheren Flussgeschwindigkeiten einher. Bei konstant gehaltenem Pumpendruck bleiben Temperatur und Flussgeschwindigkeit stabil.

3.2.3 Ermittlung eines Umrechnungsfaktors für verschiedenen Medien durch Kalibrierung des Flusssensors

Die Sensorkalibrierung erfolgte zunächst mit VE-Wasser, um das Verfahren zu prüfen. Anschließend wurden Messungen mit gefrorenem FFP und mit Humanserum durchgeführt. Die nachfolgende Tabelle (Tabelle 11) zeigt die ermittelten Messwerte.

Perfusorfluss [mL/min]	VE-Wasser Sensorfluss [mL/min]	FFP-Sensorfluss [mL/min]	Humanserum Sensorfluss [mL/min]
2	2,14	1,83	1,31
2	2,03	1,88	1,28
2	1,88	1,76	1,22
2	1,99	1,79	1,33
2	2,17	1,80	1,29
Mittelwerte	2,04	1,81	1,29
Standardabweichung	0,12	0,05	0,04
Umrechnungsfaktor	0,98	1,10	1,56

Tabelle 11: Kalibrierung des Flusssensors. Neben dem eingestellten Perfusorfluss wurden die mit dem Flusssensor ermittelten Volumenströme mit VE-Wasser, FFP und Humanserum aufgeführt. Daraus ergaben sich die aufgeführten Umrechnungsfaktoren.

Die mit dem Sensor ermittelten Flusswerte bei Einsatz von VE-Wasser stimmten im Mittel mit denen des Perfusors überein. Es ergaben sich ein Mittelwert von 2,04 und eine Standardabweichung von 0,12. Die mit dem Sensor ermittelten Werte für FFP und Humanserum lagen niedriger als die tatsächlichen Perfusorflüsse. Bei der Durchführung mit gefrorenem Frischplasma ergab sich ein mittlerer Sensorfluss von 1,81mL/min mit einer Standardabweichung von 0,05. Bei der Verwendung von Humanserum wurde ein mittlerer Sensorfluss von 1,29mL/min ermittelt. Die Standardabweichung betrug 0,04.

Aus den Mittelwerten wurde ein durchschnittlicher Umrechnungsfaktor ermittelt. Dieser betrug für gefrorenes Frischplasma 1,10 und für Humanserum 1,56.

3.3 Ergebnisse der Versuche zur Plasmavorbereitung und –herstellung

In den folgenden Abschnitten werden die Resultate der Untersuchungen bezüglich der Plasmavorbereitung und -herstellung dargestellt.

3.3.1 Untersuchung von PPP auf Fraktionierung

Es konnte keine Fraktionierung im Zentrifugat (1500g, 15min) nachgewiesen werden. Die durchflusszytometrische Analyse zeigt durchweg hohe Thrombozytendichten. Diese finden sich bereits ab 1mL unter dem Oberflächenspiegel. Diese Herstellung von PPP wurde daher für die Perfusionsversuche nicht verwendet.

3.3.2 Auswertung und Vergleich verschiedener Protokolle zur Plasmaherstellung mittels Durchflusszytometrie und Histologie

Nachfolgend werden die Ergebnisse der verschiedenen Zentrifugationsmodelle (Tabelle 5), die einer möglichst schonenden Gewinnung von PFP dienen sollten, und die Ergebnisse der Plasmafiltrierung dargestellt.

In den entsprechenden Abbildungen sind die Fluoreszenz-Aufnahmen bezüglich des vWF rot dargestellt. Für die Darstellung bezüglich des CD42-Antikörpers beziehungsweise CD62P-Antikörpers wurde grün gewählt. Die zusätzliche Untersuchung auf aktivierte Thrombozyten mit einem CD62p-Antikörper erfolgte ausschließlich bei den PRP-Proben.

Die Ergebnisse von Modell 1 der Plasmaherstellung (Tabelle 5) wurden bereits unter 3.3.1 geschildert.

In einem zweiten Ansatz wurde PRP über eine Zentrifugation bei 190g für 10min hergestellt (Abbildung 11). In der Färbung der Zytopinpräparate mit einem CD42-Antikörper zeigte sich ein thrombozytenreiches Bild. Es zeigten sich neben einzelnen Thrombozyten auch kleinere Thrombozytenaggregate mit granulärem vWF. Die weitere Zentrifugation bei 4000g für 10min ergab nach wie vor ein thrombozytenreiches Bild. Die CD42-

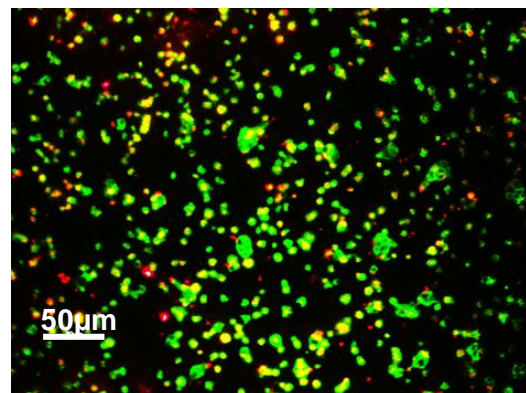


Abbildung 11: Überlagerung mit CD42-Antikörper (grün) und vWF-Antikörper (rot) in der Fluoreszenz-Mikroskopie (400x). Herstellung von PRP bei Zentrifugation bei 190g für 10min. Es zeigt sich ein thrombozytenreiches Bild mit kleineren Thrombozytenaggregaten. Die Thrombozyten stellten sich mehrheitlich als vWF-positive Strukturen dar.

Färbung zeigte darüber hinaus stellenweise eine Aggregatbildung der Thrombozyten. Ein Vergleich mit der vWF-Färbung wies diese Thrombozytenaggregate als vWF-positive Strukturen nach. Die vWF-Färbung zeigte weiterhin großflächig positiv angefärbte Bereiche in den Zytospinpräparaten. Fadenartige vWF-Strukturen konnten beobachtet werden (Abbildung 12).

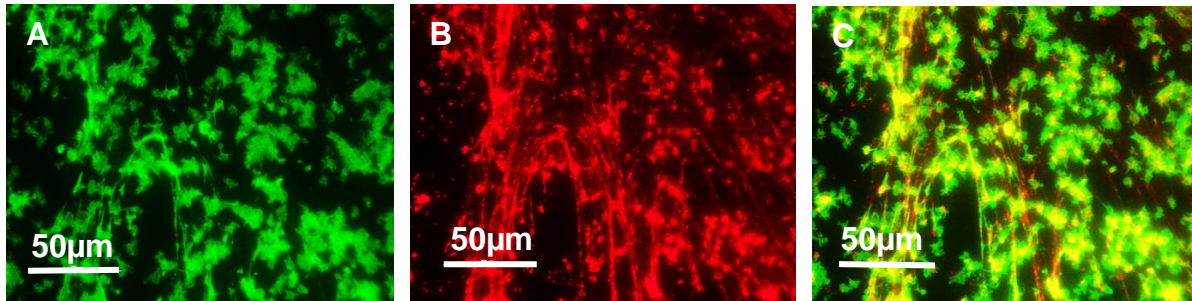


Abbildung 12: Fluoreszenz-Mikroskopie mit CD42-Antikörper (A), vWF-Antikörper (B) und Überlagerung (C) mit CD42-Antikörper (grün) und vWF-Antikörper (rot) (Alle 400x). Zentrifugation bei 190g für 10min und bei 4000g für 10min. A: Es zeigte sich ein thrombozytenreiches Bild. Die Thrombozyten bildeten Aggregate aus. B: Es zeigten sich großflächige vWF-positive Bereiche. Es wurden fadenartige Strukturen beobachtet C: Die Überlagerung stellte A und B als größtenteils kolokalisiert dar.

Im dritten Zentrifugationsschritt wurde eine Probe bei 10000g für 5min (Probe 2.1) zentrifugiert. Eine weitere Probe wurde bei 20000g für 5min (Probe 2.2) zentrifugiert. Es wurde kein Unterschied zwischen Probe 2.1 und Probe 2.2 festgestellt. In beiden Fällen zeigte sich ein stark von Zelldetritus geprägtes Bild (Abbildung 13).

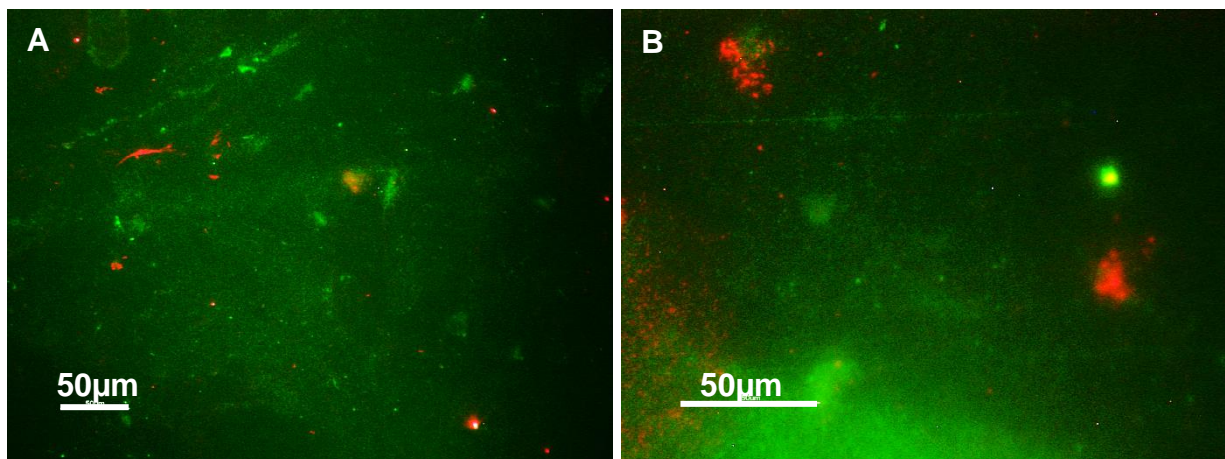
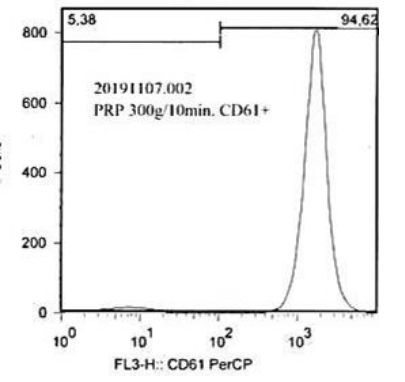
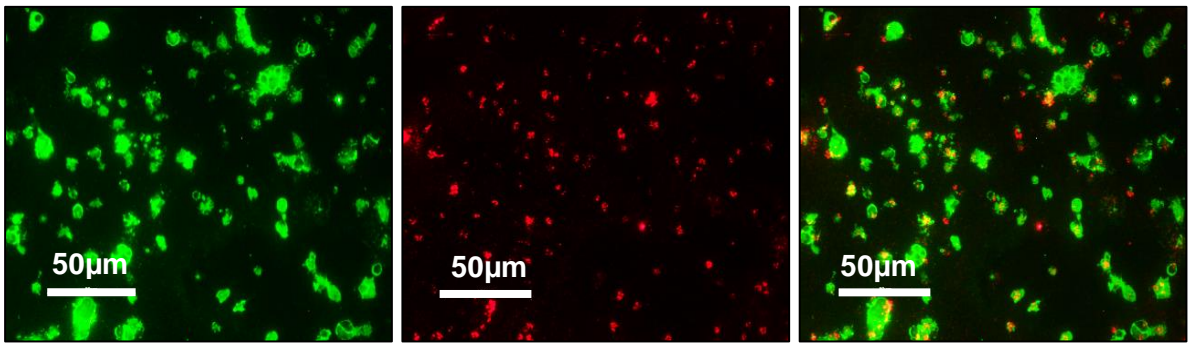
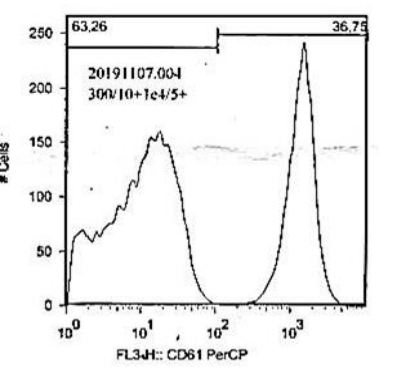
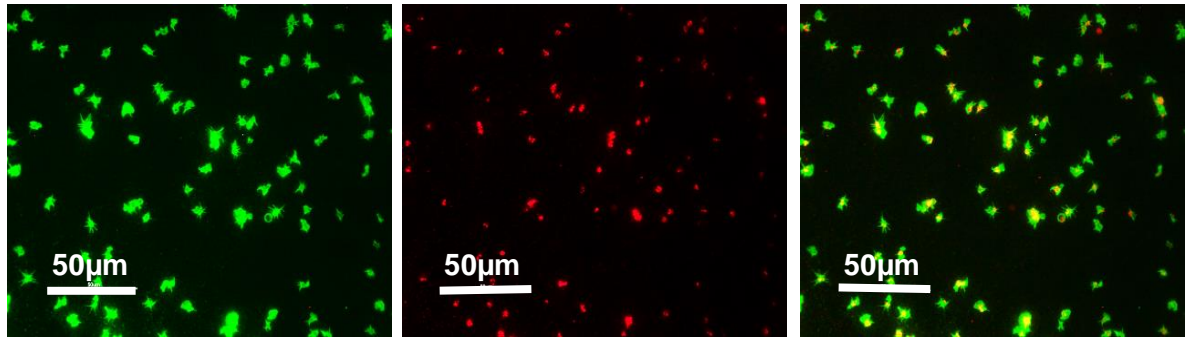


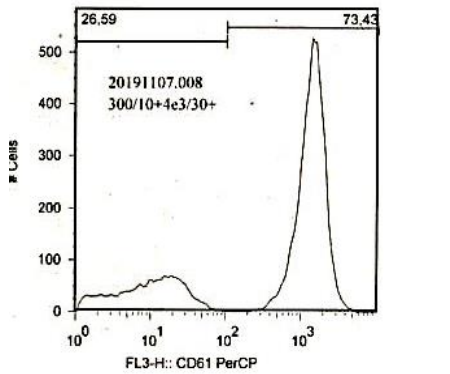
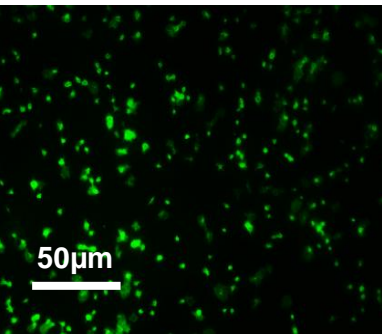
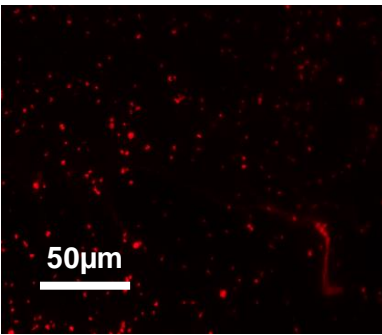
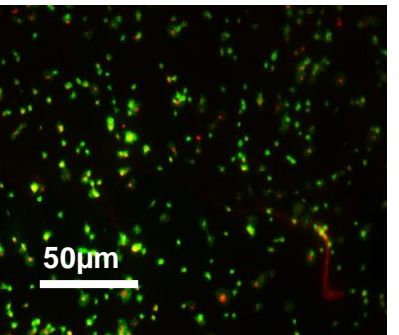
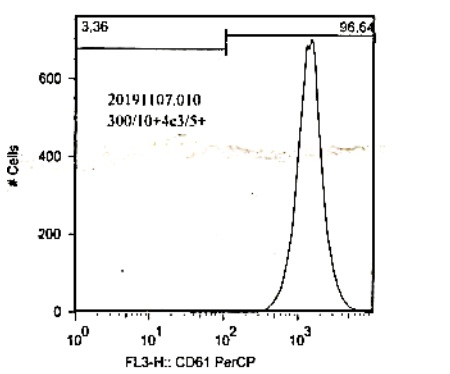
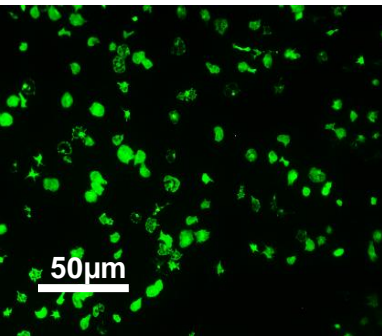
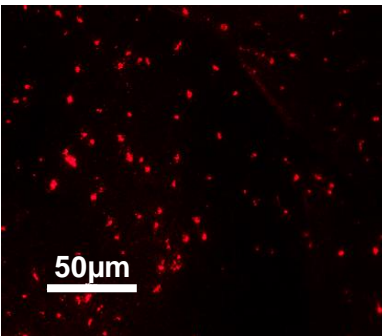
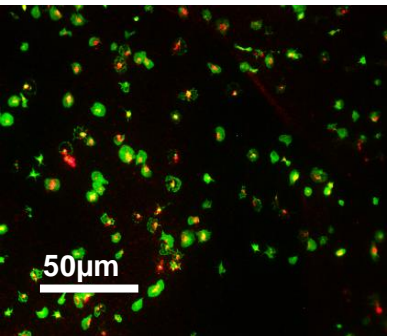
Abbildung 13: Fluoreszenzmikroskopie von Probe 2.1 (A) und Probe 2.2 (B) (400x). Darstellung der Überlagerungen mit CD42-Antikörper (grün) und vWF-Antikörper (rot). Herstellung durch Zentrifugation bei 190g für 10min, 4000g für 10min und 10000g für 5min (A) bzw. 20000g für 5min (B). In beiden Fällen zeigte sich ein von starkem Hintergrundrauschen dominiertes Bild. CD42-positive Strukturen und vWF-Strukturen waren nicht mehr eindeutig zu interpretieren.

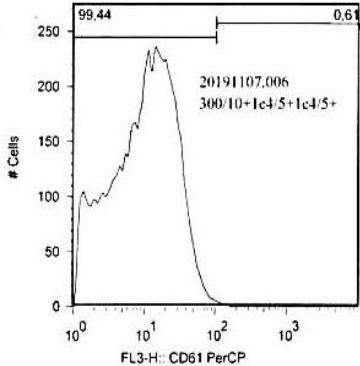
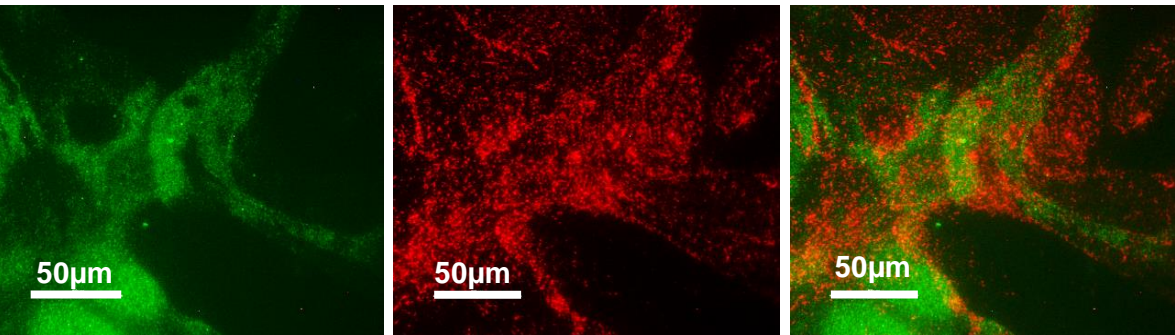
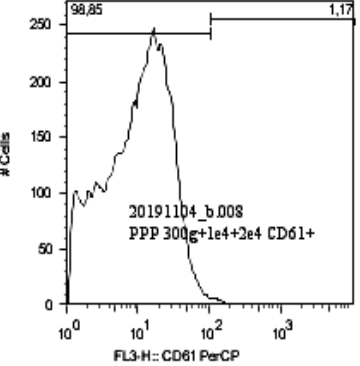
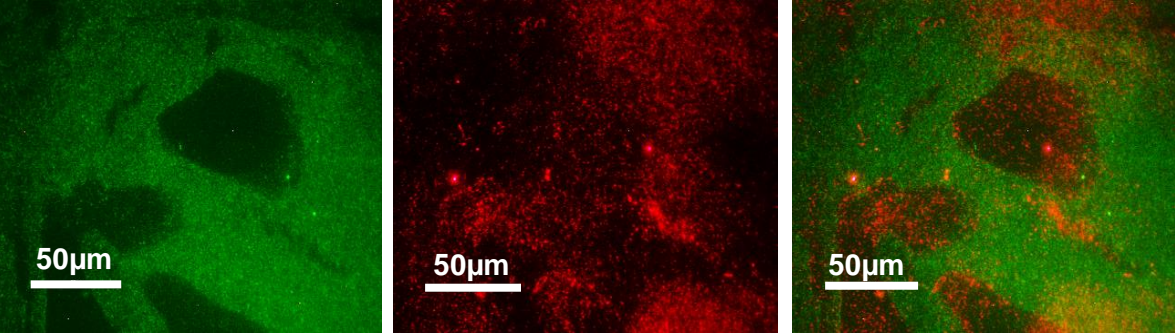
Der Zelldetritus stellte sich als CD42-positiv, sowie vWF-positiv dar. Außerdem konnten intakt gebliebene Thrombozyten und Thrombozytenaggregate in einer CD42-Färbung nachgewiesen werden. Die Thrombozytenklots wurden ebenfalls in

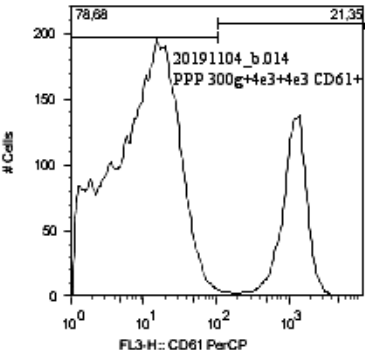
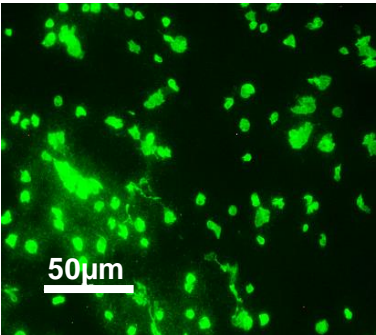
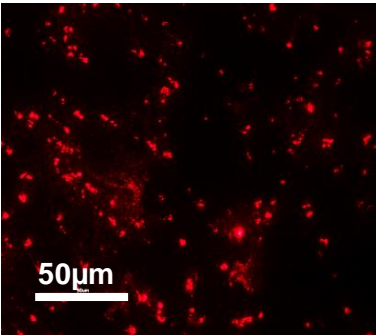
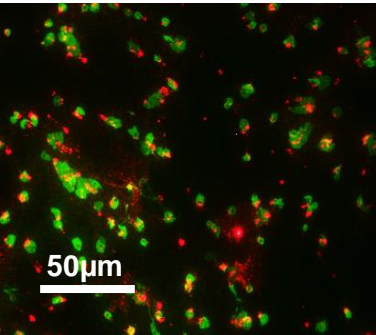
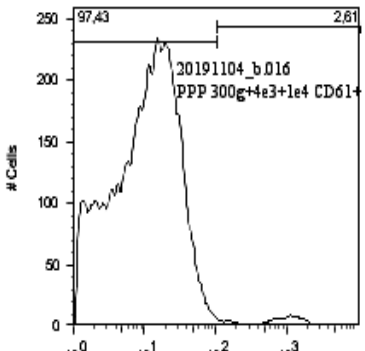
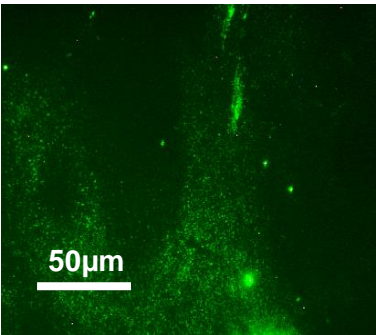
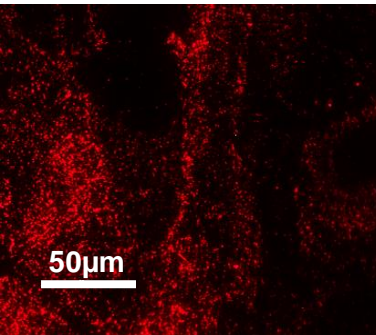
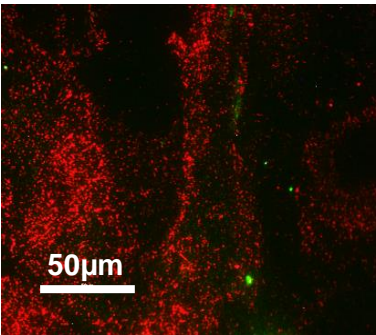
der Färbung mit einem vWF-Antikörper sichtbar. Fadenartige Strukturen wurden vereinzelt beobachtet.

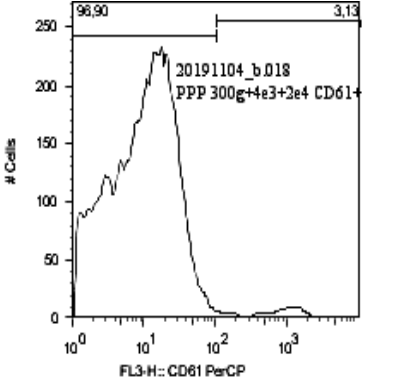
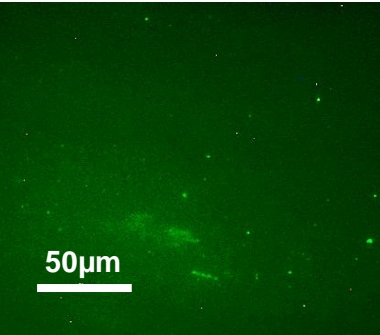
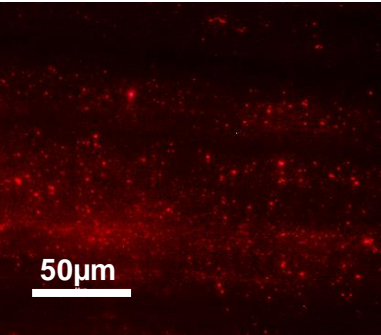
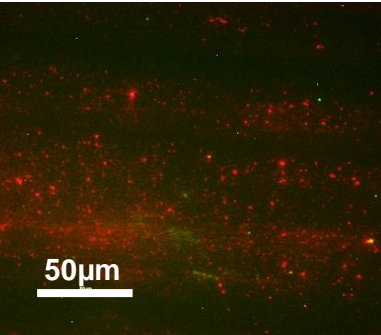
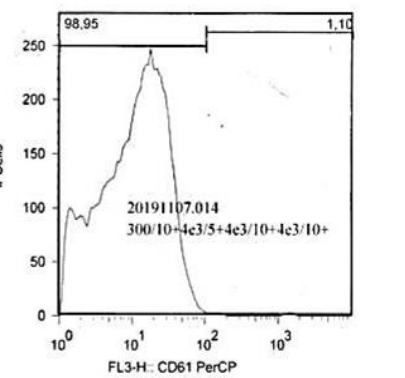
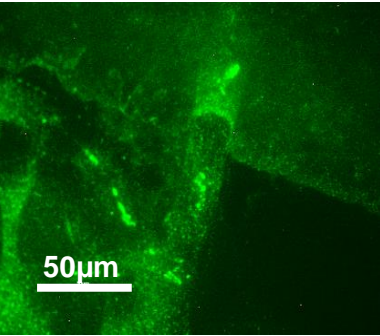
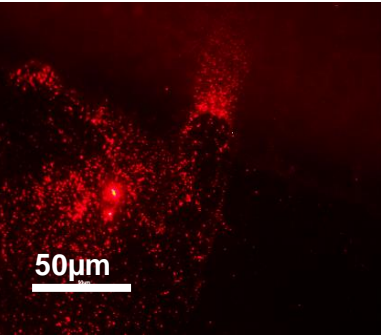
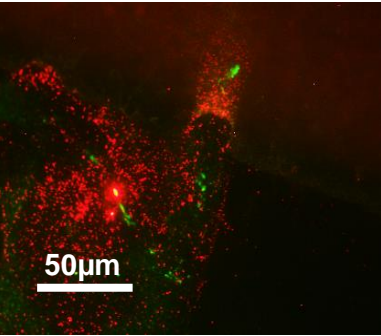
In einem dritten Ansatz wurde PRP über eine Zentrifugation bei 300g für 10min hergestellt. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Probenuntersuchungen und die Ergebnisse der Zytospinanalysen sind in den folgenden Tabellen (Tabelle 12 und Tabelle 13) dargestellt. Die Probenbezeichnung orientiert sich dabei an Tabelle 5. In den Histogrammen der Durchflusszytometrie wurde die CD61-Intensität gegen die Anzahl positiver Ereignisse aufgetragen. Als Fluoreszenzfarbstoff bei der relativen Intensitätsbestimmung diente PerCP. Nachfolgend werden Intensitäten kleiner 100 als CD61⁻ bezeichnet und Intensitäten über 100 als CD61⁺. Im Falle einer hohen CD61-positiven Population in der Durchflusszytometrie, wurden in der histologischen Auswertung der Zytospinpräparate hohe Thrombozytendichten (in den Abbildungen grün dargestellt) beobachtet. In der histologischen Auswertung ist die vWF-Antikörper-Fluoreszenz-Reaktion rot dargestellt.

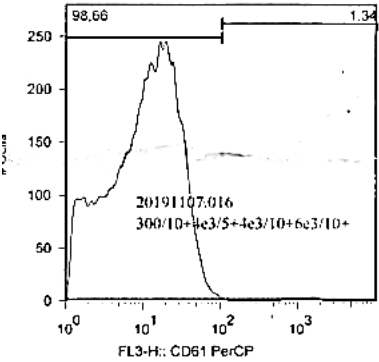
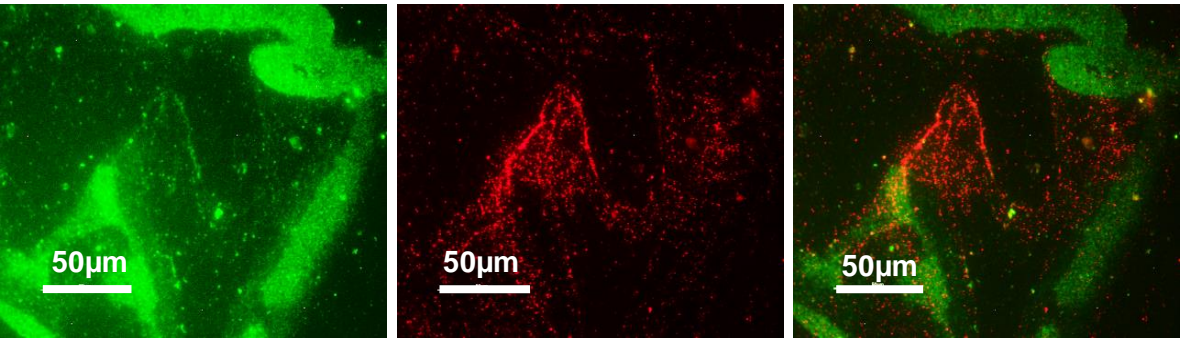
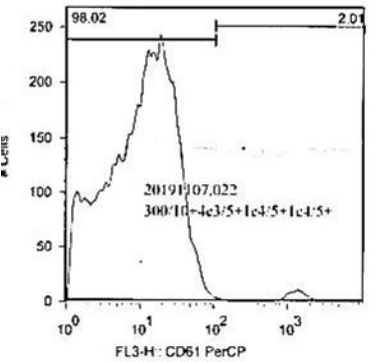
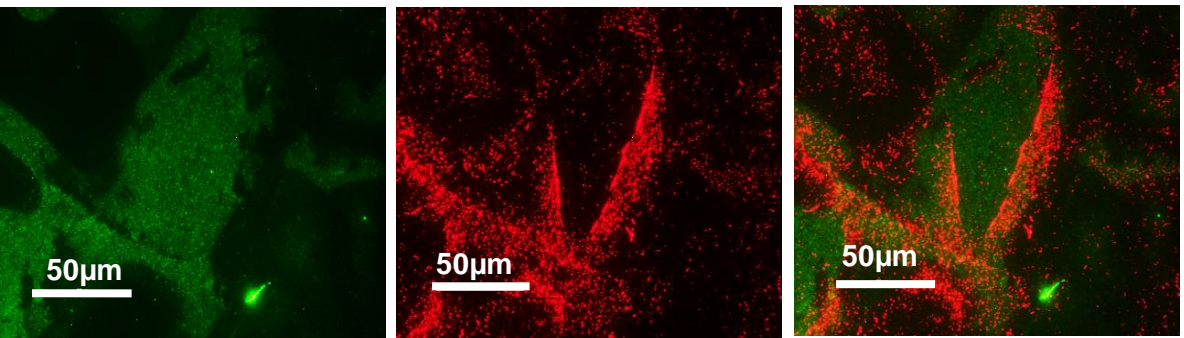
Probe	Durchflusszytometrie	Histologie
<p>3.0 300g/10min</p>	 <p>Abbildung 14: Durchflusszytometrie zu Probe 3.0</p>	 <p>Abbildung 15: Histologie zu Probe 3.0</p> <p>Beurteilung: Es zeigten sich zahlreiche Thrombozyten (94,6% in der Durchflusszytometrie und grün in der Histologie). In der CD42-Färbung (grün) wurden Hypertrophien der Thrombozyten beobachtet. Diese stellten sich in der vWF-Antikörper-Fluoreszenz-Reaktion (rot) als vWF-negative Strukturen dar. In der vWF-Färbung zeigten sich zahlreiche vWF-positive Flächen. Die Überlagerung zeigte nicht in allen Fällen Übereinstimmung von CD42-positiven und vWf-positiven Strukturen. 5,4% der in der Durchflusszytometrie registrierten Ereignisse wurden als CD61⁺ klassifiziert.</p>
<p>3.1 300g/10min 10000g/5min</p>	 <p>Abbildung 16: Durchflusszytometrie zu Probe 3.1</p>	 <p>Abbildung 17: Histologie zu Probe 3.1</p> <p>Beurteilung: Es zeigten sich viele Thrombozyten (36,8% in der Durchflusszytometrie und grün in der Histologie). Die Thrombozyten stellten sich teilweise als stechapfelförmig dar (grün). Diese erschienen in der vWF-Reaktion negativ. Es zeigten sich punktförmige vWF-positive Anfärbungen (rot). Stellenweise wurden vWF-positive, zusammengelagerte Strukturen beobachtet (rot). Ein schwach CD42-positiver und vWF-positiver Hintergrund wurde beobachtet. Die Überlagerung zeigte eine stellenweise Kolokalisation der punktförmigen vWF-positiven Strukturen und der stechapfelförmig veränderten Thrombozyten. 63,2% der in der Durchflusszytometrie registrierten Ereignisse wurden als CD61⁺ klassifiziert.</p>

Probe	Durchflusszytometrie	Histologie		
<p>3.2</p> <p>300g/10min 4000g/10min</p>	 <p>Abbildung 18: Durchflusszytometrie zu Probe 3.2</p>	 <p>Abbildung 19: Histologie zu Probe 3.2</p>		
<p>Beurteilung: Hoher Anteil an Thrombozyten (73,4% in der Durchflusszytometrie und grün in der Histologie). Die Thrombozyten bildeten teilweise Aggregate aus (grün), die in der vWF-Färbung (rot) als vWF-positive Strukturen dargestellt werden konnten. Die Überlagerung zeigte eine Lokalisation der vWF-positiven Strukturen nahe der CD42-positiven Aggregate, jedoch ohne spezifische Zuordenbarkeit. 26,6% der in der Durchflusszytometrie registrierten Ereignisse wurden als CD61⁺ klassifiziert.</p>				
<p>3.3</p> <p>300g/10min 4000g/30min</p>	 <p>Abbildung 20: Durchflusszytometrie zu Probe 3.3</p>	 <p>Abbildung 21: Histologie zu Probe 3.3</p>		
<p>Beurteilung: Es wurde ein thrombozytenreiches Bild (96,6% in der Durchflusszytometrie und grün in der Histologie) mit teilweise zusammengelagerten Thrombozyten beobachtet. Die vWF-Färbung zeigte punktförmige und diffuse vWF-Strukturen (rot). In der Überlagerung zeigte sich sowohl eine Kolokalisation der vWF-positiven Strukturen und der CD42-positiven Aggregate, als auch ein voneinander unabhängiges Auftreten vWF-positiver und CD42-positiver Strukturen. 3,4% der in der Durchflusszytometrie registrierten Ereignisse wurden als CD61⁺ klassifiziert.</p>				

Probe	Durchflusszytometrie	Histologie
<p>3.4</p> <p>300g/10min 10000g/5min 10000g/5min</p>	 <p>Abbildung 22: Durchflusszytometrie zu Probe 3.4</p>	 <p>Abbildung 23: Histologie zu Probe 3.4</p>
<p>Beurteilung: Es konnten kaum noch intakte Thrombozyten nachgewiesen werden (0,6% in der Durchflusszytometrie). Eine großflächige Anfärbung konnte jedoch dennoch mit der vWF-Färbung (rot) als auch in der CD42-Färbung (grün) beobachtet werden. Es handelte sich jedoch um keine zellulären Strukturen, sondern lediglich um diffuse Zellfragmente, auf denen die entsprechenden Epitope exprimiert wurden. Die Probe enthielt nahezu vollständig fragmentäre Überreste von Blutbestandteilen. Die Überlagerung ergab ein entsprechend diffuses Bild. 99,4% der in der Durchflusszytometrie registrierten Ereignisse wurden als CD61⁺ klassifiziert.</p>		
<p>3.5</p> <p>300g/10min 10000g/5min 20000g/5min</p>	 <p>Abbildung 24: Durchflusszytometrie zu Probe 3.5</p>	 <p>Abbildung 25: Histologie zu Probe 3.5</p>
<p>Beurteilung: Es konnten kaum noch intakte Thrombozyten nachgewiesen werden (1,1% in der Durchflusszytometrie). Eine großflächige Anfärbung konnte jedoch dennoch mit der vWF-Färbung (rot) als auch in der CD42-Färbung (grün) beobachtet werden. Stellenweise wurden punktuelle Anfärbungen beobachtet. Mehrheitlich handelte sich jedoch nicht um zelluläre Strukturen, sondern lediglich um diffuse fragmentäre Überreste von Blutzellen, auf denen die entsprechenden Epitope exprimiert wurden. 98,9% der in der Durchflusszytometrie registrierten Ereignisse wurden als CD61⁺ klassifiziert.</p>		

Probe	Durchflusszytometrie	Histologie		
<p>3.6</p> <p>300g/10min 4000g/10min 4000g/10min</p>	 <p>Abbildung 26: Durchflusszytometrie zu Probe 3.6</p>	 <p>Abbildung 27: Histologie zu Probe 3.6</p>		
<p>Beurteilung: Es wurden stellenweise Thrombozyten beobachtet (21,3% in der Durchflusszytometrie und grün in der Histologie). Diese erschienen teilweise großvolumig oder zu Aggregaten zusammengelagert. Weiterhin wurde im Umfeld großvolumiger Thrombozyten bzw. von Zusammenlagerungen ein CD42-positiver, kleinfragmentärer Hintergrund beobachtet. In der vWF-Reaktion (rot) zeigten sich neben einem kleinfragmentären vWF-positiven Hintergrund vereinzelt vWF-positive Strukturen. Die Überlagerung zeigte eine Kolokalisation vWF- und CD42-positiver Strukturen vor allem in den Bereichen vergrößerter Thrombozyten bzw. der zuvor beschriebenen Aggregate. 78,7% der in der Durchflusszytometrie registrierten Ereignisse wurden als CD61⁺ klassifiziert.</p>				
<p>3.7</p> <p>300g/10min 4000g/10min 10000g/5min</p>	 <p>Abbildung 28: Durchflusszytometrie zu Probe 3.7</p>	 <p>Abbildung 29: Histologie zu Probe 3.7</p>		
<p>Beurteilung: Es wurden stellenweise intakte Thrombozyten beobachtet (2,6% in der Durchflusszytometrie und grün in der Histologie). Diese erschienen vereinzelt großvolumig. Weiterhin wurde ein CD42-positiver, stellenweise verdichteter, kleinfragmentärer Hintergrund beobachtet. In der vWF-Reaktion (rot) zeigten sich stellenweise Verdichtungen vWF-positiver Strukturen vor einem kleinfragmentären vWF-positiven Hintergrund. Die Überlagerung ergab keine aussagekräftigen Kolokalisationen. 97,4% der in der Durchflusszytometrie registrierten Ereignisse wurden als CD61⁺ klassifiziert.</p>				

Probe	Durchflusszytometrie	Histologie		
<p>3.8</p> <p>300g/10min 4000g/10min 20000g/5min</p>	 <p>Abbildung 30: Durchflusszytometrie zu Probe 3.8</p>	 <p>Abbildung 31: Histologie zu Probe 3.8</p>		
<p>Beurteilung: Es wurden stellenweise intakte Thrombozyten beobachtet (3,1% in der Durchflusszytometrie und grün in der Histologie). Diese ließen sich in der CD42-Färbung (grün) beobachten. Weiterhin stellte sich ein CD42-positiver, kleinfragmentärer Hintergrund dar. In der vWF-Reaktion (rot) zeigten sich neben einem kleinfragmentären vWF-positiven Hintergrund vereinzelt vWF-positive Zellen und Strukturen. Die Überlagerung ergab ein diffuses Bild CD42-positiver und vWF-positiver Strukturen. 96,9% der in der Durchflusszytometrie registrierten Ereignisse wurden als CD61⁺ klassifiziert.</p>				
<p>3.9</p> <p>300g/10min 4000g/10min 4000g/10min 4000g/10min</p>	 <p>Abbildung 32: Durchflusszytometrie zu Probe 3.9</p>	 <p>Abbildung 33: Histologie zu Probe 3.9</p>		
<p>Beurteilung: Es zeigten sich vereinzelt Thrombozyten (1,1% in der Durchflusszytometrie und grün in der Histologie), welche stellenweise zusammengelagert vorlagen. Auffällig war ein CD42-positiver (grün), kleinfragmentärer Hintergrund. In der vWF-Reaktion (rot) zeigten sich neben einem kleinfragmentären vWF-positiven Hintergrund vereinzelt vWF-positive Strukturen. Diese deckten sich vereinzelt mit CD42-positiven Thrombozyten. 98,9% der in der Durchflusszytometrie registrierten Ereignisse wurden als CD61⁺ klassifiziert.</p>				

Probe	Durchflusszytometrie	Histologie
<p>3.10</p> <p>300g/10min 4000g/10min 4000g/10min 6000g/10min</p>	 <p>Abbildung 34: Durchflusszytometrie zu Probe 3.10</p>	 <p>Abbildung 35: Histologie zu Probe 3.10</p> <p>Beurteilung: Es zeigten sich nur sehr vereinzelt Thrombozyten (1,3% in der Durchflusszytometrie und grün in der Histologie), welche in der Darstellung mit CD42 stellenweise vergrößert erschienen. Es zeigte sich ein stark ausgeprägter CD42-positiver (grün), kleinfragmentärer Hintergrund, sowie Ballungszentren CD42-positiver Reaktionen. In der vWF-Reaktion (rot) zeigten sich neben einem kleinfragmentären vWF-positiven Hintergrund vereinzelt vWF-positive Strukturen. Diese vWF-positiven Strukturen zeigten sich in der Überlagerung stellenweise deckungsgleich mit CD42-positiven Bereichen. 98,7% der in der Durchflusszytometrie registrierten Ereignisse wurden als CD61⁺ klassifiziert.</p>
<p>3.11</p> <p>300g/10min 4000g/10min 4000g/10min 10000g/5min</p>	 <p>Abbildung 36: Durchflusszytometrie zu Probe 3.11</p>	 <p>Abbildung 37: Histologie zu Probe 3.11</p> <p>Beurteilung: Es zeigten sich vereinzelt Thrombozyten (2,0% in der Durchflusszytometrie und grün in der Histologie). Außerdem konnten CD42-positiv Aggregate (grün) beobachtet werden. Es wurde ein CD42-positiver, kleinfragmentärer Hintergrund mit stellenweise CD42-positiven Verdichtungen beobachtet. In der vWF-Reaktion (rot) zeigten sich neben einem kleinfragmentären vWF-positiven Hintergrund vereinzelt vWF-positive Verdichtungen. Stellenweise konnten Kolokalisationen CD42-positiver und vWF-positiver Bereiche in der Überlagerung dargestellt werden. 98,0% der in der Durchflusszytometrie registrierten Ereignisse wurden als CD61⁺ klassifiziert.</p>

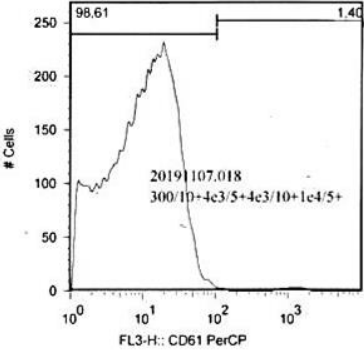
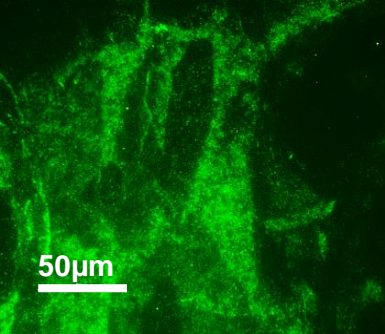
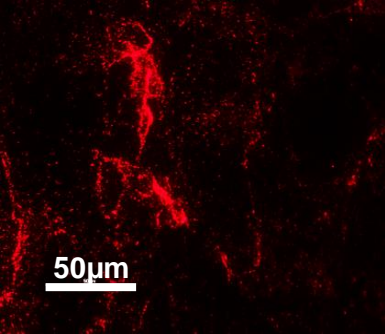
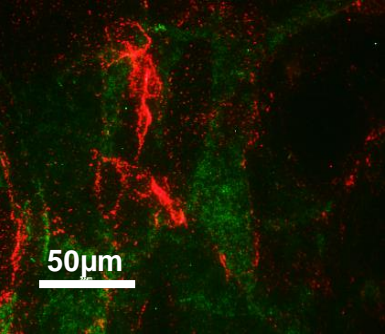
Probe	Durchflusszytometrie	Histologie		
<p>3.12</p> <p>300g/10min 4000g/10min 10000g/5min 10000g/5min</p>	 <p>Abbildung 38: Durchflusszytometrie zu Probe 3.12</p>	 <p>Abbildung 39: Histologie zu Probe 3.12</p>		
<p>Beurteilung: Es wurden vereinzelt Thrombozyten nachgewiesen (1,4% in der Durchflusszytometrie und grün in der Histologie). In der CD42-Färbung (grün) zeigte sich ein CD42-positiver, kleinfragmentärer Hintergrund beobachtet. Stellenweise stellten sich Verdichtungen Cd42-positiver Bereiche dar. In der vWF-Reaktion (rot) zeigten sich ein kleinfragmentärer vWF-positiver Hintergrund, sowie diffuse, fadenartige vWF-positive Bereiche. In der Überlagerung ergaben sich keine aussagekräftigen Kolokalisationen. 98,6% der in der Durchflusszytometrie registrierten Ereignisse wurden als CD61⁺ klassifiziert.</p>				

Tabelle 12: Darstellung der Ergebnisse der Plasmaherstellung nach Modell 3 (Tabelle 5). Die Tabelle zeigt, neben der Probenbezeichnung inklusive Zentrifugationsabfolge gemäß Tabelle 5, grafische Darstellungen der durchflusszytometrischen Untersuchung und der entsprechenden Histologie. Die Auswertung der Durchflusszytometrie erfolgte über eine Einparameterdarstellung in Form von Histogrammen. Hierbei wurden die CD61-Intensitätsverteilung (Abszisse) gegen die Anzahl Zellen (Ordinate) aufgetragen. Die histologische Darstellung erfolgte mit einer CD42-Färbung (grün), vWF-Färbung (rot) und Überlagerung der zuvor genannten Färbungen. Für alle Darstellungen wurde eine 400-fache Vergrößerung gewählt.

Im Folgenden (Tabelle 13) wurden die grafischen Darstellungen der Tabelle 12 zusammengefasst und mit einer qualitativen Beurteilung hinsichtlich Zelldetritus/Debris und Thrombozytenzahl klassifiziert.

Probe	Zentrifugationsart				Durchflusszytometrie			Histologie	
	Zentr. 1	Zentr.2	Zentr. 3	Zentr.4	CD61+ [%]	CD61- [%]	Zelldetritus	Thrombozyten	Debris
3.0	300g 10min				94,6	5,38	wenig	viele	wenig
3.1	300g 10min	10000g 5min			36,8	63,2	viel	viele	viel
3.2	300g 10min	4000g 10min			73,4	26,6	wenig	viele	wenig
3.3	300g 10min	4000g 30min			96,6	3,40	nichts	viele	wenig
3.4	300g 10min	10000g 5min	10000g 5min		0,60	99,4	viel	wenig	viel (CD42+/ ν WF+)
3.5	300g 10min	10000g 5min	20000g 5min		1,20	98,8	viel	wenig	viel (CD42+/ ν WF+)
3.6	300g 10min	4000g 10min	4000g 10min		21,4	78,6	viel	viele	viel (CD42+/ ν WF+)
3.7	300 g 10 min	4000 g 10 min	10000g 5min		2,60	97,4	viel	viele	viel (CD42+/ ν WF+)
3.8	300g 10min	4000g 10min	20000g 5min		3,10	96,9	viel	viele	viel (CD42+/ ν WF+)
3.9	300g 10min	4000g 10min	4000g 10min	4000g 10min	1,10	98,9	viel	teilweise	viel (CD42+/ ν WF+)
3.10	300g 10min	4000g 10min	4000g 10min	6000g 10min	1,34	98,7	viel	teilweise	viel (CD42+/ ν WF+)
3.11	300g 10min	4000g 10min	4000g 10min	10000g 5min	2,00	98,0	viel	teilweise	viel (CD42+/ ν WF+)
3.12	300g 10min	4000g 10min	10000g 5min	10000g 5min	1,40	98,6	viel	wenig	viel (CD42+/ ν WF+)
3.4	300g 10min	10000g 5min	10000g 5min		0,60	99,4	viel	wenig	viel (CD42+/ ν WF+)
3.7	300g 10min	4000g 10min	10000g 5min		2,60	97,4	viel	viele	viel (CD42+/ ν WF+)
3.5	300g 10min	10000g 5min	20000g 5min		1,20	98,8	viel	wenig	viel (CD42+/ ν WF+)
3.8	300g 10min	4000g 10min	20000g 5min		3,10	96,9	viel	viele	viel (CD42+/ ν WF+)
3.3	300g 10min	4000g 30min			96,6	3,40	nichts	viele	wenig
3.9	300g 10min	4000g 10min	4000g 10min	4000g 10min	1,10	98,9	viel	teilweise	viel (CD42+/ ν WF+)

Tabelle 13: Numerische Darstellung der Ergebnisse der Plasmaherstellung nach Modell 3 (vergleiche Tabelle 12). Die Zahlenwerte wurden auf drei signifikante Stellen gerundet. Im oberen Teil der Tabelle wurden die Ergebnisse der einzelnen Proben bezüglich durchflusszytometrischer und histologischer Untersuchung dargestellt. Im unteren Teil der Tabelle wurden einzelne Proben einander gegenübergestellt. Die grün markierte Zentrifugationsfolge lieferte das für diese Arbeit am besten bewertete Plasma.

Stellte man zuerst PRP her und zentrifugierte dieses anschließend bei 4000g für 10min, so lag immer noch ein Thrombozytenanteil von 73% vor, allerdings mit wenig Zelldetritus. Bei Verlängerung der Zentrifugationszeit auf 30min war der Anteil an Thrombozyten sogar noch höher (97%). Zentrifugierte man dagegen zweimal bei 4000g für jeweils 10min, so lag der Anteil der Thrombozyten nur noch bei 21%,

jedoch mit viel Zelldetritus. Fügt man noch einen dritten identischen Zentrifugationsschritt an, so waren keine Thrombozyten mehr im Plasma nachweisbar, jedoch wiederum mit einem hohen Anteil an Zelldetritus. Auch eine abschließende hochtourige Zentrifugation (10000g für 5min) reichte nicht aus, um den Zelldetritus zu entfernen.

Eigentlich würde es ausreichen, PRPs nur einmal mit 4000g für 10min und anschließend bei hoher Umdrehungszahl (10000g für 5min) zu zentrifugieren, um die Thrombozyten annähernd komplett zu entfernen, jedoch für den Preis von viel Zelldetritus im Plasma.

Eine initial hochtourige Behandlung (10000g für 5min) von PRPs zerstört offensichtlich 63% der Zellen, da ein hoher Anteil an destruierten Zellen nachweisbar war. Auch hier müssten mindestens zwei derartige Zentrifugationsschritte hintereinander geschaltet werden, um die Thrombozyten aus dem Plasma zu entfernen – wieder mit viel Zelldetritus im Plasma.

3.3.3 Vergleich der Perfusion mit filtriertem Plasma mit der Perfusion mit nativem Plasma

Es wurden 18mL Plasma mithilfe eines 0,2µm Spritzenfilters filtriert. Das nach der Filtrierung verbliebene Volumen von 15mL wurde mit 100IE Heparin versetzt und in einem Perfusionsversuch auf Klotbildung untersucht. Es wurden keine durchflusszytometrischen Untersuchungen oder Zytospin-Untersuchungen der filtrierten Probe durchgeführt.

Nach 30min konnte eine leichte Eintrübung des Plasmas beobachtet werden. Diese Eintrübung nahm in den nächsten 90min zu, eine Klotbildung blieb jedoch aus. Das Plasma ließ sich nach Beendigung des Versuches ohne Rückstände mit Einmalspritzen aus dem System entnehmen.

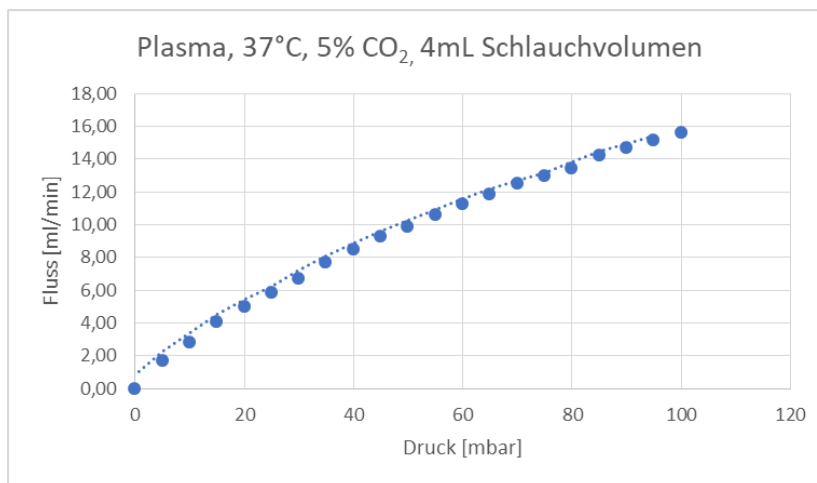
Es wurden zwei Aliquots entnommen und bei 17000g für 15min beziehungsweise bei 4000g für 15min zentrifugiert. In beiden Fällen kam es zum Ausfallen einer fibrinartigen Substanz. Bei der Zentrifugation mit 17000g bildete der Überstand 94% des Ursprungsvolumens. Bei der Zentrifugation mit 4000g bildete der Überstand 87,86% des Ursprungsvolumens.

3.4 Plasmaversuche

Nachfolgend werden die Ergebnisse der Perfusionsversuche mit Proband:innen-PFP dargestellt.

3.4.1 Phasenkontrastmikroskopische Darstellung einer Klotbildung bei Perfusion mit PFP bei variablem Pumpendruck

Temperatur und Flussgeschwindigkeit blieben über den Messzeitraum entsprechend des angelegten Pumpendruckes konstant. Die mittleren Flussgeschwindigkeiten

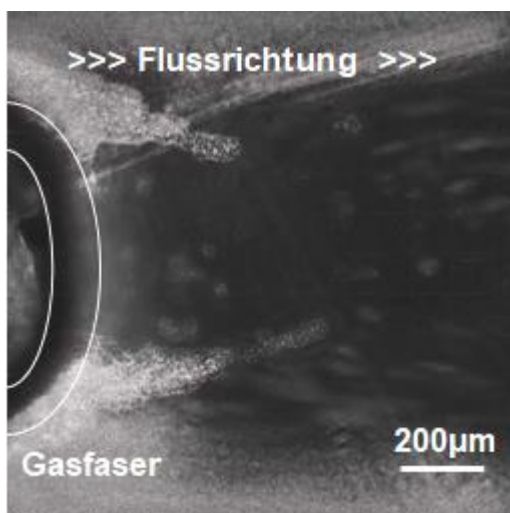


wurden im folgenden Diagramm gegen den angelegten Pumpendruck aufgetragen (Diagramm 1). Das Diagramm bezieht sich auf Messungen mit dem Flusssensor.

Diagramm 1: Druck-Fluss-Kurve bei Plasmaversuchen. Die mittlere Flussgeschwindigkeit wurde in mL/min gegen den Perfusionsdruck in mbar aufgetragen.

Es wurde über den Messzeitraum von einer Stunde eine wachsende Klotbildung um die

Gasfaser beobachtet. Die Klotbildung fiel, verglichen mit den Ergebnissen der unter 3.5 beschriebenen Serumversuche, größer und flockenförmiger aus.



Bei Drücken zwischen 80mbar und 100mbar zeigte sich die Klotbildung lediglich im Bereich der Gasfaser (Abbildung 40).

Durch eine Unterbrechung des Flusses konnte ein Zusammenbruch des Klots herbeigeführt werden.

Bei Drücken zwischen 5mbar und 20mbar zeigte sich eine vermehrte Klotbildung (Abbildung 41).

Abbildung 40: Plasmaversuch bei 100mbar. Links im Bild ist die Gasfaser zu sehen. Daran bildeten sich strömungsgerichtet Ablagerungen aus.

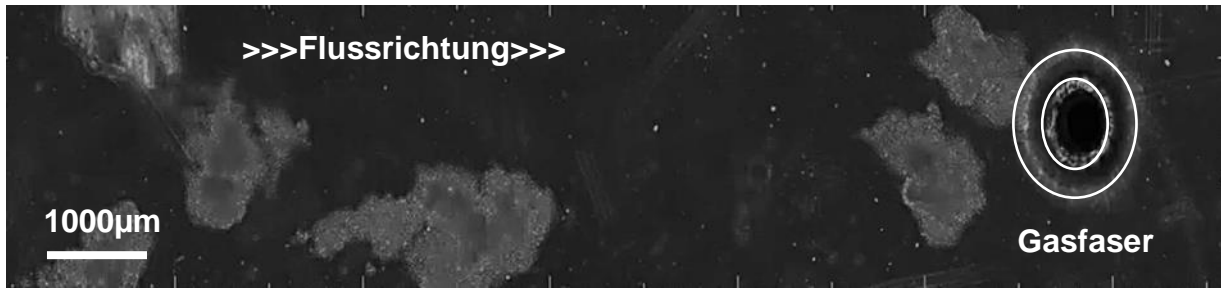


Abbildung 41: Plasmaversuch bei 5mbar. Die Ausbildung von mehreren Klots wurde beobachtet. Diese bewegten sich in Flussrichtung durch das System. In dieser Darstellung wurde auf eine Messung der Klotgröße verzichtet. Unter Berücksichtigung des angegebenen Maßstabes ist jedoch eine Abschätzung der Klotgröße möglich.

Das folgende Diagramm (Diagramm 2) zeigt für einen Plasmaversuch bei verschiedenen Pumpendrücken ermittelte Volumenflüsse. Es wurden entsprechende Berechnungen angestellt, um unter Annahme nicht-turbulenter Strömungen Scherspannungen zu ermitteln. Die im Diagramm 2 dargestellten Werte sind nur als

Näherung an die tatsächlichen

Gegebenheiten zu

betrachten, da der

Nachweis turbulenter

Strömungsverhältnisse

im Perfusionssystem

erst in weiteren

Versuchen erfolgte.

Das Diagramm zeigt,

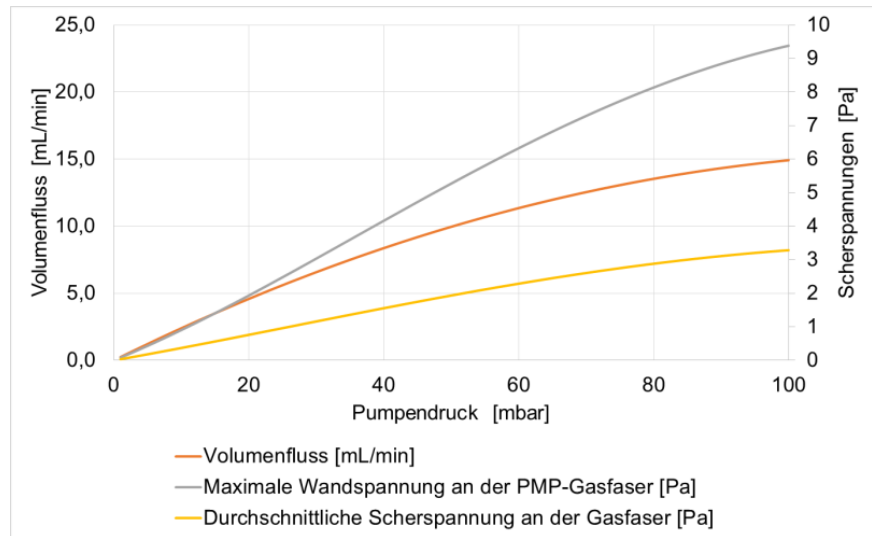
dass mit hohen

Pumpendrücken

höhere

Volumenströme

einhergehen (roter



Graph). Bei 100mbar liegt die Scherspannung für den ermittelten Volumenfluss (roter

Graph) bei circa 6Pa. Ab 3Pa werden an der Gasfaser Scherspannungen erreicht

(gelber Graph), bei welchen eine Entfaltung des vWF prinzipiell möglich ist (42). Dies

ist nach dem obigen Diagramm bei einem Volumenfluss von circa 80mL/min möglich.

Diagramm 2: Darstellung der Volumenfluss-Strömungsverhältnisse im Perfusionssystem für Plasma unter der Annahme laminarer Strömungsbedingungen. Der rote Graph stellt dabei die Abhängigkeit des Volumenflusses vom Pumpendruck dar. Der blaue Graph zeigt die maximalen Wandspannungen an der Gasfaser, der gelbe die durchschnittliche Scherspannung an der Gasfaser. Diese können mit dem obigen Diagramm in ein direktes Verhältnis zu Volumenfluss und angelegtem Pumpendruck gebracht werden. Die dargestellten Daten wurden in vorbereitenden Versuchen ermittelt und freundlicherweise von Tamara Steiger zur Verfügung gestellt.

Graph). Bei 100mbar liegt die Scherspannung für den ermittelten Volumenfluss (roter Graph) bei circa 6Pa. Ab 3Pa werden an der Gasfaser Scherspannungen erreicht (gelber Graph), bei welchen eine Entfaltung des vWF prinzipiell möglich ist (42). Dies ist nach dem obigen Diagramm bei einem Volumenfluss von circa 80mL/min möglich.

3.4.2 Phasenkontrastmikroskopische Darstellung einer Klotbildung bei Perfusion mit PFP bei konstantem Pumpendruck

Bei der Versuchsdurchführung bei 100mbar hielten sich Temperatur und Flussgeschwindigkeit konstant über den gesamten Messzeitraum von 105min. Die Werte betragen im Mittel 37,49°C und 17,33mL/min. In einem wiederholten Versuch mit anderem PFP wurden unter gleichen Bedingungen geringere Flussgeschwindigkeiten gemessen. Der Durchschnitt betrug 16,88mL/min. Eine Ausbildung von Klots an der Gasfaser und in Strömungsrichtung konnte in beiden Fällen beobachtet werden. Eine Obstruktion des Systems blieb aus.

Bei der Versuchsdurchführung bei 50mbar über 120min wurde ebenfalls die Ausbildung eines Klots an der Gasfaser beobachtet (Abbildung 42). Der Klot bildete sich in Strömungsrichtung von der Gasfaser ausgehend. Der Klot, welcher sich bei 50mbar bildete, war deutlich größer als der Klot, welcher sich bei einem Pumpendruck von 100mbar gebildet hatte. Die Ausbildung erfolgte erstmalig nach circa 10min. Der ausgebildete Klot riss im Laufe des Versuches mehrfach von der Gasfaser ab. Nach wenigen Minuten erfolgte eine erneute Klotbildung an der Gasfaser.

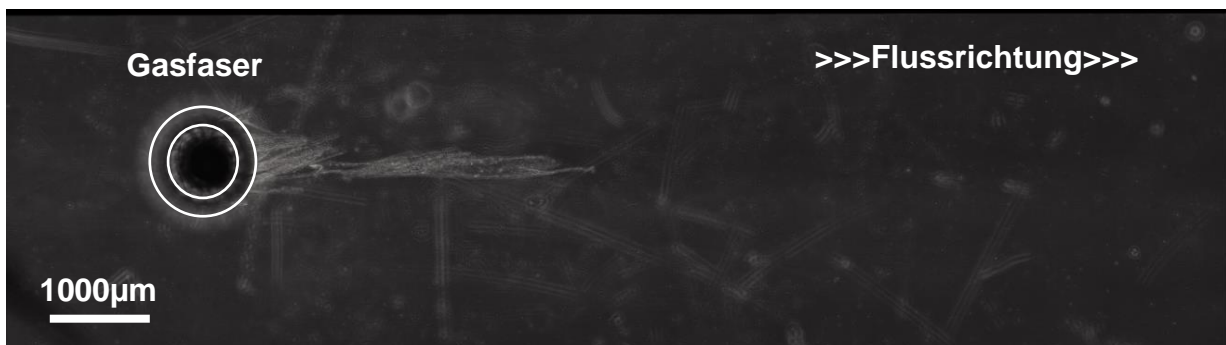


Abbildung 42: Plasmaversuch bei 50mbar, Phasenkontrastaufnahme. Es zeigte sich in Strömungsrichtung die Ausbildung eines Aggregats an der Polymethylpenten-Gasfaser. Auf die Messung der Größe des Klots wurde in diesem Versuch verzichtet. Unter Berücksichtigung des angegebenen Maßstabes kann eine ungefähre Länge von 3000µm angenommen werden.

Die Versuchsdurchführung bei 5mbar wurde nach 120min beendet, da es zu einer Obstruktion des Perfusionssystems gekommen war. Mit der Abnahme der Flussgeschwindigkeit ging ein Temperaturabfall einher. Die folgende Tabelle (Tabelle 14) zeigt die Temperatur- und die Flussgeschwindigkeitsentwicklung über den Messzeitraum.

Zeit [min]	Temperatur [°C]	Fluss [mL/min]
0	25,8	0,08
30	24,9	0,03
60	24,8	0,008
90	24,8	0,002
120	24,7	0,000

Tabelle 14: Temperatur und Flussgeschwindigkeiten bei 5mbar im Plasmaversuch

Eine Klotbildung erfolgte bei 5mbar nach einer Versuchsdauer von 30min und war auch unabhängig von der Gasfaser zu beobachten. Eine Ausrichtung des Klots entlang der Strömungsrichtung konnte, anders als bei höheren Pumpendrücken, bei 5mbar nicht beobachtet werden.

Die Ermittlung der Größe einiger bei 5mbar gebildeter Klots ergab verschiedene Werte. Die folgenden Abbildungen (Abbildung 43) zeigen die entsprechenden Messergebnisse.

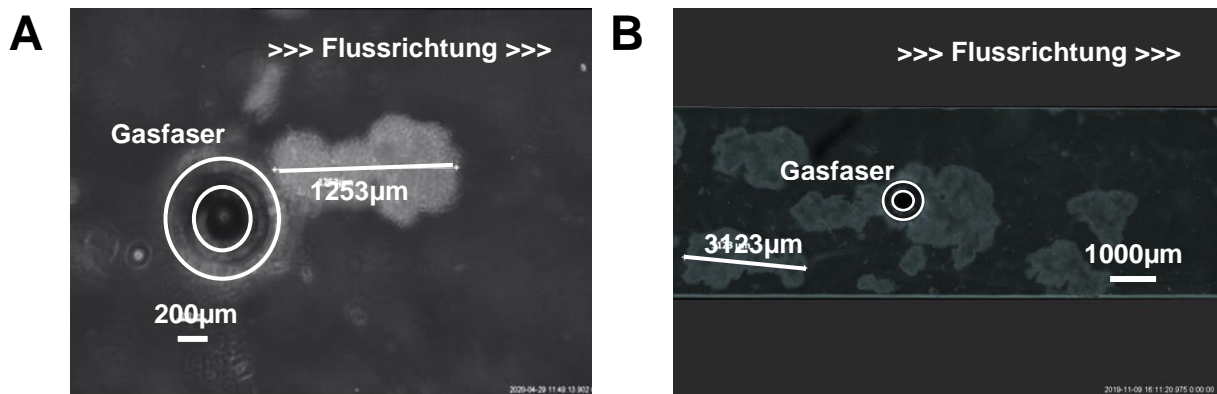


Abbildung 43: Klotbildung an der Gasfaser in zwei Versuchen bei 5mbar, Phasenkontrastaufnahme. A: Es ergab sich ein Klotdurchmesser von 1253µm. B: Es ergab sich ein exemplarischer Klotdurchmesser von 3123µm.

Die Okklusion wurde auch makroskopisch festgestellt (Abbildung 44 A). Das Ausgangsplasma war flüssig, dunkelgelb und klar. Nach Beendigung des Versuches aufgrund einer Obstruktion wurde aus dem System eine geleeartige, hellgelbe Substanz entnommen (Abbildung 44 B).

A**B**

Abbildung 44: Makroskopische Aggregatbildung. A: Aggregatbildung in der *Fluidic Unit*. In den Spritzen der *Fluidic Unit* bildete sich ein trübgelbes Präzipitat aus. Die Pegelstände veränderten sich nicht mehr, woraus ein Fluss nahe 0mL/min resultierte. B: Aggregat nach Entnahme aus dem System. Das Aggregat wurde aus den Spritzen der *Fluidic Unit* mithilfe eines Spatels isoliert. Es stellte sich als trübgelbe, geleeartige Substanz dar.

3.4.3 Effekte verschiedener Antikoagulanzen auf die Klotbildung

Die unter 3.4.1 und 3.4.2 beschriebenen Beobachtungen wurden unabhängig von der gewählten Antikoagulation der Vollblutprobe gemacht. Die je nach gewähltem Pumpendruck unterschiedlich geartete Klotbildung wurde bei EDTA-Plasma, Citrat-Plasma und heparinisierem Plasma gleichermaßen festgestellt. Die Daten wurden nicht gezeigt.

3.4.4 Klotbildung bei der Perfusion nach einer zusätzlichen Heparinisierung von bereits mit Heparin antikoaguliertem Plasma

Basierend auf der Überlegung, die Antikoagulation des Vollblutes vor der Plasmaherstellung könnte unzureichend sein, wurde das hergestellte Plasma mit 20IE Heparin versetzt. In einem weiteren Versuch erfolgte der Zusatz von 100IE Heparin. Die Versuche wurden bei einem Pumpendruck von 5mbar durchgeführt.

In beiden Fällen wurde nach 30min eine Eintrübung des Plasmas festgestellt. Temperatur und Flussgeschwindigkeit fielen im Laufe der Messung ab. Nach 90min war kein Fluss mehr festzustellen.

Aus dem Perfusionssystem konnte ein trübgelber, geleeartiger Klot isoliert werden.

3.4.5 Klotbildung bei einer Heparinspülung des Systems und der Verwendung von doppelt Heparin-antikoaguliertem Plasma

Das Perfusionssystem wurde vor der Durchführung eines Perfusionsversuches mit einer Heparinlösung gespült. Dieser Versuchsansatz diente der Absättigung möglicher thrombogener Bindestellen im System. Der anschließende Perfusionsversuch wurde mit Plasma durchgeführt, welches zusätzlich mit 100IE Heparin versetzt worden war. Die Durchführung erfolgte bei einem Pumpendruck von 5mbar. Nach 30min wurde eine Eintrübung des zuvor klaren Plasmas festgestellt. Die Flussgeschwindigkeit nahm innerhalb der nächsten 60min auf 0mL/min ab.

Von den ursprünglichen 14mL Plasma im System konnten nur 2mL in flüssiger Form entnommen werden. Aus den übrigen 12mL der Probe hatte sich ein fester gelblicher Klot gebildet.

3.4.6 Untersuchung eines ausgefallenen Klots

Nachfolgend werden die Ergebnisse der Klotuntersuchungen dargestellt. Für die Untersuchungen wurden Aliquots eines zuvor in einem Perfusionsversuch ausgefallenen Klots verwendet.

3.4.6.1 Untersuchung der Klotzusammensetzung mittels Immunfluoreszenz

Es wurden Paraffinschnitte hergestellt, die mit spezifischen Antikörpern gefärbt und mit Diaminobenzidin(DAB) bzw. Fluorophor-markierten Antikörpern sichtbar gemacht wurden.

In den DAB-gefärbten Schnitten zeigten sich in den vWF-Färbungen runde, stark vWF-positive Ballungsbereiche (vergleiche Abbildung 45 A). Stellenweise konnten punktuelle Verdichtungen beobachtet werden. In den Fibrinogen-gefärbten Präparaten bot sich ein sehr ähnliches Bild (vergleiche Abbildung 45 B). Die Fibrin-Färbung zeigte eine großflächige, aber blasse Anfärbung (Abbildung 45 C). Stellenweise konnten auch hier punktuelle Verdichtungen beobachtet werden. In der CD42-Färbung wurden runde Bereiche blass angefärbt. Die CD42-Färbung zeigte eine schwammartige, von Thrombozyten durchsetzte Struktur (Abbildung 45 D).

Die histologische Beurteilung ergab, dass sich der Klot sowohl aus vWF und Fibrin, als auch aus Fibrinogen und Thrombozyten zusammensetzt. Die unterschiedliche

Größe der Ballungsbereiche der Färbungen fiel auf. Diese Ballungsbereiche fielen in der vWF-Färbung und in der CD42-Färbung größer aus als in den Fibrin- und Fibrinogen-Färbungen. Insbesondere in der vWF-Färbung zeigte sich eine netzartige Organisation des Klots.

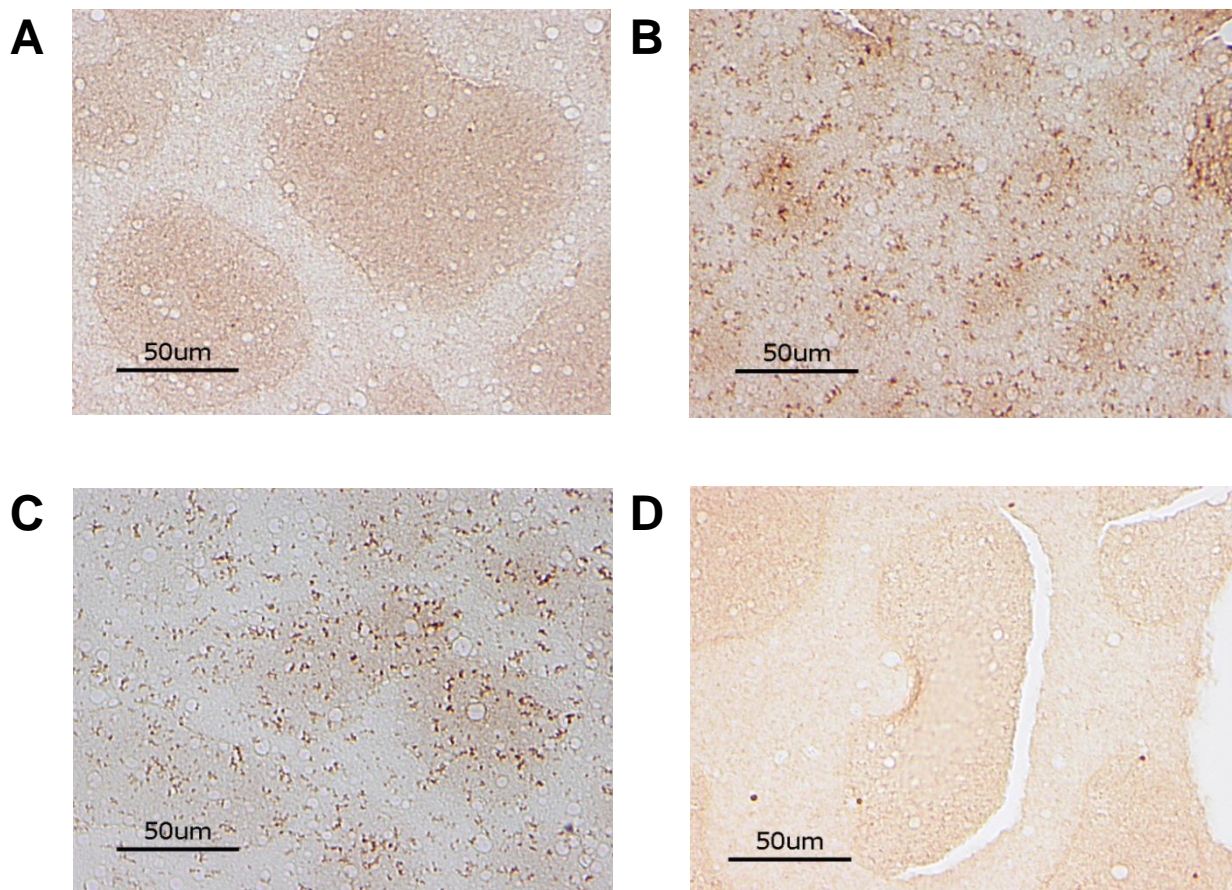


Abbildung 45: Histologische Untersuchung eines Formol-fixierten Klots mittels DAB-Färbung, alle 400x. A: vWF-Färbung (400x). Es sind vWF-positive Ballungsbereiche erkennbar, welche sich in der Färbung dunkler zeigen und eine netzartige Struktur aufweisen. B: Fibrinogen-Färbung (400x). Dunkel angefärbt zeigen sich stark Fibrinogen-positive Bereiche. Es wurden Zellen spezifisch angefärbt C: Fibrin-Färbung (400x). Es zeigten sich zahlreiche kleine Fibrin-positive Ballungsbereiche. Die spezifische Anfärbung von Zellen fiel auf D: CD42-Färbung (400x). Es zeigt sich eine verstärkte Anfärbung runder Bereiche. Trotz der Hintergrundfärbung zeichnen sich an den Rändern der runden Bereiche Thrombozytenansammlungen an. Bei der lochartigen Struktur und den Rissen im Präparat könnte es sich um ein Präparationsartefakt handeln.

Außerdem stach die Anfärbung zellulärer Strukturen ins Auge. Dies geschah vor allem in der Fibrinogen-Färbung und in der Fibrin-Färbung. Vereinzelt wurde die Anfärbung von Zellen auch in der CD42-Färbung beobachtet.

Für die sensitiveren fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden Überlagerungen durchgeführt. Die vWF-Fibrinogen-Färbung zeigte runde positiv angefärbte Bereiche. Stellenweise wurden randsaumartig stark positive, halbrunde Strukturen beobachtet (Abbildung 46).

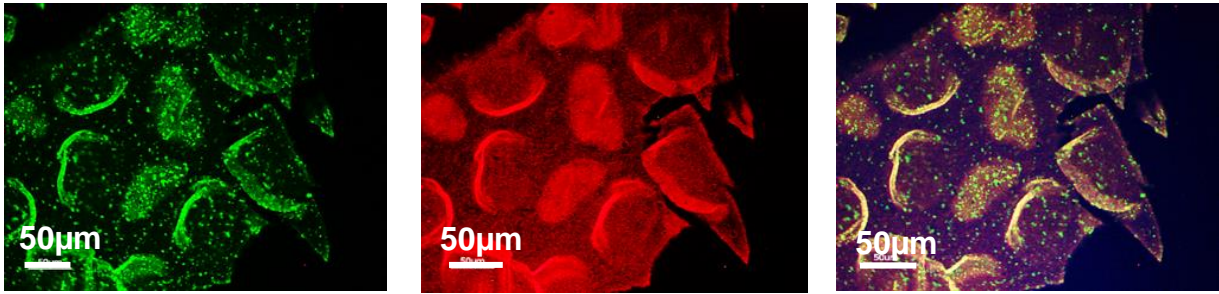


Abbildung 46: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des Klots mit Fibrinogen-Antikörpern (grün) und vWF-Antikörpern (rot), sowie Darstellung einer Überlagerung, alle 200x. In der Fibrinogen-Färbung zeigte sich eine Anfärbung von Zellen, sowie eine Organisation der Anfärbung in runden Bereichen. Randständig fiel dabei eine verstärkte Anfärbung auf. In der vWF-Färbung zeigt sich ebenfalls eine Organisation in runden Ballungsbereichen mit verstärktem Rand. Die Überlagerung zeigt eine Kolokalisation der Ballungsbereiche.

Eine weitere Überlagerung wurde für vWF und Fibrin durchgeführt. Es wurden runde, vWF-positive Bereiche mit stärker positiv angefärbten Halbrunden beobachtet. Fibrin konnte nur marginal nachgewiesen werden (Abbildung 47). Die vWF-CD42-Überlagerung bei pH 6 zeigte ebenfalls die beschriebenen Halbrunde. Diese stellten sich als vWF-positive und CD42-positive Strukturen dar (Abbildung 48). Die vWF-CD42-Überlagerung wurde ebenfalls bei pH 9 durchgeführt. In diesen Präparaten wurden Thrombozyten beobachtet, sowie CD42-positive und vWF-positive diffuse Strukturen (Abbildung 49).

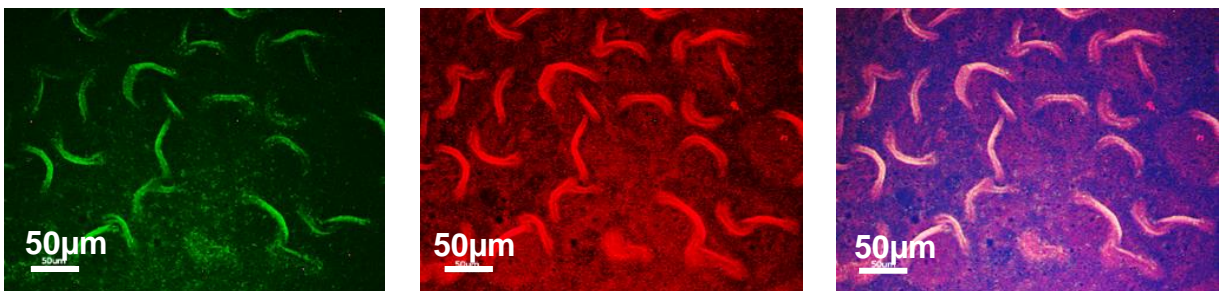


Abbildung 47: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des Klots mit Fibrin-Antikörpern (grün) und vWF-Antikörpern, sowie Darstellung einer Überlagerung, alle 200x. Die Fibrin-Färbung zeigte eine Anfärbung von Debris, sowie eine Konzentration der Anfärbung in halbrunden Strukturen. In der vWF-Färbung zeigten sich ebenfalls Debris, sowie halbrunde Strukturen. Die Überlagerung zeigte eine Deckung der Halbrunde.

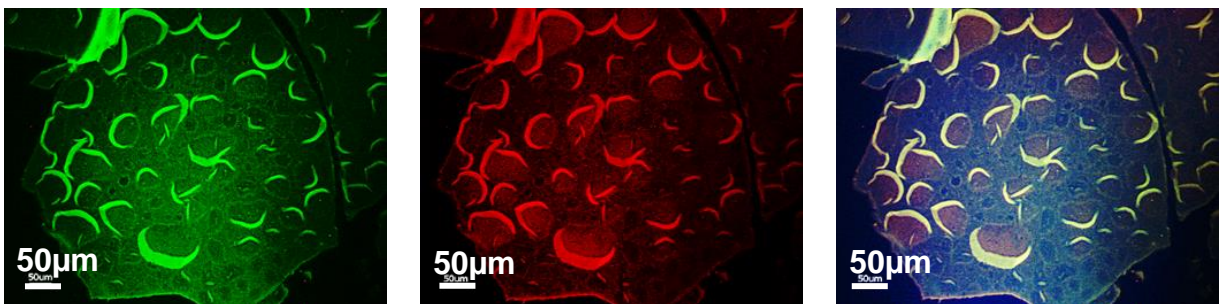


Abbildung 48: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des Klots mit CD42-Antikörpern (grün) und vWF-Antikörpern bei pH 6, sowie Darstellung einer Überlagerung, alle 200x. Die CD42-Färbung zeigte eine Organisation in annähernd runde Bereiche, wobei eine verstärkte Anfärbung im Randbereich dieser Bereiche beobachtet wurde. In der vWF-Färbung wurden ebenfalls annähernd runde Bereiche mit randständig verstärkter

Anfärbung beobachtet. Die Überlagerung zeigte eine Übereinstimmung der stärker angefärbten Randbereiche, sowie der Ballungsbereiche.

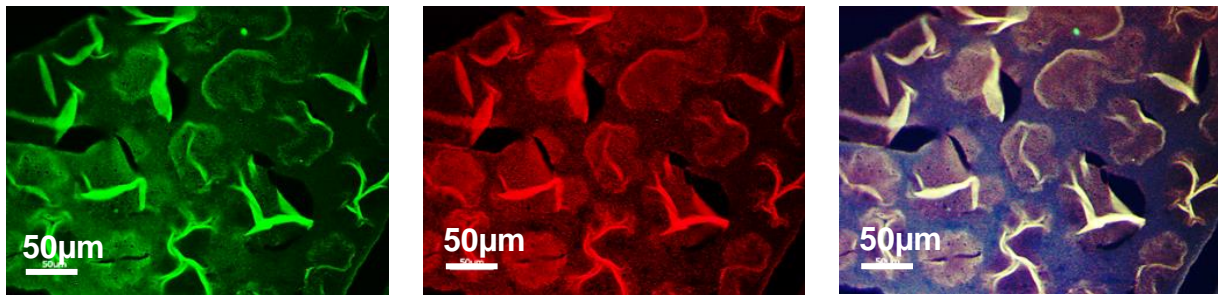


Abbildung 49: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des Klots mit CD42-Antikörpern (grün) und vWF-Antikörpern bei pH 9, sowie Darstellung einer Überlagerung, alle 200x. Die CD42-Färbung zeigte eine Organisation in unregelmäßig verdichtete Bereiche, wobei eine verstärkte Anfärbung im Randbereich dieser Bereiche beobachtet wurde. In der vWF-Färbung wurden ebenfalls unregelmäßige Verdichtungen mit randständig verstärkter Anfärbung beobachtet. Die Überlagerung zeigte eine Übereinstimmung der angefärbten Halbrunde, sowie der Ballungsbereiche.

3.4.6.2 Ergebnisse des Klotauflusses mit tPA und Trypsin

Die mehrstündige Inkubation des Aliquots eines bei einem Perfusionsversuch ausgefallenen Klots mit tPA zeigte keinen Effekt. Es konnte weder eine Verkleinerung des Klots noch eine strukturelle Instabilisierung nachgewiesen werden.

Weiterhin wurde die Auflösbarkeit des Klots mit Trypsin untersucht. Der Klot wurde vor der Untersuchung mit Trypsin gewogen. Es ergab sich eine Feuchtmasse von 83,5mg. Nach einer dreistündigen Inkubation mit Trypsin konnte eine makroskopische Veränderung des Klots festgestellt werden. Das anschließende Wiegen ergab eine Feuchtmasse von 42,0mg. Neben der Gewichtsreduktion konnte außerdem eine Abnahme der strukturellen Stabilität des Klots beobachtet werden.

3.4.7 Die Materialbeschaffenheit des Systems als Einflussfaktor auf die Klotbildung

Da die Klotbildung unabhängig von der Flussgeschwindigkeit in der Perfusionsanlage passiert, sollte der Effekt der Materialien der verschiedenen Systemkomponenten auf die Klotbildung untersucht werden. Nachfolgend werden die Ergebnisse der entsprechenden Untersuchungen aufgeführt.

3.4.7.1 Klotbildung im Standversuch mit einzelnen Modellkomponenten

Es wurden statische Versuche mit heparinisiertem Proband:innenplasma, sowie mit Citratplasma in einzelnen Modellkomponenten durchgeführt (vergleiche Abbildung

26). Die Versuche erfolgten bei Raumluft (78% Stickstoff, 21% Sauerstoff, 1% Edelgase, 0,03% CO₂). Die Proben wurden bei 37°C inkubiert.

Nach drei Stunden Versuchsdauer konnte in keiner Systemkomponente eine Eintrübung des Mediums nachgewiesen werden. Eine Klotbildung blieb ebenfalls aus (Abbildung 50).

Die Strömungsabhängigkeit der Klotbildung konnte nachgewiesen werden, da bei einer Flussgeschwindigkeit von 0mL/min keine Klotbildung beobachtet wurde.

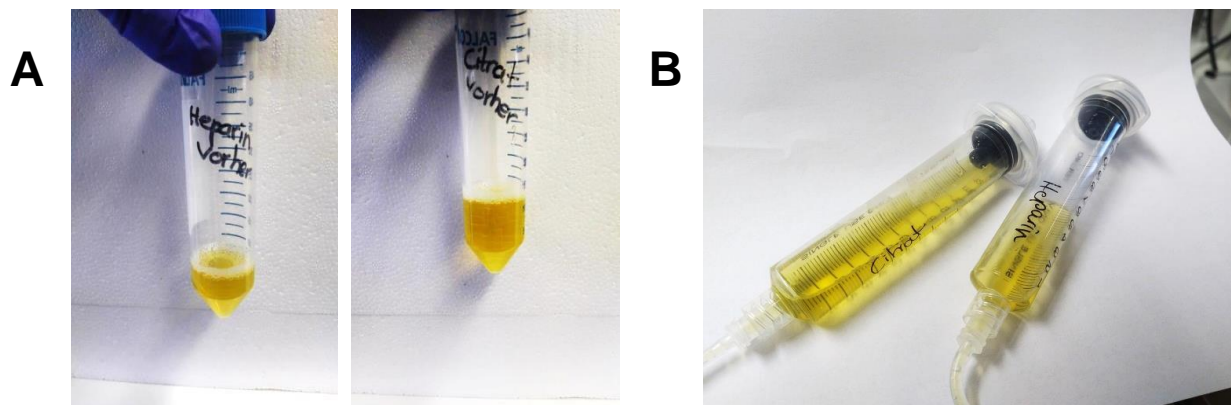


Abbildung 50: Heparinisiertes Plasma und Citratplasma vor dem Versuch (A) und nach dem Versuch (B). Zur Gewinnung erfolgte eine Blutabnahme in Form von peripherer Venenpunktion mit Citrat-Monovetten und Lithium-Heparin-Monovetten. Die Plasmaherstellung erfolgte nach folgendem Zentrifugationsschema: 300g für 10min, 4000g für 5min, 4000g für 5min, 4000g für 5min. Die Inkubation erfolgte unter Raumluftbedingungen bei 37,0°C bei einem Fluss von 0,0mL/min. In beiden Fällen ergab sich die in der Abbildung gezeigte klare, gelbe Flüssigkeit. Nach dem Versuch zeigte sich das Plasma in beiden Fällen klar und flüssig. Eine Klotbildung wurde nicht festgestellt.

3.4.7.2 Klotbildung bei der Perfusion ohne Strömungskammer

Es wurden Perfusionsversuche ohne Einbau einer Strömungskammer bei einem Pumpendruck von 5mbar durchgeführt. Nach 30min konnte eine Eintrübung des Plasmas beobachtet werden. Im weiteren Verlauf des Versuches kam es zu einer Klotbildung im System.

3.4.7.3 Strömungsmechanische Evaluation eines Eckkonnektors und Vergleich der Perfusion mit geraden Luer-Konnektoren

Bei der strömungsmechanischen Untersuchung eines Eckkonnektors stellte sich dieser in seiner Beschaffenheit als kompromittierend für die Zielsetzung dieser Arbeit heraus.

Es konnte exemplarisch an einem Volumenstrom von 20mL/min nachgewiesen werden, dass sich im Eckkonnektor kritische Scherraten bilden, die eine Entfaltung des vWF möglich machen. Die berechneten kritischen Scherraten im Eckkonnektor

sind verglichen mit den erwarteten Scherraten an der Gasfaser niedrig (Abbildung 51 B).

Die kritischen Scherraten wurden für den schmalen Teil des Eckkonnektors bestimmt, der unmittelbar an das Schlauchsystem angrenzt (Abbildung 51 A). Außerdem wurden in dem Bereich, in welchem der Volumenstrom vom schmalen in einen weiteren Teil tritt, hohe Scherraten nachgewiesen.

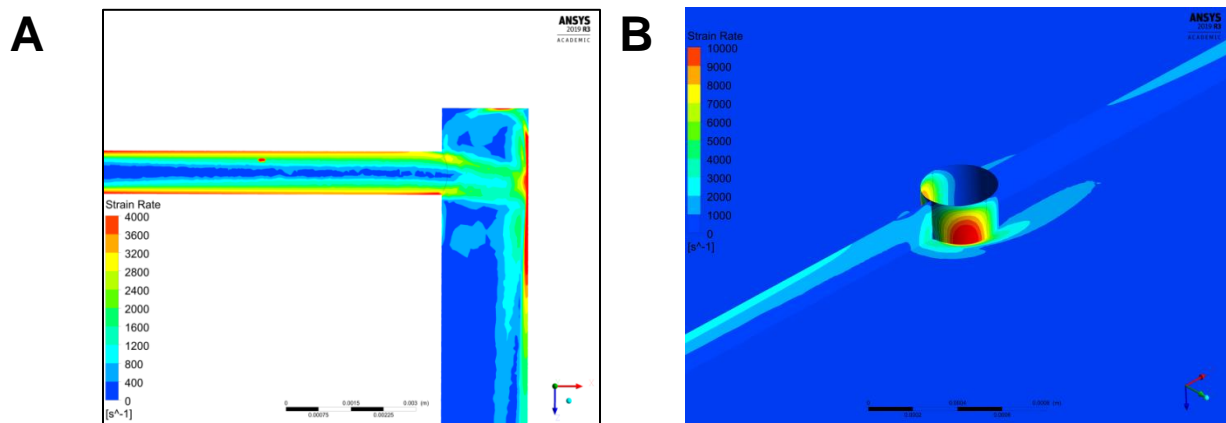


Abbildung 51: Darstellung von Scherraten. A: Darstellung der Scherraten im Eckkonnektor. In dem schmalen Teil des Eckkonnektors, sowie an der dem schmalen Teil gegenüberliegenden Wand des breiten Teils des Eckkonnektors treten kritische Scherraten von bis zu 4000/s (rot) auf. Eine Entfaltung des vWF ist unter diesen Scherraten möglich. Gelb und orange sind Bereiche mit Scherraten von 3200/s und 3600/s dargestellt, grün und blau wurden Scherraten kleiner als 2800/s dargestellt. Diese Scherraten sind als unkritisch einzustufen. B: Darstellung der Scherraten an der Gasfaser. An der Gasfaser wurden mögliche kritische Scherraten von bis zu 10000/s (rot) bestimmt. Die Bilder stammen aus der persönlichen Korrespondenz mit Clemens Birkenmaier, mit dessen Einverständnis sie in dieser Arbeit verwendet werden dürfen.

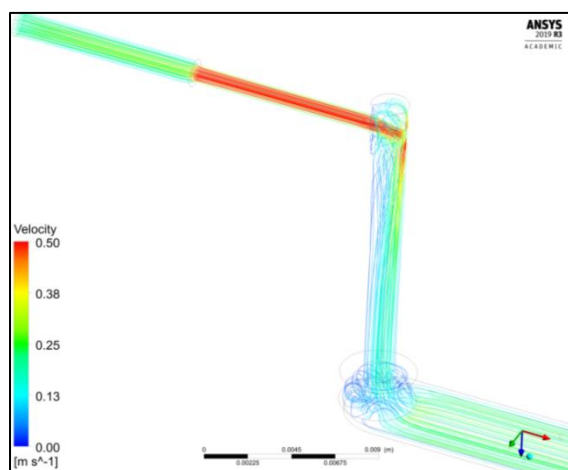


Abbildung 52: Flussgeschwindigkeiten im Eckkonnektor. Im schmalen Teil des Eckkonnektors wurden erhöhte Flussgeschwindigkeiten von bis zu 0,5m/s (rot) festgestellt. Außerdem wurden Verwirbelungseffekte an den Umlenkstellen des Eckkonnektors festgestellt. Die Flussgeschwindigkeiten an den Verwirbelungen bewegen sich in niedrigen Wertebereichen von 0 bis 0,25m/s (blau). Das Bild stammt aus der persönlichen Korrespondenz mit Clemens Birkenmaier und darf mit dessen Einverständnis in dieser Arbeit verwendet werden.

Neben den Scherraten wurden die Flussgeschwindigkeiten im Eckkonnektor analysiert (Abbildung 52). In dem schmalen Teil des Eckkonnektors erhöht sich mit einer Verringerung des Innenradius die Flussgeschwindigkeit. Außerdem zeigte die Darstellung der Flussgeschwindigkeiten mit Stromlinien Verwirbelungseffekte (Abbildung 52).

Es wurden folglich Perfusionsversuche unter der Aussparung von Eckkonnektoren durchgeführt. Bei der Verwendung von mit einem vWF/FVIII-Kombipräparat versetzen

Serum wurde nach 2min eine Ablagerung an der Gasfaser beobachtet. Der Nachweis von vWF mithilfe eines vWF-Antikörpers fiel für die sich ablagernde Struktur positiv aus. Der Nachweis gelang bei 85mbar Pumpendruck.

Bei der Verwendung von ungefiltertem Proband:innenplasma wurde bereits 10min nach Perfusionsbeginn bei 5mbar eine Eintrübung des Plasmas beobachtet. Über den Zeitraum der Messung unterlag die Flussgeschwindigkeit Schwankungen. Nach 40min wurde der Versuch beendet, da die Flussgeschwindigkeit 0mL/min betrug. Die Temperatur betrug zu Perfusionsbeginn 26,7°C und fiel bis zum Versuchsende um 2°C. Eine Klotbildung wurde mikroskopisch beobachtet. Makroskopisch kam es zur Okklusion des Systems.

Die anschließende Zentrifugation der ohne Eckkonnektoren perfundierten Probe (Probe a) erfolgte bei 17000g für 15min. Ebenso wurde mit einer unter der Verwendung von Eckkonnektoren perfundierten Probe (Probe b) verfahren. Für Probe a betrug der Überstand 97% des Ursprungsvolumens, für Probe b 60%.

Bei der Verwendung von gefiltertem Proband:innenplasma wurde nach 25min erstmals eine Trübung beobachtet. Der Fluss hielt sich bei einem Perfusionsdruck von 5mbar über den Messzeitraum von 60min bei durchschnittlich 0,75mL/min. Eine Klotbildung konnte weder makroskopisch noch mikroskopisch nachgewiesen werden. Allerdings erschwerte eine Eintrübung der Probe den mikroskopischen Nachweis von vWF-Fäden.

3.4.8 pH-Wertänderungen als Einflussfaktor auf die Klotbildung

Eine Erniedrigung des pH-Werts im Plasma würde ausfallendes Protein hinreichend erklären. Zu diesem Zwecke wurden vor und nach erfolgten Perfusionsversuchen mit Plasma vergleichende pH-Wertbestimmungen durchgeführt. Der pH-Wert vor Perfusionsversuchen betrug im Mittel 7,4. Größere Abweichungen wurden nicht beobachtet. Der pH-Wert änderte sich im Laufe der Perfusion nicht.

Eine Proteinausfällung aufgrund einer Ansäuerung des verwendeten Proband:innenplasmas konnte somit ausgeschlossen werden.

3.5 Serumversuche

Für die Serumversuche wurde neben am Versuchstag hergestelltem Proband:innenserum gepooltes Humanserum verwendet. Bei den Perfusionsversuchen mit Proband:innenserum wurden personenabhängig verschiedene Flussgeschwindigkeiten bei gleichen Pumpendrücken beobachtet (siehe Tabelle 15). Die Verwendung von gekauftem Humanserum bietet den Vorteil definierter Eigenschaften des Mediums.

	Pumpendruck [mbar]	Durchschnittliche Flussgeschwindigkeit [mL/min]
Probe 1	100	18,0
Probe 2	100	17,0
Probe 3	100	15,9
Probe 4	100	16,7

Tabelle 15: Personenabhängigkeit der Flussgeschwindigkeiten bei einem Druck von 100mbar

3.5.1 Phasenkontrastmikroskopische Darstellung einer Klotbildung bei Perfusion mit Proband:innen- und Humanserum bei variablem Pumpendruck

Während einer dreistündigen Untersuchung auf Fadenbildung an der Gasfaser im Serumversuch (mit Proband:innenserum und ohne vWF-Zusatz) wurde keine Klotbildung beobachtet. Die Klotbildung blieb bei jedem getesteten Pumpendruck aus. In weiteren Versuchen mit gepooltem Humanserum und ebenfalls ohne vWF-Zusatz konnte die Ausbildung fadenartiger Klots beobachtet werden. Die Klotbildung erfolgte nach wenigen Minuten, jedoch nur in geringem Maße.

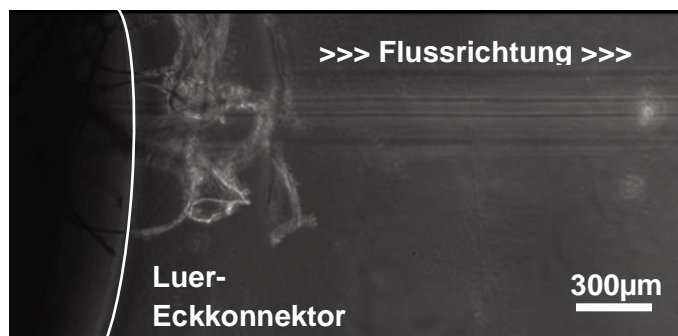
In einem weiteren Versuch wurde Proband:innen- und Humanserum vor Beginn des Perfusionsversuches mit einem vWF/FVIII-Kompipräparat versetzt. Die Messergebnisse eines Perfusionsversuches mit Proband:innenserum sind in der folgenden Tabelle (Tabelle 16) dargestellt.

Zeit [min]	Fluss [mL/min]	Pumpendruck [mbar]	Temperatur [°C]
0	5,1	20	32,8
30	4,9	20	36,9
60	10,8	55	36,4
90	10,5	55	36,4
120	15,3	85	36,3
150	16,9	100	36,5
180	17,0	100	36,2

Tabelle 16: Messergebnisse eines Perfusionsversuches bei variablem Pumpendruck unter Zusatz von vWF

Bei niedrigen Pumpendrücken von 20mbar sowie Pumpendrücken von 55mbar und den damit einhergehenden niedrigeren Flussgeschwindigkeiten konnte keine Klotbildung beobachtet werden.

Bei hohen Pumpendrücken zwischen 55mbar und 100mbar konnte eine Fadenbildung (Abbildung 53) ohne makroskopisches Korrelat nachgewiesen werden.



Diese Beobachtungen ergaben sich ebenfalls bei der Perfusion mit gepooltem Humanserum unter Zusatz des vWF/FVIII-Kombipräparates.

Abbildung 53: Ausbildung fadenartiger Strukturen bei der Perfusion mit Proband:innenserum bei 85mbar. Bei der Abbildung handelt es sich um eine Phasenkontrastaufnahme. Links im Bild ist der Luer-Eckkonnektor angeschnitten.

3.5.2 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung einer Klotbildung bei Perfusion mit Proband:innenserum bei konstanten Pumpendrücken

Die Klotbildung an der Gasfaser trat, wie unter 3.5.1 beschrieben, bei hohen Pumpendrücken auf. Es wurden dementsprechend Versuche mit Proband:innenserum durchgeführt, bei denen ausschließlich mit hohen Pumpendrücken (85mbar bis 100mbar) gearbeitet wurde.

Bei einem ersten Durchlauf bei 85mbar Pumpendruck wurden eine mittlere Temperatur von 37,1°C und eine mittlere Flussgeschwindigkeit von 14,7mL/min beobachtet. Beide Werte unterlagen keinen größeren Schwankungen. Nach 5min konnte die Ausbildung fadenartiger Klots beobachtet werden. Zur qualitativen

Identifizierung der Zusammensetzung des Präzipitats wurden FITC-konjugierte vWF-Antikörper in das Perfusionssystem eingebracht.

Der Nachweis von von-Willebrand-Fäden bei einem Pumpendruck von 85mbar verlief positiv (Abbildung 53).

Gleichermaßen wurde bei einem Pumpendruck von 100mbar verfahren. Die mittlere Temperatur betrug hier 37,6°C, die mittlere Flussgeschwindigkeit lag bei 17,8mL/min. Eine Fadenbildung wurde nach 7min beobachtet. Auch bei einem Pumpendruck von 100mbar konnten von-Willebrand-Fäden nachgewiesen werden. Abbildung 53 zeigt fadenartige Klots mit positiver vWF-Reaktion nach Ablösung von der Gasfaser.

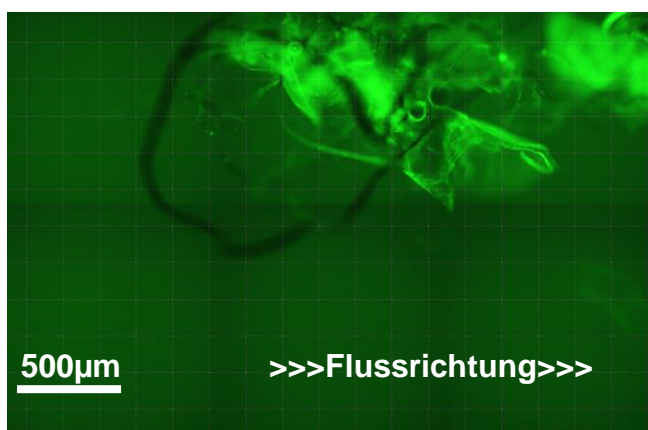


Abbildung 54: vWF-Nachweis im Serumversuch bei 85mbar. Der Nachweis erfolgte mittels vWF-Antikörper-Fluoreszenz (grün). Die Abbildung zeigt Fäden, die sich bereits von der Gasfaser gelöst haben und in Strömungsrichtung fortbewegen.

Die Fadenbildung erfolgte bevorzugt bei Pumpendrücken von 85mbar bis 100mbar und den damit einhergehenden Volumenströmen. Bei Pumpendrücken von 100mbar wurde allerdings eine weniger ausgeprägte Ausbildung von von-Willebrand-Fäden beobachtet. Es handelt sich um keine statische Struktur. Die Struktur reißt, insbesondere bei hohen Flussgeschwindigkeiten, nach

wenigen Minuten ab. Wird der Fluss unterbrochen kommt es ebenfalls zu einer Destruktion der vWF-Fäden.

3.5.3 vWF-Fadenbildung bei der Perfusion mit Proband:innen- und Humanserum

Da sich bei den Versuchen mit Proband:innenserum personenabhängig unterschiedliche Flussgeschwindigkeiten bei gleichen Pumpendrücken bemerkbar machten, wurden weitere Versuche mit gepooltem Humanserum durchgeführt. Der Vorteil des aufbereiteten Humanserums besteht in den definierten Flusseigenschaften des Mediums, da man immer vom gleichen Pool ausgeht. Die sieben Versuche, wovon fünf mit Proband:innenserum und zwei mit gepooltem Humanserum erfolgten, wurden bei Pumpendrücken von 100mbar und 85mbar

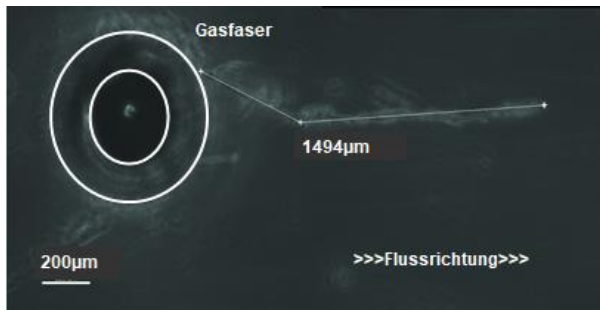


Abbildung 55: vWF-Fadenbildung an der Polymethylpenten-Gasfaser im Serumversuch bei 85mbar. Die Aggregatbildung fand in Flussrichtung statt und erreichte eine Länge von 1494 μm . Bei der Abbildung handelt es sich um eine Phasenkontrastaufnahme. Der vWF-Nachweis erfolgte mittels vWF-Antikörper-Fluoreszenz.

(Abbildung 55) durchgeführt. In allen Versuchen wurde ein vWF/FVIII-Kombipräparat zugesetzt.

Der fünfte Versuch mit Proband:innenserum, sowie beide Versuche mit Humanserum wurden zusätzlich unter Verwendung von geraden Konnektoren durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle (Tabelle 17) dargestellt.

Medium	Pumpendruck [mbar]	Durchschnittlicher Fluss [mL/min]	Temperatur [°C]	Zeit bis zur Klotbildung [min]
1.Proband:innenserum	85	15,3	36,3	4
	100	16,9	36,5	Keine Zeitangabe
2.Proband:innenserum	85	14,7	-	5
	100	16,9	-	7
3.Proband:innenserum	85	14,4		5
	100	15,9	-	Keine Fadenbildung beobachtet
	85	14,3	-	3
4.Proband:innenserum	85	14,9	-	4
	100	16,7	-	5
5.Proband:innenserum	85	15,4	-	2
	100	18,3	-	Keine Fadenbildung beobachtet
Gepooltes Humanserum	85	14,7	35,2	5
	100	16,3	37,3	Keine Fadenbildung beobachtet
Gepooltes Humanserum	85	k.A.	-	2

Tabelle 17: Ergebnisse der Serumversuche mit Proband:innenserum und gepooltem Humanserum bei 85mbar und 100mbar

Aufgrund von zwischenzeitlichen Defekten im Temperatursensor wurden nicht bei allen Messungen Temperaturwerte erhoben. Im Rahmen der erhobenen Daten ergab sich bei 100mbar eine durchschnittliche Temperatur von 36,9°C und ein durchschnittlicher Fluss von 16,83mL/min. Bei 85mbar ergaben sich eine durchschnittliche Temperatur von 35,75°C und ein durchschnittlicher Fluss von 14,81mL/min. Eine Fadenbildung wurde in allen Versuchen mit Humanserum in einem Zeitraum von durchschnittlich 6min nach Perfusionsbeginn bei 100mbar und durchschnittlich 3,75min nach Perfusionsbeginn bei 85mbar beobachtet. Die

Fadenbildung dauerte bei 100mbar durchschnittlich länger oder blieb in der Mehrheit der Fälle (4 von 6) vollständig aus. Die Fäden bildeten sich in Strömungsrichtung aus (vergleiche Abbildungen 53, 54 und 55).

Die folgende Tabelle (Tabelle 18) zeigt die Länge der vWF-Fäden bei den Versuchen mit Proband:innenserum und bei den Versuchen mit gepooltem Humanserum.

Serumprobe	Pumpendruck [mbar]	Länge des Fadens [μm]
1.Proband:innenserum	85	1579
	100	1904
2.Proband:innenserum	85	2525
	100	1180
3.Proband:innenserum	85	1481
	100	Keine Fadenbildung beobachtet
4.Proband:innenserum	85	510
	100	Faden reißt nicht ab, daher auch 510
5.Proband:innenserum	85	758
	100	Keine Fadenbildung beobachtet
Gepooltes Humanserum	85	k.A.
	100	Keine Fadenbildung beobachtet
Gepooltes Humanserum	85	1494

Tabelle 18: Darstellung der ermittelten Fadenlängen bei Versuchen mit Proband:innenserum und Versuchen mit gepooltem Humanserum bei 85mbar und 100mbar.

Bei einem Perfusionsdruck von 100mbar wurden die Fäden durchschnittlich $718\mu\text{m}$ lang. Bei 85mbar wurden die Fäden durchschnittlich $1391\mu\text{m}$ lang. Sofern sich eine Fadenbildung beobachten ließ, schienen die Fäden bei 100mbar schneller abzureißen als bei 85mbar. Jedoch konnte weder bei der Fadenlänge, noch bei der Zeit bis zur Fadenbildung ein signifikanter Unterschied ermittelt werden. Dagegen war der gemessene Fluss signifikant höher bei 100mbar ($p = 0,002$). Der vWF-Nachweis gelang mithilfe eines vWF-Fluoreszenz-Antikörpers. Diese Begebenheiten sind im folgenden Diagramm (Diagramm 3) veranschaulicht.

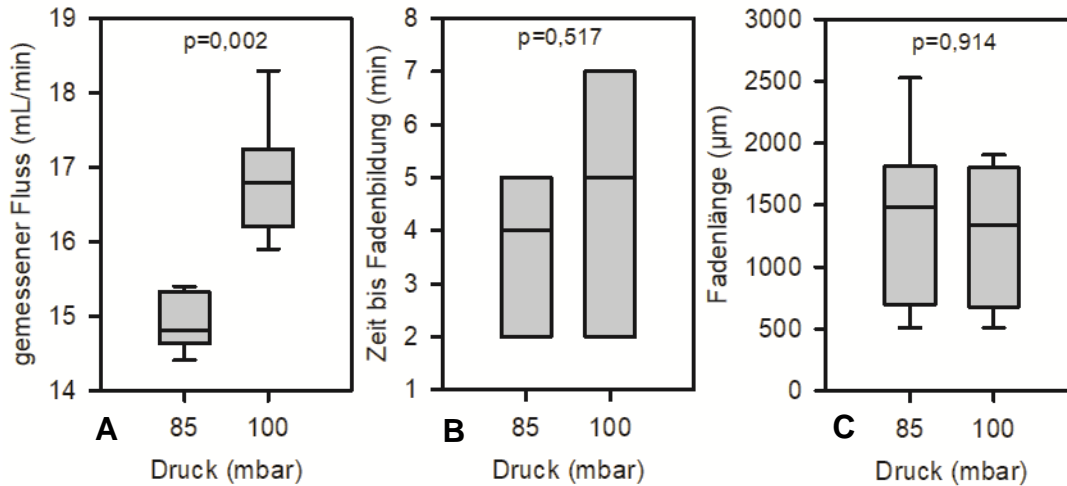


Diagramm 3: Darstellung der Ergebnisse der Serumversuche mittels Boxplot. Es wurde keine Unterscheidung zwischen gepooltem Humanserum und Proband:innenserum vorgenommen. A: Der gemessene Fluss in mL/min wurde gegen den Pumpendruck in mbar aufgetragen. Das dritte Quartil für 85mbar liegt bei 15,3mL/min, das erste Quartil bei 14,4mL/min. Der Median der Messungen bei 85mbar liegt bei 14,7mL/min. Da keine enormen Abweichungen gemessen wurden, markieren der obere und untere Whisker den Maximalwert von 15,4mL/min bzw. den Minimalwert von 14,4 mL/min. Das dritte Quartil für 100mbar liegt bei 16,9mL/min, das erste Quartil bei 16,3mL/min. Der Median der Messungen bei 100mbar liegt bei 16,8mL/min. Da keine enormen Abweichungen gemessen wurden, markieren der obere und der untere Whisker den Maximalwert von 18,3mL/min bzw. den Minimalwert von 15,9mL/min. Mit $p = 0,002$ ist die Abhängigkeit von Druck und Volumenfluss in diesem Aufbau statistisch signifikant B: Die Zeit bis zur Fadenbildung in min wurde gegen den Pumpendruck in mbar aufgetragen. Das dritte Quartil für 85mbar liegt bei 4min, das erste Quartil bei 2min. Der Median der Messungen bei 85mbar liegt bei 4min. Da keine enormen Abweichungen gemessen wurden und der Wert des ersten bzw. dritten Quartils dem Minimal- bzw. Maximalwert entspricht, wurden keine Whisker dargestellt. Das dritte Quartil für 100mbar liegt bei 7min, das erste Quartil bei 2min. Der Median der Messungen bei 100mbar liegt bei 5min. Da keine enormen Abweichungen gemessen wurden und der Wert des ersten bzw. dritten Quartils dem Minimal- bzw. Maximalwert entspricht, wurden keine Whisker dargestellt. Mit $p = 0,517$ ist das Testergebnis statistisch nicht signifikant C: Die gemessene Fadenlänge in μm wurde gegen den Pumpendruck in mbar aufgetragen. Das dritte Quartil für 85mbar liegt bei 1579 μm , das erste Quartil bei 758 μm . Der Median der Messungen bei 85mbar liegt bei 1487,5 μm . Da keine enormen Abweichungen gemessen wurden, markieren der obere und untere Whisker den Maximalwert von 1579 μm bzw. den Minimalwert von 510 μm . Das dritte Quartil für 100mbar liegt bei 1542 μm , das erste Quartil bei 845 μm . Der Median der Messungen bei 100mbar liegt bei 1180 μm . Da keine enormen Abweichungen gemessen wurden, markieren der obere und der untere Whisker den Maximalwert von 1904 μm bzw. den Minimalwert von 510 μm . Mit $p = 0,914$ ist das Testergebnis statistisch nicht signifikant.

3.6 Albuminversuche

Die Hypothese, dass die Klotbildung zu Anteilen auf Albumin zurückzuführen ist, sollte überprüft werden. Die Ergebnisse diesbezüglicher Untersuchungen werden im Folgenden dargestellt.

3.6.1 Klotbildung bei der Perfusion mit Albumin bei 5mbar und 100mbar

Sollte die zuvor für Plasma und Serum beschriebene Klot- beziehungsweise Fadenbildung auf Albumin zurückzuführen sein, so müsste die Perfusion von Albumin zu einer Klotbildung im Perfusionsmodell führen.

Die Messergebnisse der entsprechenden Perfusionsversuche bei 5mbar und bei 100 mbar sind in den folgenden Tabellen aufgeführt (Tabelle 19 und Tabelle 20).

Zeit [min]	Temperatur [°C]	Fluss [mL/min]
0	28,1	1,20
30	24,4	0,65
60	25,0	0,68
90	25,3	0,67
120	25,6	0,66

Tabelle 19: Messergebnisse der Perfusion mit BSA bei 5mbar. Temperatur und Flussgeschwindigkeit hielten sich über die Zeit konstant.

Zeit [min]	Temperatur [°C]	Fluss [mL/min]
0	36,0	20,1
30	36,8	17,8
60	35,5	18,2
90	35,8	17,7
120	36,2	18,3

Tabelle 20: Messergebnisse der Perfusion mit BSA bei 100mbar. Temperatur und Flussgeschwindigkeit hielten sich über die Zeit konstant.

In beiden Versuchsdurchläufen blieben eine Trübung und eine Klotbildung aus. Weiterhin wurde im Hinblick auf die frühere Praxis, ECMO-Systeme vor dem Gebrauch am Patient:innen mit Albumin zu spülen, ein Plasma-Perfusionsversuch angeschlossen. Auch bei diesem Plasmaversuch kam es zu der bereits beschriebenen massiven Klotbildung im Perfusionssystem.

3.6.2 Fluoreszenzmikroskopischer Albumin-Antikörpernachweis bei der Perfusion mit Serum

Es wurde ein Serumversuch, wie zuvor zum Nachweis von von-Willebrand-Fäden beschrieben, durchgeführt. Zu dem Zeitpunkt der Beobachtung von Aggregatbildung im Perfusionssystem wurde ein Albumin-Antikörper hinzugegeben. Die Fluoreszenz-Reaktion blieb aus. Bei der Ausbildung der Präzipitate an der Gasfaser spielt Albumin daraus folgend keine Rolle.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein *ex vivo*-Perfusionsmodell aufgebaut, das die strömungsinduzierte Thrombusbildung an einer einzelnen Polymethylpenten-Gasfaser (vereinfachtes ECMO-Modell) abbilden sollte. Die Optimierung der Methodik beinhaltete eine garantierte Konstanz von Versuchsbedingungen. Hierzu

gehörten gerätespezifische Aufrechterhaltung der physiologischen Temperatur, des pH-Wertes, konstanter Flussraten sowie stabiler Mediumbedingungen. Besonders problematisch stellte sich die Verwendung von antikoaguliertem Plasma dar, da sich bereits bei kleinsten Flussraten Klots im System bildeten. Diese führten konsekutiv zu einer Okklusion der Anlage und machten damit die Nachverfolgung der vWF-Fadenbildung unmöglich. Schließlich konnte Letzteres durch Verwendung von Serumproben bzw. der Zugabe eines vWF-Produktes umgesetzt werden.

4.1 Bedeutung eines *ex vivo*-Perfusionsmodells

Das für die vorliegende Arbeit verwendete ibidi-Perfusionssystem hat den Vorteil, dass es *on top* verfügbar ist, ein relativ kleines Füllvolumen (max. 12mL) besitzt, für *live cell imaging* getestet ist, eine weite Spanne für Flussraten (0,1-40mL/min) aufweist und leicht handhabbar ist. Allerdings wurde das System für scherkraftabhängige Zellkulturexperimente entwickelt (Herstellerangaben). In der vorliegenden Arbeit sollte dieses System Teil eines vereinfachten ECMO-Modells sein. Mit einer modifizierten Flusskammer, die eine senkrecht zur Flussrichtung stehende Gasfaser beinhaltet, sollte der Frage nachgegangen werden, ob dieses „Hindernis“ ausreicht, um dort die Bildung von vWF-Fäden zu initiieren. Diese Frage resultierte aus einer *in vivo*-Studie von Steiger et al. (2019), wo fadenartige vWF-Strukturen in gebrauchten Oxygenatoren gefunden wurden, allerdings ohne eine genaue Aussage zu den vorherrschenden Scherkräften machen zu können (16). In Kombination mit *Live-Monitoring* am Mikroskop konnte die Klotbildung an einer Polymethylpenten-Gasfaser mit einem ressourcensparenden Aufbau bezüglich benötigter Menge an Blutprodukten und Bauteilen untersucht werden. Es wurde in Anlehnung an ein im Rahmen einer Studie von Maugheri et al. beschriebenes Modell etabliert. Dort wurden die Wechselwirkungen von Thrombozyten und Granulozyten unter verschiedenen Fluss- und Kulturbedingungen untersucht und mittels *Live Cell Imaging* dargestellt (19).

Bereits in einer Vorstudie (I. Heim, nicht publizierte Dissertation) konnte die scherkraftabhängige Bildung von vWF-Fäden mit diesem Modell gezeigt werden. Allerdings traten technische Probleme auf, die gelöst werden mussten, um die Validität des Modells zu gewährleisten.

Bedeutung der Sensorkalibrierung für Volumenströme verschiedener Medien

Ein Problem war der Nachweis konstanter Volumenströme. Die Messung des Flusses erfolgte in dem in dieser Arbeit verwendeten *ex vivo*-Modell mit einem, nach Angaben des Herstellers Sensirion (Stäfa, Schweiz), für Wasser kalibrierten Flusssensor. Der Flusssensor bedient sich eines thermischen Messprinzips. Aus diesem Grund sind die thermischen Eigenschaften der Probenflüssigkeiten relevant für die durch den Sensor ermittelten Werte. Im Fall eines starken Abweichens der Parameter Wärmekapazität und Wärmeleitfähigkeit der Probenflüssigkeit von Wasser können Korrekturmaßnahmen notwendig werden. Daher wurde hinsichtlich dieses Flusssensors eine Sensorkalibrierung bezüglich Humanserum und Plasmaproben durchgeführt. Die Sensorkalibrierung wurde bei Volumenflüssen von 2mL/min unter Zuhilfenahme einer Spritzenpumpe durchgeführt (2mL/min entspricht der maximalen Perfusionsgeschwindigkeit der Spritzenpumpe). Allerdings ist der durch die Spritzenpumpe erzeugte Volumenfluss von 2mL/min deutlich niedriger als die Volumenflüsse im Perfusionsmodell. Hierbei wurden bei maximalem Pumpendruck und unter Verwendung von VE-Wasser Volumenflüsse von bis zu 30mL/min beobachtet. Eine Möglichkeit, derartige Volumenflüsse mit einer Spritzenpumpe zu erreichen, wäre eine Parallelschaltung mehrerer Spritzenpumpen. In einem solchen Fall würden sich die Volumenströme addieren. Das hätte aber zur Folge, dass sich das Probenvolumen erhöhen würde. Die Kalibrierung erfolgte lediglich bei 2mL/min.

Es wurden proteinhaltige Medien (Plasma, Serum) eingesetzt. Da es sich dabei um Newtonsche Flüssigkeiten handelt (17,62), musste das Hagen-Poiseuille-Gesetz berücksichtigt werden. Es ist davon auszugehen, dass der Volumenstrom sich proportional zur Schubspannung verhält. Daher ist anzunehmen, dass die bestimmten Umrechnungsfaktoren für Humanserum und FFP bei höheren Pumpendrücken gleichermaßen gültig sind.

Des Weiteren ist die vorgenommene Kalibrierung des Flusssensors nur für das verwendete FFP, sowie das verwendete Humanserum gültig. Theoretisch müsste für jede Probe ein eigener Umrechnungsfaktor bestimmt werden, da bei den unterschiedlichen Proben trotz Anwendung eines einheitlichen Herstellungsprotokolls von einem geringfügig unterschiedlichen Anteil zellulärer Fragmente auszugehen ist. Aufgrund von ähnlichen Volumenströmen bei gleichen Versuchsbedingungen mit

verschiedenen Plasmen, wurde in dieser Arbeit auf eine spezifische Bestimmung zu jeder Probe verzichtet.

Weiterhin wurden Maßnahmen ergriffen, um die Analogie zu *in vivo*-Systemen hinsichtlich stabiler Temperatur, pH und Antikoagulation zu erhalten.

Temperatureigenschaften und –stabilität im Perfusionssystem

Bei den Temperaturmessungen in der Wärmekammer, der Klimakammer des Mikroskops und dem fließenden Medium wurde festgestellt, dass die Umgebungstemperatur in Wärme- und Klimakammer höher liegt als im Medium. Hier lässt sich erklärend ein Wärmeverlust durch Wärmekonvektion bzw. -diffusion (63) im fließenden Medium anführen, da die Raumtemperatur mit circa 20°C unter der angestrebten Perfusionstemperatur liegt. Im Rahmen der Weiterführung des Projektes ergaben sich für das Medium in der *Fluidic Unit* bei Verwendung der Wärmekammer Temperaturen von über 40°C. Basierend auf dieser persönlichen Mitteilung stellt eine Proteindenaturierung in der Wärmekammer eine mögliche Ursache der Klotbildung dar.

Die nach der Isolierung des Schlauchsystems durchgeführten Temperaturmessungen zeigten auch über Zeiträume von mehreren Stunden Werte, die nur geringen Schwankungen unterlagen. Der maximale Pumpendruck geht mit physiologischen Perfusionstemperaturen von 37°C bis 38°C einher. Bei niedrigen Pumpendrücken nahm die Temperatur ab. Einen Erklärungsansatz für diesen Zusammenhang liefern das Hagen-Poiseuille-Gesetz und die Arrhenius-Andrade-Gleichung (63,64). Nach dem Hagen-Poiseuille-Gesetz verhält sich der Volumenstrom umgekehrt proportional zur Viskosität. Eine Steigerung der Flussgeschwindigkeit hat dementsprechend eine Erniedrigung der Viskosität zur Folge. Die Arrhenius-Andrade-Gleichung stellt einen linearen Zusammenhang zwischen der Viskosität und der Temperatur her. Die Temperatur und die Viskosität stehen dabei in einem umgekehrt proportionalen Verhältnis. Eine ausreichend starke Änderung der Viskosität des Mediums hätte in Zusammenführung beider Gleichungen eine Erniedrigung des Flusses und einen Temperaturabfall zur Folge.

Ein weiterer Erklärungsansatz besteht darin, dass die mit niedrigen Pumpendrücken einhergehenden niedrigen Flüsse eine längere Zeitspanne mit sich bringen, in

welche sich die Temperatur des Mediums der Umgebungstemperatur anpassen kann.

Betrachtung einer pH-Wert-Änderung als *Clotting*-begünstigender Faktor

Eine Stabilität des pH-Wertes im Medium muss gewährleistet sein. So kommt es bei einer pH-Verschiebung ins Saure in proteinhaltigen Medien zu einer Proteinausfällung. Vor und nach Perfusionsversuchen mit Plasma wurden daher pH-Wertbestimmungen durchgeführt. Die Bestimmung erfolgte mit Indikatorpapier. Bei der kolorimetrischen pH-Bestimmung mit Reagenzpapier anhand einer Farbskala handelt es sich um eine nicht hinreichend genaue pH-Bestimmung. Da bereits die grobe Bestimmung des pH-Wertes vor und nach Perfusion im Rahmen dieser Arbeit keine pH-Verschiebungen ergab, wurde auf eine genauere Bestimmung mittels Titration oder Galvanometrie verzichtet.

Prävention einer Klotbildung mittels Antikoagulation

In der Vorarbeit von I. Heim wurde humanes Blutplasma eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass sich bereits bei kleinen Pumpendrücker von 5mbar Klots unabhängig von der Gasfaser bildeten.

Es wurde spekuliert, dass unbeschichtete Oberflächen im Perfusionssystem eine entsprechende Klotbildung initiieren könnten. Eine initial durchgeführte Heparinspülung des kompletten Systems sollte gewährleisten, dass eventuelle unzureichend abgesättigte, thrombogene Bindestellen im System abgedeckt werden. Die Heparinspülung des Perfusionssystems vor Beginn der Perfusion versucht, die Heparinbeschichtung von ECMO-Systemen zu simulieren (65). In Bezug auf der Perfusion vorangehende Heparinspülungen konnten Studien eine verminderte Thrombogenität und Komplementaktivierung, sowie eine verringerte Aktivierung proinflammatorischer Zytokine nachweisen (3). Trotz der Heparinisierung bildeten sich Klots bereits bei niedrigen Flüssen.

Eine andere Erklärung für die Klots könnte eine Ausfällung von Albumin sein. Bei Albumin handelt es sich um ein Plasmaprotein, welches mit circa 60% den höchsten Anteil an Plasmaproteinen in Plasma und Serum einnimmt (17). Darüber hinaus ist es das wichtigste Transportprotein für Calcium, welches wiederum eine essentielle Rolle bei der Thrombozytenaggregation und bei Koagulationsprozessen spielt (66).

Um die Beteiligung von Albumin an der Klottbildung zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit Perfusionsversuche mit bovinem Serumalbumin durchgeführt. Da eine Klottbildung in Plasmaversuchen bei Pumpendrücken von 5mbar beobachtet wurde, wurde auch bei der Perfusion mit Albumin ein Pumpendruck von 5mbar gewählt. Weiterhin wurden Versuche bei 100mbar durchgeführt, da in Serumversuchen Präzipitate bei Drücken von 100mbar beobachtet wurden. In beiden Fällen wurde keine Klottbildung beobachtet. Zudem konnte durch Zugabe eines spezifischen Albumin-Antikörpers zu fadenartigen Ausbildungen an der Gasfaser im Serumversuch keine positive Immunreaktion nachgewiesen werden. Dies spricht dagegen, dass es sich um eine Albuminaggregation handelt. Albumin wurde daher als maßgebliches Element bei der Klottbildung in Plasmaversuchen und bei der Fadenbildung in Serumversuchen ausgeschlossen.

In vivo kann vor Verwendung einer ECMO eine Absättigung von Oberflächenladungen durch Albumin stattfinden, um einen Abfall des osmotischen Drucks zu verringern (3). Dieses Verfahren zeigte im Perfusionsversuch keine Auswirkung auf die Klottbildung im Plasma. Die durch das *Priming* des Perfusionssystems beabsichtigte Verhinderung der Adsorption von Fibrinogen und Hemmung der Aktivierung und Adhäsion von Thrombozyten in Analogie zum ECMO-*Priming* (67), konnte somit nicht beobachtet werden.

Auch unterschiedliche Antikoagulanzen (wie Heparin, Citrat, EDTA) in unterschiedlichen Konzentrationen (für Heparin) zeigten letztlich keinen Einfluss auf die beschriebene Klottbildung im Perfusionsmodell.

Zur weiteren Analyse wurden die Plasmaproben auf Thrombozytengehalt (Durchflusszytometrie) untersucht bzw. die Klots immunhistologisch aufgearbeitet.

4.2 Thrombogene Mikropartikel als mögliche Auslöser für die Klottbildung im Perfusionsmodell

Das Herstellungsverfahren von Plasmaproben könnte einen Einfluss auf die Klottbildung haben. Bei der Herstellung von FFP werden zunächst zelluläre Komponenten entfernt. FFP enthält alle Gerinnungsfaktoren, Fibrinogen (400-900 mg/U), physiologische Gerinnungsinhibitoren (darunter Protein C, Protein S, Antithrombin und *Tissue Factor Pathway Inhibitor*), sowie Plasmaproteine (insbesondere Albumin), Elektrolyte und ein zugefügtes Antikoagulans. Bei letzterem

handelt es sich in der Regel um Citrat (68). Es wird spekuliert, dass unter den beschriebenen Versuchsbedingungen zur Herstellung von FFP das enthaltene Thrombin eine Fibrinospaltung und damit die Bildung von Fibrinklots bedingt (69). Weiterhin ist bekannt, dass Fibrinkleber aus PRP oder PPP hergestellt werden können (70). Auch hier arbeiten die beiden Hauptkomponenten, Fibrinogen und Thrombin, zusammen. Es lag daher die Vermutung nahe, dass es sich bei den gelben Aggregaten aus den Perfusionsversuchen um Fibrinklots handelt, die aufgrund der Anwesenheit von Fibrinogen und Thrombin in der Perfusionsanlage gebildet werden könnten.

Die Zytospinpräparate der hergestellten PRP-Präparate zeigten neben einer normalen Thrombozytenmorphologie auch scheinbar hypertrophierte Thrombozyten. Es wird vermutet, dass dem zentrifugalkraftbedingten Aufplatzen der Thrombozyten ein Anschwellen vorausgeht. Dies legt die Vermutung nahe, dass höhere Zentrifugalbeschleunigungen mit nekroseartigen Reaktionen der Zellen einhergehen können. So könnte eine geringere Umdrehungszahl die Thrombozyten weniger tangieren. Söderström et al. (71) konnten zeigen, dass eine höhere Umdrehungszahl einen Einfluss auf die Aktivierung der Thrombozyten hat. Die Herstellung von PRP bei niedrigen Umdrehungszahlen (100-250g für 10min) bewirkte eine geringere Aktivierung der Zellen (11-15% der Thrombozyten exprimieren P-Selektin). Eine höhere Umdrehungszahl von 20000g für 10min erhöht zwar die Ausbeute, führt jedoch zu einer Aktivierung der Zellen (43-56% P-Selektin-positive Zellen). Letzteres ist nicht wünschenswert. Daher wurden, ausgehend von einer Arbeit von B.A.Herbig und S.L. Diamond (25), PRPs bei 190g und 300g präpariert. Zur Herstellung von PPP sind Studien beschrieben, die höhertourige Zentrifugationsverfahren verwenden. Rikkert et al. (72) verwendeten beispielsweise zwei Zentrifugationsschritte mit 2500g für je 15min und verglichen dieses Verfahren mit einem Zentrifugationsschritt à 5000g für 20min. Ziel war die Isolierung von extrazellulären Vesikeln, die bei beiden Methoden im Plasmaanteil vorherrschten, bei einem geringen Anteil an Thrombozyten, die keine Unterschiede im Aktivierungsgrad zeigten. Eine einschlägige Leitlinie zur Herstellung von PRP und PPP gibt es bisher nicht. Verschiedene Studien beschreiben abhängig von ihrem Forschungsziel verschiedene Verfahren. Zudem werden von verschiedenen Herstellern für Medizinprodukte Röhrchen mit unterschiedlichen Suspensionen und Zentrifugationsanweisungen zur Herstellung von PRP vermarktet (73,74).

Die Auswertung der verschiedenen Zentrifugationsstufen zur Plasmaherstellung zeigte ausgedehnte vWF-positive Bereiche in den Präparaten. Inwieweit es sich dabei um freigesetzten vWF aus den Granula der Thrombozyten (unter Umständen nach Aktivierung durch Zentrifugation), oder eine Akkumulation von frei vorliegendem vWF im Plasma (aufgrund hoher Scherkräfte durch Zentrifugation) handelt, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden. Allerdings könnte man zusammengelagerte, vWF-positive Strukturen mit der Selbstassoziationsfähigkeit des vWF erklären (75).

Insbesondere in höheren Zentrifugationsstufen wurden stellenweise stark von Zelldetritus geprägte Bildausschnitte beobachtet. Es zeigten sich dabei sowohl CD42-positive als auch vWF-positive Bereiche. Da Thrombozyten an sich schon sehr klein sind und mit der herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopie als Einzelzellen praktisch nicht abbildbar sind, kann man nicht unterscheiden, ob es sich bei den CD42/vWF-positiven Bereichen um Thrombozyten oder Zellfragmente handelt, die noch die entsprechenden Epitope exprimieren (56). Auch eine Anreicherung von Thrombozyten-Neutrophilen-Aggregaten wäre möglich (18). Gleichmaßen zeigten die entsprechenden durchflusszytometrischen Analysen kaum noch intakte Zellen, dafür fand sich ein hoher Grad an Zelldebris in den Proben. Es lässt sich daraus ableiten, dass hohe Zentrifugalbeschleunigungen mit einer höheren Destruktion von Zellen einhergehen. Für zunehmende Zentrifugationsbeschleunigungen wurde proportional dazu eine steigende Thrombozytenaktivierung beobachtet (71). Da eine Thrombozytenaktivierung zur Freisetzung von PMPs führen kann, kann nicht ausgeschlossen werden, dass hohen Zentrifugalbeschleunigungen ausgesetzte Plasmaproben ein hohes Maß an PMPs aufweisen (76). Darüber hinaus wurde bereits beschrieben, dass sich infolge der Zentrifugation von Vollblut PMPs nachweisen lassen (77). Diese bleiben unabhängig von der scherkraftbedingten Destruktion der Thrombozyten in der Plasmaprobe vorhanden. Eine steigende Konzentration von PMPs wird für eine Aktivierung von Thrombozyten wie auch für das Klotwachstum verantwortlich gemacht (78). So könnte eine präparationsbedingte Anwesenheit von PMPs als Auslöser für die Bildung der Klots verantwortlich gemacht werden. Leider konnte die Anwesenheit von PMPs im Plasma mit dem vorhandenen FACS-Calibur nicht bestimmt werden, sodass dies nur eine Annahme bleibt.

Trotz des Bestrebens, ein PFP mit möglichst wenigen Verunreinigungen herzustellen, zeigte sich auch in den schließlich in Versuchen verwendeten

Plasmaproben histologisch ein hoher Restanteil an CD42-positiven, sowie vWF-positiven Fragmenten/Zellen. Nichtsdestotrotz scheint ein mehrstufiger Zentrifugationsansatz ein weniger von Detritus geprägtes Ergebnis zu liefern als ein einstufiger Ansatz. Es wird angenommen, dass durch dieses Verfahren auch die PMPs aus der Plasmaprobe entfernt werden könnten. Andere Studien zeigten, dass dies durch Verlust von Thrombozyten zwischen den einzelnen Schritten erreicht wird (71,79).

Inwieweit die stimulatorische Funktion der PMPs im Koagulationsprozess (vergleiche 1.4) zu der Klotbildung in der Perfusionsanlage führt, kann nicht abschließend beantwortet werden, da weder PMPs noch die Konzentration an Thrombin bzw. Fibrinogen bestimmt wurde. Zudem bleibt die Frage unbeantwortet, warum die präparierten Plasmaproben unter statischen Bedingungen keine Trübung bzw. Klotbildung zeigten. Allerdings führte die zusätzliche Filtration der Plasmaproben mit Spritzenfiltern mit einer Porengröße von 0,2µm in unserem Perfusionsmodell zu einer verzögerten Trübung der Plasmaprobe. Eine Okklusion blieb aus.

4.3 Strömungsmechanische Aspekte der Klotbildung in Plasma

Matsunari et al. untersuchten die Rolle des Gewebsthromboplastins an der Ausbildung von vWF-abhängigen Thromben aus Vollblut. Sie wiesen in ihren Versuchen mit Flusskammern eine Okklusion nach 10 bis 12min nach (54). Wir stellten bei der Untersuchung einer strömungsinduzierten Klotbildung in Plasmaversuchen eine Okklusion nach 30min fest. *In vivo* beträgt die durchschnittliche Zeit bei ECMO-Anwendungen, nach welcher der Filter gewechselt werden muss, jedoch 9 Tage (8). Bezüglich Analogie des *ex vivo*-Perfusionsmodells gegenüber *in vivo*-Systemen wäre daher eine Verlängerung der möglichen Zeit bis zur Okklusion des Modells notwendig. Eine direkte Übertragbarkeit der *in vivo* Bedingungen an ECMO-Systemen auf *ex vivo*-Perfusionsmodelle ist bisher nicht möglich. Die maximale Laufzeit für *Mock Loops* beträgt aktuell 6 bzw. 12 Stunden. Ein großes Problem bei diesen *in vitro* Modellen ist die unphysiologische Umgebung, was die Funktion der isolierten Zellen stark beeinträchtigt (72).

Die oben diskutierte Problematik der Klotbildung in unseren Plasmaproben erfolgte bereits bei niedrigen Pumpendrücken. Die Klotbildung bei 5mbar mündete schließlich in der Obstruktion des Systems. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu der

Eingangshypothese, dass strömungsinduziert klotbildende vWF-Strukturen an der Gasfaser entstehen. Der vWF durchläuft normalerweise bei hohen Scherraten, welche als Geschwindigkeitsgradient bei hohen Flussgeschwindigkeiten auftreten, eine Konformationsänderung (25). Die dadurch exponierten Domänen und Bindestellen ermöglichen eine Adhäsion von Thrombozyten, Fibrinogen und Kollagen. Folglich kann es leichter zu einer scherkraft-induzierten Klotbildung kommen (25).

Die bei 5mbar beobachteten Präzipitate traten auch bei hoher Antikoagulation der Plasmaproben auf. Mit 8,3IE/mL (entspricht 8333IE/kg) wurden Heparindosen getestet, welche weit oberhalb der therapeutischen Dosis lagen. Trotz des Überschusses an Antikoagulanzen wurde eine Klotbildung festgestellt. Daraus kann geschlossen werden, dass die Hemmung des Gerinnungsfaktors X keine ausreichende Maßnahme zur Verhinderung der Klotbildung in unserem Modell darstellt (63). Die zuvor bereits genannte Theorie der thrombogenen Mikropartikel ist, basierend auf diesen Ergebnissen, nach wie vor möglich (56). Welchen Einfluss dabei jedoch die geringen Scherkräfte bei 5mbar haben, kann nicht beantwortet werden.

Es handelt sich bei dem im Rahmen dieser Arbeit in Paraffin- und Fluoreszenzschnitten untersuchten Klot anscheinend um eine Mischform aus vWF-Klot und Fibrin-Klot. Die Beobachtung von runden, positiv angefärbten Bereichen in vWF-gefärbten Schnitten könnte auf die Selbstassoziationsfähigkeit des vWF zurückzuführen sein (75). Die untersuchten Klots entstanden jedoch vorrangig bei niedrigen Scherraten. Diese Beobachtung legt neben dem vWF die Beteiligung von mindestens einer weiteren Komponente bei der Klotbildung nahe. In das Maschenwerk des entstandenen Klots lagerten sich Thrombozyten bzw. kleinere Thrombozytenaggregate ein. Ein derartiger Mechanismus ist in der Literatur bereits beschrieben worden (29,75)

Die heterogene Beschaffenheit des Klots steht in Einklang mit der nicht gelungenen Auflösung des Klots durch tPA. TPA besitzt lediglich fibrinolytische Eigenschaften. Ein ähnliches Ergebnis wird für einen alleinigen Lyseversuch mit ADAMTS-13 erwartet. Dass die Quervernetzung des Klots durchaus unspezifisch enzymatisch gespalten werden kann, zeigt der Lyseversuch mit Trypsin.

Relaxationsprozesse im *ex vivo*-Modell

In Plasmaversuchen bei Pumpendrücken von 80mbar und 100mbar konnte eine Klotbildung mit fadenartigen Strukturen lediglich im Bereich der Gasfaser festgestellt werden. Die Beobachtung erfolgte visuell mit dem Fluoreszenzmikroskop. Es ist nicht auszuschließen, dass andernorts im Perfusionssystem weitere derartige Klotstrukturen ausgebildet wurden, die sich jedoch außerhalb des Sichtfeldes befanden.

Durch Anhalten der Pumpe wurde die kontinuierliche Erzeugung eines Volumenflusses unterbrochen. In diesem Fall wurde ein scheinbares Zusammenfallen der Ablagerung beobachtet. Physikalisch lässt sich dieses Verhalten der Flüssigkeit durch Relaxationsprozesse im Zusammenhang mit Reibung erklären. Ab dem Zeitpunkt t_0 , an welchem die Pumpe angehalten wird, beträgt die Antriebskraft $F_A = 0$. Für jeden Zeitpunkt $t > t_0$ wirken nur noch die Viskosität als Reibungskraft und, dieser entgegengerichtet, die kinetische Energie der Flüssigkeit (80). Für den hier beschriebenen Fall bedeutet es vereinfachend, dass der Volumenfluss im *ex vivo*-Perfusionsmodell erst nahe 0mL/min liegt, wenn die der kinetischen Energie entgegenwirkende Viskosität der Plasmaprobe gegenüber der kinetischen Energie der Moleküle der Flüssigkeit ausreichend größer ist. Die Beurteilung der Strömungsmechanik der Experimente im Rahmen dieser Arbeit ergab eine turbulente Strömungsform im Bereich des Eckkonnektors. Turbulente Strömungsformen bringen hohe kinetische Energien mit sich (17). Im Rahmen des Relaxationsprozesses wird ein Zustand erreicht, in welchem die Reynoldszahl wieder unter eins liegt. Dies entspricht einer laminaren Strömung (17). In diesem Fall kann für die an der Klotbildung beteiligten Mikropartikel das Stoke'sche Gesetz angewendet werden (81). Es kommt zu einem Absinken der Bestandteile der beobachteten Ablagerung an der Gasfaser. Dieses Absinken findet, solange der Volumenfluss ungleich 0mL/min ist, im gesamten Schlauchsystem des *ex vivo*-Modells statt.

Wechselwirkende Einflüsse bei verschiedenen Pumpendrücken

Es wurden weitere Versuche bei für den jeweiligen Versuch unverändertem Pumpendruck durchgeführt. Für 100mbar und 50mbar konnten strömungsgerichtete Ablagerungen an der Gasfaser beobachtet werden. Der bei 50mbar beobachtete Klot

erschien augenscheinlich größer, als der bei 100mbar beobachtete Klot (siehe Abbildung 55).

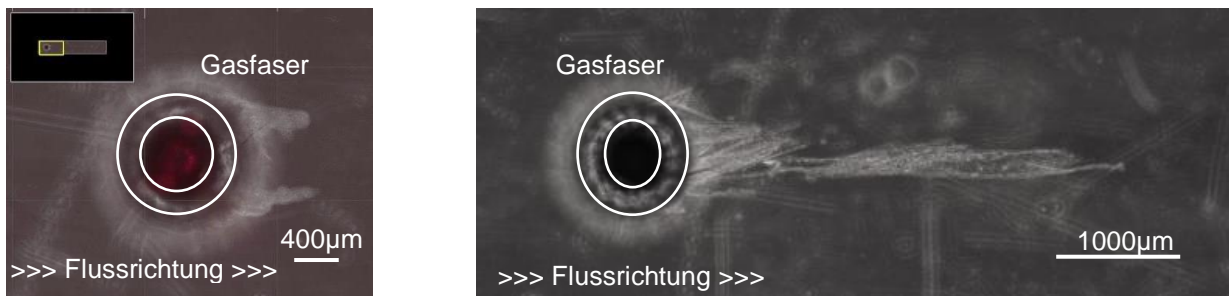


Abbildung 56: Darstellung der Klotbildung an der Polymethylpenten-Gasfaser bei 100mbar (links) und bei 50mbar (rechts). Die Ablagerung erfolgte in beiden Fällen in Strömungsrichtung. Bei der Perfusion bei 50 mbar erschien diese jedoch länger als bei 50mbar. Diese Beobachtung lässt sich mit den höheren Scherspannungen bei den mit höheren Pumpendrücken einhergehenden höheren Volumenflüssen erklären. In dieser Darstellung wurde auf eine Längenmessung des Klots verzichtet, eine ungefähre Abschätzung ist jedoch unter Berücksichtigung der angegebenen Maßstäbe möglich.

Diese Beobachtung lässt sich damit erklären, dass hohe Volumenflüsse eher hohe Scherspannungen bedingen als geringe Volumenflüsse (82). Die in Diagramm 2 dargestellten hohen Scherspannungen bei hohen Pumpendrücken sind nur als näherungsweise korrekte Werte zu betrachten, da erst in auf die Berechnungen folgenden Versuchen genauere Informationen bezüglich des Strömungsverhaltens im Perfusionssystem gewonnen werden konnten.

Die hohen Scherspannungen und die Klotbildung stehen in den Versuchen bei 100mbar und 50mbar in einem derartigen Verhältnis zueinander, dass eine Klotbildung zwar möglich ist, eine Okklusion jedoch ausbleibt.

Die Verlangsamung des Volumenflusses und die folgende Okklusion des Perfusionssystems in Versuchen bei 5mbar sind darauf zurückzuführen, dass die auftretenden Scherspannungen den in dieser Situation vorherrschenden Bestrebungen zur Klotbildung nicht mehr ausreichend entgegen wirken können.

Erklärungsansätze für den damit einhergehenden Temperaturabfall sind unter 4.1 aufgeführt.

Aus den aufgeführten Beobachtungen ergab sich die Fragestellung, ob zwischen der Tendenz zur Klotbildung und der Temperatur im Perfusionssystem ein Zusammenhang besteht. Hierfür spricht zunächst die transfusionsmedizinische Praxis, Thrombozytenkonzentrate bei Raumtemperatur zu lagern, da es bei 4°C zu einer Thrombozytenaktivierung kommt. Da das im Rahmen dieser Arbeit angewandte

Protokoll der Plasmaherstellung mit einem Restanteil thrombozytärer Bestandteile einhergeht, könnte eine Temperaturerniedrigung bei 5mbar die Tendenz zur Klotbildung erhöhen und die Okklusion des Systems beschleunigen. Studien belegen zudem, dass es ebenfalls bei RT zu einer Aktivierung der Thrombozyten kommt (35). Eine Verringerung der Tendenz zur Klotbildung durch eine Temperaturerhöhung auf circa 42°C ist theoretisch möglich (83). Jedoch ist bei Temperaturen von über 40°C mit einer Denaturierung der Plasmaproteine zu rechnen, was sich wiederum in einer Okklusion des Perfusionssystems äußern würde. Darüber hinaus besteht, ebenfalls aus dem Grund der möglichen Proteindenaturierung, bei Temperaturen von über 40°C bezüglich der Verwendung eines ECMO-Systems keine klinische Relevanz.

Einfluss des Eckkonnektors

Für den im System ursprünglich eingebauten Eckkonnektor wurden Verwirbelungseffekte, sowie hohe Scherkräfte und Flussgeschwindigkeiten festgestellt. Die Verwirbelungen sind als Zeichen einer turbulenten Strömung zu werten (17). Der Eckkonnektor könnte also auch ein Auslöser für Scherkraft-induzierte vWF-abhängige Klotbildung sein.

In Plasmaversuchen mit ungefiltertem Plasma wurde auch nach Ausbau der Eckkonnektoren eine Eintrübung mit anschließender Okklusion beobachtet. Im gleichen Versuchsaufbau, aber unter Verwendung von in Anlehnung an eine Arbeit von Dey-Hazra (56) gefiltertem Plasma kam es erst 15min später zu einer Eintrübung des Plasmas, eine Okklusion blieb aus. Es ist anzunehmen, dass es bei längerer Beobachtung auch in diesem Aufbau zu einer Okklusion gekommen wäre. Damit rückte auch hier, nach Entfernung der für die Zielsetzung kompromittierenden Eckkonnektoren, eine klotinduzierende Wirkung der PMPs in den Fokus.

Die im Rahmen von Serumversuchen berechneten Scherraten legen bezüglich des Eckkonnektors die Vermutung nahe, dass die scherkraftbedingte Entfaltung des vWF systembedingt unabhängig von der Gasfaser möglich ist.

4.4 Ausbildung von vWF-Fäden in Serum

In unserem Modell wurde eine Polymethylpenten-Gasfaser analog zum Aufbau von Herbig und Diamond in die Flusskammer eingebracht. Durch die eingebrachte

Gasfaser änderte sich das Flussverhalten in der Umgebung der Faser (siehe Abbildung 30 B).

Für das in dieser Arbeit etablierte Modell wurden für Bereiche an der Gasfaser Scherraten von mindestens 2000/s (hellblauer Bereich in Abbildung 30 B) und bis zu 10000/s (roter Bereich in Abbildung 30 B) berechnet. Scherraten und Scherspannung sind über die Viskosität miteinander verknüpft (23). Mit einer Plasma- bzw. Serumviskosität von 1,2mPa s (17), ergeben sich für unser Perfusionsmodell mindestens Scherspannungen von mindestens 2,4Pa bzw. von bis zu 12Pa.

Dass sich in Serumversuchen zwar fadenartige Strukturen, aber keine Klots bildeten, spricht dafür, dass Plasma Komponenten enthält, welche bei der Klotbildung eine maßgebliche Rolle spielen und in Serum weitestgehend fehlen. Der für diese Arbeit relevanteste Unterschied zwischen Serum und Plasma besteht darin, dass Plasma alle Gerinnungsfaktoren enthält (62). In beiden Blutprodukten ist jedoch vWF enthalten (84).

In Serumversuchen konnte eine Ausbildung von vWF-Antikörper-positiven Strukturen an der Gasfaser beobachtet werden. Die Ausbildung erfolgte sowohl in Serum ohne Zusatz von einem vWF/FVIII-Kombipräparat, als auch in Versuchen, in welchen dem Serum das Kombipräparat zugesetzt und damit die vWF-Konzentration erhöht wurde. Auffällig war vor allem, dass es bei Perfusionsversuchen mit gepooltem Humanserum ohne den Zusatz des vWF/FVIII-Kombipräparates zur Ausbildung fadenartiger Strukturen kam, während dieser Effekt bei der Verwendung von Proband:innenserum im Beobachtungszeitraum ausblieb. Dies ist am ehesten mit einem höheren Anteil von vWF in dem gepooltem Humanserum verglichen mit dem untersuchten Proband:innenserum zu erklären.

Es konnte zudem exemplarisch an einem Volumenstrom von 20mL/min nachgewiesen werden, dass sich im Eckkonnektor kritische Scherraten bilden, die eine Entfaltung des vWF möglich machen (vergleiche 4.3). Scherspannung und Scherrate unterliegen für laminare Strömungen einem proportionalen Zusammenhang (85). Bei durch pathologisch erhöhte Flussraten erhöhten Scherspannungen kommt es beim vWF zu einer Konformationsänderung. In der Arbeit von Schneider et al. wird eine Entfaltung des vWF auf Längen von bis zu 10µm unter Scherspannungen von 4-5Pa beschrieben. Die Untersuchung erfolgte

mittels Fluoreszenzmikroskopie (53). Nach Singh et al. ist eine Entfaltung des vWF bei geringeren Scherspannungen ebenfalls möglich. Für einen Anteil von 10-15% wurde eine Entfaltung bereits bei 3Pa nachgewiesen (52). Siedlecki et al. gelang der Nachweis einer Konformationsänderung des vWF an einer hydrophoben Oberfläche bei 3,5Pa (60).

In entfaltetem Zustand hat der vWF die Fähigkeit zur Selbstassoziation (25). Shankaran et al. definierten nach eigenen Versuchen mit Flusskammern eine Scherspannung von 6Pa als mindestens notwendig für eine Selbstassoziation des vWF in Lösung (35).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für einen Volumenfluss von 15mL/min (entspricht einem Pumpendruck von 50mbar, ohne Berücksichtigung eines Korrekturfaktors) Scherspannungen an der Polymethylpenten-Gasfaser berechnet. Diese lagen durchschnittlich bei 3Pa. Es wurde eine maximale Scherspannung von 9Pa erreicht. Damit sind entsprechend der zuvor geschilderten Hintergründe die Bedingungen zur Selbstassoziation des vWF gegeben.

Bisher ist wenig bekannt über den genauen Mechanismus der Selbstassoziation von vWF bei hoher Scherspannung. Es kommt zur Ausbildung eines vWF-Netzwerkes, in das sich Thrombozyten einlagern können (75).

5 Zusammenfassung

Neben Blutungen stellen thrombotische Ablagerungen ein bisher nur unzureichend geklärtes Problem der ECMO-Therapie dar. In früheren Forschungsprojekten konnte eine Verschlechterung der Gasaustauschleistung der Oxygenatormembran durch thrombotische Ablagerungen festgestellt werden. Mit der Verwendung eines ECMO-Modells besteht die Möglichkeit, Einzelfaktoren zu betrachten und auf diese Weise spezifisch Informationen bezüglich der Klottbildung zu gewinnen. Mithilfe von Flusskammern, welche mit senkrecht zur Flussrichtung stehenden Gasfasern versehen wurden, sollte mit dem in dieser Studie verwendeten Perfusionsmodell eine Klot- beziehungsweise vWF-Fadenbildung in Blutserum bzw. Blutplasma unter kontrollierten Bedingungen mittels *Live-Imaging* sichtbar gemacht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst ein Herstellungsverfahren für PFP etabliert. Zur Reduktion thrombogener Mikropartikel in den Proben erfolgte eine Plasmafiltrierung. Die Mikropartikel entstehen wahrscheinlich durch die scherkraftbedingte Destruktion von Zellen und bzw. oder durch eine Thrombozytenaktivierung bei der Zentrifugation. Für Mikropartikel wurde bereits in anderen Arbeiten eine Assoziation mit Thrombogenität hergestellt. Im Rahmen dieser Studie wurde keine Mikropartikeluntersuchung durchgeführt. Die vergleichenden Ergebnisse der Plasmaversuche mit und ohne vorangegangene Filtrierung des Mediums sind jedoch richtungsweisend. Für die im Perfusionsmodell verbauten Eckkonnectoren wurden gesteigerte Scherraten nachgewiesen, welche eine Entfaltung des vWF mit anschließender Selbstassoziation erwarten lassen. In Serumversuchen kam es insbesondere bei Pumpendrücken von 100mbar bzw. 85mbar zur Ausbildung von vWF-Fäden. Es wurden Fäden mit Längen von bis zu 2525µm erzeugt. Der Nachweis erfolgte mithilfe spezifischer Antikörper in der Fluoreszenzmikroskopie.

Eine Klotbildung wurde in Plasmaversuchen bei niedrigem Pumpendruck beobachtet. Bei 5mbar führte diese schließlich zur Obstruktion des Systems. Die beobachteten Klots traten auch bei hoher Antikoagulation (100IE Heparin) der Plasmaproben auf. Zudem wurde eine Klotbildung unabhängig von der Gasfaser beobachtet. Die histologische Untersuchung eines isolierten Klots ergab eine Zusammensetzung aus vWF, Fibrinogen und Thrombozyten.

6 Ausblick

Der in dieser Arbeit verwendete Versuchsaufbau kann in verschiedene Richtungen modifiziert werden.

Es besteht die Möglichkeit, Gasfasern waagrecht zur Flussrichtung einzubauen. Weiterhin können, zur weiteren Annäherung an die Gegebenheiten in ECMO-Systemen, künftig *Slides* mit mehreren hintereinander oder zueinander versetzt angeordneten Gasfasern verwendet werden.

Weiterhin besteht die Möglichkeit PPP oder PRP als Perfusionsmedium heranzuziehen. Die erhöhte Zellzahl des PPP bzw. des PRP erlaubt die Untersuchung der Klotbildung hinsichtlich speziell thrombozytärer Faktoren. Es ist anzumerken, dass das Perfusionsmedium mit steigender Zellzahl zunehmend die

Eigenschaften einer nicht-newtonschen Flüssigkeit aufweist. Vor diesem Hintergrund erfordern zellreiche Blutmedien erneute Eichmaßnahmen des verwendeten Flusssensors.

Die Verwendung von Humanserum unter Zusatz von rekombinantem vWF bietet die Möglichkeit, eine strömungsinduzierte Ausbildung von vWF-Strukturen an der Gasfaser spezifisch zu untersuchen. Im gleichen Versuchsaufbau ließe sich durch Zugabe rekombinanter ADAMTS-13 eine mögliche Lysereaktion feststellen. Die Verwendung von bereits fertig aufbereitetem vWF bietet den Vorteil definierter Bedingungen.

Das Einbringen neutrophiler Granulozyten in ein aggregatbildendes Medium zeigt, ob die Immunzellen eine Rolle bei der Klottbildung einnehmen. Auch eine Auflösung des Präzipitats oder eine Verhinderung der Ausbildung durch neutrophile Granulozyten sind möglich.

Alle beschriebenen, weiterführenden Überlegungen stehen vor dem Hintergrund der Thrombusbildung an realen Oxygenatormembranen. Die Identifizierung einer Ursache und möglicher Gegenmaßnahmen im *ex vivo*-Modell und der mögliche Transfer auf ECMO-Systeme würde eine langfristige Verbesserung der ECMO-Behandlung bedeuten.

7 Anhang

7.1 Materialien

7.1.1 Geräte

Name	Hersteller	Ort
Ibidi-Pump System	Ibidi	Gräfelfing, Deutschland
Schlauchsystem (Silicone Tubing)	Ibidi	Gräfelfing, Deutschland
2x Luer Connector Male	Ibidi	Gräfelfing, Deutschland
4x Elbow Luer Connector Male	Ibidi	Gräfelfing, Deutschland
2x Female Luer Lock Coupler	Ibidi	Gräfelfing, Deutschland
Ibidi-Slides (μ Slide I 0,6 Luer), modifiziert durch die Ostbayerische Technische Hochschule	Ibidi	Gräfelfing, Deutschland
Silica-Kugeln in	Ibidi	Gräfelfing, Deutschland

Trockenflaschen		
Prototype-FTC-CO2-09NaCl	PreSens	Regensburg, Deutschland
OXY-1 SMA (Trace)	PreSens	Regensburg, Deutschland
SLS_1500 Liquid Flow Meter	Sensirion	Stäfa, Schweiz
Inliner Luer Injection Port	Ibidi	Gräfelfing, Deutschland
Styroporkiste		
Wärmefolie		
Trafo-Netzgerät	Manson	Kwai Chung, China
Dell Vostro	Dell Technologies	Austin, USA
Dell Latitude	Dell Technologies	Austin, USA
CAPNOMAC Ultima	DATEX Engström	Duisburg, Deutschland
Trajan 808	Dräger	Lübeck, Deutschland
BD Discardit II Einmalspritzen mit Luer Anschluss (10mL)	Becton Dickinson	Franklin Lakes, USA
INU Incubation System for Microscopes	Tokai Hit Co., Ltd.	Fujinomiya-shi, Japan
Mikroskop DMi8 IRB	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH	Wetzlar, Deutschland
sCMOS Mikroskop Kamera	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH	Wetzlar, Deutschland
All-In-One Fluorescence Microscope	Keyence	Neu-Isenburg, Deutschland
Heraeus Sepatech Megafuge 1.0 R	Thermo Fisher Scientific	Langenselbold, Deutschland
Heraeus Intruments Biofuge Stratos	Thermo Fisher Scientific	Hanau, Deutschland
Mikrozentrifuge Micro Star 17R	VWR International	Radnor, USA
Centrifuge 5810R	Eppendorf	Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Heraeus Multifuge 1 L-R	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Heraeus Megafuge 16R	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Digitale Einstichthermometer POCKET-DIGITEMP	TFA Dostmann GmbH	Wertheim, Deutschland
Zytozentrifuge Cytospin 3/Probenkammer	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Menzel-Gläser Superfrost® Plus	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
BD FACSCalibur	Becton Dickinson	Franklin Lakes, USA
Spritzenfilter 0,2µm	Sarstedt	Nürnberg, Deutschland

BP221S Waage	Sartorius	Göttingen, Deutschland
Additionsstopper 1/5 Sek.	Hanhart 1882 GmbH	Gütenbach, Deutschland
5ml FACS-Röhrchen	Sarstedt	Nürnberg, Deutschland

7.1.2 Software

Name	Hersteller	Ort
Pump Control, Version 1.5.4	Ibidi	Gräfelfing, Deutschland
PreSens Measurement Studio, Version 2	PreSens	Regensburg, Deutschland
USB/RS485 Sensor Viewer, Version 2.91	Sensirion	Stäfa, Schweiz
Imaris x64, Version 2.91	Bitplane	Zürich, Schweiz
Leica Application Suite X	Leica	Wetzlar, Deutschland
BZ observation application	Keyence	Neu-Isenburg, Deutschland
FLOWJO, Version 10	Becton Dickinson	Franklin Lakes, USA
Microsoft Excel 2010	Microsoft Corporation	Redmond, USA

7.1.3 Chemikalien

Name	Hersteller	Ort
0,9%-ige Kochsalzlösung	Braun	Melsungen, Deutschland
Fahndi 250l.E./10ml	Grifols	Barcelona, Spanien
Humanserum	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
PSA/BSA 0,5%		
CD61p Antikörper	Becton Dickinson	Franklin Lakes, USA
Actilyse ® 20mg	Boehringer Ingelheim	Ingelheim am Rhein, Deutschland
Trypsin	Sigma Aldrich	Steinheim, Deutschland
Heparin-Natrium 25000 I.E./5ml Injektions-/lösung	Braun	Melsungen, Deutschland
TBS	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Tween20	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
CD42b/GPIb α (MM2/174)	Novus Biologicals	Centennial, USA
Rabbit vWF	Dako	Glostrup, Dänemark
Mouse CD62p	Santa Cruz Biotechnology	Dallas, USA
Donkey anti-mouse IgG-AF488	Abcam	Cambridge, Vereinigtes Königreich

Donkey anti-rabbit IgG-AF594	Abcam	Cambridge, Vereinigtes Königreich
DAPI, 0,5µg/mL	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Fluoromount G ®	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Paraformaldehyd	Merck	Darmstadt, Deutschland
EDTA-Puffer	Sigma Aldrich	Steinheim, Deutschland
1% BSA	Roth	Karlsruhe, Deutschland
2% NDS	Sigma Aldrich	Steinheim, Deutschland
0,2% Coldwater Fish Gelat	Sigma Aldrich	Steinheim, Deutschland
0,05% Triton	Sigma Aldrich	Steinheim, Deutschland
Fibrinogen β (D-4)	Santa Cruz Biotechnology	Dallas, USA
Mouse Fibrin	EMD Millipore Corporation	Burlington, USA

7.1.4 Sonstige Materialien

Name	Hersteller	Ort
Aluminiumfolie		
Silikonschläuche		
S-Monovette ® 4,3 mL Citrat 3,2% (1:10)	Sarstedt	Nürnbrecht, Deutschland
S-Monovette ® 7,5 mL K3 EDTA	Sarstedt	Nürnbrecht, Deutschland
S-Monovette ® 7,5 mL Lithium-Heparin	Sarstedt	Nürnbrecht, Deutschland
Indikatorpapier	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
DAKO Pen	Dako Agilent	Santa Clara, USA

7.2 Protokolle zur Vorbereitung

7.2.1 Protokoll zur Präparatvorbereitung im Rahmen der Zytospinanalyse

1. Vorbereitung und Zytospin der Proben

1.1. Verdünnung der PRP-Proben in einem Verhältnis von 1:100 mit TBS-Puffer (*TRIS-buffered saline*) (100mL TBS + 1g 1% BSA + 2mL 2% NDS + 200µL 0,2% *ColdwaterFishGelat* + 50µL 0,05% Triton + 50µL 0,05% Tween20).

1.2. Aufbringen der Proben unter Verwendung eines Zytospins auf Objektträger. Anschließendes Trocknen der Objektträger und Umrandung des entsprechend benetzten Bereiches auf dem Objektträger mit einem Fettstift.

- 1.3. Fünfminütige Fixierung der Präparate in 4% Paraformaldehyd bei RT.
Anschließendes Waschen der fixierten Präparate mit TBS
- 1.4. Strukturaufschluss mit TBS und 0,1% Tween20 für 10min
- 1.5. Blocken unspezifischer Bindungen mit TBS-Puffer unter Inkubation bei RT für eine Stunde.
2. Färbung mit den Primärantikörpern
 - 2.1. Aufbringen der Antikörper für die Doppelfärbungen
 - 2.1.1. Maus-anti-*human* CD42b-Antikörper (1:200 verdünnt) und ein Kaninchen-anti-*human* vWF-Antikörper (1:500 verdünnt)
 - 2.1.2. Maus-anti-*human* CD62p-Antikörper (mit TBS-Puffer im Verhältnis 1:150 verdünnt) und ein Kaninchen-anti-*human* vWF-Antikörper (mit TBS-Puffer im Verhältnis 1:500 verdünnt)
 - 2.2. Antikörper-Inkubation über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer
 - 2.3. Waschen der Präparate zunächst 5min in TBS-Puffer, dann erneut zweimal 5min in TBS-Puffer
3. Färbung mit dem Sekundärantikörper
 - 3.1. Ansetzen von Esel-anti-*mouse* IgG-AF488 (1:300 verdünnt) und ein Esel-anti-*rabbit* IgG-AF594 (1:300 verdünnt) in TBS
 - 3.2. Inkubation der Präparate für 60min
 - 3.3. Dreimaliges Waschen der Präparate für 5min in TBS-Puffer und anschließendes Abklopfen
4. Aufbringen von 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) als dritter Farbstoff. DAPI ermöglicht durch Interkalation in die DNS eine Anfärbung der Zellkerne.
5. Eindecken der Objektträger durch das Versetzen der Präparate mit Fluoromount G[®] und Inkubation über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer zur Polymerisation

7.2.2 Protokoll zur Probenvorbereitung im Rahmen der durchflusszytometrischen Analyse

1. Verdünnung des PRP-Aliquots im Verhältnis 1:10 mit PBS/BSA 0,5%. Die weiteren Proben wurden nicht weiter verdünnt.
2. Fixierung der Proben mit jeweils 100µL 1% Paraformaldehyd. Anschließende Inkubation für 30min bei RT.
3. Waschen der Proben, mit Ausnahme der PRP-Proben, mit jeweils 500µL PBS/BSA 0,5%.
4. Befüllen aller verwendeten Mikroreaktionsgefäße mit 2mL PBS/BSA 0,5%
5. 10-minütige Zentrifugation bei 520g bei 22°C. Verwerfen des Überstandes.
6. Hinzufügen von je 5µL CD61-Antikörper und 1µL eines Maus-anti-*human* CD62p-Antikörpers zu den Pellets der Positivproben. Anschließende Inkubation im Dunklen bei RT für 45min
7. Waschen aller Proben mit jeweils 500µL PBS/BSA 0,5%
8. Resuspension mit je 500µL PBS/BSA 0,5%

7.2.3 Protokoll zur Präparatvorbereitung im Rahmen einer histologischen Klotanalyse nach Perfusion

1. Herstellung und Vorbereitung der Schnitte
 - 1.1. Zentrifugation eines Teils des Klots für 15min bei 17000g. Verwerfen des Überstandes.
 - 1.2. Einlegen der Probe in eine 10%-ige Formaldehydlösung zur Fixierung
 - 1.3. Einbettung der Probe in Paraffin, Schneiden und Färben. Als Kontrollschnitt diente Tonsillengewebe. Der Gewebeaufschluss erfolgte nach einem Protokoll nach Brinckmann, V. et al. (86)
 - 1.4. Erstellung von Schnitten aus dem Paraffinblock mit dem eingebetteten Klot mit einem Mikrotom 5µm-Schnitte erstellt und Ziehen der Schnitte auf auf Objektträger. Anschließendes Trocknen der Objektträger über Nacht bei 50°C
 - 1.5. Zweimaliges Entparaffinieren für 5min mit Xylol und Überführen der Schnitte mittels absteigender Alkoholreihe in ein wässriges Milieu.
 - 1.6. Waschen der Objektträger mit vollentsalztem (VE-)Wasser gewaschen
 - 1.7. Hemmung der endogenen Peroxidase für 10min mit 3%-igem Wasserstoffperoxid in VE-Wasser
 - 1.8. Waschen der Objektträger mit VE-Wasser gewaschen
 - 1.9. Sieden der Objektträger über 20min in EDTA-Puffer (Zytomed Systems Tris-EDTA Buffer pH 9,0 (10X)) zum Aufschluss vernetzter Epitope. Anschließendes Abkühlen über 20min
 - 1.10. Waschen der Objektträger mit VE-Wasser gewaschen
 - 1.11. Trocknen der Objektträger und Umrandung des Schnittes mit Fettstift
 - 1.12. Versetzen der Objektträger für 5min mit VE-Wasser, dann für 5min mit TBS-Puffer versetzt.
 - 1.1. Blocken unspezifischer Bindungen durch TBS für zwei Stunden im Dunkeln bei RT
2. Färbung mit dem Primärantikörper
 - 2.1. Aufbringen von
 - 2.1.1. *mouse CD42b* im Verhältnis 1:200 mit TBS-Puffer verdünnt (pH 9)
 - 2.1.2. *mouse Fibrinogen β* im Verhältnis 1:550 mit TBS-Puffer verdünnt (pH 6)
 - 2.1.3. *mouse Fibrin* im Verhältnis 1:350 mit TBS-Puffer verdünnt (pH 6)
 - 2.1.4. *rabbit vWF* im Verhältnis 1:500 mit TBS-Puffer verdünnt (pH 6)
 - 2.2. Inkubation über Nacht bei 4°C
 - 2.3. Dreimaliges Waschen der Objektträger mit TBS
3. Färbung mit dem Sekundärantikörper
 - 3.1. Aufbringen von
 - 3.1.1. *donkey anti-mouse-AF488* im Verhältnis 1:300 mit TBS verdünnt
 - 3.1.2. *donkey anti-rabbit-AF594* im Verhältnis 1:300 mit TBS verdünnt
 - 3.2. Inkubation für 60min im Dunkeln bei RT
 - 3.3. Dreimaliges Waschen der Objektträger mit TBS
4. Aufbringen von 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) als dritter Farbstoff. DAPI ermöglicht durch Interkalation in die DNS eine Anfärbung der Zellkerne.

5. Eindecken der Objektträger durch das Versetzen der Präparate mit Fluoromount G® und Inkubation über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer zur Polymerisation

7.3 Einverständniserklärung zur Verwendung von Bildmaterial

Einverständniserklärung zur Verwendung von wissenschaftlichen Bildaufnahmen

Folgende Einverständniserklärung wird geschlossen

Zwischen **Annika Spychalski, Universität Regensburg**

**Strömungsinduzierte Thrombusbildung an einer
Polymethylpenten-Gasfaser in einem ex-vivo
Perfusionsmodell (Arbeitstitel), Prof. Dr. Karla Lehle**

Und **Clemens Birkenmaier, Ostbayerische Technische
Hochschule Regensburg**

Herr Clemens Birkenmaier gesteht Frau Annika Spychalski ein unwiderrufliches Nutzungsrecht an den folgenden wissenschaftlichen Bildaufnahmen zu. Das einfache Nutzungsrecht umfasst die Verwendung der Bildaufnahmen sowohl in ihrer Ganzheit, als auch in Teilen, eine Veröffentlichung in der oben genannten Dissertationsschrift und eine Neuauflage derselben.

plasma_Vd 20ml_min_fam_tr-1_gammadot_01.png (166 KB)

plasma_Vd 20ml_min_fam_tr-1_gammadot_02.png (122 KB)

plasma_Vd 20ml_min_fam_tr-1_gammadot_03.png (182 KB)

plasma_Vd 20ml_min_fam_tr-1_streamlines_U_01.png (267 KB)

plasma_Vd 20ml_min_fam_tr-1_streamlines_U_02.png (610 KB)

plasma_Vd 20ml_min_fam_tr-1_streamlines_U_03.png (600 KB)

plasma_Vd 20ml_min_fam_tr-1_tau01.png (203 KB)

plasma_Vd 20ml_min_fam_tr-1_vorticity1000_gammadot_01.png (622 KB)

Diese Berechtigung bezieht sich ausschließlich auf die oben genannte Dissertation von Frau Annika Spychalski. Eine Übertragung des Nutzungsrechts durch Frau Annika Spychalski an Dritte ist nicht gestattet.

Ort, Datum

Regensburg, den 21.09.2020

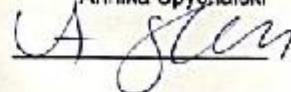
Clemens Birkenmaier



Ort, Datum

Regensburg, 8.10.20

Annika Spychalski



7.4 Abbildungsverzeichnis

- 1 Vereinfachte Darstellung der Gerinnungskaskade. Die dargestellten Abläufe sind Teil der sekundären Hämostase. Die extrinsische (blau) und intrinsische Gerinnung (grün) unterscheiden sich dabei in ihrer Auslösung. Bei der intrinsischen Gerinnung besteht ein endogener Auslöser. Unter exogenen Einflüssen kommt es zur Aktivierung des extrinsischen Weges. Beide Wege münden schließlich in die Ausbildung eines Fibrinpolymers (grau). Modifiziert nach Silbernagl et al. (17).11
- 2 Schematische Darstellung der Bestandteile der vorliegenden Arbeit20
- 3 Darstellung eines nicht-präparierten Ibidi-Slides (A) und eines präparierten Ibidi-Slides (B). A: Nativer Ibidi-Slide ohne Gasfaser. Die Strömungskammer mündet zu beiden Seiten in einen Luer-Anschluss. An diesen werden bei Einbau ins System über Konnektoren die Silikonschläuche befestigt. Mittig ist die belassene Strömungskammer zu erkennen. B: Ibidi-Slide mit eingeborhrter Gasfaser. Mit einem Mikrobohrer wird die Strömungskammer mit einem Loch versehen. In dieses Loch wird die Polymethylpenten-Faser hineingeklebt. Aufgrund der Gefahr von Mikrorissen in der Strömungskammer durch den Prozess der Slide-Modifizierung, sind die Strömungskammern vor Gebrauch auf Dichtigkeit zu prüfen.22
- 4 Bestandteile des Pumpensystems. A: *Fluidic Unit* des Pumpensystems. Die Spritzen sind idealerweise je mit 5-7mL Medium gefüllt. Die Spritzen münden in Silikonschläuche, die in ein Ventilsystem eingespannt werden. Über koordiniertes Öffnen und Schließen der Ventile soll ein kontinuierlicher Fluss erzeugt werden. B: Luftpumpe des Pumpensystems. Der elektronische Teil der Pumpe wird über eine Computersoftware (*PumpControl*, Ibidi) angesteuert. Außerdem ist die Luftpumpe mit der *Fluidic Unit* (Bild A), sowie mit einer Silicagelflasche verbunden.23
- 5 Schlauchsystem. Das Schlauchsystem setzt sich aus Silikonschläuchen variierbarer Längen zusammen. Die einzelnen Schläuche werden über Konnektoren miteinander verbunden, wodurch sich Schnittstellen ergeben. An diesen Schnittstellen können Sensoren eingebaut werden.23
- 6 Sensoren der Firma PreSens. A: CO₂-Durchflusszelle. Die Zelle ist über einen Lichtleiter (schwarz unten im Bild) mit der dazugehörigen Software (PreSens Measurement Studio, PreSens) verbunden. B: Der Temperatursensor ist eine Durchflusszelle, die über Lichtleiter mit der zugehörigen Steuerungssoftware (PreSens Measurement Studio, PreSens) verbunden ist. Um Messfehler durch Wärmeverluste am Sensor selber zu vermeiden, wurde der Temperatursensor mit Schaumstoff isoliert und die Isolationsschicht mit einer Klammer (blau im Bild) gesichert.24
- 7 Flusssensor der Firma Sensirion. Der Flusssensor besitzt zwei Anschlüsse (blau) für die Silikonschläuche des Perfusionssystems. Links oben ist der Anschluss für das Verbindungskabel zur Steuerungssoftware (USB/RS485

- Sensor Viewer, Sensirion) dargestellt. Der Sensor bedient sich eines thermischen Messprinzips.....25
- 8 Blick von oben auf die Klimakammer des Mikroskops. Rechts führen die Silikonschläuche des Perfusionssystems in die Klimakammer, zusammen mit einem CO₂-Sensor. Mittig in der Klimakammer sieht man die an die Strömungskammer angeschlossenen Silikonschläuche. Da es sich um ein inverses Mikroskop handelt, befindet sich die Leuchte über dem Objektisch. .25
- 9 Versuchsaufbau. A: Schematische Darstellung. Die Klimakammer des Mikroskops enthält die mit einer Polymethylpenten-Gasfaser bestückte Strömungskammer. Über Silikonschläuche ist diese mit Fluss-, Temperatur- und CO₂-Sensoren, sowie einer Luftdruckpumpe verbunden. Außerdem besteht Verbindung zu der *Fluidic Unit* des Pumpensystems, welche sich in einer Wärmekammer befindet. In der Wärmekammer herrschen idealerweise kontrollierte Temperatur- und CO₂-Bedingungen. An den Kreislauf angeschlossen sind außerdem eine Silicagelflasche zur Luftentfeuchtung, sowie eine Narkosegasgerät (Trajan) und ein Atemgasmonitor (Capnomac) zur Überwachung und Einstellung der CO₂-Zufuhr. Die Sensoren und die Luftdruckpumpe werden mittels entsprechender Software von einem Computer angesteuert. B: Darstellung im Labor mit Legende. Der Übersichtlichkeit halber wurden die Modellkomponenten mit Buchstaben gekennzeichnet und die Bedeutung in der nebenstehenden Legende erläutert.....26
- 10 Isolation des Schlauchsystems. A: Schlauchsystem ohne Isolation. Die Silikonschläuche haben einen Innendurchmesser von 1,6mm. B: Schlauchsystem mit Isolation. Die Silikonschläuche wurden mit Alufolie umwickelt und anschließend in Silikonschläuche größeren Durchmessers gebracht. Die äußeren Schläuche wurden an den offenen Enden mit Alufolie und Klebeband verschlossen. Das Bild zeigt die Isolation drei einzelner Schlauchabschnitte unter Aussparung der Sensorschnittstellen.27
- 11 Überlagerung mit CD42-Antikörper (grün) und vWF-Antikörper (rot) in der Fluoreszenz-Mikroskopie (400x). Herstellung von PRP bei Zentrifugation bei 190g für 10min. Es zeigt sich ein thrombozytenreiches Bild mit kleineren Thrombozytenaggregaten. Die Thrombozyten stellten sich mehrheitlich als vWF-positive Strukturen dar.....44
- 12 Fluoreszenz-Mikroskopie mit CD42-Antikörper (A), vWF-Antikörper (B) und Überlagerung (C) mit CD42-Antikörper (grün) und vWF-Antikörper (rot) (Alle 400x). Zentrifugation bei 190g für 10min und bei 4000g für 10min. A: Es zeigte sich ein thrombozytenreiches Bild. Die Thrombozyten bildeten Aggregate aus. B: Es zeigten sich großflächige vWF-positive Bereiche. Es wurden fadenartige Strukturen beobachtet C: Die Überlagerung stellte A und B als größtenteils kolokalisiert dar.....45
- 13 Fluoreszenzmikroskopie von Probe 2.1 (A) und Probe 2.2 (B) (400x). Darstellung der Überlagerungen mit CD42-Antikörper (grün) und vWF-Antikörper (rot). Herstellung durch Zentrifugation bei 190g für 10min, 4000g für 10min und 10000g für 5min (A) bzw. 20000g für 5min (B). In beiden Fällen

	zeigte sich ein von starkem Hintergrundrauschen dominiertes Bild. CD42-positive Strukturen und vWF-Strukturen waren nicht mehr eindeutig zu interpretieren.....	45
14	Durchflusszytometrie zu Probe 3.0	47
15	Histologie zu Probe 3.0	47
16	Durchflusszytometrie zu Probe 3.1	47
17	Histologie zu Probe 3.1	47
18	Durchflusszytometrie zu Probe 3.2	48
19	Histologie zu Probe 3.2	48
20	Durchflusszytometrie zu Probe 3.3	48
21	Histologie zu Probe 3.3	48
22	Durchflusszytometrie zu Probe 3.4	49
23	Histologie zu Probe 3.4	49
24	Durchflusszytometrie zu Probe 3.5	49
25	Histologie zu Probe 3.5	49
26	Durchflusszytometrie zu Probe 3.6	50
27	Histologie zu Probe 3.6	50
28	Durchflusszytometrie zu Probe 3.7	50
29	Histologie zu Probe 3.7	50
30	Durchflusszytometrie zu Probe 3.8	51
31	Histologie zu Probe 3.8	51
32	Durchflusszytometrie zu Probe 3.9	51
33	Histologie zu Probe 3.9	51
34	Durchflusszytometrie zu Probe 3.10	52
35	Histologie zu Probe 3.10	52
36	Durchflusszytometrie zu Probe 3.11	52
37	Histologie zu Probe 3.11	52
38	Durchflusszytometrie zu Probe 3.12	53
39	Histologie zu Probe 3.12	53
40	Plasmaversuch bei 100mbar. Links im Bild ist die Gasfaser zu sehen. Daran bildeten sich strömungsgerichtet Ablagerungen aus.	56
41	Plasmaversuch bei 5mbar. Die Ausbildung von mehreren Klots wurde beobachtet. Diese bewegten sich in Flussrichtung durch das System. In dieser Darstellung wurde auf eine Messung der Klotgröße verzichtet. Unter Berücksichtigung des angegebenen Maßstabes ist jedoch eine Abschätzung der Klotgröße möglich.....	57
42	Plasmaversuch bei 50mbar, Phasenkontrastaufnahme. Es zeigte sich in Strömungsrichtung die Ausbildung eines Aggregats an der Polymethylpenten-Gasfaser. Auf die Messung der Größe des Klots wurde in diesem Versuch verzichtet. Unter Berücksichtigung des angegebenen Maßstabes kann eine ungefähre Länge von 3000µm angenommen werden.	58
43	Klotbildung an der Gasfaser in zwei Versuchen bei 5mbar, Phasenkontrastaufnahme. A: Es ergab sich ein Klotdurchmesser von 1253µm. B: Es ergab sich ein exemplarischer Klotdurchmesser von 3123µm.	59

- 44 Makroskopische Aggregatbildung. A: Aggregatbildung in der *Fluidic Unit*. In den Spritzen der Fluidic Unit bildete sich ein trübgelbes Präzipitat aus. Die Pegelstände veränderten sich nicht mehr, woraus ein Fluss nahe 0mL/min resultierte. B: Aggregat nach Entnahme aus dem System. Das Aggregat wurde aus den Spritzen der *Fluidic Unit* mithilfe eines Spatels isoliert. Es stellte sich als trübgelbe, geleeartige Substanz dar.60
- 45 Histologische Untersuchung eines Formol-fixierten Klots mittels DAB-Färbung, alle 400x. A: vWF-Färbung (400x). Es sind vWF-positive Ballungsbereiche erkennbar, welche sich in der Färbung dunkler zeigen und eine netzartige Struktur aufweisen. B: Fibrinogen-Färbung (400x). Dunkel angefärbt zeigen sich stark Fibrinogen-positive Bereiche. Es wurden Zellen spezifisch angefärbt C: Fibrin-Färbung (400x). Es zeigten sich zahlreiche kleine Fibrin-positive Ballungsbereiche. Die spezifische Anfärbung von Zellen fiel auf D: CD42-Färbung (400x). Es zeigt sich eine verstärkte Anfärbung runder Bereiche. Trotz der Hintergrundfärbung zeichnen sich an den Rändern der runden Bereiche Thrombozytenansammlungen an. Bei der lochartigen Struktur und den Rissen im Präparat könnte es sich um ein Präparationsartefakt handeln.....62
- 46 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des Klots mit Fibrinogen-Antikörpern (grün) und vWF-Antikörpern (rot), sowie Darstellung einer Überlagerung, alle 200x. In der Fibrinogen-Färbung zeigte sich eine Anfärbung von Zellen, sowie eine Organisation der Anfärbung in runden Bereichen. Randständig fiel dabei eine verstärkte Anfärbung auf. In der vWF-Färbung zeigt sich ebenfalls eine Organisation in runden Ballungsbereichen mit verstärktem Rand. Die Überlagerung zeigt eine Kolokalisation der Ballungsbereiche.63
- 47 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des Klots mit Fibrin-Antikörpern (grün) und vWF-Antikörpern, sowie Darstellung einer Überlagerung, alle 200x. Die Fibrin-Färbung zeigte eine Anfärbung von Debris, sowie eine Konzentration der Anfärbung in halbrunden Strukturen. In der vWF-Färbung zeigten sich ebenfalls Debris, sowie halbrunde Strukturen. Die Überlagerung zeigte eine Deckung der Halbrunde.63
- 48 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des Klots mit CD42-Antikörpern (grün) und vWF-Antikörpern bei pH 6, sowie Darstellung einer Überlagerung, alle 200x. Die CD42-Färbung zeigte eine Organisation in annähernd runde Bereiche, wobei eine verstärkte Anfärbung im Randbereich dieser Bereiche beobachtet wurde. In der vWF-Färbung wurden ebenfalls annähernd runde Bereiche mit randständig verstärkter Anfärbung beobachtet. Die Überlagerung zeigte eine Übereinstimmung der stärker angefärbten Randbereiche, sowie der Ballungsbereiche.63
- 49 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des Klots mit CD42-Antikörpern (grün) und vWF-Antikörpern bei pH 9, sowie Darstellung einer Überlagerung, alle 200x. Die CD42-Färbung zeigte eine Organisation in unregelmäßig verdichtete Bereiche, wobei eine verstärkte Anfärbung im Randbereich dieser Bereiche beobachtet wurde. In der vWF-Färbung wurden ebenfalls unregelmäßige Verdichtungen mit randständig verstärkter Anfärbung

- beobachtet. Die Überlagerung zeigte eine Übereinstimmung der angefärbten Halbrunde, sowie der Ballungsbereiche.....64
- 50 Heparinisiertes Plasma und Citratplasma vor dem Versuch (A) und nach dem Versuch (B). Zur Gewinnung erfolgte eine Blutabnahme in Form von peripherer Venenpunktion mit Citrat-Monovetten und Lithium-Heparin-Monovetten. Die Plasmaherstellung erfolgte nach folgendem Zentrifugationsschema: 300g für 10min, 4000g für 5min, 4000g für 5min, 4000g für 5min. Die Inkubation erfolgte unter Raumluftbedingungen bei 37,0°C bei einem Fluss von 0,0mL/min. In beiden Fällen ergab sich die in der Abbildung gezeigte klare, gelbe Flüssigkeit. Nach dem Versuch zeigte sich das Plasma in beiden Fällen klar und flüssig. Eine Klotbildung wurde nicht festgestellt.....65
- 51 Darstellung von Scherraten. A: Darstellung der Scherraten im Eckkonnector. In dem schmalen Teil des Eckkonnectors, sowie an der dem schmalen Teil gegenüberliegenden Wand des breiten Teils des Eckkonnectors treten kritische Scherraten von bis zu 4000/s (rot) auf. Eine Entfaltung des vWF ist unter diesen Scherraten möglich. Gelb und orange sind Bereiche mit Scherraten von 3200/s und 3600/s dargestellt, grün und blau wurden Scherraten kleiner als 2800/s dargestellt. Diese Scherraten sind als unkritisch einzustufen. B: Darstellung der Scherraten an der Gasfaser. An der Gasfaser wurden mögliche kritische Scherraten von bis zu 10000/s (rot) bestimmt. Die Bilder stammen aus der persönlichen Korrespondenz mit Clemens Birkenmaier, mit dessen Einverständnis sie in dieser Arbeit verwendet werden dürfen.66
- 52 Flussgeschwindigkeiten im Eckkonnector. Im schmalen Teil des Eckkonnectors wurden erhöhte Flussgeschwindigkeiten von bis zu 0,5m/s (rot) festgestellt. Außerdem wurden Verwirbelungseffekte an den Umlenkstellen des Eckkonnectors festgestellt. Die Flussgeschwindigkeiten an den Verwirbelungen bewegen sich in niedrigen Wertebereichen von 0 bis 0,25m/s (blau). Das Bild stammt aus der persönlichen Korrespondenz mit Clemens Birkenmaier und darf mit dessen Einverständnis in dieser Arbeit verwendet werden.....66
- 53 Ausbildung fadenartiger Strukturen bei der Perfusion mit Proband:innenserum bei 85mbar. Bei der Abbildung handelt es sich um eine Phasenkontrastaufnahme. Links im Bild ist der Luer-Eckkonnector angeschnitten.69
- 54 vWF-Nachweis im Serumversuch bei 85mbar. Der Nachweis erfolgte mittels vWF-Antikörper-Fluoreszenz (grün). Die Abbildung zeigt Fäden, die sich bereits von der Gasfaser gelöst haben und in Strömungsrichtung fortbewegen.....70
- 55 vWF-Fadenbildung an der Polymethylpenten-Gasfaser im Serumversuch bei 85mbar. Die Aggregatbildung fand in Flussrichtung statt und erreichte eine Länge von 1494 µm. Bei der Abbildung handelt es sich um eine Phasenkontrastaufnahme. Der vWF-Nachweis erfolgte mittels vWF-Antikörper-Fluoreszenz.71
- 56 Darstellung der Klotbildung an der Polymethylpenten-Gasfaser bei 100mbar (links) und bei 50mbar (rechts). Die Ablagerung erfolgte in beiden Fällen in Strömungsrichtung. Bei der Perfusion bei 50 mbar erschien diese jedoch länger

als bei 50mbar. Diese Beobachtung lässt sich mit den höheren Scherspannungen bei den mit höheren Pumpendrücken einhergehenden höheren Volumenflüssen erklären. In dieser Darstellung wurde auf eine Längenmessung des Klots verzichtet, eine ungefähre Abschätzung ist jedoch unter Berücksichtigung der angegebenen Maßstäbe möglich.85

7.5 Diagrammverzeichnis

- 1 Druck-Fluss-Kurve bei Plasmaversuchen. Die mittlere Flussgeschwindigkeit wurde in mL/min gegen den Perfusionsdruck in mbar aufgetragen.56
- 2 Darstellung der Volumenfluss-Strömungsverhältnisse im Perfusionssystem für Plasma unter der Annahme laminarer Strömungsbedingungen. Der rote Graph stellt dabei die Abhängigkeit des Volumenflusses vom Pumpendruck dar. Der blaue Graph zeigt die maximalen Wandspannungen an der Gasfaser, der gelbe die durchschnittliche Scherspannung an der Gasfaser. Diese können mit dem obigen Diagramm in ein direktes Verhältnis zu Volumenfluss und angelegtem Pumpendruck gebracht werden. Die dargestellten Daten wurden in vorbereitenden Versuchen ermittelt und freundlicherweise von Tamara Steiger zur Verfügung gestellt.57
- 3 Darstellung der Ergebnisse der Serumversuche mittels Boxplot. Es wurde keine Unterscheidung zwischen gepooltem Humanserum und Proband:innenserum vorgenommen. A: Der gemessene Fluss in mL/min wurde gegen den Pumpendruck in mbar aufgetragen. Das dritte Quartil für 85mbar liegt bei 15,3mL/min, das erste Quartil bei 14,4mL/min. Der Median der Messungen bei 85mbar liegt bei 14,7mL/min. Da keine enormen Abweichungen gemessen wurden, markieren der obere und untere Whisker den Maximalwert von 15,4mL/min bzw. den Minimalwert von 14,4 mL/min. Das dritte Quartil für 100mbar liegt bei 16,9mL/min, das erste Quartil bei 16,3mL/min. Der Median der Messungen bei 100mbar liegt bei 16,8mL/min. Da keine enormen Abweichungen gemessen wurden, markieren der obere und der untere Whisker den Maximalwert von 18,3mL/min bzw. den Minimalwert von 15,9mL/min. Mit $p = 0,002$ ist die Abhängigkeit von Druck und Volumenfluss in diesem Aufbau statistisch signifikant B: Die Zeit bis zur Fadenbildung in min wurde gegen den Pumpendruck in mbar aufgetragen. Das dritte Quartil für 85mbar liegt bei 4min, das erste Quartil bei 2min. Der Median der Messungen bei 85mbar liegt bei 4min. Da keine enormen Abweichungen gemessen wurden und der Wert des ersten bzw. dritten Quartils dem Minimal- bzw. Maximalwert entspricht, wurden keine Whisker dargestellt. Das dritte Quartil für 100mbar liegt bei 7min, das erste Quartil bei 2min. Der Median der Messungen bei 100mbar liegt bei 5min. Da keine enormen Abweichungen gemessen wurden und der Wert des ersten bzw. dritten Quartils dem Minimal- bzw. Maximalwert entspricht, wurden keine Whisker dargestellt. Mit $p = 0,517$ ist das Testergebnis statistisch nicht signifikant. C: Die gemessene Fadenlänge in μm wurde gegen den Pumpendruck in mbar aufgetragen. Das dritte Quartil für 85mbar liegt bei 1579 μm , das erste Quartil bei 758 μm . Der Median der Messungen bei 85mbar

liegt bei 1487,5µm. Da keine enormen Abweichungen gemessen wurden, markieren der obere und untere Whisker den Maximalwert von 1579µm bzw. den Minimalwert von 510µm. Das dritte Quartil für 100mbar liegt bei 1542µm, das erste Quartil bei 845µm. Der Median der Messungen bei 100mbar liegt bei 1180µm. Da keine enormen Abweichungen gemessen wurden, markieren der obere und der untere Whisker den Maximalwert von 1904µm bzw. den Minimalwert von 510µm. Mit $p = 0,914$ ist das Testergebnis statistisch nicht signifikant.....73

7.6 Formelverzeichnis

1	Scherrate (23).....	13
---	---------------------	----

7.7 Tabellenverzeichnis

1	Scherraten und Schubspannungen in Gefäßen (7,23–25)	14
2	Verhalten des vWF bei verschiedenen Strömungsbedingungen (25,35,51–53)	16
3	Darstellung des zellulären Ursprungs der Mikropartikel im Blut (56–58).....	17
4	Übersicht über die Proband:innenparameter: Die Tabelle zeigt die Zahlen für Proband:innen aufgeschlüsselt nach Art des Perfusionsversuches (Serumversuch oder Plasmaversuch) und, ob es sich bei den Proband:innen um einmalige oder mehrfache Spender:innen handelte. Alter und BMI sind in Form von Median und Interquartilsabständen (IQR) angegeben, Geschlecht, Blutgruppe und Rhesus-Typ wurden sowohl in Absolutwerten, als auch in Prozentwerten dargestellt. Die tabellarische Zusammenstellung entstand in freundlicher Zusammenarbeit mit Dr. Tamara Steiger	22
5	Zentrifugationsbedingungen zur Plasmaherstellung. Die Zentrifugationsmodelle wurden ausgehend von einer Arbeit von B.A.Herbig und S.L. Diamond (25) erstellt und modifiziert. Die Untersuchung der jeweiligen Zentrifugationsstufen erfolgte mittels Zytospinanalytik und Durchflusszytometrie. In Form von einer Nummerierung der Proben in runden Klammern erfolgt eine Zuordnung der Proben zu den in den Ergebnissen aufgeführten Untersuchungsergebnissen.	30
6	Allgemeiner Überblick über die Ergebnisse der Arbeit. Neben der Art des Versuches wurden zusammenfassend die Versuchsbedingungen und die entsprechenden Ergebnisse, sowie Verweise auf detaillierte Ergebnisdarstellung aufgeführt	40
7	Darstellung der Temperatur im Wärmeschrank und im Medium zu verschiedenen Messzeiten.....	41
8	Vergleichende temperaturbezogene Untersuchungen bei 100mbar	42
9	Vergleichende temperaturbezogene Untersuchungen bei 50mbar	42
10	Vergleichende temperaturbezogene Untersuchungen bei 20mbar	42
11	Kalibrierung des Flusssensors. Neben dem eingestellten Perfusorfluss wurden die mit dem Flusssensor ermittelten Volumenströme mit VE-Wasser, FFP und	

	Humanserum aufgeführt. Daraus ergaben sich die aufgeführten Umrechnungsfaktoren.....	43
12	Darstellung der Ergebnisse der Plasmaherstellung nach Modell 3 (Tabelle 5). Die Tabelle zeigt neben der Probenbezeichnung inklusive Zentrifugationsabfolge gemäß Tabelle 5, grafische Darstellungen der durchflusszytometrischen Untersuchung und der entsprechenden Histologie. Die Auswertung der Durchflusszytometrie erfolgte über eine Einparameterdarstellung in Form von Histogrammen. Hierbei wurden die CD61-Intensitätsverteilung (Abszisse) gegen die Anzahl Zellen (Ordinate) aufgetragen. Die histologische Darstellung erfolgte mit einer CD42-Färbung (grün), vWF-Färbung und Überlagerung der zuvor genannten Färbungen. Für alle Darstellungen wurde eine 400-fache Vergrößerung gewählt.	53
13	Numerische Darstellung der Ergebnisse der Plasmaherstellung nach Modell 3 (Tabelle 12). Die Zahlenwerte wurden auf drei signifikante Stellen gerundet. Im oberen Teil der Tabelle wurden die Ergebnisse der einzelnen Proben bezüglich der durchflusszytometrischen und histologischen Untersuchung dargestellt. Im unteren Teil der Tabelle wurden einzelne Proben einander gegenübergestellt. Die grün markierte Zentrifugationsfolge lieferte das für diese Arbeit am besten bewertete Plasma.	54
14	Temperatur und Flussgeschwindigkeiten bei 5mbar im Plasmaversuch.....	59
15	Personenabhängigkeit der Flussgeschwindigkeiten bei einem Druck von 100mbar	68
16	Messergebnisse eines Perfusionsversuches bei variablem Pumpendruck unter Zusatz von vWF	69
17	Ergebnisse der Serumversuche mit Proband:innenserum und gepooltem Humanserum bei 85mbar und 100mbar.....	71
18	Darstellung der ermittelten Fadenlängen bei Versuchen mit Proband:innenserum und Versuchen mit gepooltem Humanserum bei 85mbar und 100mbar.....	72
19	Messergebnisse der Perfusion mit BSA bei 5mbar. Temperatur und Flussgeschwindigkeit hielten sich über die Zeit konstant	74
20	Messergebnisse der Perfusion mit BSA bei 100mbar. Temperatur und Flussgeschwindigkeit hielten sich über die Zeit konstant	74

7.8 Literaturverzeichnis

- 1 Broman LM, Taccone FS, et al. The ELSO Maastricht Treaty for ECLS Nomenclature: abbreviations for cannulation configuration in extracorporeal life support - a position paper of the Extracorporeal Life Support Organization. Crit Care. 2019;23(1):36. doi:10.1186/s13054-019-2334-8 Cited in: PubMed; PMID 30736845.
- 2 Lehle K, Philipp A, et al. Flow dynamics of different adult ECMO systems: a clinical evaluation. Artif Organs. 2014;38(5):391–8. doi:10.1111/aor.12180 Cited in: PubMed; PMID 24117454.

- 3 Schmid C, Philipp A. Leitfaden extrakorporale Zirkulation. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2011. ger.
- 4 Hugo Van Aken, Konrad Reinhart, et al. Intensivmedizin: Thieme Verlag; 2007. de.
- 5 Wilm J. Charakterisierung zellulärer Ablagerungen auf Polymethylpenten-Gaskapillaren nach extrakorporaler Membranoxygenierung bei akutem Lungen- oder Herzversagen; 2016 [cited 2021 Apr 28]. 158 p.
- 6 Steiger TR. Die Beteiligung des von Willebrand Faktors an der Clotbildung in Membranoxygenatoren einer extrakorporalen Membranoxygenierung: Universität Regensburg; 2019.
- 7 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 Biol.* 2013;33(1):105–13. doi:10.1161/ATVBAHA.112.300522 Cited in: PubMed; PMID 23104847.
- 8 Lubnow M, Philipp A, et al. Technical Complications during Venovenous Extracorporeal Membrane Oxygenation and Their Relevance Predicting a System-Exchange – Retrospective Analysis of 265 Cases. *PLoS One.* 2014;9(12). doi:10.1371/journal.pone.0112316 Cited in: PubMed; PMID 25464516.
- 9 Dornia C, Philipp A, et al. Analysis of thrombotic deposits in extracorporeal membrane oxygenators by multidetector computed tomography. *ASAIO J.* 2014;60(6):652–6. doi:10.1097/MAT.000000000000133 Cited in: PubMed; PMID 25158889.
- 10 Dornia C, Philipp A, et al. D-dimers Are a Predictor of Clot Volume Inside Membrane Oxygenators During Extracorporeal Membrane Oxygenation. *Artif Organs.* 2015;39(9):782–7. doi:10.1111/aor.12460 Cited in: PubMed; PMID 25845704.
- 11 Birkenmaier C, Dornia C, et al. Analysis of Thrombotic Deposits in Extracorporeal Membrane Oxygenators by High-resolution Microcomputed Tomography: A Feasibility Study. *ASAIO J.* 2019. doi:10.1097/MAT.0000000000001089 Cited in: PubMed; PMID 31609797.
- 12 Lehle K, Philipp A, 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(6):612–7. doi:10.1097/MAT.0b013e318186a807 Cited in: PubMed; PMID 19033775.
- 13 Niimi Y, Ichinose F, et al. The effects of heparin coating of oxygenator fibers on platelet adhesion and protein adsorption. *Anesth Analg.* 1999;89(3):573–9. doi:10.1097/00000539-199909000-00006 Cited in: PubMed; PMID 10475283.
- 14 Weber M, Steinle H, et al. Blood-Contacting Biomaterials: In Vitro Evaluation of the Hemocompatibility. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2018;699. doi:10.3389/fbioe.2018.00099

- 15 Wilm J, Philipp A, et al. Leukocyte Adhesion as an Indicator of Oxygenator Thrombosis During Extracorporeal Membrane Oxygenation Therapy? *ASAIO J.* 2018;64(1):24–30. doi:10.1097/MAT.0000000000000586 Cited in: PubMed; PMID 28475562.
- 16 Steiger T, Foltan M, et al. Accumulations of von Willebrand factor within ECMO oxygenators: Potential indicator of coagulation abnormalities in critically ill patients? *Artif Organs.* 2019;43(11):1065–76. doi:10.1111/aor.13513 Cited in: PubMed; PMID 31192471.
- 17 Pape H-C, Kurtz A, et al., editors. *Physiologie.* 9th ed. Stuttgart: Thieme; 2019. 1028 p.
- 18 Finsterbusch M, Schrottmaier WC, et al. Measuring and interpreting platelet-leukocyte aggregates. *Platelets.* 2018;29(7):677–85. doi:10.1080/09537104.2018.1430358 Cited in: PubMed; PMID 29461910.
- 19 Maugeri N, Campana L, 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(12):2074–88. doi:10.1111/jth.12710 Cited in: PubMed; PMID 25163512.
- 20 Stewart DL, Dela Cruz TV, et al. The use of extracorporeal membrane oxygenation in patients with gram-negative or viral sepsis. *Perfusion.* 1997;12(1):3–8. doi:10.1177/026765919701200102 Cited in: PubMed; PMID 9131715.
- 21 Reutern G-M von, Kaps M, et al., editors. *Ultraschalldiagnostik der hirnersorgenden Arterien: Dopplersonographie und Farbduplexsonographie der extra- und intrakraniellen Arterien ; 39 Tabellen.* 3rd ed. Stuttgart, New York: Thieme; 2000. 325 p.
- 22 Schmidt RF, Lang F, et al., editors. *Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie: mit Online-Repetitorium.* 31st ed. Berlin: Springer; 2017. 979 p. (Lehrbuch). ger.
- 23 Pop GAM, Duncker DJ, et al. The clinical significance of whole blood viscosity in (cardio)vascular medicine. *Neth Heart J.* 2002;10(12):512–6. Cited in: PubMed; PMID 25696056.
- 24 Gogia S, Neelamegham S. Role of fluid shear stress in regulating VWF structure, function and related blood disorders. *Biorheology.* 2015;52(5-6):319–35. doi:10.3233/BIR-15061 Cited in: PubMed; PMID 26600266.
- 25 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(9):1699–708. doi:10.1111/jth.13044 Cited in: PubMed; PMID 26178390.
- 26 Huang JY, Ignjatovic V, et al. Bleeding and thrombotic events occur early in children on durable ventricular assist devices. *Thromb Res.* 2019;17365–70. doi:10.1016/j.thromres.2018.11.019 Cited in: PubMed; PMID 30476715.

- 27 Geisen U, Heilmann C, et al. Non-surgical bleeding in patients with ventricular assist devices could be explained by acquired von Willebrand disease. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2008;33(4):679–84. doi:10.1016/j.ejcts.2007.12.047 Cited in: PubMed; PMID 18282712.
- 28 Heilmann C, Geisen U, et al. Acquired von Willebrand syndrome in patients with extracorporeal life support (ECLS). *Intensive Care Med.* 2012;38(1):62–8. doi:10.1007/s00134-011-2370-6 Cited in: PubMed; PMID 21965100.
- 29 Kim D, Bresette C, et al. *APL Bioeng.* 2019;3(4):41502. doi:10.1063/1.5115554 Cited in: PubMed; PMID 31768485.
- 30 WEIBEL ER, PALADE GE. NEW CYTOPLASMIC COMPONENTS IN ARTERIAL ENDOTHELIA. *J Cell Biol.* 1964;23:101–12. doi:10.1083/jcb.23.1.101 Cited in: PubMed; PMID 14228505.
- 31 Wagner DD, Olmsted JB, et al. Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *J Cell Biol.* 1982;95(1):355–60. doi:10.1083/jcb.95.1.355 Cited in: PubMed; PMID 6754744.
- 32 Lynch CJ, Lane DA, et al. Control of VWF A2 domain stability and ADAMTS13 access to the scissile bond of full-length VWF. *Blood.* 2014;123(16):2585–92. doi:10.1182/blood-2013-11-538173 Cited in: PubMed; PMID 24558203.
- 33 Nichols WL, Hultin MB, et al. von Willebrand disease (VWD): evidence-based diagnosis and management guidelines, the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) Expert Panel report (USA). *Haemophilia.* 2008;14(2):171–232. doi:10.1111/j.1365-2516.2007.01643.x Cited in: PubMed; PMID 18315614.
- 34 Wagner DD. Cell biology of von Willebrand factor. *Annu Rev Cell Biol.* 1990;6:217–46. doi:10.1146/annurev.cb.06.110190.001245 Cited in: PubMed; PMID 2275814.
- 35 Shankaran H, Alexandridis P, et al. Aspects of hydrodynamic shear regulating shear-induced platelet activation and self-association of von Willebrand factor in suspension. *Blood.* 2003;101(7):2637–45. doi:10.1182/blood-2002-05-1550 Cited in: PubMed; PMID 12456504.
- 36 Sporn LA, Marder VJ, et al. Inducible secretion of large, biologically potent von Willebrand factor multimers. *Cell.* 1986;46(2):185–90. doi:10.1016/0092-8674(86)90735-X
- 37 Huck V, Schneider MF, et al. The various states of von Willebrand factor and their function in physiology and pathophysiology. *Thromb Haemost.* 2014;111(4):598–609. doi:10.1160/TH13-09-0800 Cited in: PubMed; PMID 24573248.
- 38 Stocksclaeder M, Schneppenheim R, et al. Update on von Willebrand factor multimers: focus on high-molecular-weight multimers and their role in hemostasis. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2014;25(3):206–16. doi:10.1097/MBC.000000000000065 Cited in: PubMed; PMID 24448155.
- 39 Federici AB, Bader R, et al. Binding of von Willebrand factor to glycoproteins Ib and IIb/IIIa complex: affinity is related to multimeric size. *Br J Haematol.*

- 1989;73(1):93–9. doi:10.1111/j.1365-2141.1989.tb00226.x Cited in: PubMed; PMID 2803984.
- 40 Fischer BE, Kramer G, et al. EFFECT OF MULTIMERIZATION OF HUMAN AND RECOMBINANT VON WILLEBRAND FACTOR ON PLATELET AGGREGATION, BINDING TO COLLAGEN AND BINDING OF COAGULATION FACTOR VIII. *Thromb Res.* 1996;84(1):55–66. doi:10.1016/0049-3848(96)00161-2
- 41 Reininger AJ. Function of von Willebrand factor in haemostasis and thrombosis. *Haemophilia.* 2008;14 Suppl 511–26. doi:10.1111/j.1365-2516.2008.01848.x Cited in: PubMed; PMID 18786007.
- 42 Moake JL, Turner NA, et al. Involvement of large plasma von Willebrand factor (vWF) multimers and unusually large vWF forms derived from endothelial cells in shear stress-induced platelet aggregation. *J Clin Invest.* 1986;78(6):1456–61. doi:10.1172/JCI112736 Cited in: PubMed; PMID 3491092.
- 43 Velik-Salchner C, Eschertzhuber S, et al. Acquired von Willebrand syndrome in cardiac patients. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2008;22(5):719–24. doi:10.1053/j.jvca.2007.05.013 Cited in: PubMed; PMID 18922429.
- 44 Klovaite J, Gustafsson F, et al. Severely impaired von Willebrand factor-dependent platelet aggregation in patients with a continuous-flow left ventricular assist device (HeartMate II). *J Am Coll Cardiol.* 2009;53(23):2162–7. doi:10.1016/j.jacc.2009.02.048 Cited in: PubMed; PMID 19497443.
45. Bartoli CR, Kang J, et al. Inhibition of ADAMTS-13 by Doxycycline Reduces von Willebrand Factor Degradation During Supraphysiological Shear Stress: Therapeutic Implications for Left Ventricular Assist Device-Associated Bleeding. *JACC Heart Fail.* 2015;3(11):860–9. doi:10.1016/j.jchf.2015.06.016 Cited in: PubMed; PMID 26454844.
- 46 Tauber H, Ott H, et al. Extracorporeal membrane oxygenation induces short-term loss of high-molecular-weight von Willebrand factor multimers. *Anesth Analg.* 2015;120(4):730–6. doi:10.1213/ANE.0000000000000554 Cited in: PubMed; PMID 25565317.
- 47 Kalbhenn J, Schlagenhaut A, et al. Acquired von Willebrand syndrome and impaired platelet function during venovenous extracorporeal membrane oxygenation: Rapid onset and fast recovery. *J Heart Lung Transplant.* 2018;37(8):985–91. doi:10.1016/j.healun.2018.03.013 Cited in: PubMed; PMID 29650295.
- 48 Barg A, Ossig R, et al. Soluble plasma-derived von Willebrand factor assembles to a haemostatically active filamentous network. *Thromb Haemost* [Internet]. 2007;97(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17393012/> Cited in: PubMed; PMID 17393012.
- 49 Zhu S, Herbig BA, et al. In microfluidico: Recreating in vivo hemodynamics using miniaturized devices. *Biorheology.* 2015;52(5-6):303–18. doi:10.3233/BIR-15065 Cited in: PubMed; PMID 26600269.

- 50 Goldfarb M, Czer LS, et al. High Molecular Weight von Willebrand Factor Multimer Loss and Bleeding in Patients with Short-Term Mechanical Circulatory Support Devices: A Case Series. *J Extra Corpor Technol.* 2018;50(2):77–82. Cited in: PubMed; PMID 29921985.
- 51 Themistou E, Singh I, et al. Application of fluorescence spectroscopy to quantify shear-induced protein conformation change. *Biophys J.* 2009;97(9):2567–76. doi:10.1016/j.bpj.2009.08.023 Cited in: PubMed; PMID 19883600.
- 52 Singh I, Themistou E, et al. Fluid Shear Induces Conformation Change in Human Blood Protein von Willebrand Factor in Solution. *Biophys J.* 2009;96(6):2313–20. doi:10.1016/j.bpj.2008.12.3900 Cited in: PubMed; PMID 19289057.
- 53 Schneider SW, Nuschele S, et al. Shear-induced unfolding triggers adhesion of von Willebrand factor fibers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(19):7899–903. doi:10.1073/pnas.0608422104 Cited in: PubMed; PMID 17470810.
- 54 Matsunari Y, Sugimoto M, et al. Functional characterization of tissue factor in von Willebrand factor-dependent thrombus formation under whole blood flow conditions. *Int J Hematol.* 2016;104(6):661–8. doi:10.1007/s12185-016-2086-z Cited in: PubMed; PMID 27562418.
- 55 Kriebardis AG, Antonelou MH, et al. Microparticles variability in fresh frozen plasma: preparation protocol and storage time effects. *Blood Transfus.* 2016;14(2):228–37. doi:10.2450/2016.0179-15 Cited in: PubMed; PMID 27136430.
- 56 Dey-Hazra E, Hertel B, et al. Detection of circulating microparticles by flow cytometry: influence of centrifugation, filtration of buffer, and freezing. *Vasc Health Risk Manag.* 2010;6:1125–33. doi:10.2147/VHRM.S13236 Cited in: PubMed; PMID 21191433.
- 57 Keuren JFW, Keuren JFW, et al. Effects of storage-induced platelet microparticles on the initiation and propagation phase of blood coagulation. *Br J Haematol.* 2006;134(3):307–13. doi:10.1111/j.1365-2141.2006.06167.x Cited in: PubMed; PMID 16848773.
- 58 Matijevic N, Wang Y-WW, et al. Decline in platelet microparticles contributes to reduced hemostatic potential of stored plasma. *Thromb Res.* 2011;128(1):35–41. doi:10.1016/j.thromres.2011.02.011 Cited in: PubMed; PMID 21421259.
- 59 Zwicker JI, Trenor CC, et al. Tissue factor-bearing microparticles and thrombus formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(4):728–33. doi:10.1161/ATVBAHA.109.200964 Cited in: PubMed; PMID 21252066.
- 60 Siedlecki CA, Lestini BJ, et al. Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor. *Blood.* 1996;88(8):2939–50. Cited in: PubMed; PMID 8874190.
- 61 <https://news.mayocliniclabs.com/>. Preparation of Platelet-Poor Plasma for Special Coagulation Testing - Insights [Internet]. 2017 [updated 2020 Jun 18; cited 2021 Jun 24].

- 62 Meridian Valley Lab. Whole Blood Viscosity vs. Serum and Plasma Viscosity | Meridian Valley Lab [Internet]. 2018 [updated 2018 May 9; cited 2021 Aug 16]. Available from: <https://www.meridianvalleylab.com/whole-blood-viscosity-vs-serum-and-plasma-viscosity/>
- 63 Cerbe G, Wilhelms G. Technische Thermodynamik: Theoretische Grundlagen und praktische Anwendungen. 17th ed. München: Carl Hanser Verlag GmbH & Co. KG; 2013. 545 p. ger.
- 64 Schmuck C, Engels B, et al. Chemie für Mediziner. 2nd ed. Pearson Studium. Hallbergmoos: Pearson; 2017. 732 p. (Always learning). ger.
- 65 Wendel HP, Philipp A, et al. Oxygenator thrombosis: worst case after development of an abnormal pressure gradient--incidence and pathway. *Perfusion*. 2001;16(4):271–8. doi:10.1177/026765910101600402 Cited in: PubMed; PMID 11486845.
- 66 Mikhailidis DP, Ganotakis ES. Plasma albumin and platelet function: relevance to atherogenesis and thrombosis. *Platelets*. 1996;7(3):125–37. doi:10.3109/09537109609023571 Cited in: PubMed; PMID 21043591.
- 67 Ricardo H Boks, Lex A van Herwerden, et al. Is the use of albumin in colloid prime solution of cardiopulmonary bypass circuit justified? *The Annals of Thoracic Surgery*. 2001;72(3):850–3. doi:10.1016/S0003-4975(01)02816-8 Cited in: PubMed; PMID 11565669.
- 68 Nascimento B, Callum J, et al. Clinical review: Fresh frozen plasma in massive bleedings - more questions than answers. *Crit Care*. 2010;14(1):202. doi:10.1186/cc8205 Cited in: PubMed; PMID 20156316.
- 69 Al-Amer OM. The role of thrombin in haemostasis. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2022;33(3):145–8. doi:10.1097/MBC.0000000000001130 Cited in: PubMed; PMID 35239615.
- 70 Irwin RM, Bonassar LJ, et al. The clot thickens: Autologous and allogeneic fibrin sealants are mechanically equivalent in an ex vivo model of cartilage repair. *PLOS ONE*. 2019;14(11):e0224756. doi:10.1371/journal.pone.0224756 Cited in: PubMed; PMID 31703078.
- 71 Söderström AC, Nybo M, et al. The effect of centrifugation speed and time on pre-analytical platelet activation. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2016;54(12). doi:10.1515/cclm-2016-0079 Cited in: PubMed; PMID 27227708.
- 72 Rikkert LG, Coumans FAW, et al. Platelet removal by single-step centrifugation. *Platelets*. 2021;32(4):440–3. doi:10.1080/09537104.2020.1779924 Cited in: PubMed; PMID 32552252.
- 73 Dhurat R, Sukesh M. Principles and Methods of Preparation of Platelet-Rich Plasma: A Review and Author's Perspective. *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery*. 2014;7(4):189–97. doi:10.4103/0974-2077.150734 Cited in: PubMed; PMID 25722595.

- 74 A Review of Platelet-Rich Plasma: History, Biology, Mechanism of Action, and Classification [Internet]. 2022 [updated 2022 Dec 6; cited 2022 Dec 6]. Available from: <https://www.karger.com/Article/Fulltext/477353>
- 75 Yuan H, Deng N, et al. The unfolded von Willebrand factor response in bloodstream: the self-association perspective. *J Hematol Oncol*. 2012;565. doi:10.1186/1756-8722-5-65 Cited in: PubMed; PMID 23067373.
- 76 Siljander PR. Platelet-derived microparticles – an updated perspective. *Thromb Res*. 2011;127S30-S33. doi:10.1016/S0049-3848(10)70152-3
- 77 Noulsri E, Palasuwan A. Effects of donor age, donor sex, blood-component processing, and storage on cell-derived microparticle concentrations in routine blood-component preparation. *Transfus Apher Sci*. 2018;57(4):587–92. doi:10.1016/j.transci.2018.07.018 Cited in: PubMed; PMID 30082165.
- 78 Böhm JK, Schäfer N, et al. Plasmatic and cell-based enhancement by microparticles originated from platelets and endothelial cells under simulated in vitro conditions of a dilutional coagulopathy. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*. 2021;29(1):38. doi:10.1186/s13049-021-00847-9 Cited in: PubMed; PMID 33622398.
- 79 Chandler WL. Microparticle counts in platelet-rich and platelet-free plasma, effect of centrifugation and sample-processing protocols. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2013;24(2):125–32. doi:10.1097/MBC.0b013e32835a0824 Cited in: PubMed; PMID 23249614.
- 80 Gerlach E, Grosse P, editors. *Physik: Eine Einführung für Ingenieure*. 4th ed. Wiesbaden: Vieweg+Teubner Verlag; 1999. Online-Ressource.
- 81 Harten U. *Physik für Mediziner*. 14th ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. 381 p. (Springer-Lehrbuch). ger.
- 82 ResearchGate. Figure 3: Wall shear stress versus volume flow rate (62) [Internet]. 2021 [updated 2021 Aug 16; cited 2021 Aug 16]. Available from: https://www.researchgate.net/figure/Wall-shear-stress-versus-volume-flow-rate-62_fig3_279595337
- 83 Horton J. Microsoft Word - ELSO Guidelines General All ECLS Version1.1.doc [Internet] [cited 2021 Jun 23]. Available from: https://www.else.org/Portals/0/ELSO%20Guidelines%20General%20All%20ECLS%20Version%201_4.pdf
84. Blann AD, Hopkins J, et al. Plasma and serum von Willebrand factor antigen concentrations in connective tissue disorders. *Ann Clin Biochem*. 1992;29 (Pt 1)67–71. doi:10.1177/000456329202900110 Cited in: PubMed; PMID 1536529.
85. ResearchGate. Fig. 1: Schematic plot of shear stress vs. shear rate for Newtonian [Internet]. 2021 [updated 2021 Aug 16; cited 2021 Aug 16]. Available from: https://www.researchgate.net/figure/Schematic-plot-of-shear-stress-vs-shear-rate-for-Newtonian-solid-line-and_fig9_315753558

86. Brinkmann V, Abu Abed U, et al. Immunodetection of NETs in Paraffin-Embedded Tissue. *Front. Immunol.* 2016;7:513. doi:10.3389/fimmu.2016.00513
Cited in: PubMed; PMID 27920776.

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben, meinen großen Dank aussprechen.

Zuallererst danke ich Herrn Prof. Dr. Christof Schmid und Herrn Prof. Dr. Bernhard Graf dafür, dass die Umsetzung dieser Promotionsarbeit am Lehrstuhl für Herz-, Thorax- und gefäßnahe Chirurgie der Universitätsklinik Regensburg in Kooperation mit dem Lehrstuhl für Anästhesiologie der Universitätsklinik Regensburg ermöglicht werden konnte.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Karla Lehle und Herrn Dr. Michael Gruber für die Überlassung des Themas, die ausgezeichnete Betreuung und die enorme Unterstützung bei der Planung, Durchführung und Umsetzung des gesamten Projektes.

Herrn Prof. Dr. Lars Krenkel und Herrn Clemens Birkenmaier der Fakultät Maschinenbau an der Ostbayerischen Technischen Hochschule Regensburg danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit und die Erlaubnis, Bildmaterial zu verwenden.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Dr. Tamara Steiger und Frau Tjalda Falt bedanken, die mich auf meinem Weg mit Rat, Anregungen, produktiven Gesprächen und lieben Worten begleitet haben.

Nicht zuletzt möchte ich zudem den Labormitarbeitern der Herz-Thorax-Chirurgie und der Anästhesie meinen herzlichen Dank äußern, die meine Arbeit durch ihre tatkräftige Unterstützung und ihre Bemühungen beeinflusst und geprägt haben.

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.

Annika Martina Elisabeth Spychalski
Regensburg 2023