

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

Die Beteiligung von Neutrophil Extracellular Traps an der Thrombenentstehung
im Membranoxygenator bei Extrakorporaler Membranoxygenierung (ECMO)

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Felix Martin Steinkirchner

2023

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

Die Beteiligung von Neutrophil Extracellular Traps an der Thrombenentstehung
im Membranoxygenator bei Extrakorporaler Membranoxygenierung (ECMO)

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Felix Martin Steinkirchner

2023

Dekan:	Prof. Dr. Dirk Hellwig
1. Berichterstatterin:	Prof. Dr. Karla Lehle
2. Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. Martin Kieninger
Tag der mündlichen Prüfung:	18.09.2023

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1. ECMO	6
1.2. Thrombosen unter ECMO-Therapie	7
1.3. Neutrophil Extracellular Traps.....	8
1.4. Bedeutung von NETs bei ECMO.....	10
1.5. Bedeutung von NETs bei Sepsis	11
1.6. Methoden zur Detektion von NETs	12
1.7. Ziel der Arbeit	13
2. Material und Methoden	14
2.1. Auswertung der Fotodokumentation einer Vorgängerarbeit	14
2.1.1. Identifizierung von NETs auf 200x vergrößerten Aufnahmen	15
2.1.2. Identifizierung von NETs auf 400x vergrößerten Aufnahmen	16
2.1.2.1. Kategorisierung von NET-Strukturen.....	16
2.1.2.2. Häufigkeit von NET-Strukturen in der Fotodokumentation.....	19
2.1.2.3. Nachweis von NETs bei verschiedenen Oxygenatoren	20
2.2. Auswertung neuer Präparate derselben Oxygenatoren	20
2.2.1. Übersichtsauswertung	23
2.2.1.1. Einteilung der Übersichtsaufnahmen nach visuellem Eindruck.....	26
2.2.1.2. Quantitative Auswertung der Übersichtsaufnahmen	27
2.2.1.3. Vergleich unterschiedlicher Übersichtsaufnahmen desselben Oxygenators (Mehrfachauswertungen)	34
2.2.2. Mikroskopische Auswertung bei 200x Vergrößerung	34
2.2.2.1. Unterschiede in der Detail-Auswertbarkeit verschiedener Oxygenatorpräparate	35
2.2.2.2. Quantitative Untersuchung „zählbarer“ Präparate	37
2.2.2.3. Qualitative NET-Bewertung Einzelkern-enthaltender Bildabschnitte.....	39
2.2.2.4. Qualitative NET-Bewertung Clot-enthaltender Bildabschnitte	40
2.2.2.5. Untersuchung verschiedener therapie- und patientenspezifischer Faktoren	40
2.3. Statistik.....	48
3. Ergebnisse	49
3.1. Auswertung der Fotodokumentation einer Vorgängerarbeit	49
3.1.1. Identifizierung von NETs auf 200x vergrößerten Aufnahmen	49
3.1.2. Identifizierung von NETs auf 400x vergrößerten Aufnahmen	52
3.1.2.1. Kategorisierung von NET-Strukturen.....	52
3.1.2.2. Häufigkeit von NET-Strukturen in der Fotodokumentation.....	52
3.1.2.3. Nachweis von NETs bei verschiedenen Oxygenatoren	54
3.2. Auswertung neuer Präparate derselben Oxygenatoren	56
3.2.1. Übersichtsauswertung	56
3.2.1.1. Einteilung der Übersichtsaufnahmen nach visuellem Eindruck.....	56
3.2.1.2. Quantitative Auswertung der Übersichtsaufnahmen	57

3.2.1.3. Vergleich unterschiedlicher Übersichtsaufnahmen desselben Oxygenators (Mehrfachauswertungen).....	61
3.2.2. Mikroskopische Auswertung bei 200x Vergrößerung	63
3.2.2.1. Unterschiede in der Detail-Auswertbarkeit verschiedener Oxygenatorpräparate	63
3.2.2.2. Quantitative Untersuchung „zählbarer“ Präparate	65
3.2.2.3. Qualitative NET-Bewertung Einzelkern-enthaltender Bildabschnitte.....	70
3.2.2.4. Qualitative NET-Bewertung Clot-enthaltender Bildabschnitte	75
3.2.2.5. Untersuchung verschiedener therapie- und patientenspezifischer Faktoren	78
4. Diskussion	94
4.1. Morphologische Identifizierung von NETs	94
4.2. Färbetechnik und Fluoreszenzmikroskopie	95
4.3. Unterscheidung verschiedener NET-Stadien	96
4.4. Existenz und Häufigkeit von NET-Strukturen auf Gasfasern von gebrauchten Oxygenatoren (Fotodokumentation einer Vorstudie)	98
4.5. Identifizierung von Kernablagerungen und von NET-Strukturen entlang der Gasfasern anhand neuer Präparate	99
4.5.1. Vergleich von Kernablagerungen und von NET-Strukturen entlang der Gasfasern von Präparaten mehrfach untersuchter Oxygenatoren	101
4.5.2. Identifizierung von Kernablagerungen und von NET-Strukturen an den Kreuzungspunkten und deren Zwischenräumen	102
4.5.3. Korrelation von Kerndichte und NET-Frequenz.....	103
4.6. Zusammenhang therapie- und patientenspezifischer Faktoren zu Kerndichte und NET-Frequenz	103
4.6.1. Verschiedene Oxygenatormodelle	103
4.6.2. ECMO-Modus	104
4.6.3. Laufzeit des Oxygenators	106
4.6.4. Wechsel des Oxygenators und laufende Oxygenatornummer	106
4.6.4.1. Laufende Nummer des Oxygenators	106
4.6.4.2. Geweante vs. ausgewechselte Oxygenatoren	107
4.6.4.3. Geweante vs. ausgewechselte und Oxygenatoren von verstorbenen Patienten.....	107
4.6.5. SOFA-Score	108
4.6.6. Überleben oder Versterben der Patienten an ECMO	109
4.7. Limitationen der Studie.....	109
4.8. Ausblick	110
5. Zusammenfassung.....	111
6. Anhang	112
6.1. Tabellenverzeichnis	112
6.2. Abbildungsverzeichnis.....	112
7. Literaturverzeichnis.....	117

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Analysis of Variance-Test
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome, akutes Atemnotsyndrom
AV-ECMO	arterio-venöse ECMO
cfDNA	zellfreie Desoxyribonukleinsäure
citH3	citrulliniertes Histon H3
Clot	Blutgerinnsel
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DIC	disseminierte intravasale Gerinnung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
ECMO	Extrakorporale Membranoxygenierung
ECMO-Modus	Kanülierungsart (VV / VA)
EET	Eosinophil extracellular traps
Endoxy	Letzter am Patienten eingesetzter Oxygenator
Ersatzoxy	Ersatzoxygenator nach Oxygenatorwechsel
KP	Kreuzungspunkt zweier übereinander gelagerter Gaskapillaren
MET	Macrophage Extracellular Traps und Monocyte Extracellular Traps
MO	Membranoxygenator, Synonyme: Oxygenator oder Gastauscher
MPO	Myeloperoxidase
NE	Neutrophile Elastase
NET	Neutrophil Extracellular Trap
NETose	Zelltod, bei dem NET entstehen
Oxy	Oxygenator, kurz für Membranoxygenator
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBST	Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Detergens Triton X100
PDMS	Polydimethylsiloxan
PM	Pseudomembran
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
SOFA-Score	Sequential Organ Failure Assessment-Score
TNF	Tumornekrosefaktor
VA-ECMO	veno-arterielle ECMO
VV-ECMO	veno-venöse ECMO
vWF	von-Willebrand-Faktor
Wechseloxy	Ausgewechselter Oxygenator
ZR	Raum zwischen Kreuzungspunkten zweier übereinander gelagerter Gaskapillaren

1. Einleitung

1.1. ECMO

1971 gelang dem Team um J. Donald Hill in Santa Barbara (USA) der erste erfolgreiche Einsatz der extrakorporalen Membranoxygenierung bei einem 24-jährigen Patienten im akuten Lungenversagen nach Polytraumatisierung bei einem Verkehrsunfall (1). In über einem halben Jahrhundert konnte die ECMO-Therapie seitdem weiterentwickelt und verbessert werden, sodass sie heute einen wichtigen Stellenwert in der Behandlung schwerstkranker Patienten auf Intensivstationen weltweit hat (2,3). Zuletzt kam der ECMO-Behandlung in der Bewältigung der COVID-19-Pandemie eine große Bedeutung und öffentliche Wahrnehmung zu (4,5).

Je nach führendem Problem kommen verschiedene Therapieverfahren in Betracht, um Patienten im akuten Lungen- und / oder Kreislaufversagen zu unterstützen (6). Bei der venösen ECMO (*VV-ECMO*) wird dem Patienten sauerstoffarmes und kohlenstoffdioxidreiches Blut über eine venöse Kanüle entnommen, im Membranoxygenator oxygeniert (mit Sauerstoff angereichert) und decarboxyliert (CO_2 wird eliminiert) und dem Patienten anschließend über eine zweite venöse Kanüle wieder zugeführt. Dieses Verfahren eignet sich folglich zum Ersatz der Lungenfunktion im Lungenversagen. Bei veno-arterieller ECMO (*VA-ECMO*) wird das Blut venös entnommen, ebenfalls extrakorporal oxygeniert und decarboxyliert und wiederum dem arteriellen Gefäßsystem des Patienten zugeführt. Dadurch kann auch bei unzureichender oder fehlender Herzaktion ein überlebenswichtiger Blutkreislauf aufrechterhalten werden. Als dritte Variante steht bei führender Decarboxylierungsstörung das pumpenfreie *interventional lung assist-* System (*ILA*) zur Verfügung (7). Hierbei wird dem Patienten arterielles Blut entnommen, im Oxygenator decarboxyliert und anschließend venös zurückgeführt. Der Fluss durch den Membranoxygenator kommt dabei einzig durch das Druckgefälle zwischen arteriellem und venösem Gefäßsystem zustande.

Während die ECMO-Therapie selbst keine ursächliche Behandlung des zu Grunde liegenden Problems darstellt, kann sie doch dem Patienten und den Behandlern Zeit für den Heilungsprozess und die Behandlung verschaffen (8). Trotz Verbesserungen im ECMO-Management und Optimierung der ECMO-Systeme treten immer noch Komplikationen auf, die die Prognose und Mortalität der Patienten beeinflussen (9–12). So steigt mit der Behandlungsdauer die Wahrscheinlichkeit für Blutungen und Thromboseereignisse (13).

Von besonderer Bedeutung sind Thromben im System. So findet man im Laufe des ECMO-Betriebs zelluläre und plasmatische Ablagerungen auf der Gasauschmembran, die den Gasaustausch beeinträchtigen können, wobei deren Menge nicht notwendigerweise mit der Nutzungsdauer des Oxygenators korreliert (14).

1.2. Thrombosen unter ECMO-Therapie

Eine wesentliche Komplikation der ECMO-Therapie ist die Entstehung von Thrombosen (11–13,15,16). Patienten mit ECMO-Unterstützung haben gegenüber anderen intensivmedizinisch behandelten Patienten ein stark erhöhtes Risiko für Thromboseereignisse sowohl in Blutgefäßen, als auch im ECMO-Systemkreislauf (17). Letztere können bis zum Versagen des extrakorporalen Kreislaufs führen. So konnte am Regensburger ECMO-Zentrum an einem großen Patientenkollektiv (n=265) gezeigt werden, dass 31% der Patienten, die eine VV-ECMO benötigten, eine Gerinnungsstörung entwickelten, die einen Systemwechsel zur Folge hatte (18). Mögliche Komplikationen, die einen Systemwechsel notwendig machten, waren Leckage des Systems, Thrombosen im Oxygenator oder im Pumpenkopf, eingeschränkter Gasaustausch durch zelluläre und plasmatische Ablagerungen im Oxygenator sowie der Verdacht der systeminduzierten Gerinnungsstörung oder Systeminfektionen. Der häufigste Grund war die Bildung eines Blutgerinnsels im System (18). Entsprechende Untersuchungen liegen auch für die Verwendung einer VA-ECMO vor (19). Olson et al. schreiben in einem Review von 2011 ECMO-Behandlungen ohne systemische Antikoagulation, in 22,9% der Behandlungen sei es zu Thromboseereignissen gekommen, die Mehrheit dieser sei in VA-Kreisläufen aufgetreten (19). Zwei Metaanalysen ergaben die Notwendigkeit des Oxygenatorwechsels aufgrund von Oxygenatorversagen in 12,8 % der untersuchten VV-ECMO-Kreisläufe (20) sowie in 29% der untersuchten VA-ECMO-Kreisläufe (21). Neben einer systemischen Antikoagulation der Patienten werden verschiedene Beschichtungen wie Heparine oder Phosphorylcholin in den Systemen eingesetzt, um das Thromboserisiko zu reduzieren (22,23).

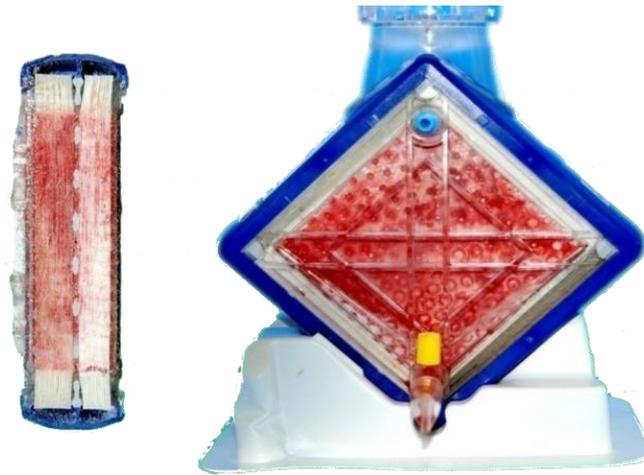


Abbildung 1: Oxygenatorthrombose:Links: Querschnitt nach Eröffnung und Anschnitt der Gasauschermembranen, Rechts: Draufsicht

Auslösende Faktoren von Thrombenbildungen im ECMO-System

Der Kontakt von Blut mit künstlichen Oberflächen und hohe Scherkräfte in ECMO-Systemen können auslösende Faktoren für die Thrombenbildung darstellen (24). Diskutiert wird die Beteiligung des von-Willebrand-Faktors als Strömungsindikator (25). Weiterhin kommen wohl auch Neutrophil Extracellular Traps (NETs) bei der Entstehung von Thromben während einer ECMO-Therapie eine wichtige Rolle zu (26).

1.3. Neutrophil Extracellular Traps

Neutrophile Granulozyten sind eine Art von Leukozyten (weiße Blutzellen). Sie haben vielfältige Aufgaben im Immunsystem (27): Über Ausschüttung von Zytokinen, wie IL-1 und TNF- α aktivieren sie andere Immunzellen wie z.B. Makrophagen. Als Phagozyten (Fresszellen) verdauen sie Pathogene. Über die Freisetzung von Sauerstoffradikalen zerstören sie Proteine von Krankheitserregern. 2004 beschrieben Brinkmann et al. eine weitere Funktion neutrophiler Granulozyten: die sogenannte NETose (28). Dabei handelt es sich um die Ausbildung extrazellulärer Netzwerke von Fäden aus dekontensierter Desoxyribonukleinsäure (DNA) mit angelagerten Proteinen wie citrullierten Histonen, Myeloperoxidase oder N-Elastase. Diese Fäden, Neutrophil Extracellular Traps (*NETs*), werden bei Stimulation des Granulozyten nach extrazellulär ausgeschleudert und sind in der Lage, pathogene Erreger einzufangen, sie so zu neutralisieren oder den verschiedenen Immunmechanismen besser zugänglich zu machen. Es

wird dabei zwischen einer „suizidalen NETose“, bei der der neutrophile Granulozyt selbst zugrunde geht, und einer vitalen Form unterschieden (29). NETs werden bedeutende Rollen in verschiedensten Erkrankungsbildern wie Autoimmunerkrankungen (z.B. Rheumatoide Arthritis, Lupus erythematoses), Thrombose oder Sepsis zugeschrieben (30). In zahlreichen Arbeiten wurde mittlerweile die thrombogene Wirkung von NETs beschrieben (31–33). Ein möglicher Grund für die Entstehung einer Thrombose ist die sogenannte Immunothrombose. Neutrophile Granulozyten können diese in Kleinstgefäßen durch NETs induzieren. Es wird angenommen, dieser Mechanismus diene physiologischerweise der Verhinderung der Ausbreitung von Krankheitserregern (34). Die Entstehung von NETs kann durch aktivierte Thrombozyten induziert werden, sie selbst fördern die Thrombozytenadhäsion mittels vWF und aktivieren die Fibrinbildung (34,35). Eine mögliche weitere Funktion von NETs könnte die Bildung eines ‚Grundgerüsts‘ für den Aufbau stabiler Thromben darstellen (35). NETs erhöhen die Stabilität von Thromben und machen diese resistenter gegen mechanischen und enzymatischen Abbau (36). Die Beteiligung von NETs an der Entstehung von Gefäßthrombosen wie Beinvenenthrombosen (37,38) oder Koronararterienthrombosen bei Myokardinfarkt (39–41) ist mittlerweile gut untersucht. Eine bemerkenswerte Feststellung mehrerer Arbeiten war dabei, dass Koronararterienthromben signifikant mehr NETs enthalten, als Thromben aus venösen Gefäßen (40,42). Auch kardioembolische Thromben, beispielsweise beim ischämischen Schlaganfall, scheinen mehr NET zu enthalten, als arteriosklerotische Thromben (43).

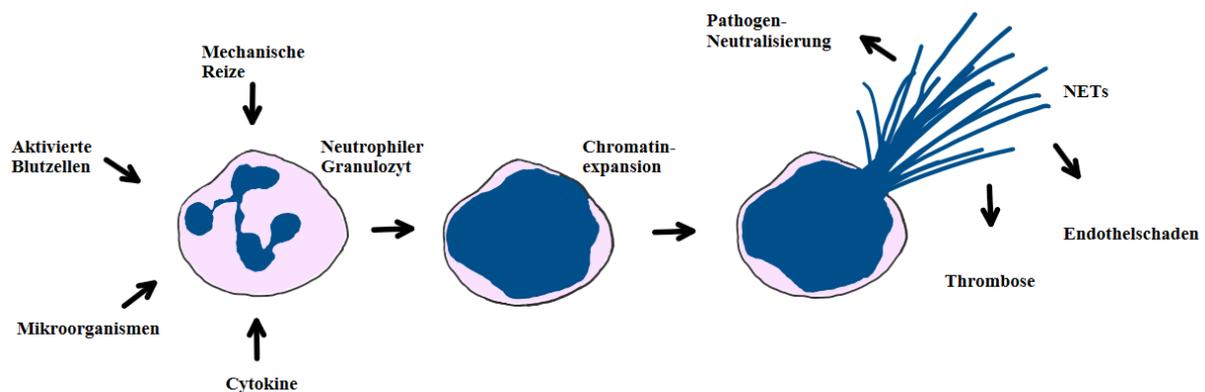


Abbildung 2: Schematische Darstellung möglicher Auslöser, des Ablaufes und möglicher Auswirkungen von NETs: Nach Einwirken eines externen Reizes auf den Neutrophilen Granulozyten dekondensiert die DNA, der Zellkern schwillt an, Kern- und Zellmembran rupturieren, DNA mit angelagerten Proteinen bildet extrazelluläre Fäden (NETs) aus. Physiologisch dienen diese der Pathogenneutralisation, sie können jedoch auch Thrombosen hervorrufen sowie das Endothel von Blutgefäßen oder Organen direkt schädigen.

1.4. Bedeutung von NETs bei ECMO

In Organersatzverfahren wie der Hämodialyse, der Herz-Lungen-Maschine oder dem Kunstherz stellt die mangelnde Hämkompatibilität der verwendeten Materialien häufig einen therapielimitierenden Faktor dar (44,45). Bei all diesen Verfahren trifft Blut in Kanülen, Schläuchen, Pumpen, Filtern oder Gastauschermembranen auf synthetische körperfremde Oberflächen. Hierbei kommt es über eine Aktivierung der Blutplättchen und des Komplementsystems zur Gerinnungsaktivierung (17). Weiterhin treten beim Blutfluss durch den extrakorporalen Kreislauf unphysiologische Scherkräfte auf. Durch die Freisetzung von Mikropartikeln von Thrombozyten kann dabei die Thrombenbildung aktiviert werden (46).

Auch neutrophile Granulozyten können neben der klassischen Aktivierung über Rezeptoren der Immunabwehr durch mechanische Reize zur NET-Produktion stimuliert werden (47–49). In den letzten Jahren kam der zunehmende Verdacht auf, auch auf diesem Wege könnten mögliche Komplikationen wie Thromboseereignisse bedingt oder aggraviert werden (50,51).

Ähnlich der ECMO durchläuft bei der Hämodialyse das Patientenblut ein synthetisches Schlauch- und Membransystem. Verschiedene Arbeiten konnten nach Hämodialyse erhöhte NET-Marker wie zellfreie DNA (cfDNA), DNA-Histon-Komplexe oder Myeloperoxidase im Blut nachweisen (52–54).

Es ist daher naheliegend, bei der Entstehung von Oxygenatorthrombosen in ECMO-Kreisläufen eine mögliche Beteiligung von NETs zu vermuten. In einer Studie von Zhang et al. setzten nach ECMO-Initiierung aus dem Blut von Schafen entnommene Neutrophile Granulozyten signifikant mehr NETs frei als einen Tag vor ECMO-Initiierung entnommene (26). Staessens et al. untersuchten die Zusammensetzung von Thromben aus ECMO-Kreisläufen mikroskopisch. Der Anteil von citrulliniertem Histon H3 als NET-Marker sei in aus der Pumpe und dem Oxygenator entnommen Thromben gegenüber aus dem Schlauchsystem entnommen Thromben signifikant erhöht gewesen, wobei insgesamt nur wenige NETs identifiziert wurden (55). Eine Studie von Winnersbach et al. ergab, dass die NET-Entstehung in Experimentellen ECMO-Kreisläufen thrombozytenabhängig ist (56).

1.5. Bedeutung von NETs bei Sepsis

Neben dem Einsatz zur Aufrechterhaltung des Kreislaufes im akuten Herzversagen oder bei Operationen kommt ECMO häufig bei Lungenversagen, meist im Rahmen von systemischen Infektionen bis hin zur Sepsis zur Anwendung. NETs scheinen am pathogenen Mechanismus beteiligt zu sein (57).

Während NETs physiologischerweise wichtige Funktionen in der Abwehr von Krankheitserregern erfüllen, kann ihre exzessive Entstehung in der Sepsis zum Organversagen führen (58). Ein maßgeblicher Mechanismus, über den NETs Organausfälle bedingen können, ist die Immuno-thrombose (59). So können NETs über die Aktivierung der Gerinnungskaskade Thrombosen bis hin zur disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) auslösen, einer oftmals tödlichen Komplikation der Sepsis (60). Neben der thrombogenen Wirkung schädigen NETs Gefäßendothelzellen verschiedener Organsysteme auch direkt und über die von ihnen ausgehende Entzündungsreaktion (60–62). Freie DNA und extrazelluläre Histone können eine Endotheldysfunktion bedingen, was zum Versagen verschiedener Organsysteme und damit zum Versterben führen kann (58,63).

Es gibt in der Literatur mehrere Ansätze, verschiedene Parameter für NETs als Biomarker für die Erkennung und Prognoseabschätzung von Sepsis heranzuziehen. Dwivedi et al. konnten zeigen, dass der Nachweis erhöhter zellfreier DNA (cfDNA) im Blut einen Prädiktor für erhöhte Mortalität bei Sepsis-Patienten darstellt (64). Hirose et al. fanden ebenfalls gehäufte DNA und citrullinierte Histone in Blutaussstrichen von kritisch kranken Patienten, wobei hier nicht ausschließlich Sepsis untersucht wurde (65). Abrams et al. fanden eine starke Korrelation von NET-Bildung zu SOFA-Score, Mortalität und Disseminierter intravasaler Gerinnung (66).

Die Detektion von NETs scheint möglicherweise geeignet, frühzeitig Sepsis und drohende Komplikationen wie DIC zu erkennen und einzugreifen. Außerdem scheint die Vermeidung einer überschießenden Neutrophilen-Aktivierung und NET- Bildung neben der Kontrolle der ursächlichen Infektion ein möglicher Ansatzpunkt in der Behandlung der Sepsis zu sein (60–62). So konnte zum Beispiel im Tiermodell an septischen Mäusen, die systemisch mittels rekombinierter DNase behandelt wurden, der sepsisbedingte Organschaden reduziert werden (67).

Da NETs auch in der Sepsis eine zentrale Bedeutung zukommen, und ECMO häufig bei sepsisbedingtem Lungenversagen eingesetzt wird, erscheint auch bei diesen ein gehäuftes Auftreten von NETs im Membranoxygenator möglich.

1.6. Methoden zur Detektion von NETs

2004 beschrieben erstmals Brinkmann et al. extrazelluläre Strukturen, die sich in vitro sowohl in Immunfluoreszenz-Mikroskopie (Färbungen für DNA, Histon-DNA-Komplexe, Neutrophile Elastase), als auch in der Elektronenmikroskopie Neutrophiler Granulozyten in identischer Ausprägung darstellen ließen (28).

Nachdem sich in Folge immer mehr die Beteiligung von NETs an verschiedensten Pathomechanismen herausstellte, wurden verschiedene Ansätze zur Identifizierung und Quantifizierung von NETs für verschiedenste Versuchsaufbauten publiziert. In Tabelle 1 sind gängige Herangehensweisen aus der Literatur zusammengefasst:

Tabelle 1: Gängige Methoden zur NET- Identifikation und Quantifikation

(Immun-) Fluoreszenz-mikroskopie außerhalb des Organismus	DNA-interskalierende Farbstoffe (z.B. DAPI), Antikörperanfärbungen für NET-spezifische Proteine (z.B. NE, MPO, CitH3) Beispiele: Organpräparate: (28,68–70) Thrombusmaterial: (40–42,71–74) Körperflüssigkeiten: (65,75–80)
Lichtmikroskopie	DNA-Anfärbung mit Hämatoxylin, GIEMSA oder Feulgen-Färbung; Aufgrund der erschwerten Abgrenzbarkeit zu anderen Strukturen scheint diese als Mittel zur NET-Detektion jedoch nur bedingt geeignet. Beispiele: (41,75,81)
Elektronenmikroskopie	Bereits für die Erstbeschreibung 2004 verwendeten Brinkmann et al. Transmissions- und Rasterelektronenmikroskopie zur strukturellen Untersuchung der NETs und Abgrenzung von anderen Varianten des Zelltods (28).
Fluoreszenz-spektroskopie	Die Methode bietet einen hohen Zelldurchsatz, bei niedrigen NET-Anteilen ist die Methode jedoch unsensibel (82).
Fluoreszenz-Durchflusszytometrie	Die Methode gilt als spezifisch, objektiv und gut quantifizierbar (83). Geschwollene Zellkerne im frühen NET-Stadium sind gut zu detektieren, die Methode scheint aber ungeeignet, um höhere NET-Stadien mit nicht mehr intakten Zellkernen zu identifizieren (84). Beispiel: (85)

In vivo: Intravitale Mikroskopie	Im Gegensatz zur Untersuchung fixierter Zellen in Organ- oder Gewebeproben sind bei der in-vivo-Mikroskopie dynamische Untersuchungen möglich, die nicht nur eine Momentaufnahme darstellen, wie die Immunfluoreszenzmikroskopie an fixierten Präparaten, sondern auch den Prozess der NET-Induktion und den Zerfall abbilden (82). In den meisten in vivo-, in situ-, und ex vivo-Versuchen wurden weniger NETs identifiziert als in in-vitro-Versuchen.
Fluoreszenz- Mikrotiterplatten- Assay und Life-cell- imaging-Systeme	Eine automatisierte Methode, NETs zu quantifizieren, ist die Detektion von extrazellulärer DNA mit nicht-Membran-permeablen Immunfluoreszenzfärbungen wie Sytox Green. Die Technik ist etabliert und einfach, birgt jedoch das Risiko falsch positiver Ergebnisse (86). Eine zur Echtzeit-Beobachtung der NET-Entstehung herangezogene Methode ist ein Life-cell-imaging-System mittels Fluoreszenzmikroskopie auf Mikrotiterplatten. Hierbei können die morphologischen Veränderungen der Zellkerne in Echtzeit beobachtet und quantifiziert werden (84,87). Beispiel: (88).
Immunblot / ELISA	Immunoblots und Immuno-Assays wie ELISA können DNA, Histone oder Granulozyten-Proteine wie MPO oder NE detektieren (84,89). Immuno-Assays sind die spezifischste objektive und quantitative Methode zur Detektion von NETose (83).

Eine relativ einfache und auch kostengünstige Methode stellt dabei die Fluoreszenzmikroskopie mit DNA-Farbstoffen (v.a. DAPI) dar.

1.7. Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung und Quantifizierung von Neutrophil Extracellular Traps bei im Oxygenator bei ECMO-Therapie adhärennten Leukozyten sowie die Identifizierung möglicher Zusammenhänge zur Oxygenatorthrombose und zu Therapie- und patientenspezifischen Faktoren. Als Untersuchungsobjekte standen hierfür bereits aus einer Vorgängerarbeit (90) präparierte und eingelagerte Membranoxygenatoren zur Verfügung. Als einfachste und kostengünstige Methode bot sich für die Untersuchung folglich die Immunfluoreszenzmikroskopie an.

Primär wurde anhand vorbestehender Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen aus der Dissertationsarbeit von J. Wilm, in denen kernhaltige Zellen mittels 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) angefärbt waren, eine Methode zur Klassifizierung von NETs erarbeitet.

In einem zweiten Teil wurden 81 neue DAPI-Präparate von 58 asservierten Membranoxygenatoren hergestellt und verblindet nach der erarbeiteten Methodik ausgewertet.

2. Material und Methoden

Das dieser Arbeit zugrundeliegende Bildmaterial sowie eingelagerte Oxygenatoren entstammten einer Vorgängerarbeit (90). Das Projekt wurde vom Ethikkommittee der Universität Regensburg genehmigt. Zugehörige patienten- und therapiespezifische Daten entstammten der prospektiv angelegten Regensburger ECMO-Datenbank. In die Studie eingeschlossen wurden ECMO-Behandlungen am Universitätsklinikum Regensburg im Zeitraum von 04/2008 bis 03/2012.

2.1. Auswertung der Fotodokumentation einer Vorgängerarbeit

Aus einer Vorgängerarbeit (90) stand ein umfangreiches Bildmaterial von DAPI-gefärbten Kernstrukturen zur Verfügung. Gegenstand dieser Vorstudie war im Wesentlichen die Identifizierung und Quantifizierung verschiedener kernhaltiger Zelltypen (v.a. Endothelzellen bzw. Leukozyten) sowie deren möglicher Einfluss auf den Verlauf der ECMO-Therapie. Die ursprüngliche Intention der Arbeit von Wilm verhindert eine Bias-getriggerte Fotodokumentation bezüglich NETs. Damit erscheint eine für ein erstes Screening ausreichende Repräsentativität des Bildmaterials als gegeben.

Herstellung der Präparate von J.Wilm

Der detaillierte Herstellungsprozess ist in der genannten Arbeit beschrieben. Vereinfacht dargestellt wurden von Patienten stammende Oxygenatoren nach ECMO-Explantation oder Oxygenatorwechsel mit physiologischer Kochsalzlösung gespült, mit 4%iger Paraform-Lösung fixiert, mit Saccharose-Lösung befüllt und bei -80°C eingefroren. Im Anschluss wurden die tiefgekühlten Membranoxygenatoren aufgesägt, das Gehäuse entfernt, und der verbleibende innere Teil aus übereinander gelegten Gaskapillarmatten in neun Stücke zerteilt. Die nun vorliegenden Blöcke wurden aufgetaut, und es wurden einzelne Gaskapillarmatten entnommen. Aus diesen wurden ca. 0,5*1cm große Abschnitte herausgetrennt, an welchen, neben anderen für die vorliegende Arbeit nicht relevanten Färbungen eine Zellkernfärbung mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) vorgenommen wurde. Die angefärbten Zuschnitte der

Gaskapillarmatten wurden schließlich auf einen Objektträger verbracht und unter Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Dabei wurde eine umfangreiche Fotodokumentation erstellt.

Sichtung und Bewertung des vorliegenden Fotomaterials

Aus dem Datenarchiv standen Schwarz-Weiß-Aufnahmen von DAPI-gefärbten Präparaten von 54 unterschiedlichen Oxygenatoren in

- 200x -Vergrößerung (n=3358 Aufnahmen, im Mittel 62 Aufnahmen je Oxygenator)
- 400x-Vergrößerung (n=1028 Aufnahmen; 18 ± 7 Aufnahmen je Oxygenator) zur Verfügung.

2.1.1. Identifizierung von NETs auf 200x vergrößerten Aufnahmen

Bei den 200x- Vergrößerungen wurden unterschiedliche Zellkernformen identifiziert (Abbildung 3).

- Rundliche, bohnenförmige, stabförmige oder segmentierte Kerne weisen auf Leukozytenablagerungen hin.
- Aufgequollene Zellkerne mit reduziertem Kontrast und DNA-Fäden lassen auf die Anwesenheit von NETose schließen (85,88,91)

Abbildung 3 zeigt exemplarisch 200x-Vergrößerungen mit den unterschiedlichen Kernformen

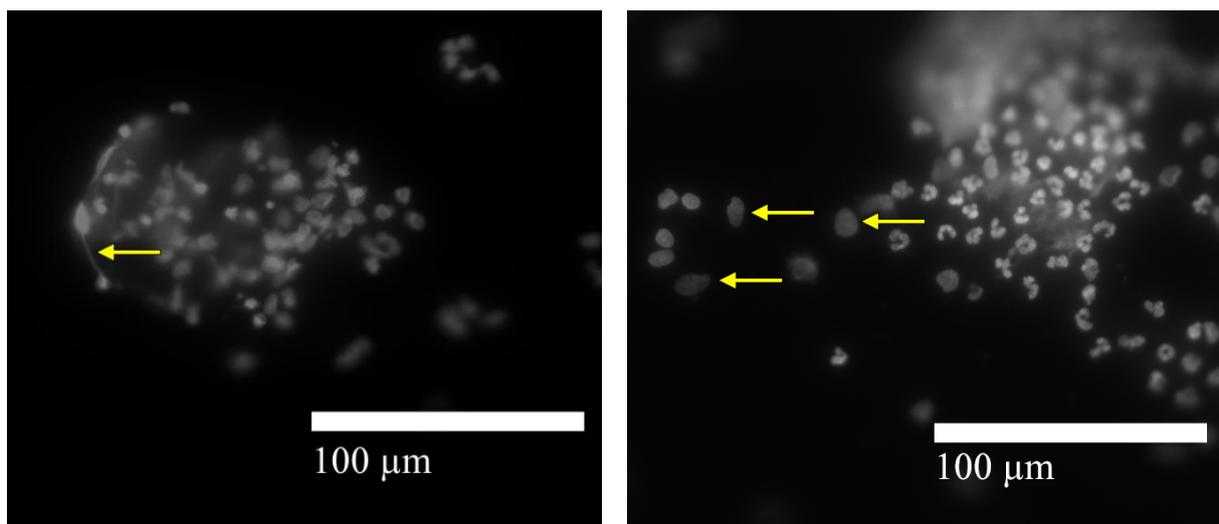


Abbildung 3: Heterogene Anordnung der Zellkerne auf den Gasfasern (200x Vergrößerung): Links: Pfeil markiert einen DNA-Faden; Rechts: Pfeile markieren aufgeblähte Zellkerne.

2.1.2. Identifizierung von NETs auf 400x vergrößerten Aufnahmen

In der Fotodokumentation eines MO konnten keine Zellkerne identifiziert werden, weshalb dieser in die Auswertung nicht mit einging. Verbleibend standen 989 400x- vergrößerte Aufnahmen von 53 MOs für die Auswertung zur Verfügung.

2.1.2.1. Kategorisierung von NET-Strukturen

Aus der Fotodokumentation wurden verschiedene Kernstrukturen, insbesondere NET-Strukturen, identifiziert und kategorisiert. Nachdem in einer Literaturrecherche zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit kein etabliertes System zur morphologischen Kategorisierung möglicher NET- Stadien gefunden wurde, wurden im Rahmen der Auswertung eigene Kriterien erarbeitet, Neutrophil Extracellular Traps zu klassifizieren. Dabei wurden Zellkerne nach ihrer Morphologie in vier Klassen nach ihrer Ausprägung eingeteilt. Eine gewisse Unschärfe bei der Eingruppierung in die verschiedenen Klassen war dabei nicht immer gänzlich vermeidbar.

Auf den 400x- Aufnahmen wurden verschiedene Zellkernmorphologien und -Strukturen beobachtet und kategorisiert, die im Folgenden exemplarisch dargestellt sind.

Normal konfigurierte Zellkerne

Bekannte Kernformen (rundlich, bohnenförmig, stabförmig oder segmentiert) ohne erkennbare Verformungen oder Ausbuchtungen wurden als ‚NET-0‘ definiert.

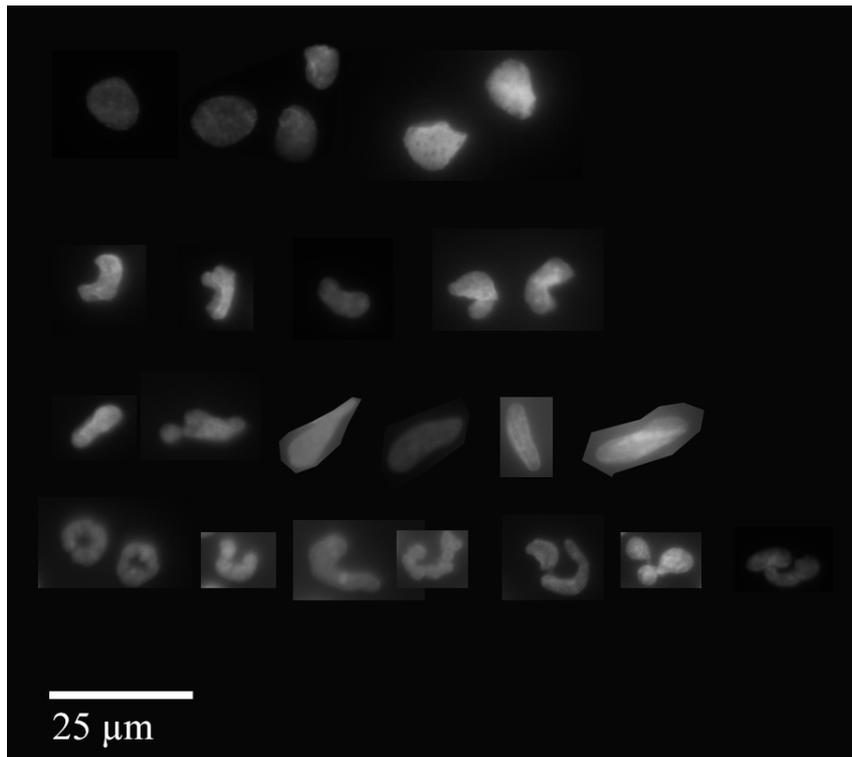


Abbildung 4: Beispielbilder für ‚NET-0‘ - Zellkerne in 400x Vergrößerung: Normale Zellkernmorphologien typischer Blutzellen (rundlich, bohnenförmig, stabförmig oder segmentiert)

Pyknotische (geschrumpfte) Zellkerne

Diese, durch Apoptose oder Nekrose degenerativ veränderten Zellkerne wurden für die Identifizierung von NETs nicht verwendet.

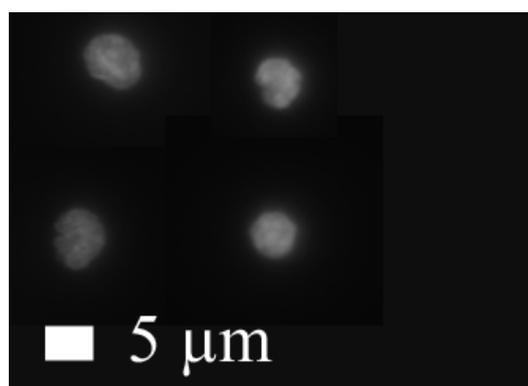


Abbildung 5: Beispiele für DAPI-gefärbte pyknotische Zellkerne: Schrumpfung a.e. aufgrund von Degeneration (Apoptose/Nekrose)

Runde bis ovale, aufgequollene und kontrastarme Zellkerne

Diese Kernform wurde in die NET-Klassifizierung nicht aufgenommen.

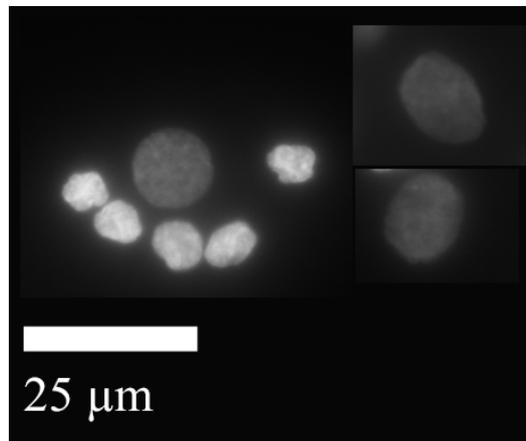


Abbildung 6: Beispiele für DAPI-gefärbte aufgequollene, blass gefärbte Zellkerne (Durchmesser >10μm)

NET-II

Zellkerne, deren eigentliche Form stark entstellt war, oder die Ausbreitungen bzw. Ausbuchtungen aufwiesen, die die halbe Kerngröße überschritten, oder deren Ausläufer unscharf begrenzt zur Darstellung kamen, wurden als ‚NET-II‘ klassifiziert.

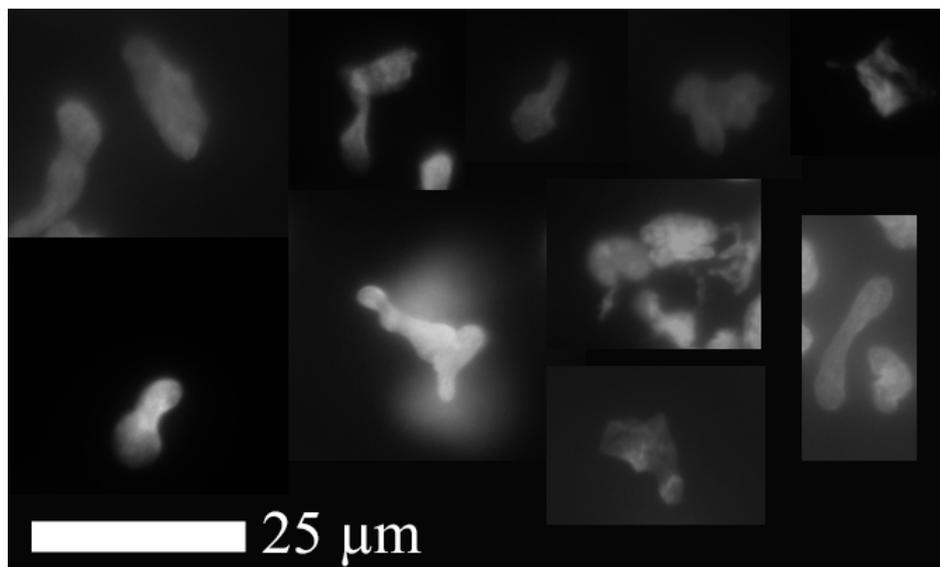


Abbildung 7: Beispiele für atypische Zellkerne (‚NET-II‘): Ausgeprägte polymorphe Abweichungen von bekannten Kernformen, Zellkerne mit Ausbreitungen bzw. Ausbuchtungen, die die halbe Kerngröße überschreiten, sowie unscharf begrenzte Verformungen.

NET-III

Die klassische Form der NETs zeichnet sich durch DNA-Fäden aus. Hier wurden DNA-Fäden mit einer Länge von mindestens 10 μm , mit und ohne erkennbaren zugehörigen Zellkern erfasst und als ‚NET-III‘ klassifiziert.

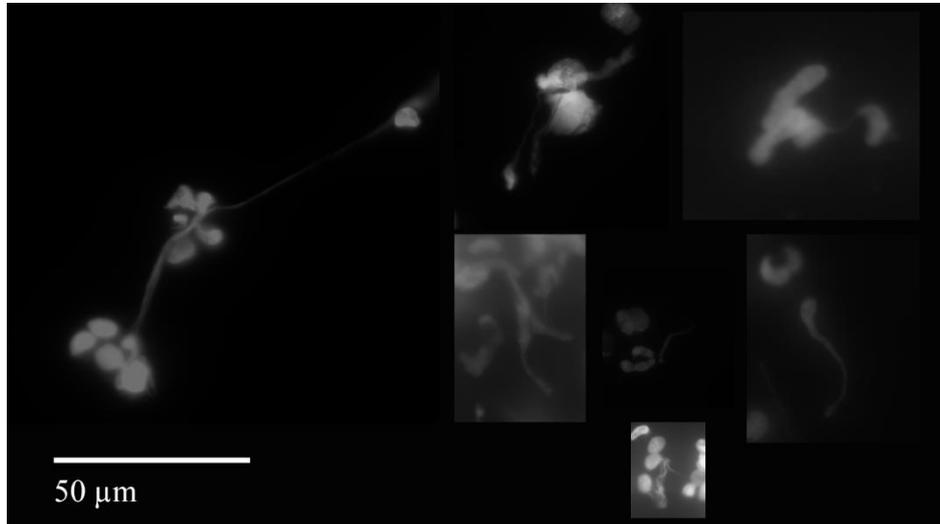


Abbildung 8: Beispiele für Merkmale der ‚NET-III‘: DNA-Fäden $> 10 \mu\text{m}$ Länge, mit und ohne assoziierten Zellkern.

Nur beim Vorliegen von NET-III kann mit ausreichender Sicherheit vom Vorliegen einer NET ausgegangen werden. Dennoch wurden die Aufnahmen der Vorgängerarbeit hinsichtlich NET-0, NET-II und NET-III begutachtet. Dagegen wurden die späteren eigenen Auswertungen ausschließlich in letzter Kategorie durchgeführt. Eine zu Beginn der Auswertung geführte Kategorie ‚NET-I‘ wurde bei mangelnder Spezifität und Unterscheidbarkeit zur NET-0 nicht fortgeführt.

2.1.2.2. Häufigkeit von NET-Strukturen in der Fotodokumentation

Einzelkernanalysen erlaubten die Quantifizierung der NET-Strukturen. Bei Anwesenheit von Zellaggregaten war aufgrund der häufigen Überlagerung eine Quantifizierung auf Einzelzellebene nicht möglich. So wurde definiert, dass bereits die Anwesenheit einer NET-III-Struktur die Zuordnung des Zellaggregats oder der Aufnahme als NET-positiv erlaubt. Die Ergebnisse wurden in einer Tabelle zusammengetragen. Der Aufbau ist im Folgenden dargestellt.

Tabelle 2: Exemplarischer Ausschnitt der Tabelle zur Eingruppierung der Zellkerne mit allen Untersuchten Aufnahmen des Oxygenator Nr. 1

Oxy	Bild	Kerne fokussiert	Kerne insgesamt	NET-II	NET-III	aufgeblähte Kerne	NET-III / Kerne	NET- II+III / Kerne
1	1KO	5	8				0,00	0,00
1	1KO-1	7	12				0,00	0,00
1	1KO-2	16	28				0,00	0,00
1	1KO-3	7	32				0,00	0,00
1	1VE	3	6				0,00	0,00
1	1VE-1	7	14	1			0,00	0,14
1	1VE-2	2	16				0,00	0,00
1	1VE-3	13	25	1	1		0,08	0,15
1	1VE-4	7	18				0,00	0,00
1	1VE-5	10					0,00	0,00
1	oxy1	15	28				0,00	0,00
1	Oxy1-1	11	20				0,00	0,00
1	Oxy1-2	5	18				0,00	0,00
1	Oxy1-3	15	25			5	0,00	0,00
1	Oxy1-4	10	20				0,00	0,00
1	Oxy1-5	7	8	1		2	0,00	0,14
1	1 gesamt	140	278	3	1	7	0,01	0,03

2.1.2.3. Nachweis von NETs bei verschiedenen Oxygenatoren

Es wurde zunächst die mittlere Kernanzahl pro Aufnahme bestimmt (= Gesamtzahl der Kerne aller Aufnahmen dividiert durch die Anzahl der Aufnahmen je Oxygenator). Diese wurde für die fokussierten und nicht fokussierten Bildausschnitte ermittelt (Abbildung 33). Weiterhin wurde der Anteil der beschriebenen NET-Strukturen als prozentualer Anteil aller gezählten Kerne ermittelt (Abbildung 34). Schließlich wurde der Anteil an NET-III-positiven Aufnahmen je Oxygenator dargestellt (Abbildung 35).

2.2. Auswertung neuer Präparate derselben Oxygenatoren

Im zweiten Teil der Arbeit wurden neue Präparate aus denselben Oxygenatoren erneut gezielt auf die Anwesenheit von NETs untersucht. Es sollte nunmehr versucht werden, das Vorkommen von NETs in MOs zu quantifizieren und deren bevorzugte Lage auf den Gasfasern (Kreuzungspunkte benachbarter Gasfasern sowie die Zwischenräume) zu bestimmen. Dafür wurden Bereiche mit Einzelkernen betrachtet und morphologisch untersucht (NET-0 und

NET-III). Dazu wurden die eingelagerten Oxygenatoren der Vorgängerarbeit verwendet (gesammelt zwischen Januar 2008 und März 2012). Die Fixierung und Lagerung wurden in der Arbeit beschrieben (90). Es wurden von Frau Katrin Bielenberg 81 Präparate von 58 Oxygenatoren ausgewählt, präpariert und verblindet.

Folgende Typen von Membranoxygenatoren wurden untersucht:

- „Hilite®LT“, Firma Medos®-AG, Heilbronn, Polymethylpenten (n=11)
- „permanent life support“ („Quadrox PLS“), „extended life support“ („Quadrox ELS“), „Quadrox-D“, Firma Maquet Cardiopulmonary AG, Rastatt. In eigenen Auswertungen aufgrund des weitgehend identischen Aufbaus alle als Quadrox bezeichnet (n=32)
- „ILA-activ®“, Novalung GmbH, Heilbronn (n=6)
- „ECC.O5“ der Firma Sorin, Mirandola, Italien (n=2)

Sieben Präparate ließen sich anhand der vorliegenden Oxygenatordatenbank nicht sicher einem Modell zuordnen. Von 15 Oxygenatoren wurden jeweils zwei Präparate, von drei Oxygenatoren jeweils drei Präparate hergestellt.

Präparateherstellung

Analog zu den Präparationen/Färbungen der Arbeit von Julius Wilm wurden neue Präparate aus den vorhandenen, tiefgefrorenen Oxygenatorblöcken gewonnen, welche wie folgt zur DNA- und vWF- Identifizierung mit Immunfluoreszenz-Farbstoffen angefärbt wurden:

Einer der eingefrorenen Blöcke des Membranoxygenators wurde aufgetaut. Die obersten vier Membranen wurden verworfen. Die fünfte Membran wurde in PBS eingelegt und auf ein ca. 0,5*1cm messendes Stück zugeschnitten, dessen etwa zehn Kapillarröhrchen seitlich jeweils durch Kettfäden fixiert waren. Die zugeschnittenen Membranabschnitte wurden in Eppendorf-Mikroreaktionsgefäße überführt und dreimal mit PBS gewaschen, um die Saccharoselösung abzuspielen. Nach dem Waschen wurden die Proben für 30min in 10% Pferde-Serum, (Sigma, D-9663) in PBST (PBS + 0,1% Triton-X 100) inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Im Anschluss wurde die Membran erneut mit PBS gewaschen und mit dem Primärantikörper (Polyklonaler Kaninchen-, anti-Human-vWF-AK, 1:500) für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln in PBST inkubiert. Danach wurde 1x mit PBST und 4x mit PBS für jeweils 5 Minuten gewaschen. In Folge wurde der Primärantikörper mit Texas Red anti-rabbit IgG (1:100) eine Stunde bei Raumtemperatur in PBS im Dunkeln konjugiert. Nach erneutem 4-maligem Waschen in PBS erfolgte die DNA-Markierung mittels 4',6-Diamidin-2-

phenylindol (DAPI) (D9542, Sigma-Aldrich), 0,5µg/ml in PBS, wofür erneut für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Nach erneutem zweimaligem waschen mit PBS wurde die Membran in einen Tropfen Fluoromount (Fluoromount-G®, ThermoFisher, CO-4958-02) auf einem Objektträger überführt und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Im Anschluss erfolgte die Auspolymerisierung über Nacht bei 4°C im Dunkeln.

Die Markierung des Von-Willebrand-Faktors erfolgte ausschließlich zur besseren Orientierung auf der Gastausermembran, weil sich damit auch bei fehlendem Kernbesatz häufig die Kreuzungspunkte identifizieren ließen. Anhand der vWF-Anfärbung selbst erfolgte keine Auswertung.

Verblindung

Die Präparate wurden für die Auswertung verblindet hergestellt und fortlaufend nummeriert. Erst nach erfolgter Auswertung durch den Autor erfolgte die Entblindung, sodass eine Zuordnung der Präparate zu den Oxygenatoren erfolgen konnte.

Mikroskopie

Die Mikroskopie in der vorliegenden Arbeit erfolgte mithilfe eines Immunfluoreszenzmikroskops Typ Keyence BZ-8100E (Neu-Isenburg, Deutschland). Im Mikroskop kamen folgende Filterblöcke zum Einsatz:

Tabelle 3: Verwendete Filterblöcke im Fluoreszenzmikroskop

Kanal	Modelbezeichnung	Erregungs- wellenlänge	Dichromatische Spiegelwellenlänge	Absorptions- wellenlänge
DAPI	OP-79304 SB Filter DAPI-BP	377/50 nm	409 nm	447/60 nm
TexasRed	OP-66838 BZ Filter TexasRed	560/40 nm	595 nm	630/60 nm

Anhand eines festgelegten Protokolls wurden von den erzeugten Präparaten erst Übersichtsaufnahmen in 20-facher Vergrößerung erstellt. Dazu wurde die Serienbildfunktion des Mikroskops verwendet. Für die Aufnahme eines vollständigen Präparats war die Aufnahme von neun (3*3) Bildabschnitten erforderlich, die automatisiert leicht überlappend jeweils in den zwei genannten Kanälen sowie in einem Overlay- Kanal fotografiert wurden. Anschließend

wurden die entstandenen Fotos mittels des Programms BZ Analyzer (Keyence, Japan) zu einem Bild des vollständigen Präparats zusammengesetzt.

Zunächst wurden Übersichtsaufnahmen in 20x Vergrößerung angefertigt. Damit war jedoch das Auftreten von NETs nicht quantifizierbar, die Identifizierung erfordert eine höhere Vergrößerung. Die zuvor ausgewerteten Aufnahmen der Fotodokumentation aus (90) in 400x Vergrößerung sind zwar gut für die Identifizierung von DNA-Fäden geeignet, die Orientierung auf dem jeweils zu untersuchenden Gasfaserabschnitt wird aber durch die hohe Vergrößerung erschwert, weshalb bei der Einzelkernauswertung mit 200x Vergrößerung gearbeitet wurde. Durch eine Anpassung der Belichtung konnten trotz der geringeren Vergrößerung im Vergleich zu den vorbestehenden Aufnahmen auch feine DAPI-gefärbte Strukturen erkannt werden. Dadurch war sowohl eine gute Übersichtlichkeit und damit Orientierung auf dem jeweils zu untersuchenden Gasfaserabschnitt als auch eine gute Identifizierbarkeit von NET-Fäden gegeben.

2.2.1. Übersichtsauswertung

Es wurden von allen 81 Präparaten Übersichtsaufnahmen (20x) erstellt. Folgende Darstellung einiger exemplarischer Übersichtsaufnahmen von Oxygenatorpräparaten zeigt die heterogene Verteilung zellulärer Ablagerungen auf Präparaten gleicher und verschiedener Oxygenatoren. Abbildungen 9 bis 11 stellen drei Präparate aus einem Oxygenator dar. Sie spiegeln die Heterogenität der Zellablagerungen auf den Präparaten und innerhalb eines Oxygenators wider. Auffallend ist die heterogene Verteilung der zellulären Ablagerungen auf den Präparaten, wie auch deren unterschiedliche Formen und Intensitäten.

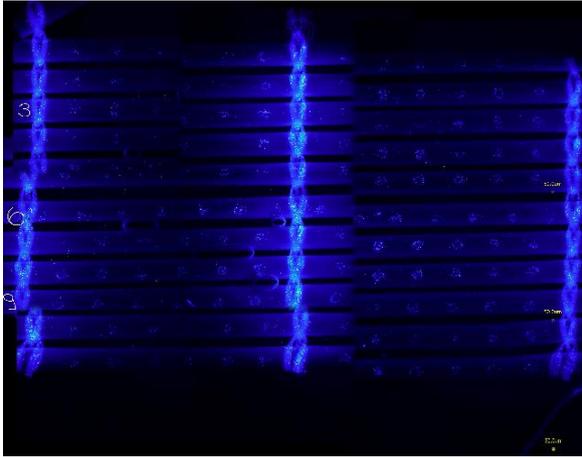


Abbildung 9: Übersichtsaufnahme eines Oxygenatorpräparat aus Oxy #6

In diesem Präparat sind Einzelzellablagerungen homogen und regelmäßig um die Kreuzungspunkte der kreuzenden Gaskapillaren adhärirt.

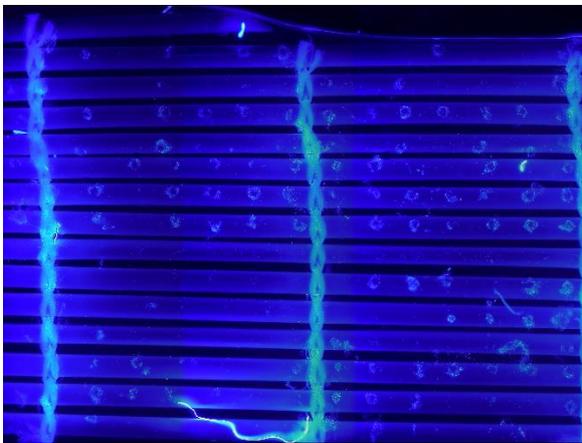


Abbildung 10: Übersichtsaufnahme eines Oxygenatorpräparat aus Oxy #6

In dieser Aufnahme ist weiterhin eine regelmäßige Anordnung um die Kreuzungspunkte erkennbar, es erscheinen jedoch deutlich größere und ungeordnetere Mengen an zellulären Ablagerungen je Kreuzungspunkt, während auch große ‚Leerbereiche‘ ohne Ablagerungen (untere Hälfte) auftreten. Zudem sind einzelne Zellkerne ohne Bezug zu Kreuzungspunkten adhärirt.

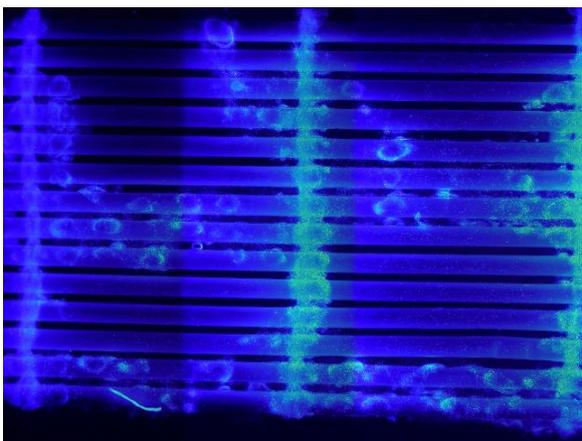


Abbildung 11: Übersichtsaufnahme eines Oxygenatorpräparat aus Oxy #6

Auch in dieser Aufnahme ist weiterhin eine regelmäßige Anordnung um die Kreuzungspunkte erkennbar, es erscheinen jedoch deutlich größere und ungeordnetere Mengen an zellulären Ablagerungen je Kreuzungspunkt, während große Leerbereiche auftreten. Auch hier sind einzelne Zellkerne adhärirt ohne Häufung an Kreuzungspunkten. Es sind vermehrte Ablagerungen an den Kettfäden (Pseudomembranen) und um vereinzelt Kreuzungspunkte erkennbar.

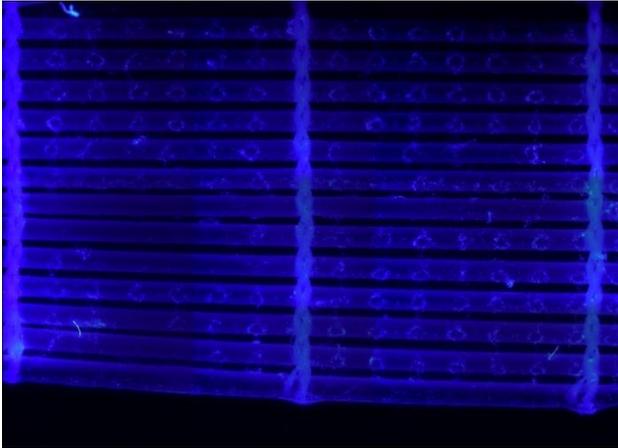


Abbildung 12: Übersichtsaufnahme eines Oxygenatorpräparat aus Oxy #20

Dieses Präparat trägt hauptsächlich Einzelzellen und kleinere Aggregate um Kreuzungspunkte, Außerdem sind teilweise Leerbereiche zu erkennen (links unten)

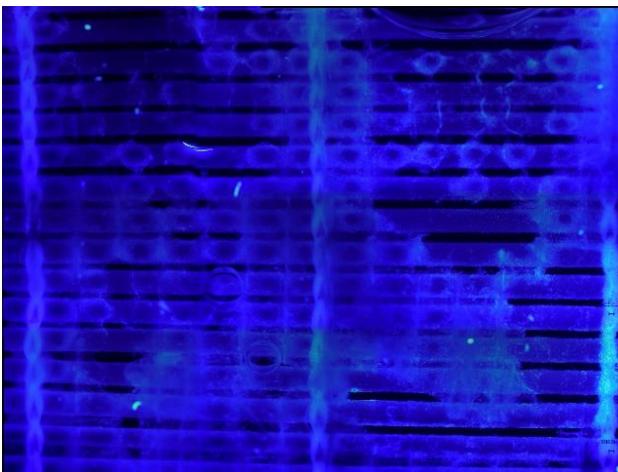


Abbildung 13: Übersichtsaufnahme eines Oxygenatorpräparat aus Oxy #7

Das Präparat ist von großflächiger Pseudomembran überspannt. Einzelkernbewertung ist nicht oder nur sehr eingeschränkt möglich.

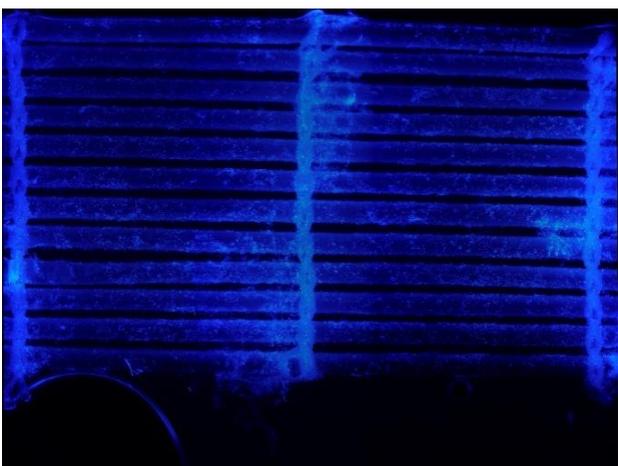


Abbildung 14: Übersichtsaufnahme eines Oxygenatorpräparat aus Oxy #18

Die Gasfasern sind mit einem Zellrasen über gesamtes Präparat belegt. Die Kreuzungspunkte sind erkennbar.

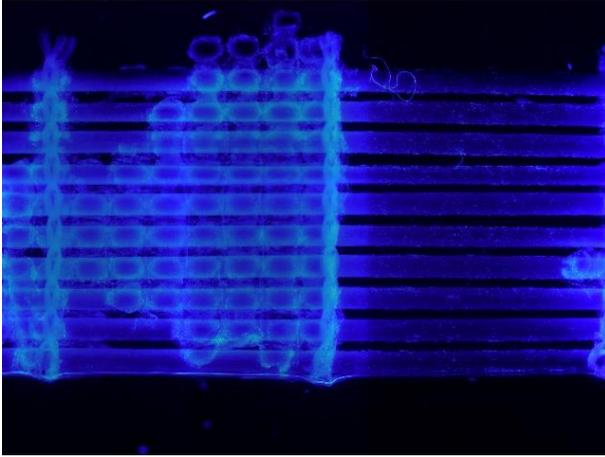


Abbildung 15: Übersichtsaufnahme eines Oxygenatorpräparat aus Oxy #25

Die linke Hälfte des Präparats ist mit regelmäßigem Zellbewuchs in Form von Pseudomembran belegt, rechts Einzelzellablagerungen ohne Kreuzungspunkterkennung (Leerbereich)

Abbildungen 12 bis 15 zeigen Beispiele von Präparaten aus vier verschiedenen Oxygenatoren. Auch hier wird die Heterogenität der Ablagerungen erkennbar.

2.2.1.1. Einteilung der Übersichtsaufnahmen nach visuellem Eindruck

Die Übersichten wurden nach folgenden Kriterien subjektiv bewertet:

1. Bewertung der Übersichtsaufnahmen nach der Homogenität der Kernablagerungen:

- Regelmäßig angeordnet: Zellkerne sind gehäuft um die Kreuzungspunkte adhärirt, die Zwischenräume sind zellkernfrei oder zellkernarm. Es gibt keine größeren Unterbrechungen dieser Ordnung im Präparat.
- Teilweise regelmäßig angeordnet: Es ist eine regelmäßige Anordnung der Zellkerne zu erkennen, die stellenweise unterbrochen ist, und / oder es gibt teilweise größere Zellkernanhäufungen in Zwischenräumen.
- ungeordnet: Eine Regelmäßigkeit in der Zellkernadhäsion ist auf den Übersichtsaufnahmen nicht zu erkennen.

2. Bewertung der Übersichtsaufnahmen nach der Zelldichte:

- wenig: es sind keine oder im Vergleich mit den anderen Präparaten deutlich unterdurchschnittlich viele Zellkerne auf den Membranen adhärirt (siehe Abbildung 18)
- mittel: Im Vergleich mit den anderen Präparaten sind etwa durchschnittlich viele Zellkerne auf der Membran adhärirt (siehe Abbildungen 9, 12, 17)

- hoch: Überdurchschnittliche bis massige Zellkernablagerungen auf den Membranen (siehe Abbildungen 13, 24)

3. Bewertung der Übersichtsaufnahmen nach Pseudomembranen:

Auf den Gastauschermembranen waren diese entweder großflächig sichtbar (Abbildungen 13, 15) oder beschränkt als kleinere Konglomerate an den Kettfäden (Abbildungen 11, 14). Diese Kategorien wurden nochmals unterteilt („keine oder kaum“, „mittel“, „viel“).

2.2.1.2. Quantitative Auswertung der Übersichtsaufnahmen

In der Folge wurden die im Rahmen der Einzelkernauswertung erstellten Übersichtsaufnahmen systematisch nach der Unterscheidbarkeit der Bildabschnitte (Kreuzungspunkt (KP) / Zwischenraum (ZR)), Homogenität des Kernbesatzes, der Verteilung der Kerne auf den Bildabschnitten und auf das Auftreten von Leerbereichen untersucht. Im Folgenden ist das dafür erarbeitete Auswerteschema dargestellt:

Untersuchungsschema für Übersichts- und Detailauswertung

Es wurden pro Übersichtsaufnahme drei bis sechs Abschnitte betrachtet: Bei ungerader Anzahl der Kapillarröhrchen auf einer Übersichtsaufnahme das Mittlere, sowie jeweils das dritte Kapillarröhrchen darüber und das dritte Kapillarröhrchen darunter. Bei gerader Anzahl jeweils das obere der zwei mittleren Kapillarröhrchen und ebenfalls das dritte Kapillarröhrchen darüber und das dritte Kapillarröhrchen darunter. Seitlich waren die untersuchten Abschnitte jeweils durch Kettfäden begrenzt. Da die untersuchten Präparate der Oxygenator-Modelle Quadrox und ILA jeweils durch drei vertikale Kettfäden seitlich begrenzt waren, wurden hierbei jeweils sechs Abschnitte untersucht (siehe Abbildung 16). Bei Präparaten der Modelle ECC.O5 und Hilite mit nur zwei Kettfäden (siehe Abbildung 17), wurden auf eine vergleichbar große Fläche drei dementsprechend doppelt so große Abschnitte untersucht.

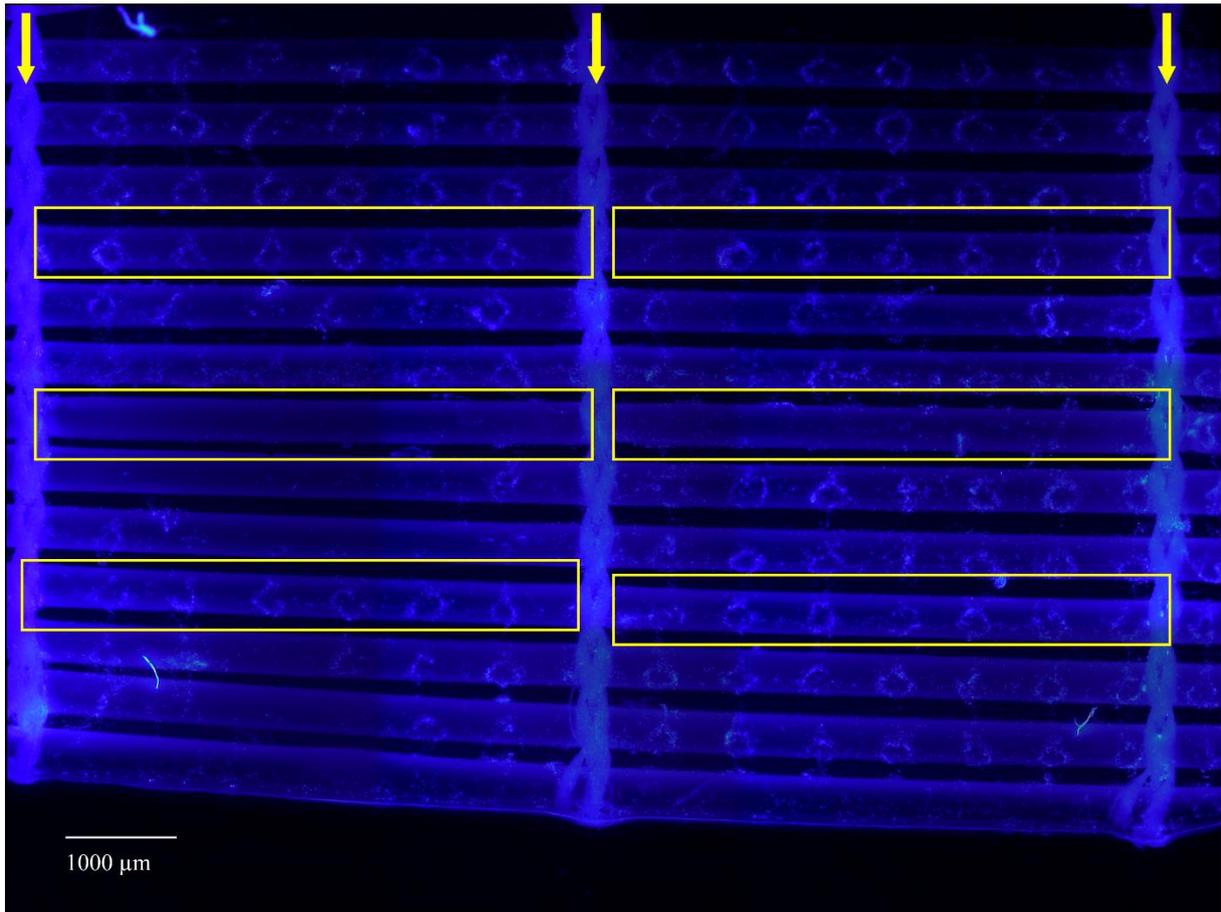


Abbildung 16: Auswertesschema für Übersichts- und Einzelkernauswertung eines Oxygenators mit drei Kettfäden: Die Rechtecke zeigen exemplarisch die betrachteten Gasfaserabschnitte an, die Pfeile markieren die Kett-Fäden.

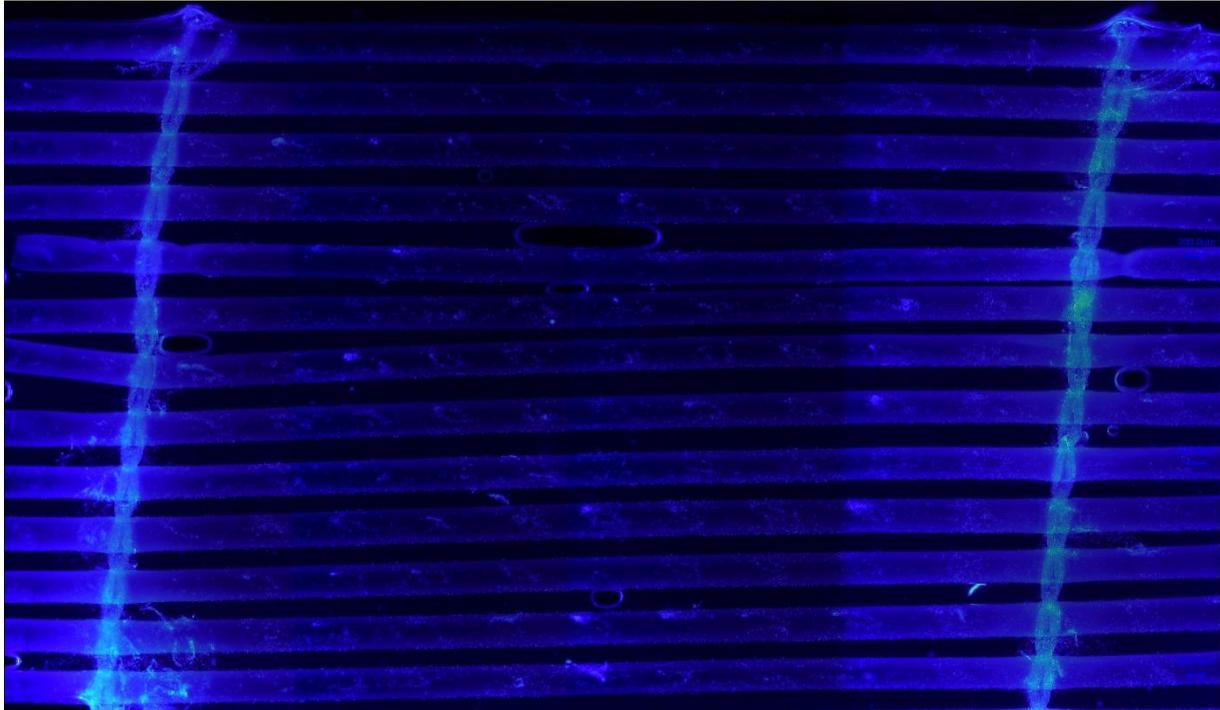


Abbildung 17: Beispiel für ein Oxygenatorpräparat ohne mittleren Kettfaden. Hierbei wurden jeweils drei Kapillarabschnitte vom linken zum rechten Kettfaden untersucht.

Im Folgenden sind die einzelnen Untersuchungskriterien der quantitativen Übersichtsauswertung beschrieben:

Identifizierbarkeit von Kreuzungspunkten (Abbildung 36)

Wie in Abbildungen 9 bis 15 exemplarisch sichtbar, waren die Bildabschnitte (Kreuzungspunkte und Zwischenräume) nicht immer zuordenbar bzw. auswertbar. Je nach Herstellermodell war eine maximale Zahl an KP vorgegeben (Quadrox: 6-7 KP pro Gasfaser zwischen 2 Kettfäden; Hilite: 10 - 11 KP, ILA: 8-9 KP). Eine Zuordnung war dann möglich, wenn eine Zellanhäufung um den KP vorlag.

Es wurde zunächst der Anteil an identifizierten an den rechnerisch zu erwartenden Kreuzungspunkten ermittelt. Anhand dieses Wertes wurde das jeweilige Präparat dann in eine der fünf folgenden Kategorien eingeteilt:

- 75 bis 100% der erwartbaren Kreuzungspunkte identifizierbar
- 50 bis 75% der erwartbaren Kreuzungspunkte identifizierbar
- 25 bis 50% der erwartbaren Kreuzungspunkte identifizierbar
- Bis zu 25% der erwartbaren Kreuzungspunkte identifizierbar

- Keine der erwartbaren Kreuzungspunkte identifizierbar.

Für diese Auswertung wurden 78 von 81 Präparaten aus 58 Oxygenatoren herangezogen. Drei Präparate wurden nicht berücksichtigt, weil bei diesen keine Zuordnung zu einem Oxygenatormodell und damit keine Zuordnung zu einer erwartbaren Anzahl von Kreuzungspunkten möglich war. Grund dafür waren fehlende Daten in der Oxygenatordatenbank. In sechs weiteren Fällen ohne Oxygenatordaten konnte die Anzahl möglicher Kreuzungspunkte visuell durch abzählen bei gleichmäßiger Kernbeladung ermittelt werden. Wurden von einem Oxygenator mehrere Präparate hergestellt, so gingen diese unabhängig voneinander als einzelne Datenpunkte in die Auswertung ein.

Untersuchung des überwiegend vorliegenden Kernbesatzes (Abbildung 37)

Die Untersuchung des überwiegend vorliegenden Kernbesatzes der Gastauschermembranen erfolgte in folgenden Kategorien:

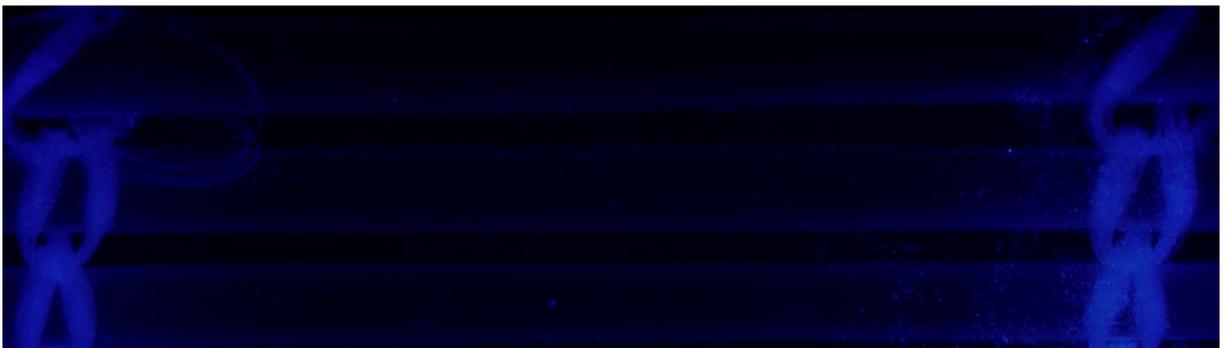


Abbildung 18: Repräsentativer Abschnitt ohne Zellbewuchs („kein Zellbewuchs“)

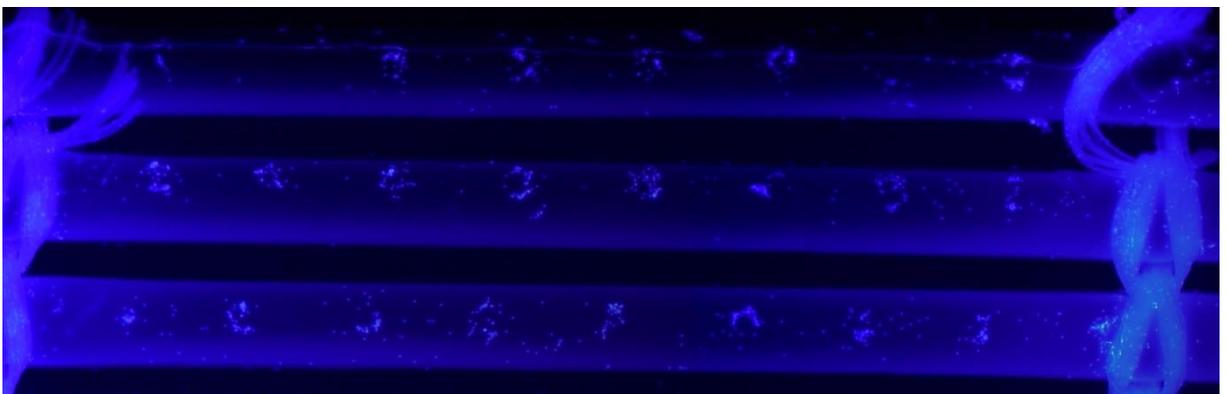


Abbildung 19: Repräsentativer Abschnitt für „Zellbewuchs streng adhärent auf Membranen“ („str. adh.“)

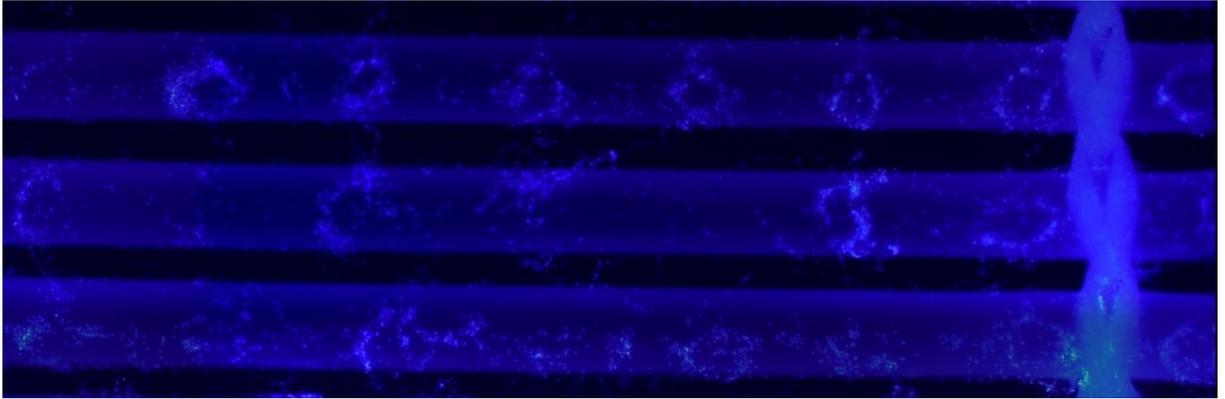


Abbildung 20: Repräsentativer Abschnitt für „etwas Pseudomembran“ („etw. PM“)

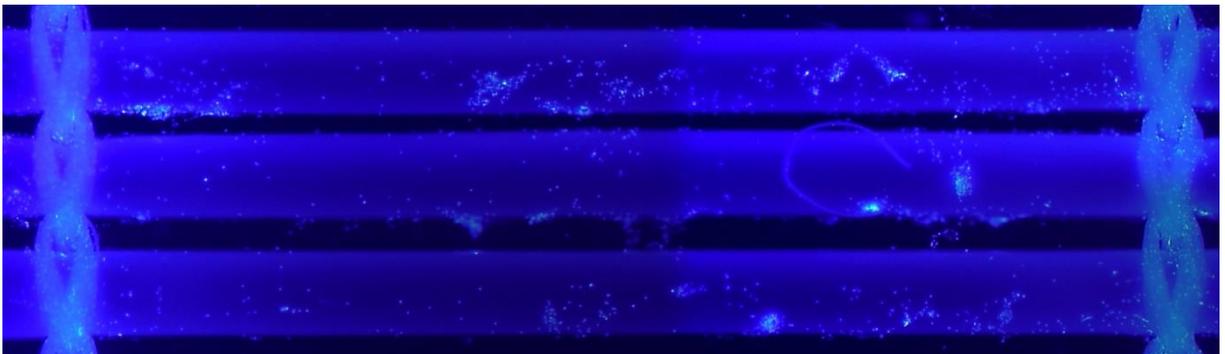


Abbildung 21: Repräsentativer Abschnitt für „einzelne Pseudomembran-Fäden überspannen Gasfasern“ („einz. Fäd.“)

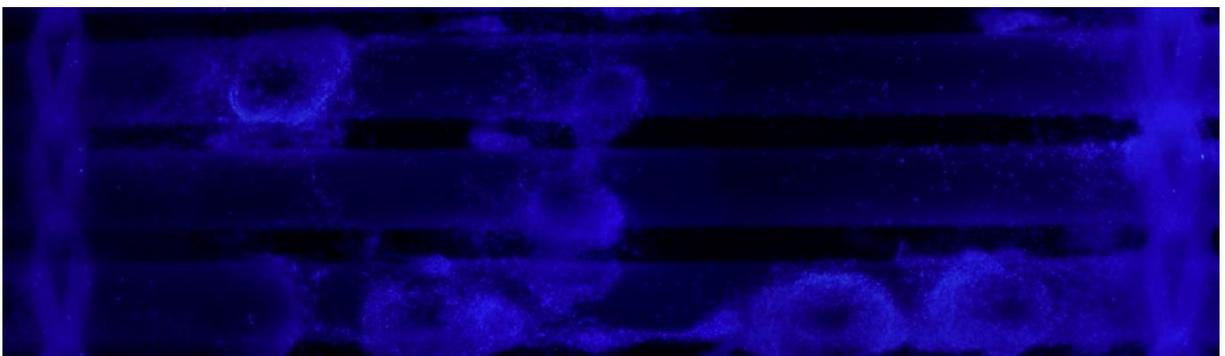


Abbildung 22: Repräsentativer Abschnitt für „einzelne Clots an den Gasfasern“ („einz. Clots“)

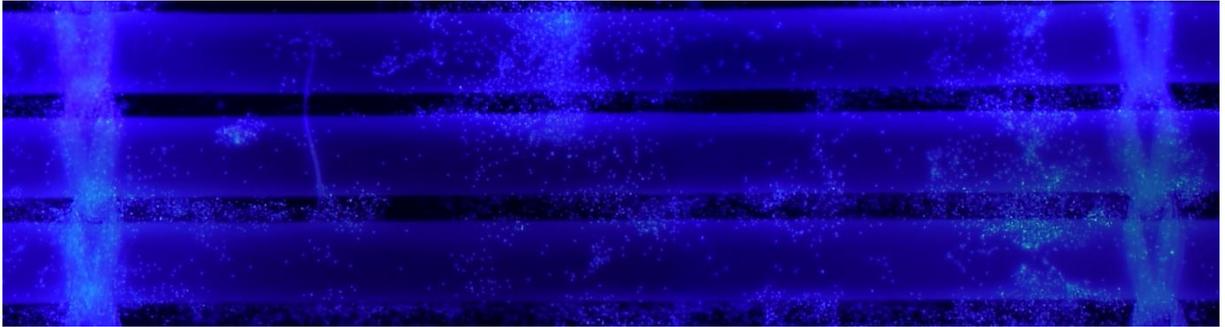


Abbildung 23: Repräsentativer Abschnitt für „großflächige Clots über Membranen, weniger als die Hälfte der Gesamtfläche“ („gr.Cs<50%“)

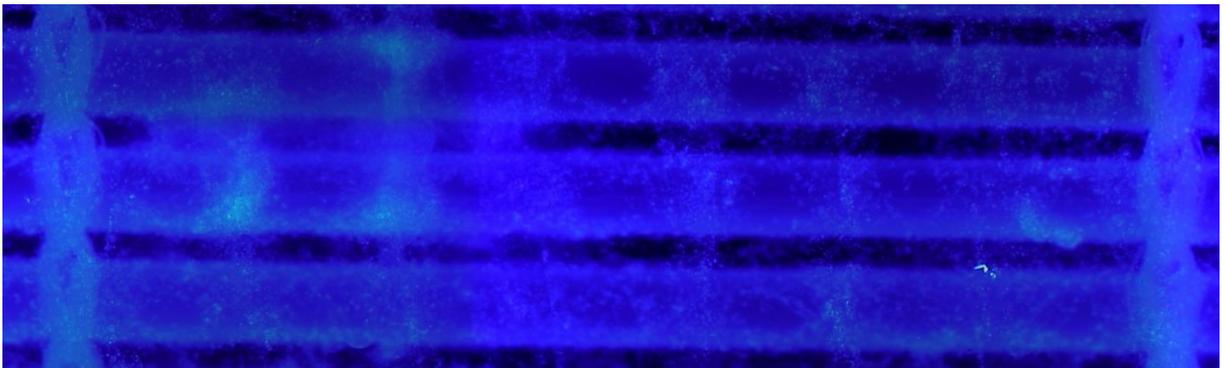


Abbildung 24: Repräsentativer Abschnitt für „großflächige Clots über Membranen, mehr als die Hälfte der Gesamtfläche“ („gr.Cs>50%“)

In dieser Auswertung wurden je Präparat drei bis sechs Untersuchungsabschnitte einzeln bewertet (je nachdem, ob ein mittlerer Kettfaden vorlag). Der Gesamtwert für jedes Präparat wurde bei Ordinalskalenniveau als Modus aus den Einzelwerten berechnet.

Zwei Präparate wurden nicht berücksichtigt, da keine Bildung eines Modus aus deren Einzelwerten möglich war, weshalb 79 von 81 Übersichtsaufnahmen in diese Auswertung eingingen.

Verteilung der Zellkerne in den Bildabschnitten (Abbildung 38)

Die Übersichten wurden danach bewertet, ob Kerne überwiegend an Kreuzungspunkten, in den Zwischenräumen oder gleichmäßig verteilt adhäriert auftraten.

Hierzu wurde für jeden der sechs (bzw. drei bei Präparaten ohne mittleren Kettfaden) untersuchten Bildabschnitte bestimmt, ob die hauptsächliche Zellkernadhäsion an den Kreuzungspunkten (KP), Zwischenräumen (ZR), oder gleichmäßig verteilt vorlag. Aus den drei

bis sechs Einzelwerten je Präparat wurde dann der Modus gebildet. Dieser ging dann als Gesamtwert für das Präparat in die Auswertung ein.

Leerbereiche (Abbildung 39)

Weiterhin wurde untersucht, wie häufig ein Präparat Bereiche mit fehlendem Kernbesatz aufwies. Als Leerbereiche wurden hierfür Areale mit flächigen Aussparungen von Kernbesatz in Nachbarschaft zu Clots oder regelmäßig angeordneten Zellkernen definiert. Zur Quantifizierung des Auftretens von Leerbereichen wurden jeweils drei bis sechs Gasfaserabschnitte pro Präparat ausgewertet, analog zu den anderen genannten Übersichtsauswertungen. Jedem Präparat wurde ein Zahlenwert zwischen 0 und 6 zugeordnet, je nachdem, wie viele die sechs ausgewerteten Gaskapillarabschnitte morphologisch Leerbereiche aufwiesen. Bei Präparaten, bei denen mangels mittleren Kettfadens nur drei Abschnitte unterschieden werden konnten, wurden diese jeweils doppelt gewertet.

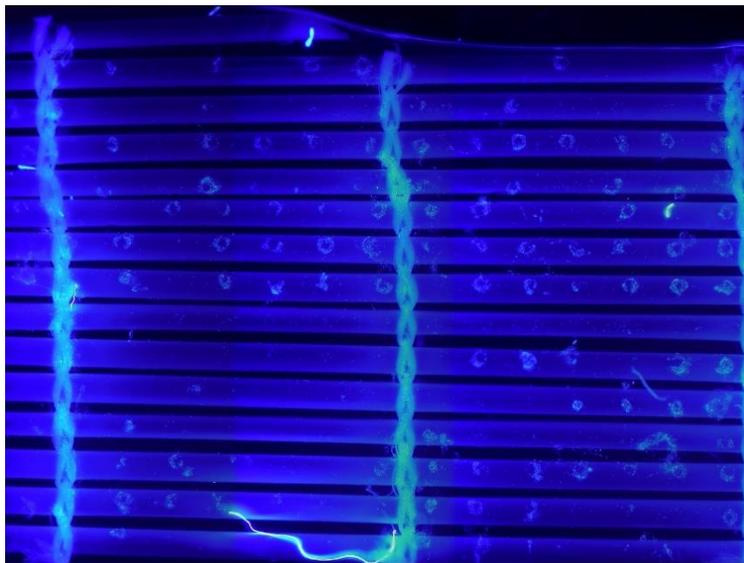


Abbildung 25: Illustration Leerbereiche. In einigen Gasfaserabschnitten ist der zu erwartende regelmäßige Zellbesatz unterbrochen

Bei zwei Übersichtsaufnahmen war aufgrund der zu ungeordneten Kernverteilung keine Bestimmung von Leerbereichen möglich.

2.2.1.3. Vergleich unterschiedlicher Übersichtsaufnahmen desselben Oxygenators (Mehrfachauswertungen) (Abbildungen 40 und 41)

Von drei Oxygenatoren (Oxy #6, #24, #41) lagen jeweils drei aus unterschiedlichen Stellen entnommene Präparate vor, von denen Übersichtsaufnahmen erstellt wurden. Von 16 weiteren Oxygenatoren wurden jeweils zwei Präparate mit Übersichtsaufnahmen erstellt.

Anzahl der pro Präparat klar zu identifizierbaren Kreuzungspunkte

Hierbei wurden jeweils die Einzelwerte aller untersuchten Präparate eines Oxygenators zueinander ins Verhältnis gesetzt. Bei Oxygenatoren mit zwei Präparaten konnte so ein Verhältnis, bei Oxygenatoren mit drei Präparaten drei Verhältnisse der Einzelwerte zueinander berechnet werden. Insgesamt konnten somit 25 Fälle mehrerer unterschiedlicher Präparate selber Oxygenatoren untersucht werden.

Auftreten von Leerbereichen

Hierbei wurden jeweils die Differenzen der Anzahl der von Leerbereichen betroffenen Untersuchungsabschnitte unterschiedlicher Präparate derselben Oxygenatoren ermittelt. Gab es von einem Oxygenator zwei Präparate, konnte eine Differenz, gab es drei Präparate, konnten drei Differenzen zwischen den Einzelwerten ermittelt werden. Als Cut-off-Wert wurde eine Differenz >2 Bildabschnitte festgelegt.

2.2.2. Mikroskopische Auswertung bei 200x Vergrößerung

Als ein möglicher Auslöser für NET-Bildung kommen Scherkräfte durch Strömung in Betracht (49).

Aufgrund der Bauart der Oxygenatoren wurde angenommen, dass sich die Strömungsverhältnisse an den Kreuzungspunkten von denen in den Zwischenräumen unterscheiden. Daher wurde beim Auszählen des Auftretens von NETs bei adsorbierten Einzelkernen unterschieden, ob die Zellkerne um den unmittelbaren Kreuzungspunkt (KP) zweier Kapillaren, oder im Zwischenraum (ZR) zwischen zwei solchen adhärirt waren.

Die 200x Vergrößerungen der eigenen neuen Präparate ermöglichte eine Unterscheidung von KP und ZR. Berücksichtigung fand dabei die inhomogene Verteilung der Zellablagerungen. Um die NET-Strukturen zu quantifizieren, wurden zunächst nur Präparate mit (zählbaren) Einzelkernablagerungen ausgewertet (3.2.2.2). Zudem wurden qualitative Auswertungen

vorgenommen, um auch die NET-Frequenz bei Präparaten mit Zellaggregaten oder zu hoher Zellzahl für Einzelkernauswertung zu ermitteln (3.2.2.3 und 3.2.2.4)

Wie in 3.2. erläutert, wurden ab hier ausschließlich vormals als NET-III bezeichnete Strukturen als NET eingestuft.

2.2.2.1. Unterschiede in der Detail-Auswertbarkeit verschiedener Oxygenatorpräparate

Die Oxygenatorpräparate wurden nach Erstellung von Übersichtsaufnahmen daraufhin begutachtet, ob eine quantitative Einzelkern-Untersuchung (Zählung, Morphologie und Lokalisation (Kreuzungspunkt vs. Zwischenraum vs. nicht definierbarer Abschnitt) der Zellkerne) möglich war, oder nicht. Sie wurden daraufhin in drei Gruppen eingeteilt:

- **„zählbar“:** Auf dem Präparat konnte klar abgegrenzt werden, ob die jeweils betrachteten Abschnitte immer einem Kreuzungspunkt „KP“ oder den dazwischenliegenden Räumen „ZR“ der übereinander gelegten Gaskapillaren zugeordnet werden konnten, und ob die einzelnen Zellkerne gezählt und nach Ausprägung der netotischen Veränderung klassifiziert werden konnten. In dieser Kategorie erfolgten sämtliche quantitative Auswertungen.
- **„eingeschränkt zählbar“:** Hier war eine quantitative Einzelkernbetrachtung nur zum Teil oder gar nicht möglich. Gründe dafür waren, dass zu viele oder zu wenige Zellkerne auf der Membran adhäriert waren, Zellkerne übereinander gelagert waren, oder die Zellkerne zu ungleichmäßig verteilt waren, um die Lokalisation auf der Membran erkennen zu können. Bei eingeschränkt zählbaren Präparaten wurde dann keine quantitative Zellkernzählung durchgeführt. Stattdessen wurde eine rein qualitative Abschnittsbetrachtung vorgenommen, d.h., sofern feststellbar, festgehalten, ob der betrachtete Abschnitt einen Kreuzungspunkt oder Zwischenraum darstellte, ob die Zellkerne einzeln („Einzelkerne“) oder in Verbänden („Clots“) gelagert waren, und ob der untersuchte Bildabschnitt sichtbare NET-III, also ‚DNA-Fäden‘ enthielt.

- **„nicht auswertbar“:** Bei den so kategorisierten Präparaten wurde aus verschiedenen Gründen keine Auswertung durchgeführt.
 - Nicht ausgewertet, weil Pseudomembranen das Präparat überspannten oder Abriss des Zellkernverbandes eine Auswertung verhinderten (Abbildung 26). Pseudomembranen sind gasfasern-überspannende Verbände aus Blutzellen und Plasmabestandteilen (90).

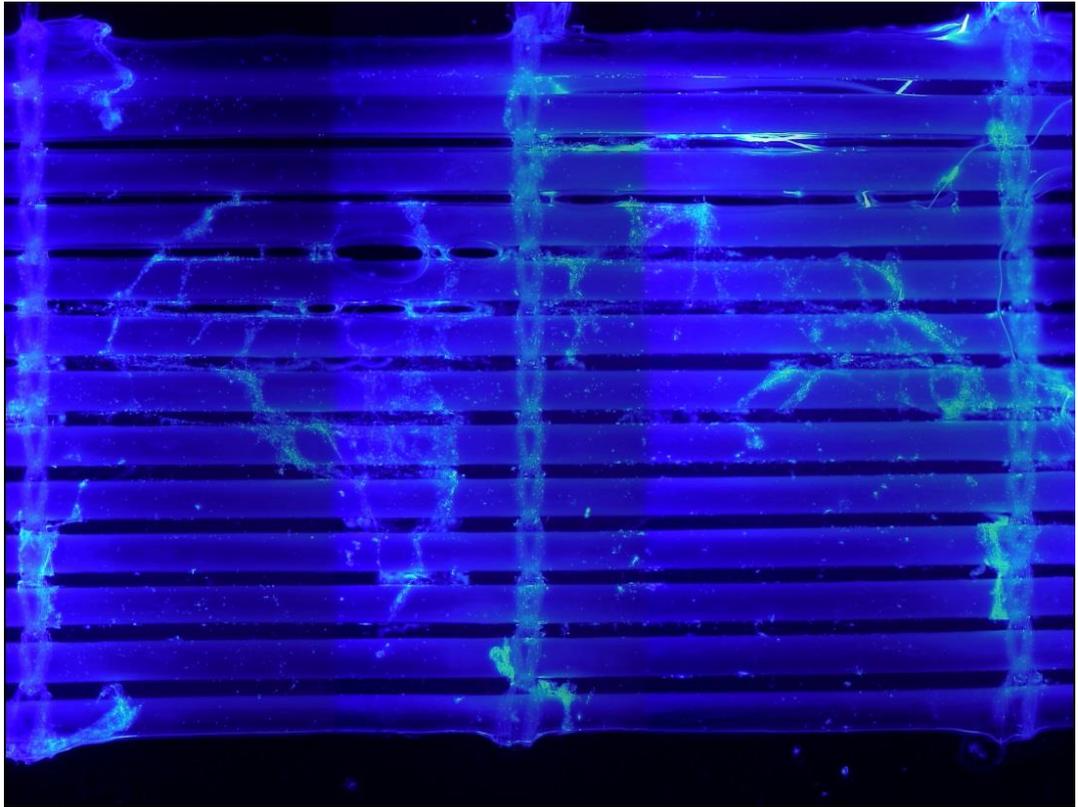


Abbildung 26: Pseudomembranen: Gasfasern-überspannende Kernverbände, außerdem großflächige Leerbereiche.

- Nicht ausgewertet wegen Herstellungsartefakt oder Fixierungsfehler (Bei Druck auf das Deckglas schwimmt der Zellrasen über das Präparat, keine Adhäsion des Zellkernbewuchses auf den Membrankapillaren,
- Nicht ausgewertet aus sonstigen oder im Nachhinein nicht mehr genau feststellbaren Gründen (Lernkurve bei Etablierung der Auswertestrategie etc.).

Auswertungen der Übersichtsaufnahmen erfolgten unabhängig von der Detailauswertbarkeit, d.h., die Übersichtsauswertungen konnten auch an den als „nicht auswertbar“ klassifizierten Präparaten vorgenommen werden.

2.2.2.2. Quantitative Untersuchung „zählbarer“ Präparate

Eine eindeutige Klassifizierung und Quantifizierung einer NET war nur auf Einzelkernebene möglich. So wurden im Folgenden nur die Präparate mit Einzelkernablagerungen betrachtet. Von insgesamt 81 Präparaten konnten bei 40 Präparaten die Kernablagerungen auf den Gasfasern einzeln ausgezählt und klassifiziert werden.

Bestimmung der Kerndichte an Kreuzungspunkten und Zwischenräumen

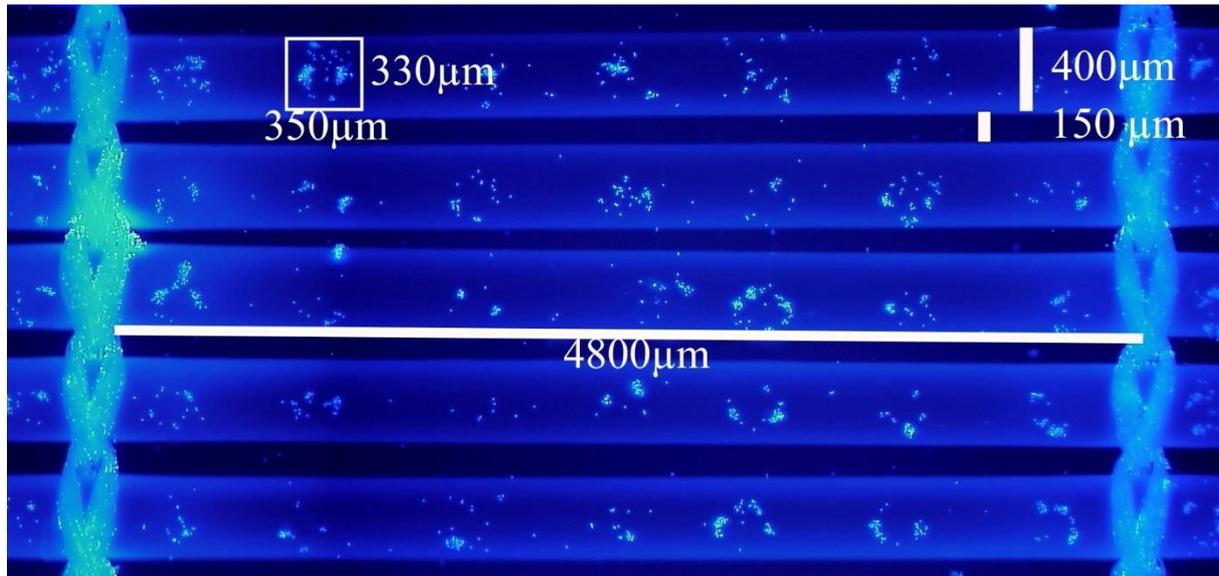


Abbildung 27: Illustration zur Bestimmung und Flächenberechnung der Bildabschnitte, Darstellung in 20-facher Vergrößerung. Oben links weiß umrandet ist ein als Kreuzungspunkt (KP) identifizierter Bildabschnitt gekennzeichnet. Die seitlich an KP angrenzenden Abschnitte bis zum Beginn eines neuen KP werden als Zwischenräume (ZR) bezeichnet. Zur Berechnung der Kerndichte wurde die Breite der Abschnitte (KP und ZR) jeweils festgelegt auf 350µm (Überlappungen abgezogen), die Bildhöhe bei 200-fach vergrößerten Aufnahme beträgt etwa 330µm. Breite mal Höhe= 0,1155 mm² pro Bildabschnitt (KP oder ZR).

Für die Bestimmung der Kerndichte je untersuchtem Bildabschnitt wurde die Fläche eines Bildabschnitts (KP oder ZR) festgelegt auf die Höhe des Mikroskopischen Bildes in 200x Vergrößerung (330µm) multipliziert mit einer einheitlich festgelegten Abschnittsbreite von 350µm. Während rein visuell nicht immer eine klare Abschnittsbegrenzung möglich war, konnte so eine einheitliche Bestimmung der Kerndichte gewahrt werden.

Unterschiedlicher Kernbesatz der Gasfaserabschnitte (Abbildung 43)

Für den Vergleich des Kernbesatzes zwischen den Kreuzungspunkten und Zwischenräumen wurden jeweils die Gesamtwerte der einzelnen Oxygenatorpräparate herangezogen. Die mittleren Kerndichten jedes Präparates, an dem eine Einzelkernuntersuchung möglich war,

gingen in die Auswertung ein. Von vier Oxygenatoren (Oxy #6, #9, #11, #55) sind jeweils zwei Präparate, von einem Oxygenator (Oxy #41) drei Präparate enthalten. Fünf Präparate, bei denen zwar Einzelkerne gezählt werden, nicht jedoch einem Bildabschnitt zugeordnet werden konnten, wurden nicht berücksichtigt.

Mangels der Zählbarkeit der in Clots formierten Zellkerne wurden hierbei nur Einzelkerne betrachtet.

Auftreten von NETs bei Einzelkernen (Abbildungen 44 und 45)

Diese Auswertung erfolgte analog zur Untersuchung des Kernbesatzes der Gasfaserabschnitte an denselben Präparaten. Es ist jeweils der Anteil der NET-positiven Zellkerne an allen zählbaren Einzelkernen aufgetragen. Jedes einzelne „zählbare“ Oxygenatorpräparat geht als Datenpunkt in die Auswertung ein.

Weiterhin wurde untersucht, ob an den unterschiedlichen Bildabschnitten NETs unterschiedlich verteilt auftreten.

Vergleich verschiedener Auswerter (quantitative Einzelkernbetrachtung) (Abbildung 46)

Vier Präparate wurden erst durch den Autor und in Folge von einer LTA (KB) unabhängig voneinander und verblindet nach dem Auswerteprotokoll untersucht.

Zusammenhang zwischen Kerndichte und NET-Frequenz

Hierzu wurden die ermittelten NET-Anteile an Einzelkernen der Kerndichte in einem Scatterplot gegenübergestellt.

Weil zu vermuten war, die Korrelation wäre vor allem durch zwei Spitzenwerte (siehe Abbildung 47) bedingt, wurde die selbe Auswertung noch einmal, ohne diese zu berücksichtigen, durchgeführt (Abbildung 48).

Vergleich mehrfach ausgewerteter Oxygenatoren (quantitative Einzelkernauswertung)

(Abbildungen 49 und 50)

Hierbei wurden jeweils unterschiedliche Präparate selber Oxygenatoren miteinander verglichen. Lagen aus einem Oxygenator zwei Präparate vor, so konnte ein Verhältnis zwischen den Werten beider Präparate zueinander ermittelt werden, bei drei Präparaten jeweils drei.

Es konnten somit jeweils sieben Verhältnisse ermittelt werden.

Es wurde jeweils die prozentuale Veränderung vom kleineren zum größeren Einzelwert berechnet, daraus wurde ein Mittelwert bestimmt.

2.2.2.3. Qualitative NET-Bewertung Einzelkern-enthaltender Bildabschnitte

Die in Einzelkern-Auswertung gewonnenen Daten können nicht als für alle Präparate repräsentativ bezüglich der Häufigkeit des Auftretens von NETs und Kerndichte betrachtet werden, weil hierbei nur Oxygenatorpräparate ausgewertet wurden, bei denen eine quantitative Einzelkernbetrachtung möglich war („zählbare Präparate“). Präparate, die ebenfalls hauptsächlich Einzelkerne aufwiesen, allerdings mangels Orientierung oder zu hoher Zellkernzahl nicht nach dem erarbeiteten Schema untersucht werden konnten, wurden hierbei nicht erfasst.

Eine im Folgenden dargestellte alternative Auswertung bezog sich deshalb auf die rein qualitative Betrachtung des jeweils mikroskopisch betrachteten Bildabschnitts (Kreuzungspunkt oder Zwischenraum). Wies dieser NETs auf, so wurde er im Ganzen als NET-positiv gewertet, unabhängig von der Zelldichte oder der NET-Anzahl.

Während bei der genannten quantitativen Einzelkernuntersuchung nur 40 Präparate untersucht werden konnten, konnten bei der qualitativen Bildabschnittsbetrachtung 56 Präparate erfasst werden, da hier auch als „eingeschränkt zählbar“ klassifizierte Präparate eingingen. Von fünf Oxygenatoren sind jeweils zwei Präparate, von zwei Oxygenatoren je drei Präparate enthalten.

In Abbildung 53 ist der NET-positive Anteil aller Bildabschnitte aufgetragen, die Einzelkerne (keine Clots) enthielten (= „Einzelkernenthaltende Bildabschnitte“).

Vergleich mehrfach ausgewerteter Oxygenatoren (qualitativ, Einzelkern-enthaltende Bildabschnitte) (Abbildungen 54 und 55)

Auch in dieser Auswertung wurden mehrfach ausgewertete Oxygenatorpräparate gesondert gegenübergestellt, um auszumachen, inwiefern unterschiedliche Präparate selber Oxygenatoren sich untereinander unterscheiden. Hierbei wurden jeweils unterschiedliche Präparate selber Oxygenatoren miteinander verglichen. Lagen aus einem Oxygenator zwei Präparate vor, so konnte eine Differenz ermittelt werden, bei drei Präparaten jeweils drei.

Bei fünf zweifach und zwei dreifach untersuchten Oxygenatoren waren so jeweils elf Vergleiche möglich.

2.2.2.4. Qualitative NET-Bewertung Clot-enthaltender Bildabschnitte

Für das Abschätzen des Vorkommens von NETs in Clots ist keine Zählung möglich. Hier kann nur jeweils abgeschätzt werden, ob darin sichtbare NETs festgestellt werden konnten oder nicht. So kann zwar eine Aussage getroffen werden, ob ein Präparat NETs enthält, nicht jedoch, wie häufig.

Vergleich mehrfach ausgewerteter Oxygenatoren (qualitativ, Clot-enthaltende Bildabschnitte) (Abbildungen 59 und 60)

Vorgegangen wurde wie in 2.2.2.3 unter ‚Vergleich mehrfach ausgewerteter Oxygenatoren‘ beschrieben.

2.2.2.5. Untersuchung verschiedener therapie- und patientenspezifischer Faktoren

Es wurde untersucht, inwiefern dokumentierte Therapievariablen (ECMO-Modus, Überleben der Patienten, Laufzeit der untersuchten Oxygenatoren, laufende Nummer der nacheinander am selben Patienten eingesetzten Oxygenatoren) Einfluss auf Kerndichte und NET-Häufigkeit (quantitativ in Einzelkernuntersuchung und qualitativ in Bildabschnittbetrachtung) haben.

Weiterhin wurde untersucht, ob dokumentierte patientenspezifische Faktoren, wie laborchemische oder klinische Sepsis-Parameter Einfluss auf Kerndichte und NET-Häufigkeit (quantitativ in Einzelkernuntersuchung und qualitativ in Bildabschnittbetrachtung) haben.

Untersuchung verschiedener Oxygenatormodelle (Abbildungen 61 bis 65)

In Abbildungen 61 bis 65 sind Kerndichte und NET-Frequenz in quantitativer und qualitativer Einzelkernbewertung sowie in ausschließlich qualitativer Clotbewertung für unterschiedliche Oxygenatormodelle gegenübergestellt. Statistische Auswertung auf Übereinstimmung erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA).

Die 40 „zählbaren“ Präparate gliederten sich auf in folgende Modelle auf:

- 24* Quadrox des Herstellers Maquet
- 8* Hilite des Herstellers Medos
- 4* ILA des Herstellers Novalung
- 1* ECC.O4 des Herstellers Sorin
- 3* ließ sich anhand der Datenbank kein Modell sicher identifizieren.

Dabei gingen aus vier Oxygenatoren jeweils zwei Präparate, aus einem Oxygenator drei Präparate in die Auswertung ein.

In den qualitativen Auswertungen konnten zusätzlich zu den zählbaren die „eingeschränkt zählbaren“ Präparate herangezogen werden, so dass hier 56 Präparate zur Verfügung standen, die sich folgendermaßen aufgliederten:

- 34* Quadrox des Herstellers Maquet
- 8* Hilite des Herstellers Medos
- 6* ILA des Herstellers Novalung
- 1* ECC.O4 des Herstellers Sorin
- 7* ließ sich anhand der Datenbank kein Modell sicher identifizieren, zu einem Präparat (P21O58) lagen vermutlich falsche Daten vor.)

Dabei gingen aus fünf Oxygenatoren jeweils zwei Präparate, aus zwei Oxygenatoren jeweils drei Präparate in die Auswertung ein.

ECMO-Modus (Veno-Arteriell vs. Veno-Venös) (Abbildungen 66 bis 70)

In der Auswertung der Kerndichten konnten aufgrund der ermittelten Unterschiede zwischen verschiedenen Oxygenatormodelle nur jeweils Präparate eines Typs untereinander verglichen werden. Fünf Oxygenatoren der Modelle ILA und ECC.O4 gingen nicht in die Auswertung der Kerndichte ein.

Bei sechs von 40 als „zählbar“ klassifizierten Präparaten lagen keine Daten zum ECMO-Modus vor. Von einem Oxygenator gingen drei, von vier Oxygenatoren jeweils zwei Präparate in die Auswertung ein.

Nachdem zwischen den verschiedenen Oxygenatormodellen keine Unterschiede in den NET-Anteilen gefunden werden konnten (Abbildungen 63 bis 65), konnten für weitere NET-Auswertungen alle Präparate mit zuordenbaren Oxygenatordaten herangezogen werden.

Bei den rein qualitativen Auswertungen (Abbildungen 69 und 70) konnten zusätzlich zu „zählbaren“ Präparaten auch als „eingeschränkt zählbar“ klassifizierte Präparate herangezogen werden. Von so insgesamt 56 Präparaten lagen zu 49 Daten bezüglich des ECMO-Modus vor. Von zwei Oxygenatoren gingen jeweils drei, von fünf Oxygenatoren jeweils zwei Präparate in die Auswertung ein.

Laufzeit des Oxygenators (Abbildungen 71 bis 77)

Für die Auswertung der Abhängigkeit der Kerndichte von der Laufzeit, standen 21 als „zählbar“ kategorisierte Oxygenatoren des Modell Quadrox zur Verfügung, wobei von drei Oxygenatoren jeweils zwei und von einem Oxygenator drei Präparate in die Auswertung eingingen.

Die quantitative NET-Auswertung erfolgte an den 34 als „zählbar“ kategorisierten Präparaten, zu denen Daten bezüglich der Laufzeit vorlagen. Dabei gingen von vier Oxygenatoren jeweils zwei und von einem Oxygenator drei Präparate ein.

Für die qualitative Auswertung auf das Auftreten von NETs in Einzelkern- und Clot-enthaltenden Bildabschnitten standen von 56 Präparaten zu 49 Präparaten Daten zur Oxygenatorlaufzeit zur Verfügung. Dabei lagen aus 5 Oxygenatoren jeweils zwei Präparate, aus zwei Oxygenatoren jeweils drei Präparate vor.

Wechsel des Oxygenators und laufende Oxygenatornummer

In einigen Therapieverläufen war der notfallmäßige oder elektive Austausch des eingesetzten Oxygenators im ECMO-Betrieb notwendig. Aufgrund der deshalb durchgeführten Oxygenatorwechsel lassen sich mehrere, teilweise überlappende Oxygenatorkollektive bilden, die aufgrund der unterschiedlichen Umstände Vergleiche sinnvoll erscheinen lassen:

- Erstoxygenatoren
- Im ECMO-Betrieb ausgewechselte Oxygenatoren („Wechseloxy“)
- Ersatzoxygenatoren (zweite oder dritte Oxygenatoren nach Oxygenatorwechsel)
- Endoxygenatoren nach erfolgreichem ECMO-Weaning: Die ECMO-Therapie konnte bei diesen Patienten erfolgreich eingestellt werden, was bedeutet, dass die zugrundeliegende Organdysfunktion ohne ECMO beherrschbar wurde.
- Endoxygenatoren nach Versterben der Patienten unter laufender ECMO-Therapie. Hier ist in der Regel von einer weiterhin schweren Dysfunktion mindestens eines der Organsysteme Herz/Kreislauf oder Lunge auszugehen.

Laufende Nummer des Oxygenators (Abbildungen 78 bis 81)

Für quantitative Auswertungen lagen insgesamt 40 „zählbare“ Präparate vor:

- 27 Erstoxygenatoren
- 4 Zweitoxigenatoren
- 2 Drittoxigenatoren.
- Zu 6 Präparaten lagen keine Daten vor,
- Zu einem Präparat möglicherweise falsche Daten (deshalb nicht mit eingegangen)

Dabei lagen aus vier Oxygenatoren jeweils zwei Präparate, aus zwei Oxygenatoren jeweils drei Präparate vor.

Zur Bestimmung der Kerndichte abhängig von der laufenden Nummer des Oxygenators, wurden 24 als „zählbar“ klassifizierte Präparate aus Quadrox-Oxygenatoren herangezogen:

- 17 Erstoxygenatoren
- 3 Zweitoxigenatoren
- 1 Drittoxigenator
- Zu 3 Präparaten lagen keine Daten vor.

Von drei Oxygenatoren gingen jeweils zwei und von einem Oxygenator drei Präparate in die Auswertung ein.

Für die qualitativen Auswertungen lagen insgesamt 56 Präparate vor, die sich folgendermaßen aufgliederten:

- 34 Erstoxygenatoren
- 12 Zweitoxigenatoren
- 2 Drittoxigenatoren

- Zu 7 Präparaten lagen keine Daten vor
- Zu einem Präparat möglicherweise falsche Daten (deshalb nicht mit eingegangen).

Dabei lagen aus fünf Oxygenatoren jeweils zwei Präparate, aus zwei Oxygenatoren jeweils drei Präparate vor.

Endoxygenatoren vs. ausgewechselte Oxygenatoren (Abbildungen 82 bis 85)

Von 81 Präparaten lagen insgesamt 40 „zählbare“ Präparate vor.

Die Auswertung der Kerndichte erfolgte ausschließlich an Quadrox-Oxygenatoren. Hierbei lagen zu 21 Präparaten Daten vor, ob es sich um einen Endoxygenator oder einen Wechseloxygenator handelte.

- 17 Endoxygenatoren
- 4 Wechseloxygenatoren

Von drei Oxygenatoren gingen dabei jeweils zwei, von einem Oxygenator gingen drei Präparate in die Auswertung ein.

Für die Untersuchung der NET-Anteile an Einzelkernen lagen zu 35 von 40 Präparaten Daten dazu vor, ob es sich beim untersuchten Oxygenator um einen Endoxygenator oder einen Wechseloxygenator handelte:

- 28 Endoxygenatoren
- 6 Wechseloxygenatoren
- 1 Präparat mit wahrscheinlich falsch zugeordneten Daten (O58) wurde in der Auswertung nicht berücksichtigt

Von vier Oxygenatoren gingen dabei jeweils zwei, von einem Oxygenator gingen drei Präparate in die Auswertung ein.

Für qualitative Auswertungen standen zu 50 von 56 Präparaten Daten dazu zur Verfügung, ob es sich um einen End- oder Wechseloxygenator handelte.

- 42 Endoxygenatoren
- 7 Wechseloxygenatoren
- 1 Präparat mit wahrscheinlich falsch zugeordneten Daten (O58) wurde in der Auswertung nicht berücksichtigt

Von fünf Oxygenatoren gingen dabei jeweils zwei, von zwei Oxygenatoren gingen jeweils drei Präparate in die Auswertung ein.

Geweante vs. ausgewechselte Oxygenatoren (Abbildungen 86 bis 89)

Weiterhin wurden die gleichen Auswertungen erneut ohne Oxygenatoren vorgenommen, während deren Betrieb oder bis zu einem Tag nach deren Explantation die Patienten verstorben waren: Für die Bestimmung der Kerndichten standen hier folgende Präparatezahlen von Quadrox-Oxygenatoren zur Verfügung:

- 12 Endoxygenatoren (ohne Oxygenatoren, während deren Betrieb oder bis zu einem Tag nach Explantation die Patienten verstarben)
- 4 Wechseloxygenatoren

Von einem Oxygenator gingen dabei zwei Präparate, von einem weiteren drei Präparate in die Auswertung ein.

Für die Auswertung der NET-Häufigkeit an Einzelkernen standen 26 Präparate zur Verfügung:

- 20 Endoxygenatoren (ohne Oxygenatoren, während deren Betrieb oder bis zu einem Tag nach Explantation die Patienten verstarben)
- 6 Wechseloxygenatoren
- 1 Präparat mit wahrscheinlich falsch zugeordneten Daten (O58) wurde in der Auswertung nicht berücksichtigt

Von zwei Oxygenatoren gingen dabei jeweils zwei, von einem Oxygenator gingen drei Präparate in die Auswertung ein.

Für qualitative Auswertungen standen zu 38 Präparaten Daten zur Verfügung, ob diese aus einem End- oder Wechseloxygenator stammten:

- 30 Endoxygenatoren (ohne Oxygenatoren, während deren Betrieb oder bis zu einem Tag nach Explantation die Patienten verstarben)
- 7 Präparate von Wechseloxygenatoren
- 1 Präparat mit wahrscheinlich falsch zugeordneten Daten (O58) wurde in der Auswertung nicht berücksichtigt

Von zwei Oxygenatoren gingen dabei jeweils zwei und von zwei weiteren Oxygenatoren jeweils drei Präparate in die Auswertung ein.

Geweante vs. ausgewechselte und Oxygenatoren von verstorbenen Patienten

(Abbildungen 90 bis 93)

Es wurden geweante Oxygenatoren Oxygenatoren gegenübergestellt, die aufgrund von Komplikationen ausgewechselt werden mussten („Wechseloxys“) oder während deren Anwendung oder bis zu einem Tag nach Explantation die Patienten verstarben.

Für die Bestimmung der Kerndichten standen hier folgende Präparatezahlen von Quadrox-Oxygenatoren zur Verfügung:

- 12 Endoxygenatoren nach Weaning
- 9 ausgewechselte Oxygenatoren und Oxygenatoren von unter ECMO verstorbenen Patienten

Von drei Oxygenatoren gingen dabei je zwei Präparate, von einem Oxygenator gingen drei Präparate in die Auswertung ein.

Für die Auswertung der NET-Häufigkeit an Einzelkernen standen 34 als "zählbar" kategorisierte Präparate zur Verfügung:

- 20 Endoxygenatoren nach Weaning
- 14 ausgewechselte Oxygenatoren und Oxygenatoren von unter ECMO verstorbenen Patienten
- 1 Präparat mit wahrscheinlich falsch zugeordneten Daten (O58) wurde in der Auswertung nicht berücksichtigt.

Von vier Oxygenatoren gingen dabei jeweils zwei, von einem Oxygenator gingen drei Präparate in die Auswertung ein.

Für qualitative Auswertungen standen zu 50 Präparaten Daten zur Verfügung, ob diese aus einem End- oder Wechseloxygenator stammten:

- 30 Präparate aus Endoxygenatoren nach Weaning
- 19 Präparate aus ausgewechselte Oxygenatoren und Oxygenatoren von unter ECMO verstorbenen Patienten
- 1 Präparat mit wahrscheinlich falsch zugeordneten Daten (O58) wurde in der Auswertung nicht berücksichtigt

Von fünf Oxygenatoren gingen dabei jeweils zwei und von zwei weiteren Oxygenatoren jeweils drei Präparate in die Auswertung ein.

SOFA-Score (Abbildungen 94 bis 97)

Weiterhin wurde die Abhängigkeit des SOFA-Score von Zellkerndichte und NET-Häufigkeit untersucht.

Für die quantitative Einzelkernauswertung lag in 30 von 40 zählbar klassifizierten Präparaten ein dokumentierter SOFA-Score vor. Bei einem Präparat war die Zuordnung zur Datenbank möglicherweise falsch, so gingen 29 Präparate in die Auswertung ein, wobei von vier Oxygenatoren jeweils zwei Präparate enthalten waren. 18 der 29 „zählbaren“ Präparate stammten von Quadrox-Oxygenatoren, wobei von drei Oxygenatoren jeweils zwei Präparate enthalten waren.

Für die qualitative Bildabschnittsbetrachtung stand zu 44 Präparaten ein dokumentierter SOFA-Score zur Verfügung. Bei einem Präparat war die Zuordnung zur Datenbank möglicherweise falsch, so gingen 43 Präparate in die Auswertung ein. Hierbei gingen von einem Oxygenator 3 Präparate, sowie von fünf Oxygenatoren jeweils zwei Präparate in die Auswertung ein.

Überleben oder Versterben der Patienten an ECMO (Abbildungen 98 bis 101)

Verglichen wurden hierbei Patienten, die aus dem Krankenhaus entlassen wurden, mit Patienten, die unter ECMO-Therapie verstarben. Patienten, die nach ECMO-Explantation noch im Krankenhaus verstarben, wurden nicht berücksichtigt.

Die Quantitativen Auswertungen erfolgten an den 40 als „zählbar“ klassifizierten Präparaten. Diese gliedern sich folgendermaßen auf:

- 20 aus Oxygenatoren von Patienten, die entlassen wurden.
- 10 aus Oxygenatoren von am System verstorbenen Patienten.
- 4 aus Oxygenatoren von nach Explantation verstorbenen Patienten
- Zu 5 Präparaten lagen keine Daten zum Outcome vor.
- Zu einem Präparat (P21Oxy58) lagen möglicherweise falsche Daten vor, deshalb nicht berücksichtigt.

Dabei lagen aus vier Oxygenatoren jeweils zwei Präparate, aus einem Oxygenator drei Präparate vor.

Für die Auswertung der Abhängigkeit der Kerndichte vom Outcome standen 21 Oxygenatoren des Modell Quadrox zur Verfügung, wobei von drei Oxygenatoren jeweils zwei und von einem Oxygenator drei Präparate in die Auswertung eingingen.

Für die Qualitativen Auswertungen standen insgesamt 56 Präparate zur Verfügung:

- 29 aus Oxygenatoren von Patienten, die entlassen wurden.
- 14 aus Oxygenatoren von am System verstorbenen Patienten.
- 6 aus Oxygenatoren von nach Explantation verstorbenen Patienten
- Zu 7 Präparaten lagen keine Daten zum Outcome vor.

Dabei lagen aus fünf Oxygenatoren jeweils zwei Präparate, aus zwei Oxygenatoren jeweils drei Präparate vor.

2.3. Statistik

Selbst erhobene, sowie anonymisierte therapie- und patientenspezifische Daten aus der Regensburger ECMO-Datenbank wurden mit Microsoft Excel 2016 und 2021 verwaltet. Statistische Auswertungen und graphische Darstellungen erfolgten mit der Analysesoftware *SigmaPlot 13* (SYSTAT Software, San José, USA).

Mittelwerte wurden jeweils mit Standardabweichung angegeben.

Die Daten wurden mittels des Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung überprüft.

Zum Vergleich normalverteilter Stichproben kamen parametrische Tests (t-Test, ANOVA) zur Anwendung. War keine Normalverteilung gegeben, wurden nicht parametrische Tests (Mann-Whitney-U-Rangsummentest, Kruskal-Wallis-Test) herangezogen.

Um die Abhängigkeit zweier Variablen voneinander zu untersuchen, wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman verwendet.

P-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet.

3. Ergebnisse

3.1. Auswertung der Fotodokumentation einer Vorgängerarbeit

Im vorhandenen Bildmaterial fielen DAPI-gefärbte Kernstrukturen auf, die weder Endothelzellen noch den klassischen Leukozyten primär zugeordnet werden konnten. Diese Aufnahmen wurden hinsichtlich Kerndichte und Kernmorphologie gesichtet und bewertet. Von besonderer Bedeutung war das Auftreten und die Häufigkeit von NETs.

3.1.1. Identifizierung von NETs auf 200x vergrößerten Aufnahmen

Die Zellkerne auf den Gasfasern zeigten eine sehr heterogene Verteilung (Abbildung 3) und wiesen zudem unterschiedliche Morphologien auf (Abbildungen 4-8). Es zeichneten sich sowohl Einzelkerne als auch kleinere bis größere Kernkonglomerate ab. Neben den zu erwartenden Kernformen von Leukozyten wurden zudem verformte und/oder aufgeblähte (weniger kontrastreiche) Zellkerne (Abbildung 3 rechts), sowie ‚DNA-Fäden‘ (Abbildung 3 links) beobachtet (Pfeile).

Die Begutachtung auf das Vorhandensein von NETs auf den Gasfasern mittels Immunfluoreszenz gestaltete sich z. T. als schwierig: So ist eine eindeutige NET-Bewertung nur bei der Betrachtung von fokussierten Einzelkernen (= nicht in Konglomeraten gelagerten Zellkernen) problemlos möglich. Bei größeren Kernansammlungen ist die Kernbetrachtung aufgrund von Überlagerung oder mangelndem Kontrast erschwert oder unmöglich. Insbesondere bei den 200x- Vergrößerungen war auch eine Einzelkernbetrachtung problematisch. Da es sich um zylinderförmige und nicht plane Präparate (Gasfasern) handelte und sich die Zellen um den Zylinder herum anordneten, ergaben sich unterschiedliche Fokussierebenen der gefärbten Zellkerne. Dadurch zeichneten sich an den oberen und unteren Bildrändern „Totbereiche“ ab, in denen die Zellkerne verschwommen erscheinen und morphologisch nicht unterschieden werden können (Abbildung 28). Der fokussierte, auswertbare Bereich (horizontaler Streifen in der Mitte der Gasfaser) liefert eine auswertbare Höhe von etwa 110-150 μm bei einer Bildhöhe von etwa 390 μm (entspricht 30-35% des mikroskopischen Feldes). Durch die Wahl einer stärkeren Vergrößerung lassen sich die Totbereiche etwas verkleinern (Abbildung 29). Bei der 400x Vergrößerung beträgt der fokussierte Bereich 80-100 μm von etwa 200 μm Bildhöhe (40-50% des mikroskopischen Feldes).

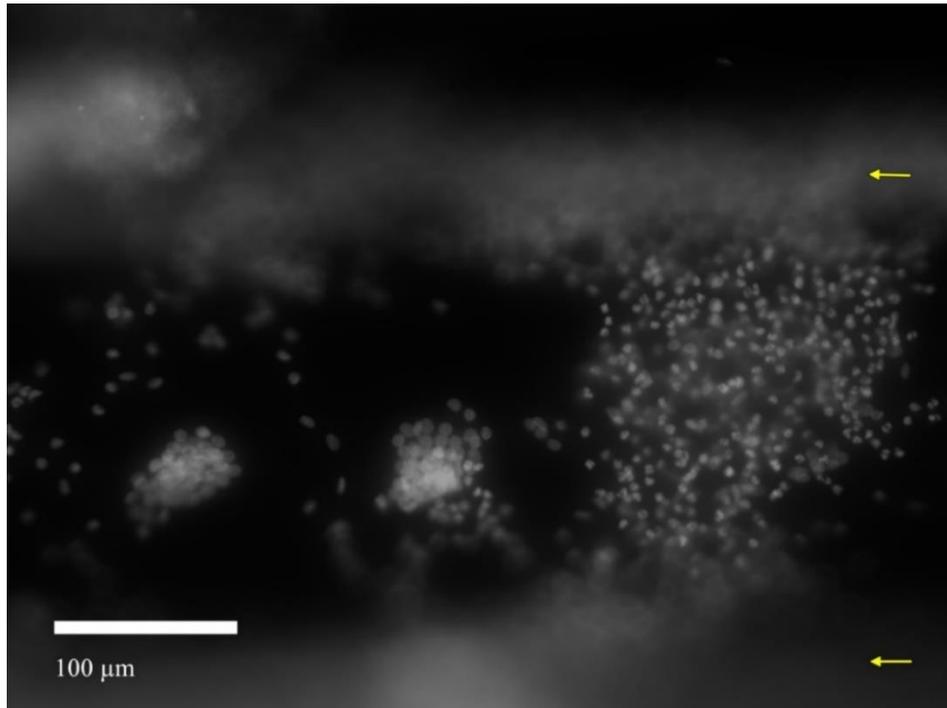


Abbildung 28: Darstellung der Totbereiche bei 200x Vergrößerung: Pfeile markieren Totbereiche. Durch die Wölbung der Gasfaser liegen der obere und untere Bildrand außerhalb des Fokus

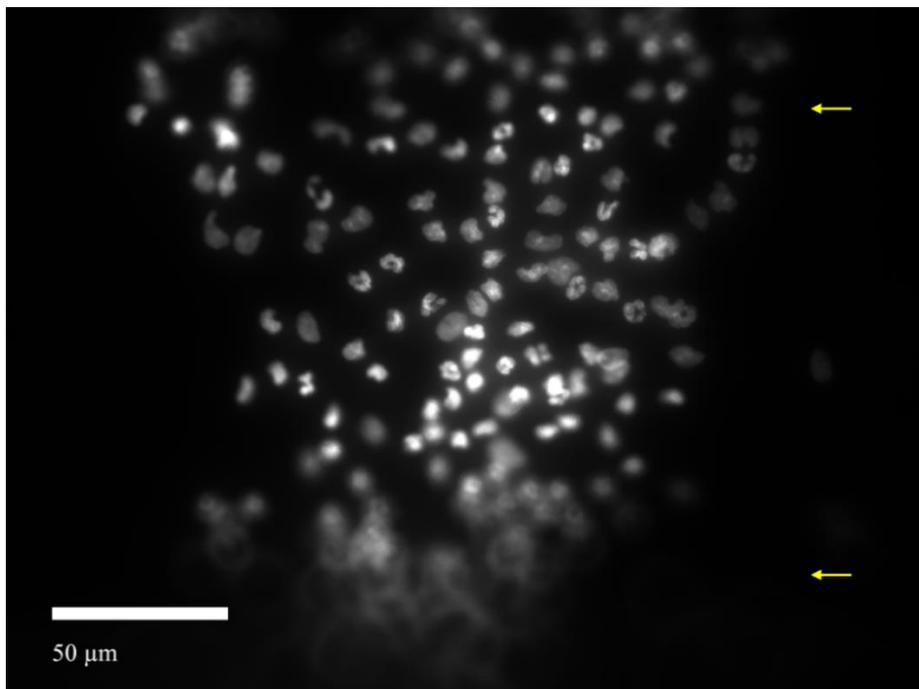


Abbildung 29: Reduktion der Totbereiche bei 400x Vergrößerung : Pfeile markieren Totbereiche. Durch die höhere Vergrößerung werden die unfokussierten Bildbereiche kleiner.

Zwar lassen sich bereits bei 200x Vergrößerung viele Kernveränderungen erkennen, die Darstellung reicht jedoch nicht immer zur sicheren Identifizierung geringgradiger

Abweichungen oder feiner DNA-Fäden aus (Abbildung 30). In der 400x Vergrößerung war die Morphologie der Einzelkerne und dieser Strukturen besser zu erkennen (Abbildung 31). Eine systematische (Einzelkern-) Betrachtung zur Identifizierung der unterschiedlichen Kernmorphologien wurde deshalb an den vorliegenden 400x vergrößerten Aufnahmen durchgeführt (Kapitel 2.1.2 bzw. 3.1.2).

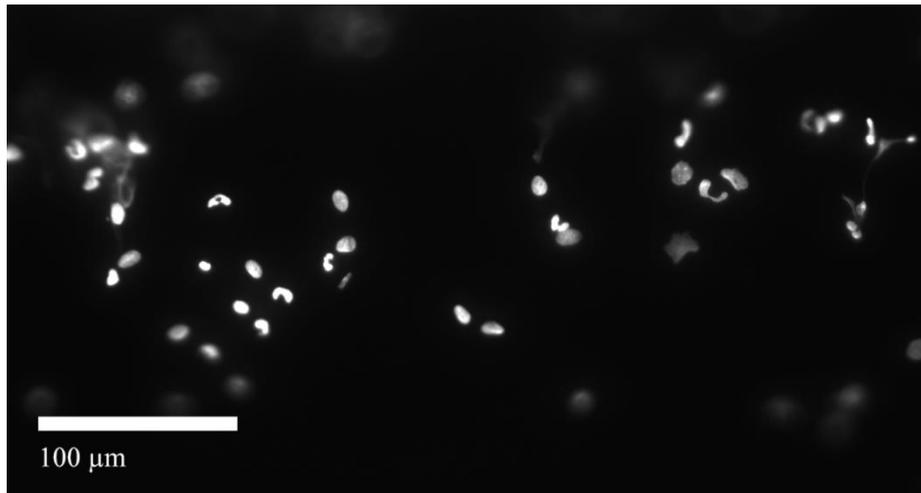


Abbildung 30: Einzelkerne bei 200x Vergrößerung: Zwar sind bereits einige NET-Stadien zu erkennen, morphologische Details sind jedoch teilweise schwer auszumachen.

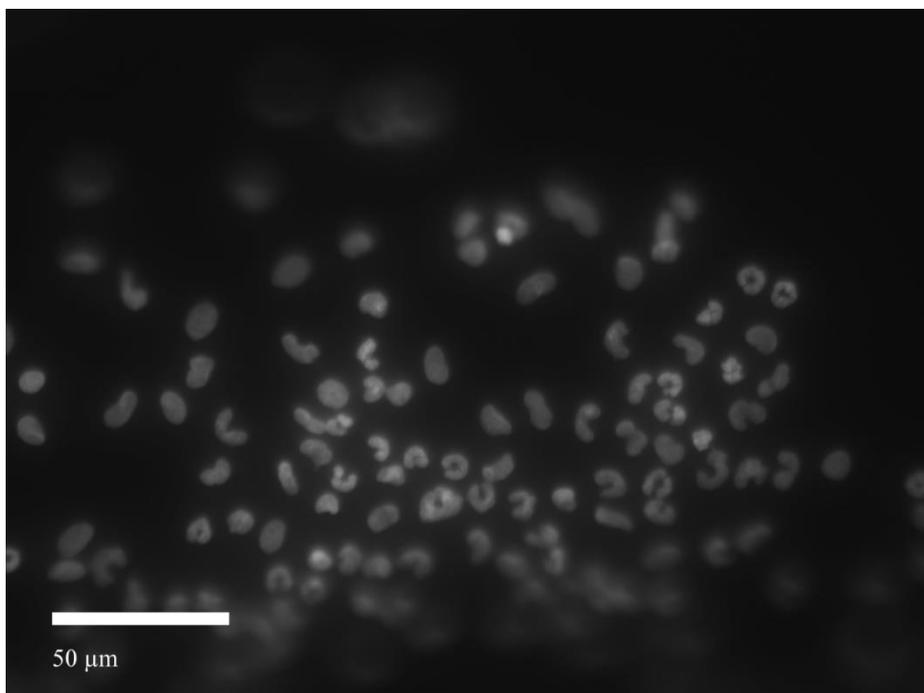


Abbildung 31: Einzelkerne bei 400x Vergrößerung: verbesserte Erkennbarkeit morphologischer Merkmale bei höherer Vergrößerung.

3.1.2. Identifizierung von NETs auf 400x vergrößerten Aufnahmen

Aufgrund der besseren Erkennbarkeit von morphologischen Unterschieden bei den 400x-Vergrößerungen, wurden diese Aufnahmen für die NET-Analyse herangezogen. Es wurden 989 400x-vergrößerte Aufnahmen von 53 unterschiedlichen Oxygenatoren ausgewertet.

3.1.2.1. Kategorisierung von NET-Strukturen

NET-Strukturen wurden in Kapitel 2.1.2.1 kategorisiert. Diese wurde nach verschiedenen Kriterien analysiert.

3.1.2.2. Häufigkeit von NET-Strukturen in der Fotodokumentation

Bei 31 von 989 Aufnahmen waren keine Zellkerne sichtbar. Bei den restlichen 958 Aufnahmen zeichneten sich im Mittel 19 ± 6 Zellkerne pro Aufnahme ab. Dabei wurden insgesamt 30194 Zellkerne gezählt. 16903 Zellkerne (56%) lagen dabei im Bildfokus (mit 17 ± 10 Zellkernen pro Aufnahme) und wurden nach den erarbeiteten Kriterien klassifiziert.

Folgende NET-Anteile wurden in allen Aufnahmen zusammengefasst gefunden:

- 264 aufgeblähte Zellkerne (1,5 % aller fokussierten Zellkerne)
- 1215 NET-II-positive Zellkerne (7,2 % aller fokussierten Zellkerne)
- 451 von 958 zellkern-enthaltenden Aufnahmen enthielten mindestens einen NET-II positiven Kern (47,1 %).

Im Mittel $1,2 \pm 1,9$ NET-II je Bild (maximal 12 je Aufnahme).

- Von 51 Präparaten lag wenigstens eine NET-II-positive Aufnahme vor (definiert die Anzahl der NET-II-positiven Oxygenatoren, 96 %), bei 2 Präparaten wurde keine NET-II identifiziert.
- 100 NET-III positive Zellkerne (0,6 % aller fokussierten Zellkerne)
- 80 von 958 zellkern-enthaltenden Aufnahmen enthielten mindestens einen NET-III positiven Kern (8,1%).
- Bei Auftreten einer NET-III wurden meist 1-2 NET-III gefunden (maximal 5 je Aufnahme). Im Mittel $0,1 \pm 0,39$ NET-III je Bild.

- Von 33 Präparaten lag wenigstens eine NET-III-positive Aufnahme vor (definiert die Anzahl der NET-III-positiven Oxygenatoren; 62%), bei 20 Präparaten wurde keine NET-III identifiziert.
- Bei den NET-III-positiven Präparaten (= Präparate, in denen NET-III identifiziert wurden, n= 33) wurden im Mittel $5,3\% \pm 17,7\%$ der Zellkerne als NET-III klassifiziert (alle Präparate: $3,3\% \pm 14,2\%$).

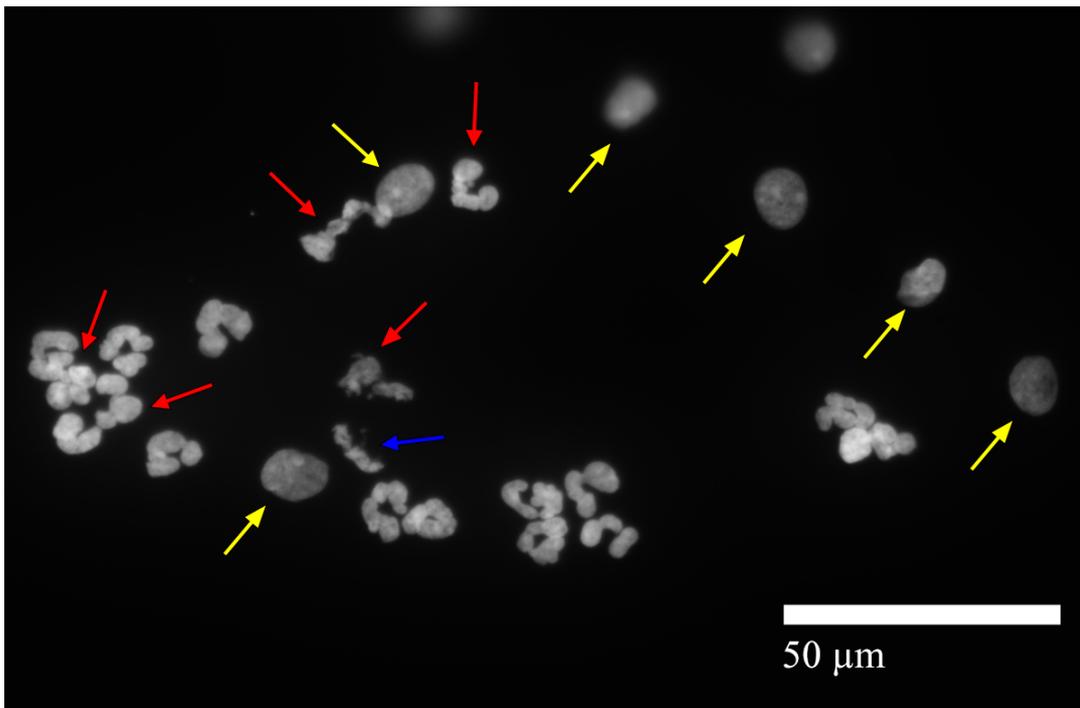


Abbildung 32: Beispielbild mit verschiedenen Kernmorphologien und -Strukturen: gezählt wurden: 20 von 25 Zellkerne ‚fokussiert‘, 5* NET-II (rote Pfeile), 1* NET-III (nicht mehr mit dem Kern morphologisch verbundene Struktur/Faden >10 μm, blauer Pfeil); 6* aufgeblähte (gelbe Pfeile)

Wie aus Abbildung 32 ersichtlich, ist eine genaue Zuordnung zu bestimmtem Kern/NET-Strukturen häufig schwierig. Bei der Identifizierung der NET-III-positiven Strukturen (DNA-Fäden) müsste zum Teil die Belichtungszeit erhöht werden, da die Fluoreszenzintensität der DNA-Fäden sehr schwach war (blauer Pfeil).

3.1.2.3. Nachweis von NETs bei verschiedenen Oxygenatoren

Die mittlere Zellkerndichte je Oxygenator (Gesamtkernzahl aller vorliegender Aufnahmen eines Oxygenators dividiert durch die Anzahl der vorliegenden Aufnahmen) weist eine breite Streuung von 0 bis 48 (fokussiert) bzw. 0 bis 93 (inkl. unfokussierten) Zellkernen pro Bild auf, im Gesamtmittel 17 ± 10 bzw. 31 ± 20 Zellkerne pro Bild.

Die oben angesprochene heterogene Verteilung der Zellkerne auf den Präparaten wird in Abbildung 33 ersichtlich. Dargestellt ist die mittlere Anzahl gezählter Zellkerne aller in 400x-Vergrößerung vorliegender Aufnahmen eines Oxygenators, aufgeteilt in „fokussierte Zellkerne“ (rot), und „nicht fokussierte Zellkerne“ (blau). Die „fokussierten Zellkerne“ wurden für die Identifizierung der Kernstrukturen verwendet. Daraus können jedoch nur eingeschränkt Schlüsse auf die Kerndichte in den Oxygenatoren gezogen werden, weil gezielt Zellverbände in den Aufnahmen festgehalten wurden, während zellfreie Stellen nicht fotodokumentiert wurden. Zudem wurde gezielt nach Stellen mit kernhaltigen Zellen gesucht.

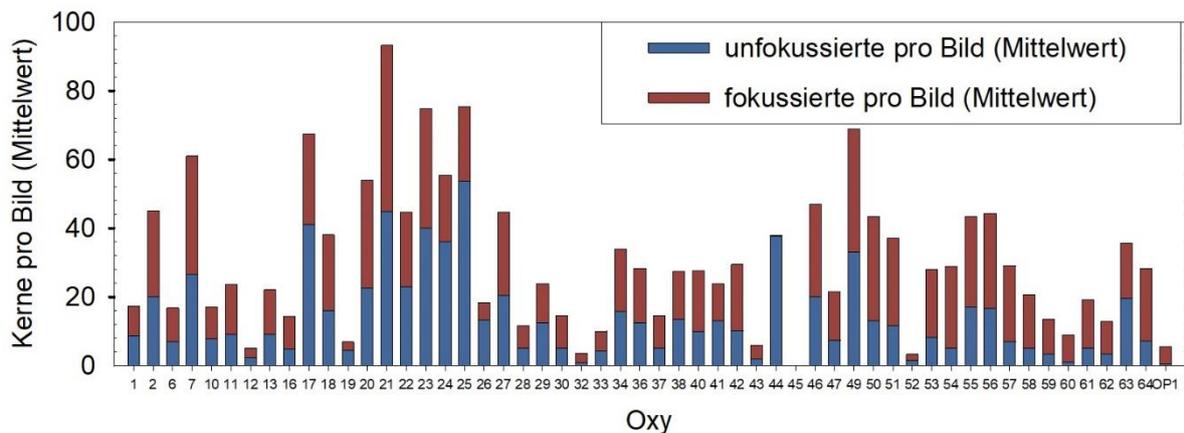


Abbildung 33: Mittlere Anzahl der je Aufnahme festgehaltenen Zellkerne für jedes Oxygenatorpräparat sowie deren Fokussierung. Nur fokussierte Zellkerne (rot) konnten in die NET-Auswertung (Abbildung 34) einfließen.

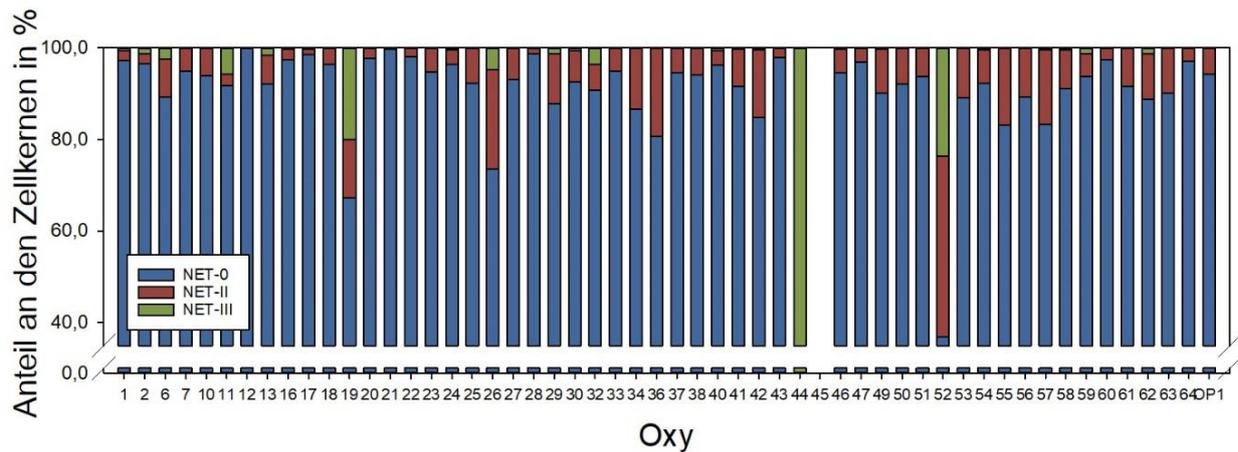


Abbildung 34: Prozentualer Anteil der verschiedenen NET-Stadien an den fokussierten Einzelkernen je Oxygenatorpräparat. Der Anteil der NET-freien Zellkerne betrug beim Großteil der Oxygenatorpräparate über 80%.

Abbildung 34 zeigt die jeweilig durch Auszählen ermittelten Anteile der verschiedenen NET-Stadien an den fokussierten Zellkernen. NET-III trat nur selten auf. Der Anteil an NET-freien Kernstrukturen lag fast immer über 80%. Vier Oxygenatorpräparate zeigten einen hohen Anteil an Kernveränderungen (Oxy #19, #26, #44, #52). Diese vier Oxygenatoren wiesen mit im Mittel nur 3, 5, 0,2 und 2 fokussierten Zellkernen je Bild alle einen unterdurchschnittlichen Kernbesatz auf ($16,7 \pm 10,3$ Zellkerne pro Bild). In den fünf vorliegenden Aufnahmen eines Oxygenatorpräparates (Oxy #44) kam nur ein einzelner Zellkern fokussiert zur Darstellung.

Aufgrund des sehr unterschiedlichen Kernbesatzes (Abbildung 33) ist ein direkter Vergleich der NET-Häufigkeiten erschwert. Deshalb wurde im Folgenden quantitativ aufgetragen, welcher Anteil der Bilder eines Oxygenatorpräparates jeweils mindestens eine NET-III aufwies (Abbildung 35). Enthielt eine Aufnahme mindestens eine NET-III, wurde sie als NET-III-positiv gewertet.

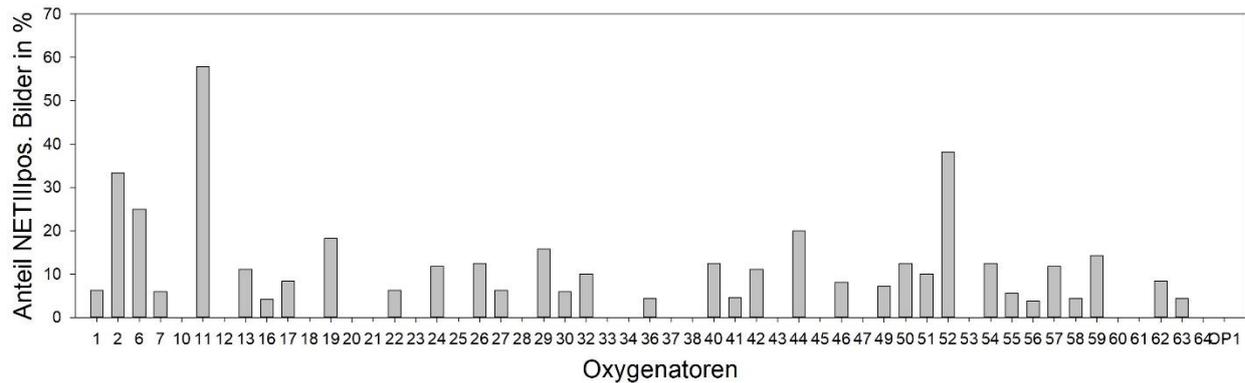


Abbildung 35: Frequenz NET-III-positiver Aufnahmen je Oxygenatorpräparat: Bei der überwiegenden Mehrheit der Oxygenatorpräparate war der Großteil der Aufnahmen NET-III-negativ.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass in 33 von 53 (62%) Oxygenatorpräparaten NET-III nachweisbar waren, allerdings war deren Frequenz an den Zellkernen niedrig (0,6% aller Zellkerne). Im Mittel waren $1,5 \pm 2$ von 19 ± 6 Aufnahmen pro Präparat NET-III-positiv. Mit Ausnahme von vier Oxygenatoren (Oxy #2, #6, #11, #52) war über alle Präparate die Gesamtfrequenz einer NET-III-positiven Aufnahme $<20\%$.

3.2. Auswertung neuer Präparate derselben Oxygenatoren

Von den eingelagerten Oxygenatoren der Arbeit von J. Wilm (90) wurden 81 Präparate von 58 Oxygenatoren ausgewählt, präpariert und verblindet ausgewertet.

Weil ausschließlich beim Vorliegen von NET-III sicher von Neutrophil Extracellular Traps ausgegangen werden kann, werden in sämtlichen folgenden Auswertungen ausschließlich NET-III betrachtet. NET-positiv bedeutet daher ab hier NET-III-positiv.

3.2.1. Übersichtsauswertung

3.2.1.1. Einteilung der Übersichtsaufnahmen nach visuellem Eindruck

Anhand der von allen 81 untersuchten Oxygenatoren gefertigten Übersichtsaufnahmen wurden nach visuellem Eindruck folgende Kriterien bewertet:

Tabelle 4: Bewertung der Übersichtsaufnahmen nach der Homogenität der Kernablagerungen

Ungeordnet (z.B. Abb. 19,21)	teilweise regelmäßig angeordnet (z.B. Abb. 8,9)	regelmäßig angeordnet (z.B. Abb. 7,10)
32 (39,5%)	29 (35,8%)	20 (24,7%)

Wie bereits oben angedeutet, waren die Kernablagerungen auf den Präparaten inhomogen verteilt. Die qualitative Bewertung zeigte, dass eine gleichmäßige Anordnung der Zellen nur bei etwa 25% der Präparate vorlag. Die Inhomogenität erschwerte die Auswertbarkeit hinsichtlich NETs.

Tabelle 5: Bewertung der Übersichtsaufnahmen nach der Zelldichte

Wenig (z.B. Abb. 16)	Mittel (z.B. Abb. 7, 10, 15)	Hoch (z.B. Abb. 11, 22)
28 (34,6%)	30 (37,0%)	23 (28,4%)

Die Oxygenatoren wiesen einen erheblichen Unterschied in der Dichte ihres Kernbesatzes auf.

Tabelle 6: Bewertung der Übersichtsaufnahmen nach Pseudomembranen

	Keine/ kaum	mittel	Viel
Großflächige Pseudomembran	25 (30,1%)	18 (22,2%)	38 (46,9%)
Pseudomembranen an Kettfäden	18 (23,0%)	12 (15,4%)	48 (61,5%)

Pseudomembranen wurden bei annähernd der Hälfte der Präparate identifiziert. Zudem wurden häufig größere Zellaggregate an den Kettfäden beobachtet.

3.2.1.2. Quantitative Auswertung der Übersichtsaufnahmen

Die Membranoxygenatoren bestehen aus gekreuzt übereinanderliegenden Gaskapillarröhrchen, die vom Patientenblut umspült werden. Die Fläche um den Berührungspunkt zweier kreuzender Gaskapillarröhrchen wird im Folgenden als Kreuzungspunkt (KP) bezeichnet. Auf den Gaskapillaren waren so immer abwechselnd Kreuzungspunkte und dazwischenliegende

„Zwischenräume, ZR“ vorhanden. Die Flächen von KP und ZR waren identisch (siehe Abbildung 27).

Identifizierbarkeit von Kreuzungspunkten

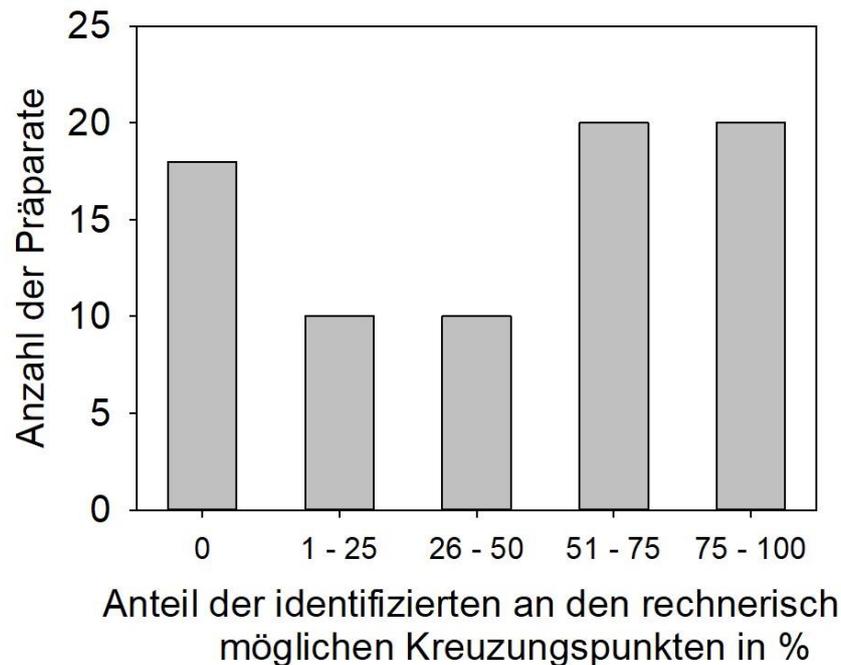


Abbildung 36: Identifizierbarkeit von Kreuzungspunkten. Der Anteil an identifizierten zur Anzahl zu erwartenden Kreuzungspunkte wurde in 5 Kategorien eingeteilt. Bei knapp der Hälfte der Präparate waren keine oder weniger als die Hälfte der zu erwartenden Kreuzungspunkte identifizierbar.

Die Untersuchung der Identifizierbarkeit von Kreuzungspunkten (KP) erfolgte als Maß für die Gleichmäßigkeit der Kernverteilung auf der Gastauschermembran. Folgende Anteile der rechnerisch erwartbaren Kreuzungspunkte konnten anhand der Zellkernadhäsion identifiziert werden:

- 75 bis 100% der erwartbaren Kreuzungspunkte identifizierbar 20x
- 50 bis 75% der erwartbaren Kreuzungspunkte identifizierbar 20x
- 25 bis 50% der erwartbaren Kreuzungspunkte identifizierbar 10x
- Bis zu 25% der erwartbaren Kreuzungspunkte identifizierbar 10x
- Keine der erwartbaren Kreuzungspunkte identifizierbar. 18x
- Nicht berücksichtigt, da keine erwartbare Anzahl an KP feststand 3x

Auch bei dieser Bewertung wird die heterogene Verteilung der Zellablagerungen sichtbar. So war beispielsweise bei 18 von 78 Präparaten in den Übersichtsaufnahmen keine Identifizierung von Kreuzungspunkten möglich. Dies verhinderte eine Bewertung der NET-Häufigkeit an diesen Stellen auf der Gasfaser.

Untersuchung des überwiegend vorliegenden Kernbesatzes

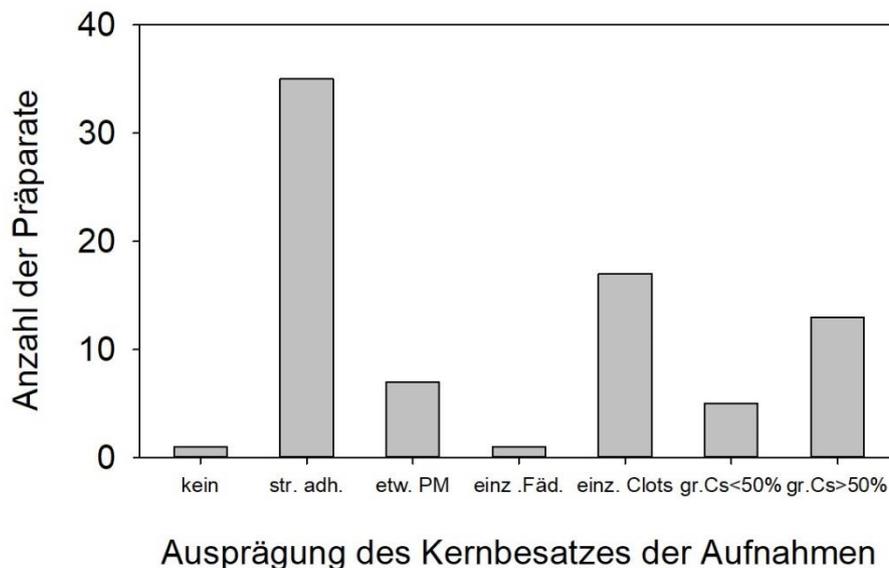


Abbildung 37: Kategorisierung des Kernbesatzes auf Oxygenatorpräparaten. Siehe entsprechende Einteilung und Legende im Methodenteil. Der Großteil der Präparate enthält hauptsächlich streng adhärenente Zellkerne, gefolgt von Clots verschiedener Ausprägung.

Die Untersuchung des überwiegend vorliegenden Kernbesatzes der Gasaustauschermembranen ergab folgende Verteilung in Ausprägung des Zellkernbesatzes der Oxygenatorpräparate:

- Kein Zellbewuchs 1x
- Zellbewuchs streng adhärenent auf Membranen 35x
- Etwas Pseudomembran 7x
- einzelne Pseudomembran-Fäden überspannen Gasfasern 1x
- einzelne Clots an den Gasfasern 17x
- großflächige Clots über Membranen, weniger als die Hälfte der Gesamtfläche 5x
- großflächige Clots über Membranen, mehr als die Hälfte der Gesamtfläche 13x
- statistisch keine Zuordnung zu genannten Gruppen möglich 2x

Streng adhärente Zellablagerungen machen den Großteil der Präparate aus.

Verteilung der Zellkerne in den Bildabschnitten

Die Übersichten wurden danach bewertet, ob Zellkerne überwiegend an Kreuzungspunkten, in den Zwischenräumen oder gleichmäßig verteilt adhäriert auftraten.

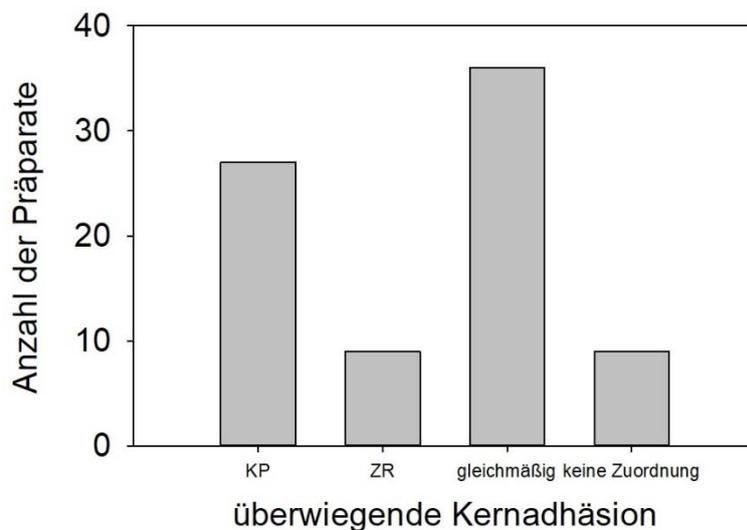


Abbildung 38: Verteilung der Zellkerne in den einzelnen Bildabschnitten. Der Großteil der Zellkerne war an den Kreuzungspunkten (KP) der Gasfasern oder gleichmäßig auf den Gasfasern adhäriert. ZR= Zwischenräume.

Bei 27 von 81 Präparaten waren die Zellkerne in der Übersicht überwiegend um die Kreuzungspunkte adhäriert, bei neun Präparaten vor allem in den Zwischenräumen, 36-mal waren die Zellkerne gleichmäßig in den Bildabschnitten verteilt. Bei neun Präparaten war aus den erhobenen Einzelwerten keine statistische Zuordnung zu den drei Kategorien möglich. Weil bei diesen Präparaten keine Häufung von Zellkernen an KP oder ZR gefunden wurde, können die Zellkernverteilungen dieser Präparate auch als überwiegend gleichmäßig interpretiert werden.

Leerbereiche

In Abbildung 39 ist dargestellt, wie viele der 6 (bzw. 3 bei Präparaten ohne mittleren Kettfaden) Bildabschnitte eines Präparates Leerbereiche aufwiesen. Bei einem Wert von 0 waren keine, bei einem Wert von 6 alle untersuchten Abschnitte von Leerbereichen betroffen.

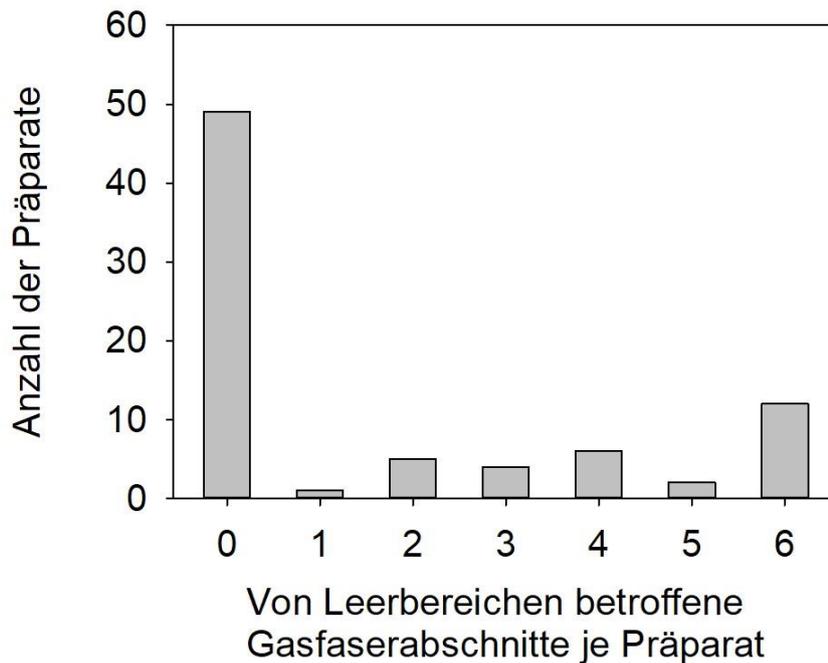


Abbildung 39: Häufigkeitsverteilung der Leerbereiche: Die Mehrzahl der Präparate wies keine Leerbereiche auf.

Bei zwei Übersichtsaufnahmen war aufgrund der zu ungeordneten Kernverteilung keine Bestimmung von Leerbereichen möglich. Von den insgesamt 79 verbleibenden ausgewerteten Übersichtsaufnahmen waren 49 (62%) frei von sichtbaren Leerbereichen. In 12 Fällen (15%) waren alle der möglichen 6 (bzw. 3) Gasfaserabschnitte von Leerbereichen betroffen. In 18 Fällen (23%) zeigten die Präparate teilweise Leerbereiche auf.

3.2.1.3. Vergleich unterschiedlicher Übersichtsaufnahmen desselben Oxygenators (Mehrfachauswertungen)

In den Abbildungen 40 und 41 sind die Anzahl der pro Präparat im definierten Untersuchungsabschnitt klar identifizierbaren Kreuzungspunkte, bzw. das Auftreten von Leerbereichen in den mehrfach untersuchten Oxygenatorpräparaten als Maß für die Homogenität verschiedener Abschnitte des jeweils selben Oxygenators dargestellt. Bei drei Oxygenatoren wurden je drei verschiedene Präparate, bei 16 Oxygenatoren wurden je zwei verschiedene Präparate untersucht.

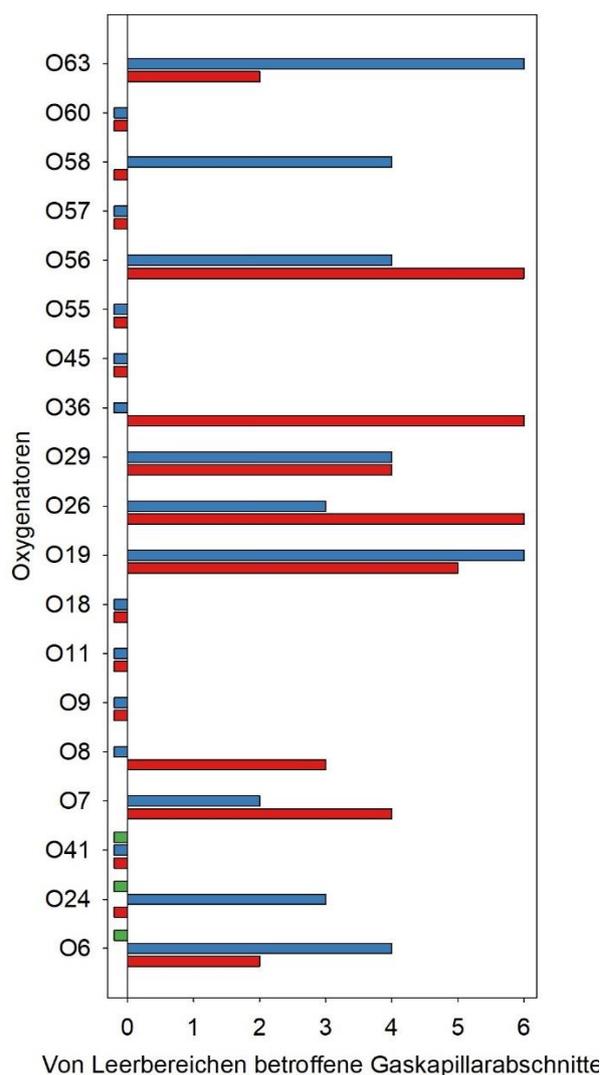
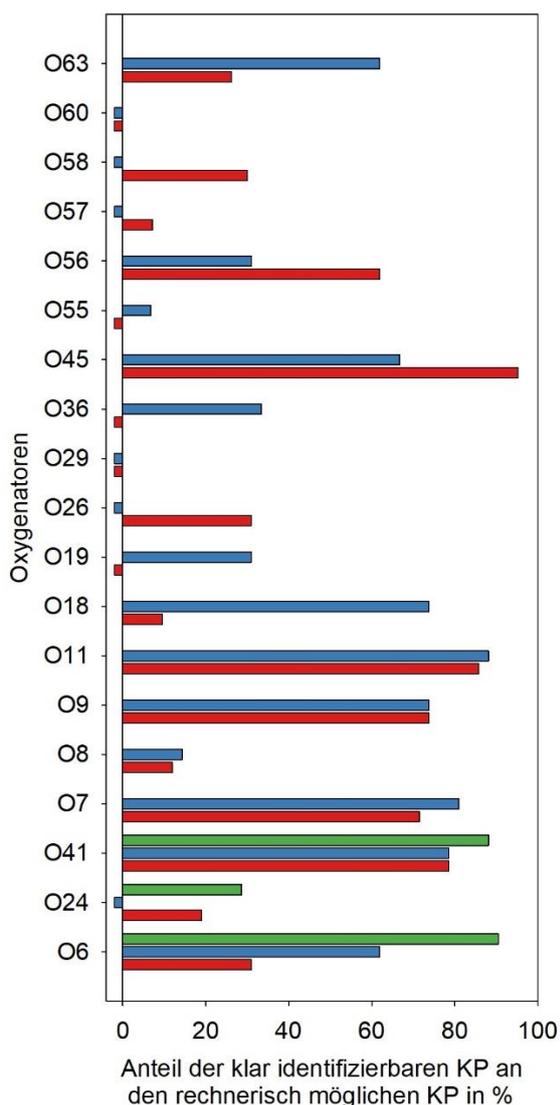


Abbildung 40: Identifizierbarkeit KP: Vergleichende Übersichtsauswertung von Präparaten mehrfach ausgewerteter Oxygenatoren. Jeder Balken steht für ein Oxygenatorpräparat. Präparate aus demselben Oxygenator sind gruppiert dargestellt. Nullwerte sind für eine bessere Darstellbarkeit als negative Balken abgebildet. Je nach Oxygenatormodell waren je Präparat 30 oder 42 Kreuzungspunkte (KP) rechnerisch möglich (=100%). Bei einigen Oxygenatoren war die Identifizierbarkeit der Kreuzungspunkte in mehreren Präparaten ähnlich gut möglich, was auf eine homogene Kernbeladung über verschiedene Oxygenatorabschnitte schließen lässt.

Abbildung 41: Leerbereiche: Vergleichende Übersichtsauswertung von Präparaten mehrfach ausgewerteter Oxygenatoren. Jeder Balken steht für ein Oxygenatorpräparat. Präparate aus demselben Oxygenator sind gruppiert dargestellt. Nullwerte sind für eine bessere Darstellbarkeit als negative Balken abgebildet. Die Balken geben jeweils an, wie viele der je Präparat untersuchten Gaskapillarabschnitte (3 oder 6) von Leerbereichen betroffen waren. Erreicht der Balken 6, so waren alle (3 bzw. 6) untersuchten Abschnitte von Leerbereichen betroffen.

Anzahl der pro Präparat klar zu identifizierbaren Kreuzungspunkte

In 12 Fällen differierte die Identifizierbarkeit der Kreuzungspunkte verschiedener Präparate der gleichen Oxygenatoren um mehr als 25%. In 13 Fällen war diese zu mehr als 75% gegeben.

Es ergibt sich bei dieser Untersuchungsmethode als Maß für Homogenität unterschiedlicher Präparate derselben Oxygenatoren eine Ähnlichkeit >75% in etwa der Hälfte der Stichprobe.

Auftreten von Leerbereichen

In 17 Fällen (68%) war der Unterschied der von Leerbereichen betroffenen Gaskapillarabschnitte zweier verschiedener Präparate derselben Oxygenatoren kleiner oder gleich zwei Abschnitte. In 8 (32%) Fällen betrug die Differenz drei oder mehr Abschnitte.

Bei dieser Betrachtung ergibt sich somit eine Ähnlichkeit verschiedener Präparate selber Oxygenatoren in etwa 2/3 der doppeluntersuchten Präparate.

3.2.2. Mikroskopische Auswertung bei 200x Vergrößerung

3.2.2.1. Unterschiede in der Detail-Auswertbarkeit verschiedener Oxygenatorpräparate

Von insgesamt 81 untersuchten Präparaten wurden 40 als zählbar (quantitative Einzelkernauswertung möglich), 16 als eingeschränkt zählbar (nur qualitative Bildabschnittsauswertung möglich), 25 Präparate als nicht auswertbar klassifiziert.

Tabelle 7: unterschiedliche Auswertbarkeiten verschiedener Oxygenatormodelle

	Quadrox (n=52)	Hilite (n=15)	ILA (n=6)	ECC.O5 (n=2)
zählbar	24 (46,1%)	8 (53,3%)	4 (66,6%)	1 (50%)
eingeschränkt zählbar	13 (25%)	1 (6,7%)	2 (33,3%)	0
nicht auswertbar	15 (28,8%)	6 (40%)	0	1 (50%)

Zu sechs Präparaten lagen keine Daten zum Oxygenatormodell vor.

Bei den als nicht auswertbar klassifizierten Präparaten wurde als Grund 18x Pseudomembran, 14x Herstellungsartefakt oder Fixierungsfehler und 6x andere Gründe dokumentiert. An diesen Präparaten konnte weder eine quantitative Einzelkernbetrachtung noch eine qualitative Bildabschnittsauswertung durchgeführt werden. Diese wurden aus der nachfolgenden Betrachtung herausgenommen.

Folgende Auswertung stellt die Laufzeiten der Oxygenatoren von „vollständig zählbaren“ Präparaten denjenigen der Oxygenatoren von „nicht auswertbaren“ Präparaten gegenüber.

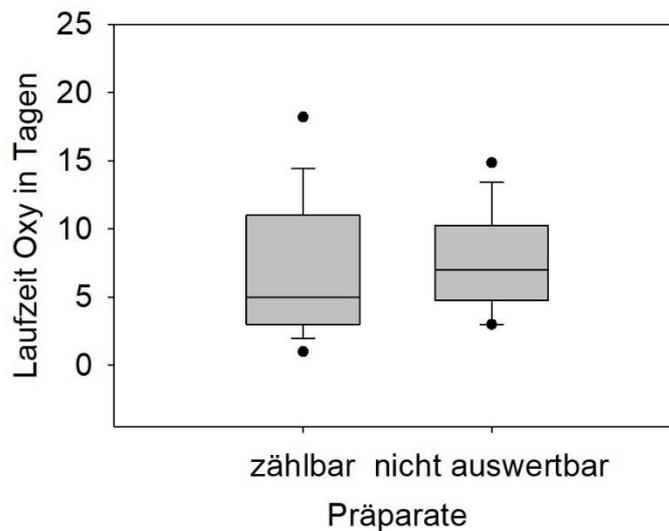


Abbildung 42: Darstellung der Oxygenatorlaufzeit von als „zählbar“ kategorisierten Präparaten gegenüber. als „nicht auswertbar“ kategorisierten Präparaten. $n(\text{zählbar})=35$, $n(\text{nicht auswertbar})=22$. „Eingeschränkt zählbare“ Präparate gingen in diese Auswertung nicht ein. Der Unterschied in der Oxygenatorlaufzeit zwischen den beiden Gruppen ist statistisch nicht signifikant.

Zu acht Präparaten lagen keine Laufzeitdaten vor. Es gab keinen signifikanten Unterschied in der Laufzeit der beiden Oxygenatorkollektive (Abbildung 42). Ebenso konnte kein signifikanter Unterschied in der Auswertbarkeit abhängig von der laufenden Nummer des Oxygenators festgestellt werden.

Tabelle 8: Auswertbarkeit der Oxygenatoren abhängig von der laufenden Oxygenatornummer am Patienten

	Erstoxygenatoren (n=53)	Zweitooxygenatoren (n=16)	Drittoxygenatoren (n=3)
zählbar	27 (= 50,1%)	6 (= 37,5%)	2 (= 66,7%)
eingeschränkt zählbar	7 (=13,2%)	8 (= 50%)	0
nicht auswertbar	19 (=35,8%)	2 (= 12,5%)	1 (= 33,3%)

Zu neun Präparaten lagen keine Daten zur laufenden Oxygenatornummer vor.

3.2.2.2. Quantitative Untersuchung „zählbarer“ Präparate

40 von 81 Präparaten (49 %) erlaubten eine quantitative Zählung von NETs auf Einzelkernebene.

Für Auswertungen, in denen zwischen den verschiedenen Bildabschnitten (KP und ZR) differenziert wurde, konnten fünf Präparate, bei denen zwar Einzelkerne gezählt, diese jedoch keinen Bildabschnitten zugeordnet werden konnten, nicht berücksichtigt werden. Hier standen dann nur jeweils 35 Präparate zur Verfügung. In Bildabschnitts-unabhängigen Auswertungen konnten alle 40 Präparate eingehen.

Unterschiedlicher Kernbesatz der Gasfaserabschnitte

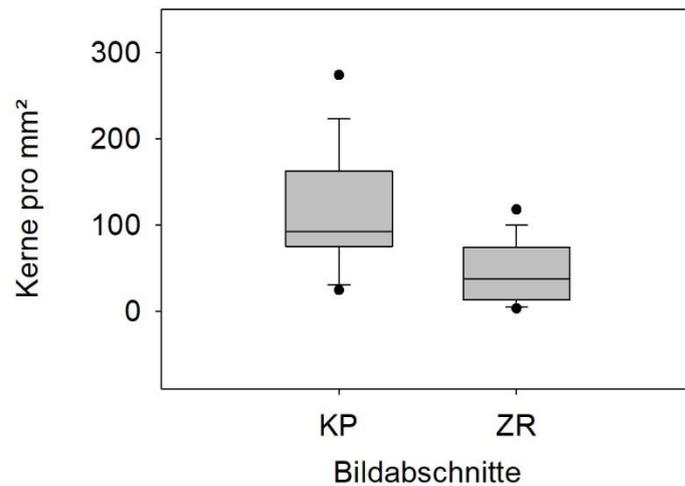


Abbildung 43: Darstellung der Kerndichte der unterschiedlichen Bildabschnitte bezogen auf die Fläche: Die Kerndichte an Kreuzungspunkten (KP) ist signifikant höher als an Zwischenräumen (ZR). (Jeweils n=35 Präparate; Mann-Whitney-U-Test: $p < 0,001$)

Die Betrachtung der Kerndichte über die verschiedenen Abschnitte der Gastauschermembran ergab im Gesamtmittel 117 ± 74 Zellkerne pro mm^2 an Kreuzungspunkten und 46 ± 39 Zellkerne pro mm^2 an Zwischenräumen. Der Unterschied zwischen den beiden Abschnitten ist statistisch signifikant ($p < 0,001$).

Auftreten von NETs bei Einzelkernen

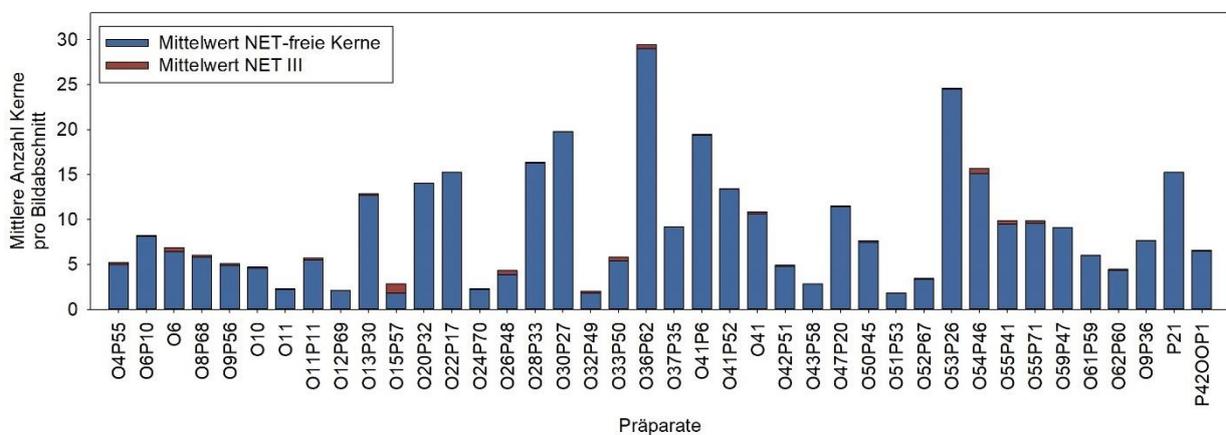


Abbildung 44: Mittlere Anzahl Kerne pro Bildabschnitt in „vollständig zählbaren“ Präparaten, n=40, aufgeschlüsselt in NET-freie Kerne und NETs. NETs traten in 38 von 40 Präparaten, meist jedoch nur in einem sehr geringen Anteil der Einzelkerne auf.

In 38 von 40 als „vollständig zählbar“ eingestuften Präparaten waren NETs identifizierbar, wobei die Anteile meist sehr niedrig waren. In zwei Oxygenatoren (Oxy #37 und #43) waren keine NETs identifizierbar.

Über alle untersuchten Bildabschnitte (KP, ZR, nicht identifizierbare), n=2600, waren von insgesamt 22476 gezählten Zellkernen 485 (2,2%) NET-positiv. Im Mittel waren je Präparat $3,3\% \pm 6,2\%$ der Zellkerne NET-positiv.

Weiterhin wurde untersucht, ob an den unterschiedlichen Bildabschnitten NETs unterschiedlich verteilt auftreten.

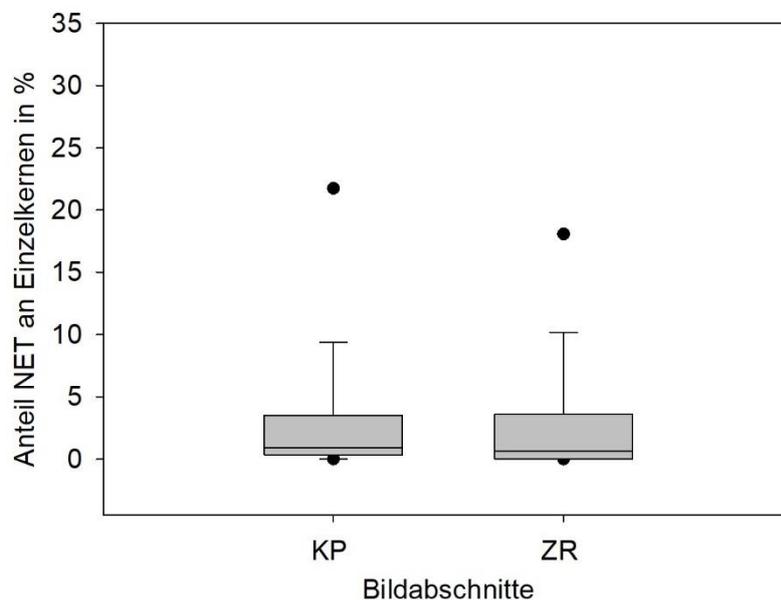


Abbildung 45: NET-Anteile bei Einzelkernen in Kreuzungspunkten und Zwischenräumen: Zwischen Kreuzungspunkten und Zwischenräumen besteht kein signifikanter Unterschied in den NET-Anteilen gezählter Einzelkerne. (n=35 gezählte Präparate; Mann-Whitney-U-Test: p=0,32)

Über alle 35 ausgezählten Präparate, an denen die Bildabschnitte zugeordnet werden konnten, ergaben sich bezüglich der jeweiligen Anteile der als NETs klassifizierten Einzelkerne folgende Mittelwerte:

- an den Kreuzungspunkten (KP, n=1036) waren von insgesamt 12984 gezählten Zellkernen 236 (1,8%) NET-positiv. Im Mittel waren pro Kreuzungspunkt $3,3\% \pm 5,4\%$ der Zellkerne NET-positiv.

- an den Zwischenräumen (ZR, n= 993) waren von insgesamt 4457 gezählten Zellkernen 57 (1,3%) NET-positiv. Im Mittel waren pro Zwischenraum $3,2\% \pm 6,3\%$ der Zellkerne NET-positiv.

Die Unterschiede im Anteil der NETs an den Zellkernen zwischen Kreuzungspunkten und Zwischenräumen waren statistisch nicht signifikant ($p= 0,32$). Es trat folglich kein relevanter Unterschied der NET -Frequenz an Einzelkernen zwischen KP und ZR auf.

Damit wurde die Unterscheidung KP - ZR für weitere quantitative Auswertungen vernachlässigbar.

Vergleich verschiedener Auswerter (quantitative Einzelkernbetrachtung)

Es wurde nach Etablierung des Auswerteverfahrens und Erstellung eines Auswerteprotokolls überprüft, ob verschiedene Auswerter anhand desselben Präparates bei gleichem Vorgehen auf ähnliche Ergebnisse kommen. Dazu wurden jeweils vier Präparate unabhängig voneinander durch eine Mitarbeiterin aus dem Labor (KB) und den Autor (FS) untersucht.

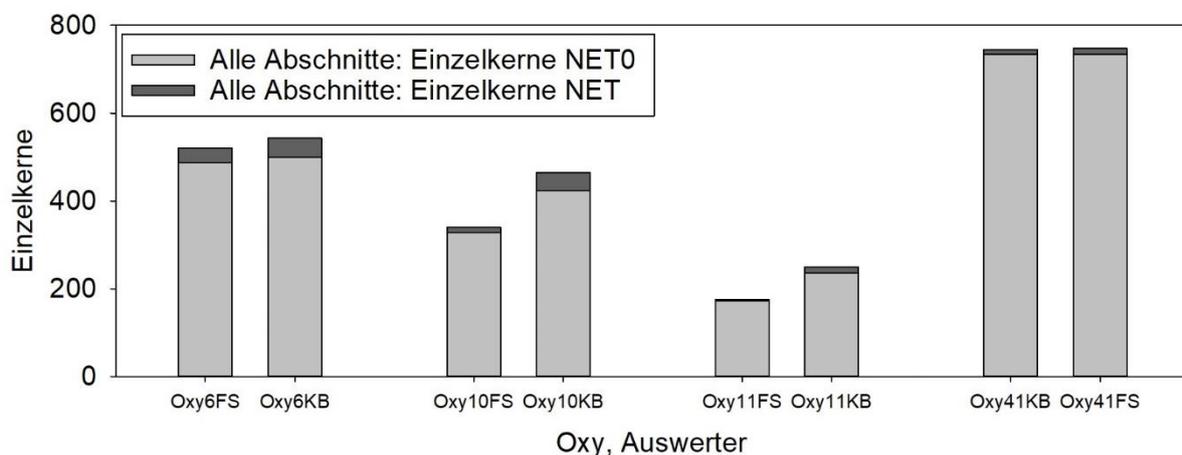


Abbildung 46: von zwei verschiedenen Auswertern untersuchte Oxygenatorpräparate: NET0= NET-negative (= normal konfigurierte) Zellkerne. Die Auswerterin KB erfasste bei sehr ähnlicher Anzahl von Einzelkernen deutlich mehr NETs als der Autor (FS).

Während bei den von unterschiedlichen Auswertern doppelt ausgewerteten Präparaten die gezählte Einzelkernanzahl durchwegs vergleichbar oder sogar gleich war, wurden durch die

Auswerterin KB anteilig mehr Zellkerne als NETs klassifiziert, als vom Autor (FS). Um diesen personenbezogenen Effekt auszuschließen, wurde die weitere Auswertung ausschließlich durch den Autor vorgenommen.

Zusammenhang zwischen Kerndichte und NET-Frequenz

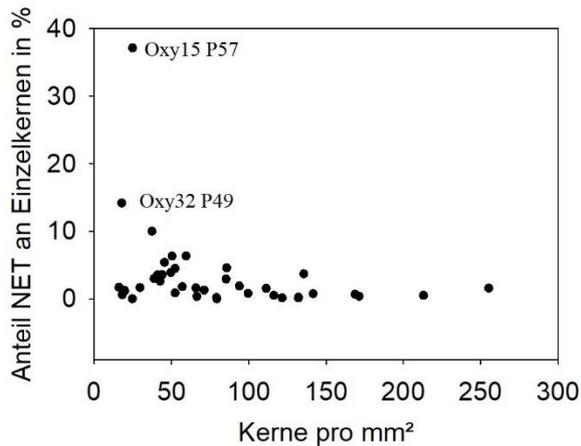


Abbildung 47: Kerndichte gegenüber dem Anteil an NET-positiven Zellkernen: Es besteht eine signifikante negative Korrelation zwischen der Kerndichte und dem Anteil der NET-positiven Einzelkerne. (n=40 Präparate; Spearman-Korrelation: $r=-0,41$, $p=0,01$)

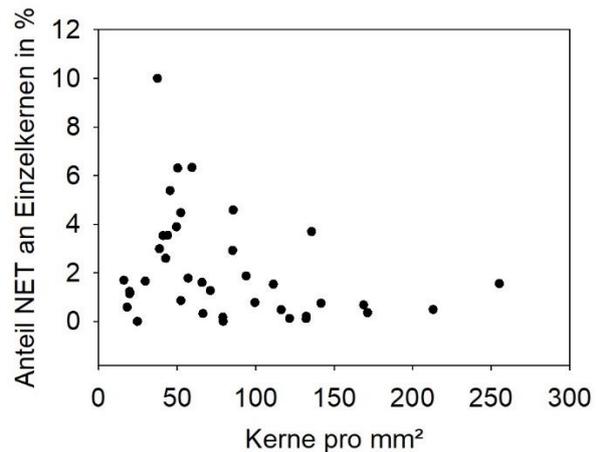


Abbildung 48: Kerndichte gegenüber dem Anteil an NET-positiven Zellkernen: Zwei Spitzenwerte (P57 und P49) wurden entfernt. Es besteht weiterhin eine signifikante negative Korrelation zwischen der Kerndichte und dem Anteil der NET-positiven Einzelkerne. (n=38 Präparate; Spearman-Korrelation: $r=-0,34$, $p=0,04$)

Abbildungen 47 und 48 zeigen den Zusammenhang zwischen der Kerndichte und dem Anteil NET-positiver Einzelkerne. Mit zunehmender Kerndichte nimmt der prozentuale Anteil von NETs an den Zellkernen ab. Auch nach Ausschluss zweier Spitzenwerte bleibt diese negative Korrelation erhalten.

Vergleich mehrfach ausgewerteter Oxygenatoren (quantitative Einzelkernauswertung)

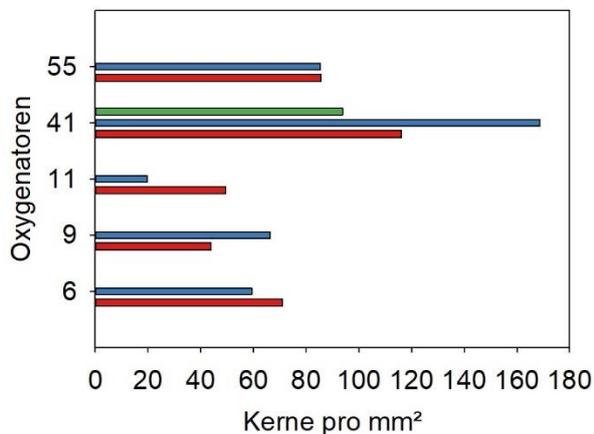


Abbildung 49: Kerndichte (Kerne pro mm²) bei mehrfach ausgewerteten Oxygenatoren. Jeder Balken steht für ein Oxygenatorpräparat. Unterschiedliche Präparate selber Oxygenatoren sind gruppiert dargestellt. Großteils ähneln die ermittelten Kerndichten verschiedener Präparate selber Oxygenatoren untereinander.

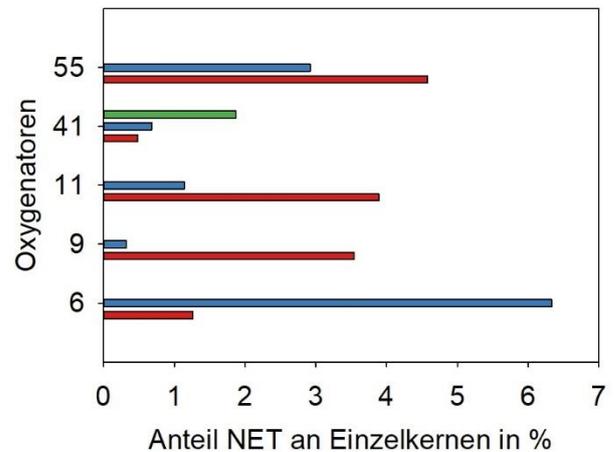


Abbildung 50: Anteile NET-positiver Einzelkerne bei mehrfach ausgewerteten Oxygenatoren. Jeder Balken steht für ein Oxygenatorpräparat. Unterschiedliche Präparate selber Oxygenatoren sind gruppiert dargestellt. Die NET-Anteile unterscheiden sich zwischen verschiedenen Präparaten derselben Oxygenatoren häufig deutlich.

Verglichen werden konnten hierbei nur Oxygenatoren, von denen mehrere als „zählbar“ klassifizierte Präparate vorlagen. Von insgesamt 19 Oxygenatoren mit Mehrfachpräparaten lagen in 5 Fällen mehrere „zählbare“ Präparate vor.

Während für verschiedene Präparate selber Oxygenatoren häufig ähnliche Werte für die Kerndichte gefunden wurden (Mittlere Abweichung der einzelnen Präparate zueinander: 53,1 % ± 50,3%), wichen die NET- Anteile häufig deutlich voneinander ab (mittlere Abweichung 314,9 % ± 327,7%).

3.2.2.3. Qualitative NET-Bewertung Einzelkern-enthaltender Bildabschnitte

Herangezogen wurden alle „zählbaren“ (n=40) und „eingeschränkt zählbaren“ (n=16) Präparate.

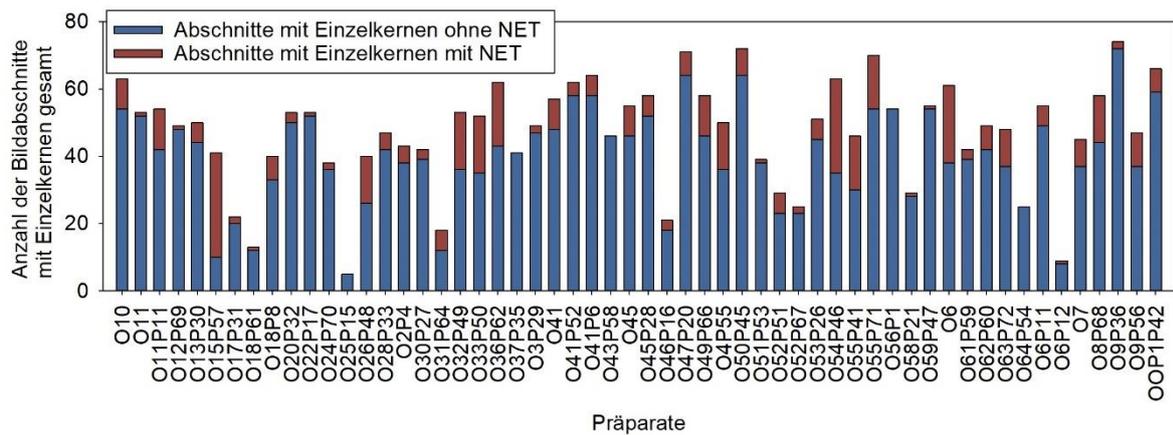


Abbildung 51: Darstellung der jeweiligen Anzahl von Einzelkern-enthaltenden Bildabschnitten je Präparat, aufgeschlüsselt in NET-freie und NET-enthaltende. 51 von 56 Präparaten wiesen mindestens einen NET-enthaltenden Bildabschnitt auf.

In 51 von 56 Präparaten waren NETs in Einzelkernen identifizierbar. 5 Präparate (Oxy #25, #37, #43, #56, #64) enthielten keine NETs in Einzelkernen.

In 400 von insgesamt 2595 Einzelkern-enthaltenden Bildabschnitten (KP, ZR und nicht identifizierbare) war mindestens eine NET zu identifizieren (= 15,4%). Im Mittel waren je Präparat $15,0\% \pm 13,8\%$ der Bildabschnitte NET-positiv.

Es wurde ein möglicher Unterschied im Auftreten von NETs zwischen KP und ZR untersucht. In diese Auswertung gingen die Präparate ein, in denen eine eindeutige Zuordnung der Bildabschnitte zu KP oder ZR möglich war. NET-positiv bedeutet mindestens einen NET-positiven Kern im Bildabschnitt.

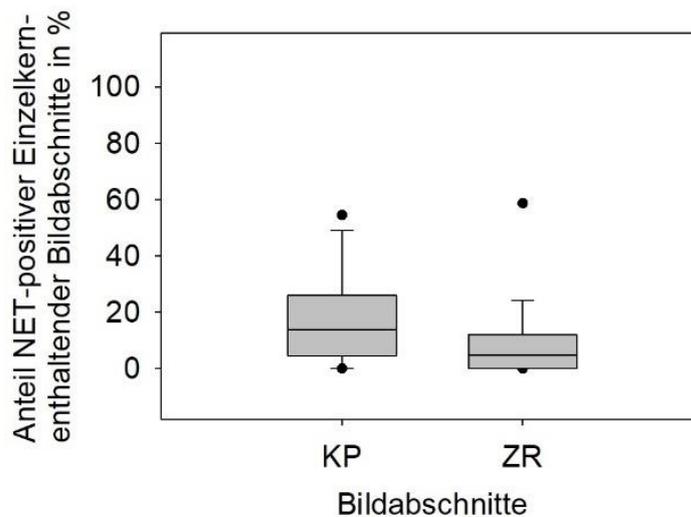


Abbildung 52: Vergleich des Anteils NET-positiver einzelkernenthaltender Bildabschnitte zwischen KP und ZR: Es wurden signifikant mehr NET-enthaltende KP als ZR festgehalten. (n=56 Präparate; Mann-Whitney-U-Test: p=0,001)

Stellt man die Frequenz der NET-positiven an den unterschiedlichen Einzelkern-enthaltenden Bildabschnitten KP und ZR gegenüber, so wurden gesamt ermittelt:

- Einzelzellkern-enthaltende KP: 1197, davon NET- positiv: 204 (17,0%); im Mittel waren je Präparat $18,7\% \pm 19,5\%$ NET-positiv.
- Einzelzellkern-enthaltende ZR: 891, davon NET- positiv: 64 (7,2%); im Mittel waren je Präparat $10,3\% \pm 14,0\%$ NET-positiv.

Einzelkern-enthaltende KP waren signifikant häufiger NET-positiv, als Einzelkern-enthaltende ZR.

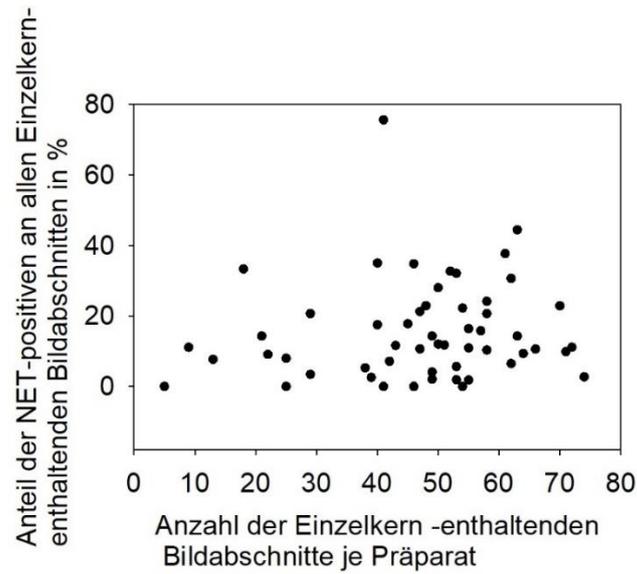


Abbildung 53: Anteil der NET-positiven an allen Einzelkern-enthaltenden Bildabschnitten. Jeder Punkt entspricht einem Oxygenatorpräparat. Es fällt keine Korrelation zwischen der Anzahl der Einzelkern-Bildabschnitte, sowie deren NET-Anteil auf. (n=56 Präparate)

Abbildung 53 zeigt den Anteil der NET-positiven an der Anzahl der je Oxygenatorpräparat insgesamt festgestellten Einzelkern-enthaltenden Bildabschnitte. Eine Korrelation zwischen den beiden Parametern fällt nicht auf.

Vergleich mehrfach ausgewerteter Oxygenatoren (qualitativ, Einzelkern-enthaltende Bildabschnitte)

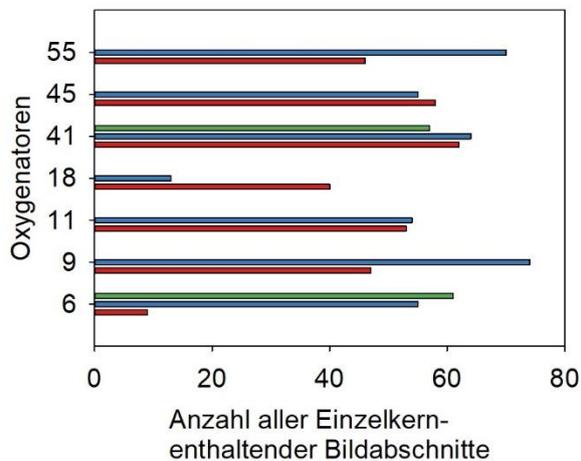


Abbildung 54: Einzelkern-enthaltende Bildabschnitte bei mehrfach ausgewerteten Oxygenatoren. Jeder Balken steht für ein Oxygenatorpräparat. Unterschiedliche Präparate selber Oxygenatoren sind gruppiert dargestellt. Die Werte für unterschiedliche Präparate selber Oxygenatoren waren meist ähnlich untereinander.

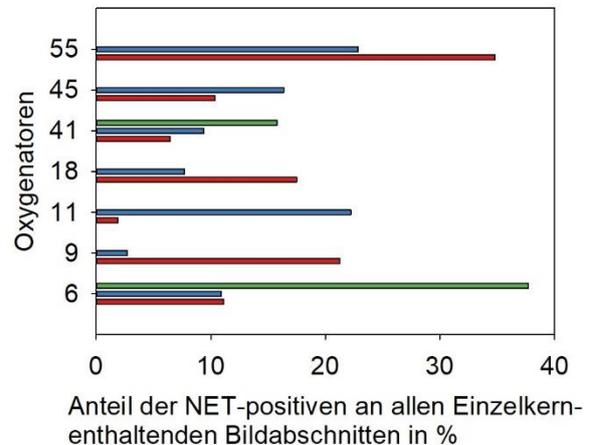


Abbildung 55: Anteile NET-positiver Einzelkern-enthaltender Bildabschnitte bei mehrfach ausgewerteten Oxygenatoren. Jeder Balken steht für ein Oxygenatorpräparat. Unterschiedliche Präparate selber Oxygenatoren sind gruppiert dargestellt. Nur in etwa der Hälfte der Vergleiche waren die Einzelwerte unterschiedlicher Präparate selber Oxygenatoren ähnlich.

Abbildungen 54 und 55 zeigen mehrfach ausgewertete Oxygenatorpräparate jeweils gruppiert dargestellt. In Abbildung 54 ist jeweils dargestellt, wie viele Bildabschnitte bei einem Oxygenatorpräparat gefunden wurden, die Einzelkerne aufwiesen. In Abbildung 55 kann jeweils abgelesen werden, in welchem Anteil dieser Einzelkern-enthaltenden Bildabschnitte NETs identifiziert wurden. Bezüglich der Anzahl aller Bildabschnitte mit Einzelkernen (Abbildung 54) unterschieden sich die Werte verschiedener Präparate derselben Oxygenatoren in sechs Fällen um maximal 12% relativ zueinander. In fünf Fällen traten höhere relative Abweichungen auf (Oxy #9, Oxy #18, Oxy #41 und 2* Oxy #6). Die mittlere Abweichung unterschiedlicher Präparate selber Oxygenatoren betrug $131,7\% \pm 213,0\%$.

Abbildung 55: Die Anteile NET-positiver Einzelkern-enthaltender Bildabschnitte verschiedener Präparate selber Oxygenatoren waren in einem Fall (1* Oxy #6) weitgehend identisch (relative Abweichung von 2%). In den übrigen 10 Fällen traten relative

Abweichungen der Werte zueinander um mindestens 45% auf. Die mittlere relative Abweichung unterschiedlicher Präparate selber Oxygenatoren betrug $249,8\% \pm 333,9\%$.

Daraus folgt, wie schon in der quantitativen Mehrfachauswertung aufgefallen, eine weitgehend vergleichbare Verteilung an Einzelkernablagerungen über verschiedene Bereiche der Gastauschermembran bei sehr ungleicher NET-Verteilung.

3.2.2.4. Qualitative NET-Bewertung Clot-enthaltender Bildabschnitte

Herangezogen wurden alle „zählbaren“ (n=40) und „eingeschränkt zählbaren“ (n=16) Präparate. Sieben Präparate wiesen keine Clots auf.

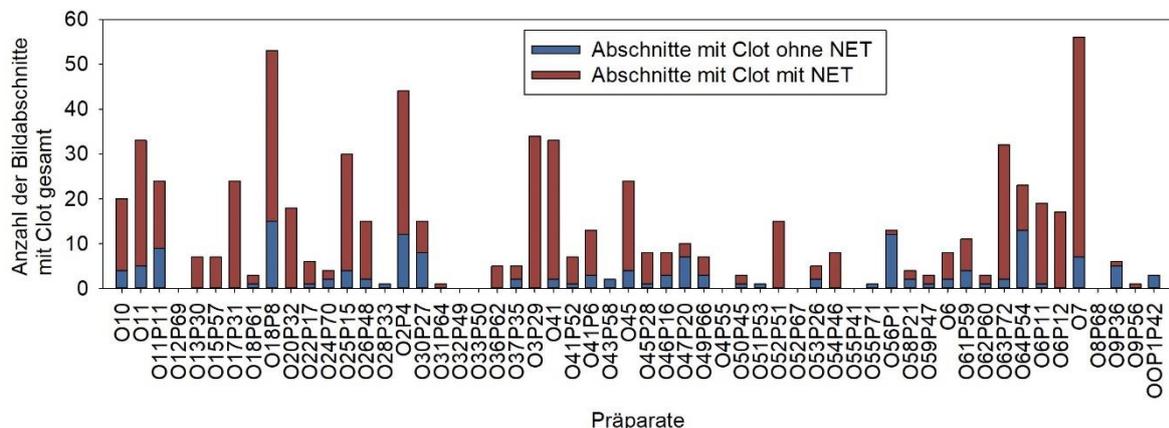


Abbildung 56: Darstellung der jeweiligen Anzahl Clot-enthaltender Bildabschnitte je Präparat, aufgeschlüsselt in NET-freie und NET-enthaltende. 44 von 49 Präparaten mit mindestens einem Clot wiesen mindestens einen NET-enthaltenden Bildabschnitt auf.

In 4 von 49 Clot-enthaltenden Präparaten waren keine NETs in Clots identifizierbar (Oxy #28, #43, #51, 1* #55), wobei auf all diesen Präparaten jeweils maximal 2 Clots identifiziert wurden.

Von insgesamt 688 Clot-enthaltenden Bildabschnitten (KP, ZR und nicht identifizierbare), konnte in 532 jeweils mindestens eine NET identifiziert werden (77,3%). Im Mittel enthielten $66,9\% \pm 31,7\%$ aller Clot-enthaltenden Bildabschnitte NETs.

Auch hier wurde ein möglicher Unterschied im Auftreten von NETs zwischen KP und ZR untersucht. In diese Auswertung gingen die Präparate ein, in denen eine eindeutige Zuordnung von Clots zu KP oder ZR möglich war. NET-positiver Clot bedeutet mindestens einen NET-

positiven Kern je Clot. Enthielt ein Bildabschnitt mehrere Clots, so wurde er nur einmal gewertet.

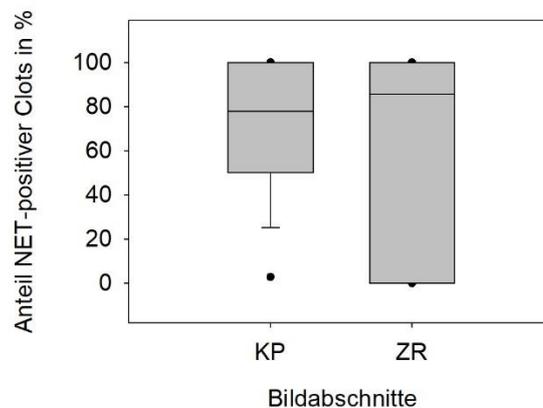


Abbildung 57: Anteil NET-positiver Clot-enthaltender Bildabschnitte bei KP und ZR: Zwischen den unterschiedlichen Bildabschnitten gab es keinen signifikanten Unterschied im Vorkommen von NET-positiven Clots. (Präparate mit verclotteten KP: n=44, Präparate mit verclotteten ZR: n=23; Mann-Whitney-U-Test: p=0,86)

Insgesamt wurden bei 44 von 56 Präparaten Clots an Kreuzungspunkten festgestellt. In 23 Präparaten wurden Clots an Zwischenräumen identifiziert.

Stellt man auch hier die Frequenz der NET-positiven Clots an den unterschiedlichen Bildabschnitten KP und ZR gegenüber, so wurden gesamt ermittelt:

- „Verclottete“ KP: 465, davon NET- positiv: 357 (76,8%); im Mittel waren je Präparat $70,9\% \pm 28,8\%$ NET-positiv.
- „Verclottete“ ZR: 181, davon NET- positiv: 143 (79,0%); im Mittel waren je Präparat $65,3\% \pm 42,6\%$ NET-positiv.

Es ergab sich kein signifikanter Unterschied im Anteil an NET-positiven Clots zwischen den beiden Gruppen. Betrachtet man folglich „alle Abschnitte“ (KP und ZR), so wurden in 49 von 56 Präparaten Clots identifiziert.

Analog zu obiger Betrachtung von Einzelkern-enthaltender Bildabschnitten, wurden im Folgenden die NET-Häufigkeit „verclotteter“ Bildabschnitte der einzelnen Oxygenatoren graphisch dargestellt:

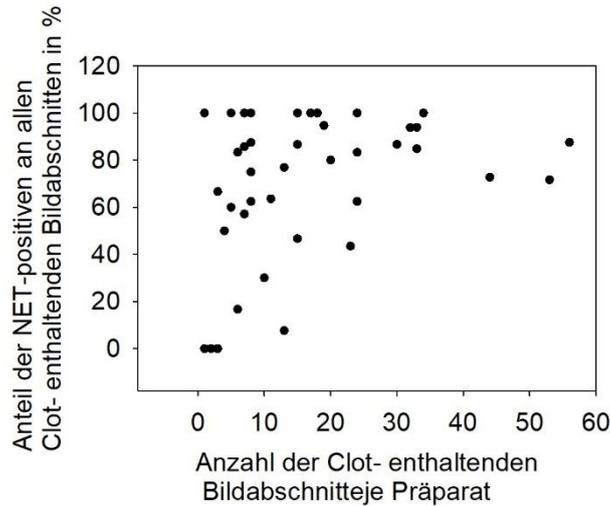


Abbildung 58: Anteil der NET-positiven an allen Clot-enthaltenden Bildabschnitten. Es besteht eine Korrelation nach Spearman. (n= 49 Präparate; $r=0,378$; $p=0,01$)

Mit zunehmender Anzahl von Clots nimmt deren Wahrscheinlichkeit, NETs zu enthalten, zu.

Vergleich mehrfach ausgewerteter Oxygenatoren (qualitativ, Clot-enthaltende Bildabschnitte)

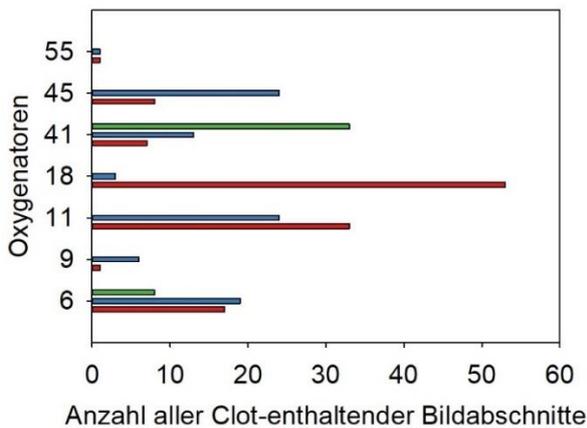


Abbildung 59: Clot-enthaltende Bildabschnitte bei mehrfach ausgewerteten Oxygenatoren. Jeder Balken steht für ein Oxygenatorpräparat. Unterschiedliche Präparate aus demselben Oxygenator sind gruppiert dargestellt. In etwa der Hälfte der mehrfach ausgewerteten Präparate wichen die gefundenen Anzahlen Clot-enthaltender Bildabschnitte verschiedener Präparate erheblich voneinander ab.

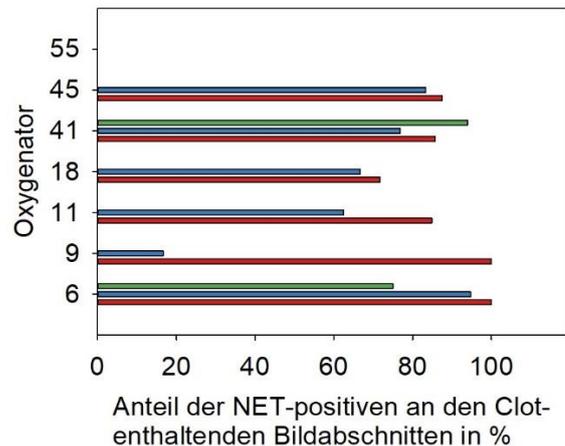


Abbildung 60: Anteile NET-positiver Clot-enthaltender Bildabschnitte bei mehrfach ausgewerteten Oxygenatoren. Jeder Balken steht für ein Oxygenatorpräparat. Unterschiedliche Präparate aus demselben Oxygenator sind gruppiert dargestellt. Die NET-Anteile waren meistens ähnlich hoch.

Abbildungen 59 und 60 zeigen mehrfach ausgewertete Oxygenatorpräparate. In Abbildung 59 ist jeweils dargestellt, wie viele Bildabschnitte (KP oder ZR) bei einem Oxygenatorpräparat gefunden wurden, die Clots enthielten. In Abbildung 60 kann jeweils abgelesen werden, in welchem Anteil dieser Bildabschnitte NETs identifiziert wurden.

Bezüglich der Anzahl aller Bildabschnitte mit Clots (Abbildung 59) unterschieden sich verschiedene Präparate selber Oxygenatoren in zwei Fällen relativ zueinander um weniger oder gleich 12% (1* Oxy #6 und 1* Oxy #55). In den verbleibenden neun Fällen traten höhere Abweichungen (>38%) auf. Die mittlere Abweichung zwischen den verschiedenen Präparaten selber Oxygenatoren zueinander betrug $297,9\% \pm 478,9\%$.

Bei Betrachtung der jeweiligen NET-Anteile (Abbildung 60) konnten zwischen den verschiedenen Präparaten derselben Oxygenatoren in sechs Fällen ähnliche Anteile NET-positiver Clot-enthaltender Bildabschnitte gefunden werden (1*Oxy #6, #18, 2*#41, #45, #55, relative Abweichung zueinander maximal 11%), in den verbleibenden fünf Fällen unterschieden sich die Anteile zwischen den beiden vorliegenden Präparaten um relativ mindestens 22% zueinander. Die Mittlere Abweichung zwischen den verschiedenen Präparaten selber Oxygenatoren zueinander betrug $65,7\% \pm 153,0\%$

Clots sind folglich deutlich ungleichmäßiger über den Oxygenator verteilt, als Einzelkernablagerungen. Der Anteil an NET-positiven Clots ist jedoch meistens ähnlich.

3.2.2.5. Untersuchung verschiedener therapie- und patientenspezifischer Faktoren

Weiterhin wurde untersucht, inwieweit Faktoren wie Oxygenatormodell, eingesetzter ECMO-Modus (= Kanülierungsart) oder Laufzeit des Oxygenators Einfluss auf die Kerndichte und die NET-Häufigkeit haben.

Untersuchung verschiedener Oxygenatormodelle

In folgenden Auswertungen wurden quantitative Einzelkernauswertungen sowie qualitative Auswertung Einzelkern- und Clot-enthaltender Bildabschnitte verschiedener Oxygenatormodelle gegenübergestellt.

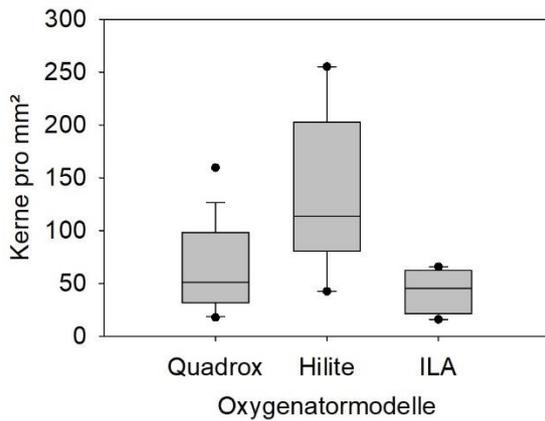


Abbildung 61: Quantitative Einzelkernbetrachtung: Oxygenatormodelle Quadrox (n=24) und ILA (n=4) tragen eine signifikant niedrigere Kerndichte als Hilite-Oxygenatoren (n=8). (ANOVA: $p=0,02$)

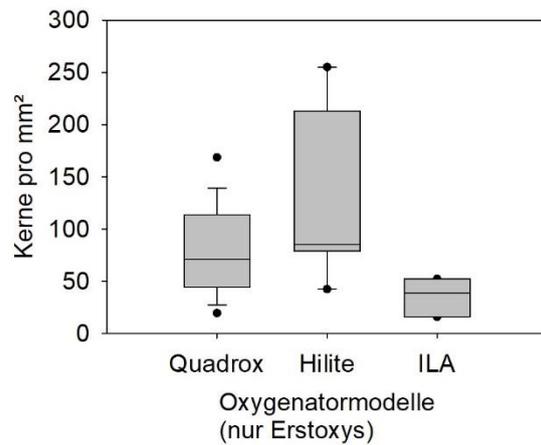


Abbildung 62: Quantitative Einzelkernbetrachtung, nur Erstoxigenatoren. Oxygenatormodelle Quadrox (n=17) und ILA (n=3) tragen eine signifikant niedrigere Kerndichte als Hilite-Oxygenatoren (n=7). (ANOVA: $p=0,03$)

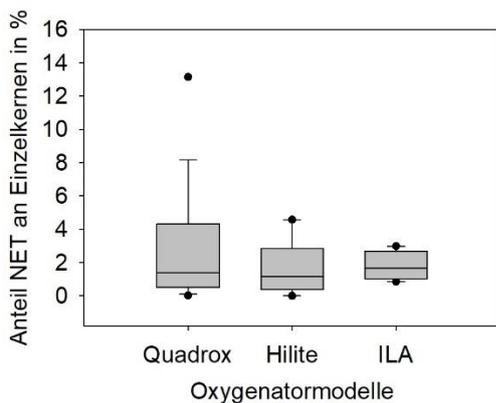


Abbildung 63: Quantitative Einzelkernbetrachtung: Quadrox (n=24), Hilite (n=8), ILA (n=4): Zwischen den verschiedenen Oxygenatormodellen besteht kein signifikanter Unterschied im Anteil der NET-positiven Einzelkerne. (Kruskal-Wallis-Test: $p=0,73$)

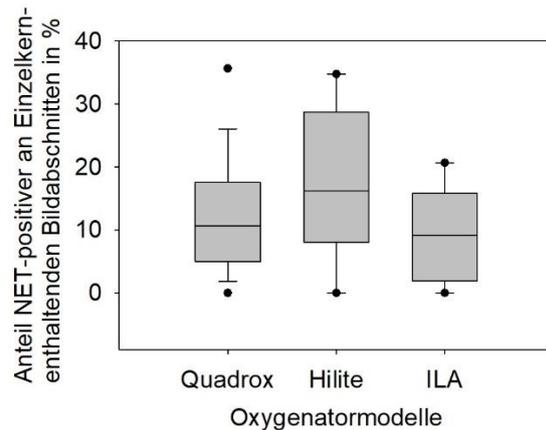


Abbildung 64: Qualitative Betrachtung Einzelkern-enthaltender Bildabschnitte: Quadrox (n=34), Hilite (n=8), ILA (n=6): Zwischen den verschiedenen Oxygenatormodellen besteht kein signifikanter Unterschied im Anteil der NET-positiven Einzelkern-enthaltenden Bildabschnitte. (ANOVA: $p=0,29$)

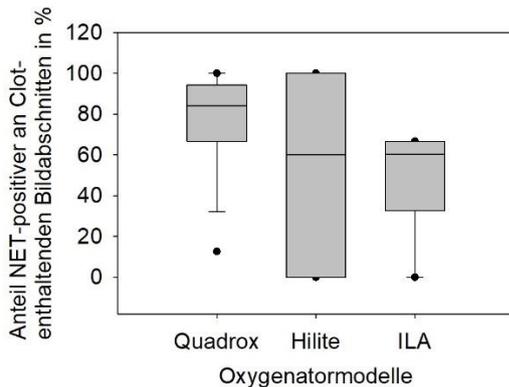


Abbildung 65: Qualitative Betrachtung Clot-enthaltender Bildabschnitte: Quadrox n=34, Hilite n= 8, ILA n=6: Bei den Quadrox-Oxygenatoren ist der Anteil der NET-positiven Clot-enthaltenden Bildabschnitte signifikant höher, als bei Hilite- und ILA-Oxygenatoren (Kruskal-Wallis-Test: p=0,02)

Die Kerndichte auf den untersuchten Quadrox-Oxygenatoren (MW $65,3 \pm 40,7$ Kerne pro mm^2) und ILA-Oxygenatoren (MW $43,23 \pm 18,4$ Kerne pro mm^2) war signifikant niedriger, als auf den Hilite-Oxygenatoren (MW $134,2 \pm 69,3$ Kerne pro mm^2) (Abbildung 61). Es ergibt sich daraus die Fragestellung, ob die höhere Kerndichte auf der Gasauschermembran durch andere Faktoren wie Oxygenatorlaufzeit oder laufende Nummer des Oxygenators am Patienten begründet werden kann. Zwar war die durchschnittliche Laufzeit der in dieser Auswahl untersuchten Hilite-Oxygenatoren mit durchschnittlich 5,5 Tagen geringer als bei Quadrox-Oxygenatoren (7,7 Tage) und ILA-Oxygenatoren (9,2 Tage), wie aus Abbildungen 71 und 72 hervorgeht, konnte jedoch keine Abhängigkeit der Zellkerndichte von der Oxygenatorlaufzeit gefunden werden.

Bezüglich der laufenden Nummer der Oxygenatoren ist festzustellen, dass von insgesamt acht in diese Auswertung eingehenden Hilite-Präparate sieben aus Erstoxygenatoren (= den ersten an den Patienten eingesetzten Oxygenatoren) stammten. Zu einem Präparat lagen hierzu keine Daten vor. Von 24 Präparaten aus Quadrox-Oxygenatoren stammten hingegen vier Präparate aus Oxygenatoren, die am Patienten nach Oxygenatortausch (=Ersatzoxygenatoren) eingesetzt waren. Zu drei Präparaten lagen keine Daten vor. Auch bei den ILA-Präparaten stammte eines von vier aus einem Ersatzoxygenator. Die Auswertung wurde deshalb an ausschließlich Erstoxygenator-Präparaten wiederholt (Abbildung 62). Auch nach Entfernung von

Ersatzoxygenatoren bleibt die Zellkerndichte bei Hilite-Oxygenatoren gegenüber Quadrox- und ILA-Oxygenatoren signifikant erhöht.

Während die Zellkerndichte sich abhängig vom untersuchten Oxygenatormodell signifikant unterscheidet, besteht kein signifikanter Unterschied in den Anteilen der NET-positiven Einzelkerne (Abbildung 63) sowie im Auftreten von NETs in der qualitativen Einzelkern-Abschnitts-Auswertung (Abbildung 64). Bei der qualitativen Betrachtung Clot-enthaltender Bildabschnitte ergab sich bei Quadrox-Oxygenatoren ein signifikant häufigeres Auftreten NET-positiver Bildabschnitte, als bei Oxygenatoren der Modelle Hilite und ILA (Abbildung 65).

ECMO-Modus (Veno-Arteriell vs. Veno-Venös)

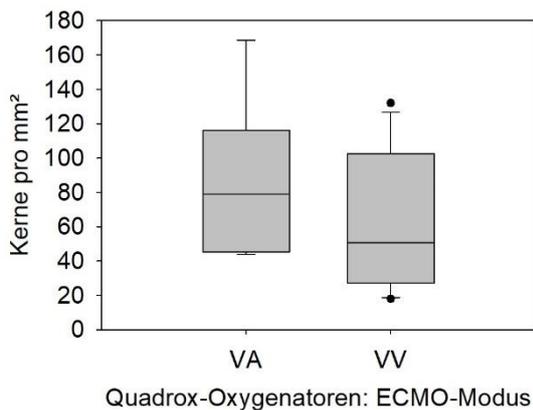


Abbildung 66: Quantitative Einzelkernbetrachtung: Kerndichte abhängig vom ECMO-MODUS; n(VA) n=7 vs. n(VV)=14; Untersucht wurden hierbei alle als „zählbar“ eingestuften Oxygenatoren des Modells Quadrox. Zwischen den beiden Gruppen besteht kein signifikanter Unterschied. (Mann-Whitney-U-Test: p=0,19)

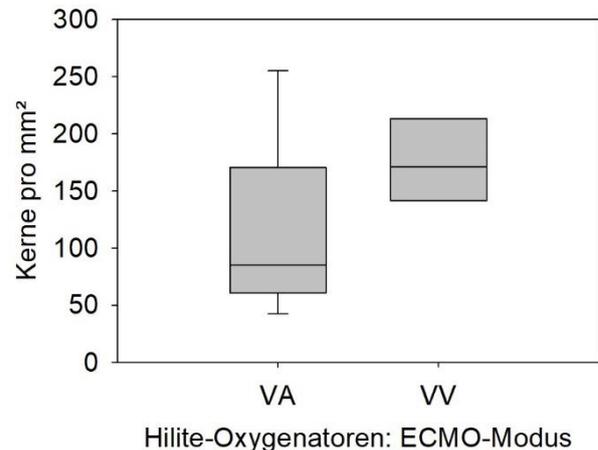


Abbildung 67: Quantitative Einzelkernbetrachtung: Kerndichte abhängig vom ECMO-Modus. Untersucht wurden hierbei alle als „zählbar“ eingestuften Oxygenatoren des Modells Hilite; n(VA)=5; n(VV)=3; Zwischen den beiden Gruppen besteht kein signifikanter Unterschied. (Mann-Whitney-U-Test: p=0,25)

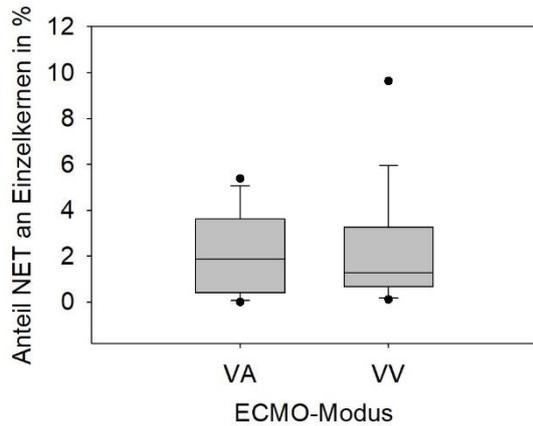


Abbildung 68: Quantitative Einzelkernbetrachtung: Zwischen den NET-Anteilen an Einzelkernen zwischen VA-ECMO (n=13) und VV-ECMO (n=21) besteht kein signifikanter Unterschied. (Mann-Whitney-U-Test: p=0,89)

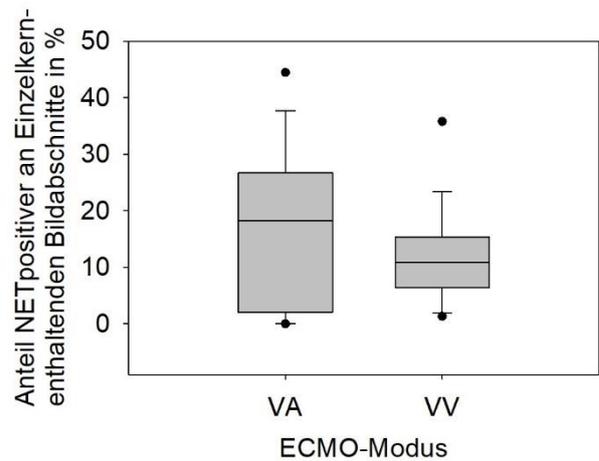


Abbildung 69: Qualitative Auswertung Einzelkern-enthaltender Bildabschnitte: Es konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. (n(VA)=16, n(VV)=33; Mann-Whitney-U-Test: p=0,49)

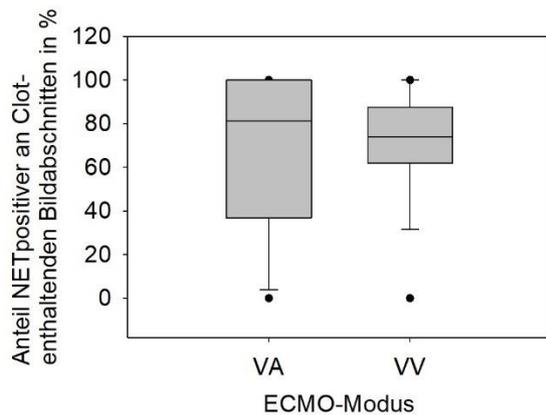


Abbildung 70: Qualitative Auswertung Clot-enthaltender Bildabschnitte: Es konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. (n(VA)=16, n(VV)=33; Mann-Whitney-U-Test: p=0,81)

Abbildungen 66 und 67 zeigen die Kerndichte auf den untersuchten Oxygenatorpräparaten abhängig vom verwendeten ECMO-Modus (Kanülierungsart) an. Weil sich die Kerndichten abhängig vom verwendeten Oxygenatormodell unterscheiden können (Abbildung 61), wurden für diese Auswertung zwei Oxygenatormodelle separat untersucht. Der Unterschied in der Kerndichte ist statistisch nicht signifikant.

In Abbildungen 68 bis 70 wird ersichtlich, dass der verwendete ECMO-Modus (VA vs. VV) keinen signifikanten Einfluss auf die gefundenen NET-Anteile hat.

Laufzeit des Oxygenators

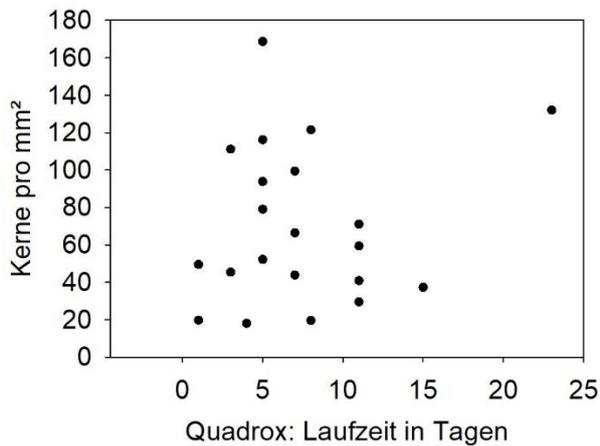


Abbildung 71: Darstellung der Kerndichte auf Oxygenatorpräparaten vs. deren Laufzeit in Tagen: Ausschließlich Oxygenatoren des Modells Quadrox. Es besteht kein signifikanter Zusammenhang zwischen den beiden Parametern. (n=21)

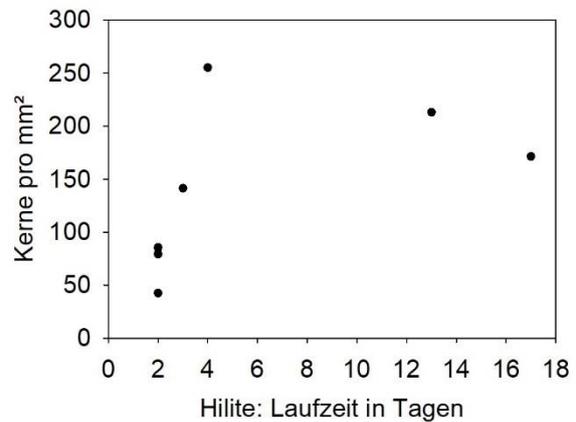


Abbildung 72: Darstellung der Kerndichte auf Oxygenatorpräparaten vs. deren Laufzeit in Tagen. Ausschließlich Oxygenatoren des Modells Hilite: Zwei Präparate aus Oxy #55 weisen bei identischer Laufzeit identische Kerndichten auf, ein drittes eine sehr ähnliche Kerndichte. Es besteht kein signifikanter Zusammenhang zwischen den beiden Parametern. (n=8)

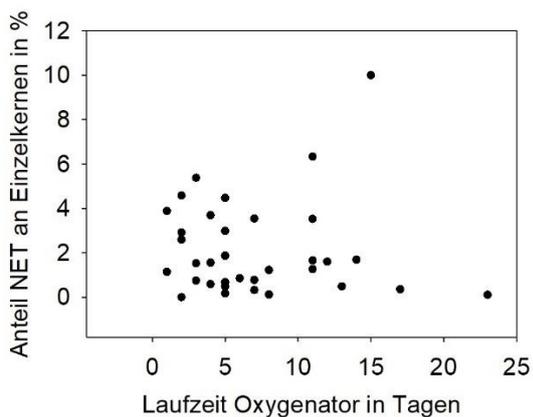


Abbildung 73: Anteil von NETs an Einzelkernen gegenüber der Oxygenatorlaufzeit in Tagen: Es konnte keine Korrelation gefunden werden. (n=34)

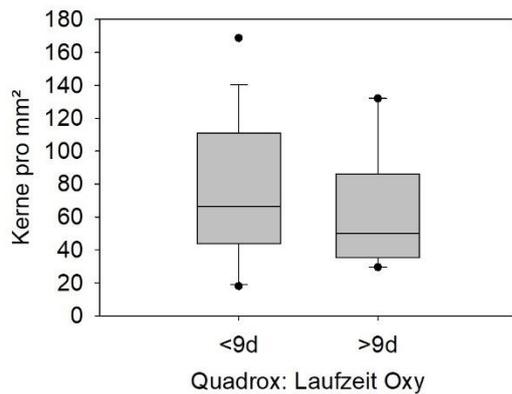


Abbildung 74: Kerndichte auf Oxygenatorpräparaten gegen deren Laufzeit in Tagen in Gruppen kürzer (<9d) und länger als 9 Tage (>9d): ausschließlich Oxygenatoren des Modells Quadrox. Zwischen den beiden Gruppen ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen. (n(<9d)=15; n(>9d)=6)

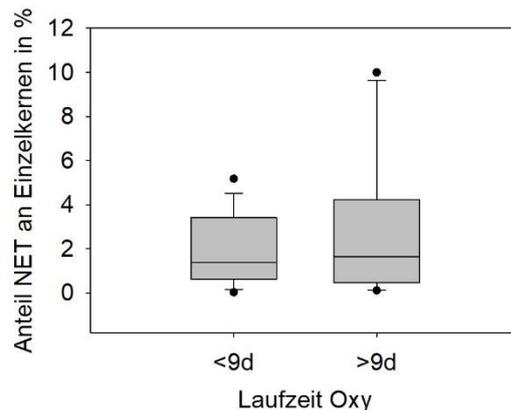


Abbildung 75: Quantitative NET-Auswertung an Einzelkernen: Zwischen den beiden Gruppen ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen. (n(<9d)=24, n(>9d)=10)

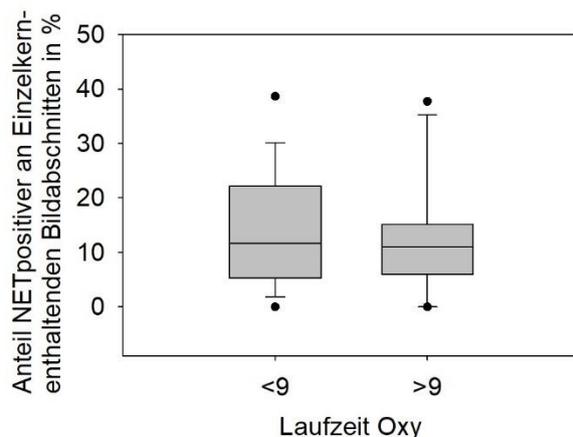


Abbildung 76: Qualitative Betrachtung Einzelkern-enthaltender Bildabschnitte: Es besteht kein signifikanter Unterschied im Auftreten von NETs. (n(<9d)=31, n(>9d)=18)

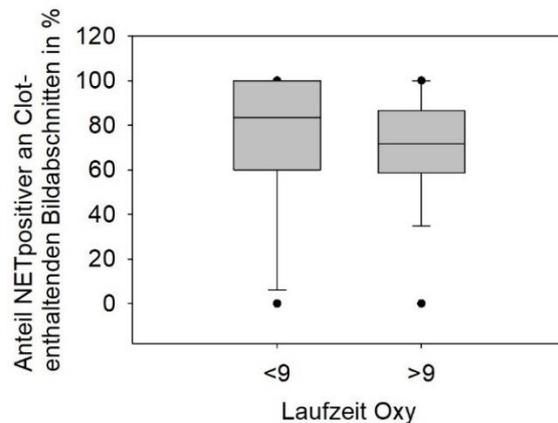


Abbildung 77: Qualitative Betrachtung Clot-enthaltender Bildabschnitte: Es besteht kein signifikanter Unterschied im Auftreten von NETs. (n(<9d)=31, n(>9d)=18)

Weil sich die Kerndichten abhängig vom verwendeten Oxygenatormodell unterscheiden können (Abbildung 61), wurden die betreffenden Auswertungen für verschiedene Oxygenatormodelle getrennt voneinander durchgeführt.

Es konnte keine Korrelation zwischen Oxygenatorlaufzeit in Tagen mit der Kerndichte sowie den Anteilen von NETs an Einzelkernen gefunden werden (Abbildungen 71 bis 73).

Die Durchschnittliche Oxygenatorlaufzeit betrug neun Tage, weshalb für die Auswertung der Kerndichte und NET-Frequenz zwei Referenzgruppen (Laufzeit kürzer /länger als neun Tage) gebildet und verglichen wurden. Unter den in die verschiedenen Auswertungen eingehenden Oxygenatoren („zählbare“ und „eingeschränkt zählbare“) gab es keine mit genau neun Tagen Laufzeit.

In den beiden Gruppen (kürzere vs. längere Oxygenatorlaufzeit als neun Tage) konnte kein statistisch signifikanter Unterschied in den Kerndichten sowie Anteilen von NETs, bzw. NET-positiven Bildabschnitten gefunden werden (Abbildungen 74 bis 77).

Wechsel des Oxygenators und laufende Oxygenatornummer

Die im Folgenden miteinander verglichenen Gruppen werden in 2.2.2.5. definiert.

Laufende Nummer des Oxygenators

Es wurde weiterhin untersucht, inwiefern sich Erstoxygenatoren von Ersatzoxygenatoren (Zweit- und Drittoxygenatoren nach Oxygenatortausch) hinsichtlich Zellkerndichte und NET-Auftreten unterscheiden.

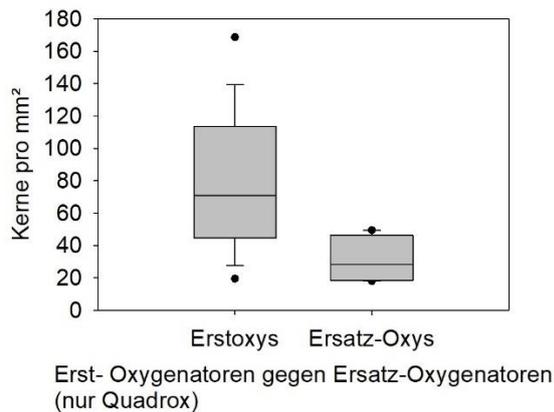


Abbildung 78: Untersuchung der Kerndichte an Erstoxygenatoren gegenüber Ersatzoxygenatoren: ausschließlich Modell Quadrox: Die Kerndichte in Erstoxygenatoren (n=17) war signifikant höher als in Ersatzoxygenatoren (n=4). (t-Test: p=0,03)

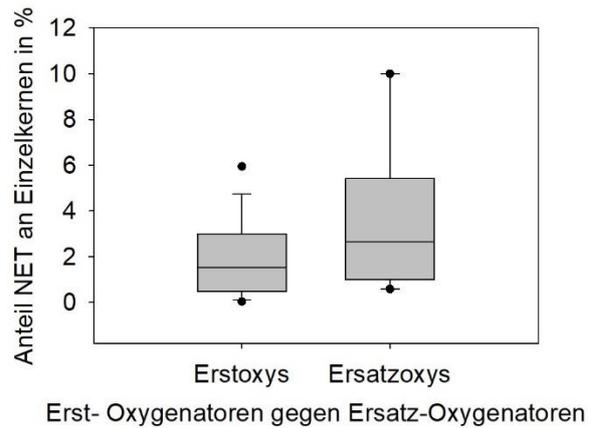


Abbildung 79: Untersuchung der NET-Anteile an Einzelkernen bei Erstoxygenatoren gegenüber Ersatzoxygenatoren: Es lässt sich beim Anteil von NETs an Einzelkernen kein signifikanter Unterschied zwischen Erstoxygenatoren (n=27) und Ersatzoxygenatoren (n=6) feststellen. (Mann-Whitney-U-Test : p=0,23)

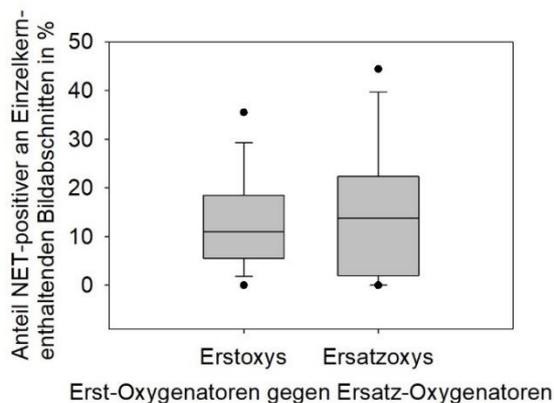


Abbildung 80: qualitative Untersuchung der Anteile NET-positiver Einzelkern-enthaltender Bildabschnitte von. Erstoxygenatoren (n=34) gegenüber Ersatzoxygenatoren (n=14). Es ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen (Mann-Whitney-U-Test: p=0,70).

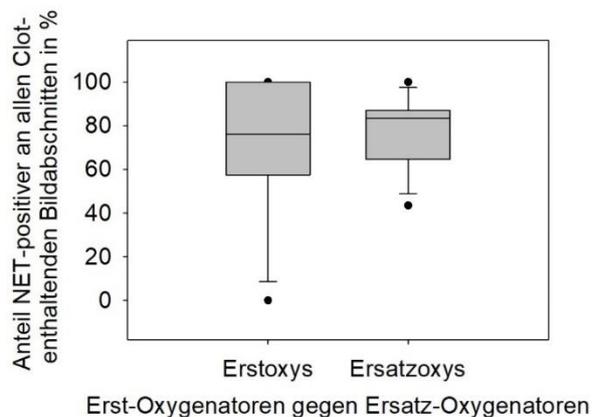


Abbildung 81: qualitative Untersuchung der Anteile NET-positiver Clot-enthaltender Bildabschnitte von. Erstoxygenatoren (n=34) gegenüber Ersatzoxygenatoren (n=14): Es ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen (Mann-Whitney-U-Test: p=0,96).

Erstoxygenatoren weisen eine höhere Zellkerndichte auf als Ersatzoxygenatoren (Abbildung 78). Die Auswertung erfolgte ausschließlich bei Quadrox-Oxygenatoren. Weder in der quantitativen Einzelkernauswertung, noch in der qualitativen Bildabschnittsbetrachtung (Einzelkern- und Clot- enthaltende Bildabschnitte) konnte ein Unterschied im Auftreten von NETs zwischen Erst- und Ersatzoxygenatoren gefunden werden (Abbildungen 79 bis 81).

Endoxygenatoren vs. ausgewechselte Oxygenatoren

Weiter wurde untersucht, ob zwischen Endoxygenatoren (Therapie-Ende wegen erfolgreichem Weaning oder Versterben) und ausgewechselten Oxygenatoren („Wechseloxy“) Unterschiede in Zellkernbeladung und der NET-Häufigkeit auftraten.

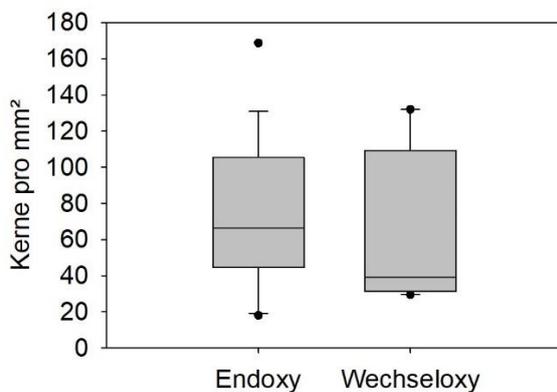


Abbildung 82: Untersuchung der Kerndichte an Endoxygenatoren (n=17) gegenüber ausgewechselten Oxygenatoren (n=4). Ausschließlich Modell Quadrox: Es besteht kein signifikanter Unterschied. (t-Test: p=0,60)

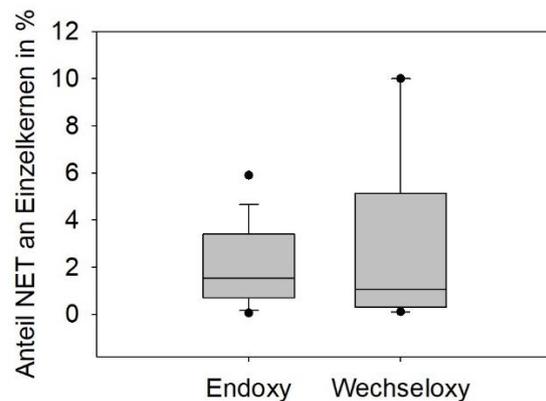


Abbildung 83: Untersuchung der NET-Anteile an Einzelkernen von Endoxygenatoren (n=28) gegenüber ausgewechselten Oxygenatoren (n=6). Es besteht kein signifikanter Unterschied. (Mann-Whitney-U-Test p=0,70)

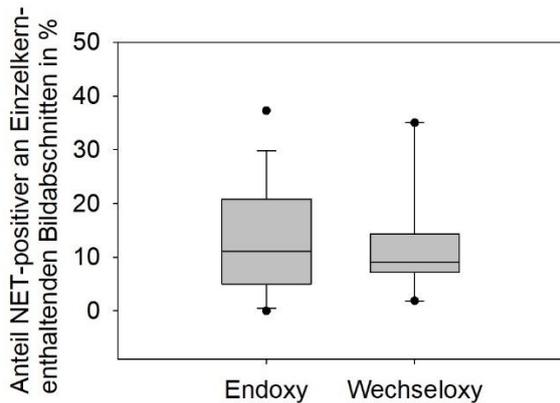


Abbildung 84: qualitative Untersuchung der Anteile NET-positiver Einzelkern-enthaltender Bildabschnitte von Endoxygenatoren (n=42) gegenüber Wechseloxygenatoren (n=7): Es ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen. (Mann-Whitney-U-Test $p=0,79$)

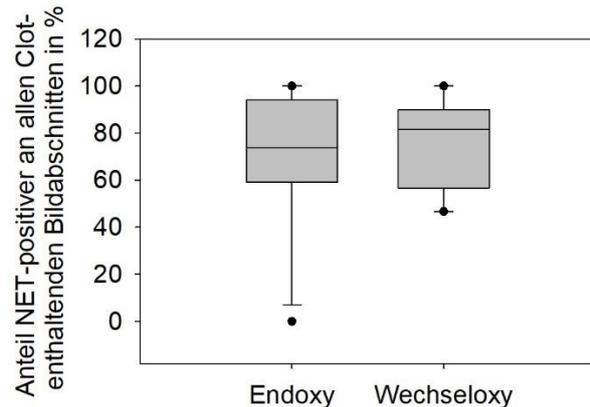


Abbildung 85: qualitative Untersuchung der Anteile NET-positiver Clot-enthaltender Bildabschnitte von Endoxygenatoren gegenüber Wechseloxygenatoren: Es ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen. (Mann-Whitney-U-Test $p=0,92$)

Bezüglich der gefundenen Kerndichten sowie der quantitativen und qualitativen NET-Anteile konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Endoxygenatoren und ausgewechselten Oxygenatoren gefunden werden.

Geweante vs. ausgewechselte Oxygenatoren

Im Folgenden wurden ausschließlich Endoxygenatoren nach erfolgreichem Weaning (ohne Oxygenatoren von Patienten, die während der ECMO-Behandlung oder bis zu einem Tag nach ECMO-Explantation verstarben) ausgewechselten Oxygenatoren („Wechseloxys“) gegenübergestellt.

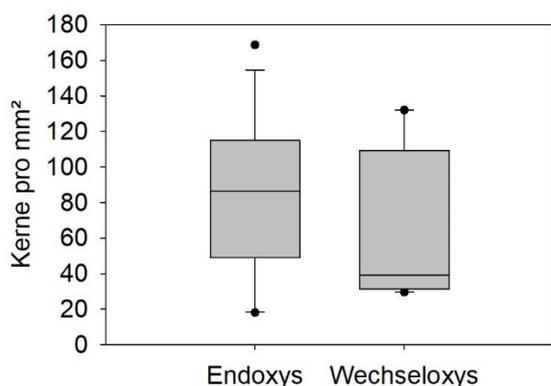


Abbildung 86: Untersuchung der Kerndichte an Endoxygenatoren nach Weaning (n=12) gegenüber ausgewechselten Oxygenatoren (n=4). Ausschließlich Modell Quadrox: Es besteht kein signifikanter Unterschied. (t-Test: $p=0,38$)

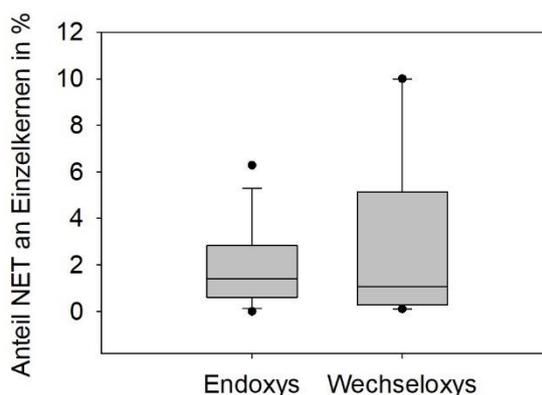


Abbildung 87: Untersuchung der NET-Anteile an Einzelkernen von Endoxygenatoren nach Weaning (n=20) gegenüber ausgewechselten Oxygenatoren (n=6): Es besteht kein signifikanter Unterschied. (Mann-Whitney-U-Test: $p=0,88$)

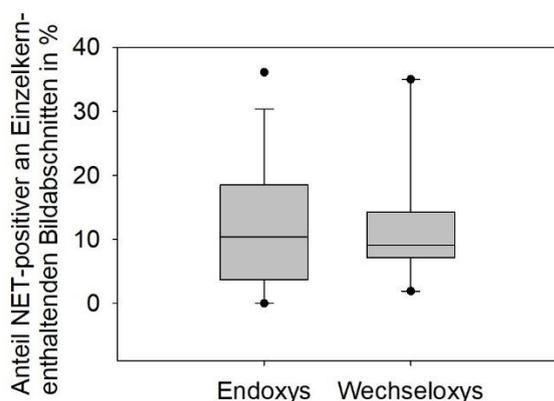


Abbildung 88: qualitative Untersuchung der Anteile NET-positiver Einzelkern-enthaltender Bildabschnitte von Endoxygenatoren nach Weaning (n=30) gegenüber Wechseloxygenatoren (n=7): Es ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen. (Mann-Whitney-U-Test: $p=0,89$)

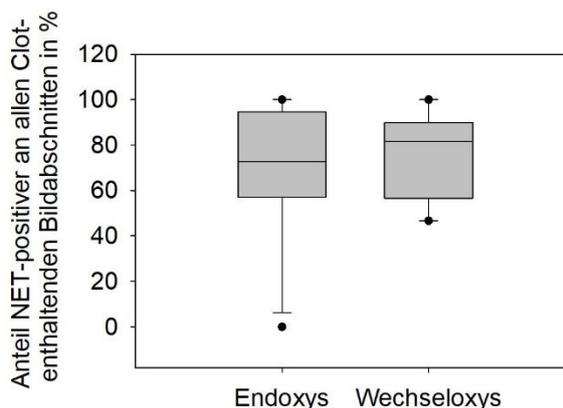
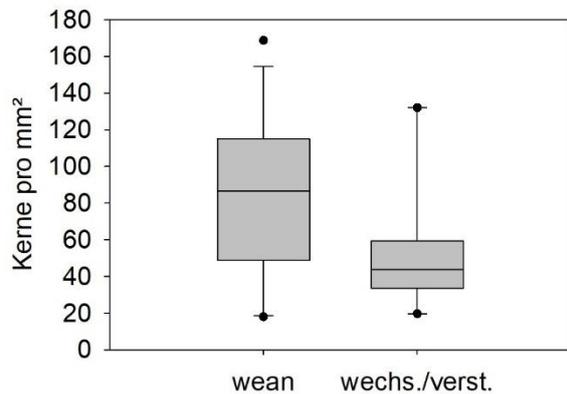


Abbildung 89: qualitative Untersuchung der Anteile NET-positiver Clot-enthaltender Bildabschnitte von Endoxygenatoren nach Weaning (n=30) gegenüber Wechseloxygenatoren (n=7): Es ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen. (Mann-Whitney-U-Test: $p=0,83$)

Auch zwischen Endoxygenatoren nach erfolgreichem ECMO-Weaning und ausgewechselten Oxygenatoren wurden keine signifikanten Unterschiede in den Kerndichten sowie in den quantitativen und qualitativen NET-Anteilen gefunden.

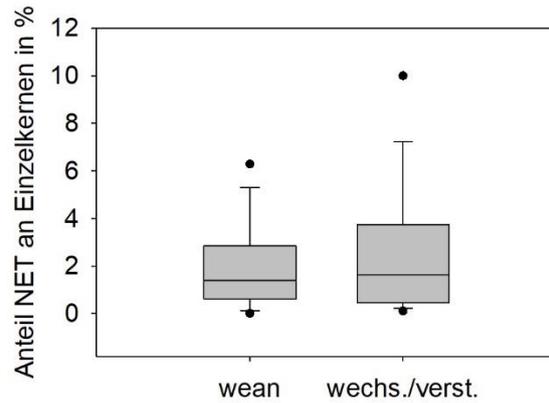
Geweante vs. ausgewechselte und Oxygenatoren von verstorbenen Patienten

Im Folgenden sind erfolgreich geweante Oxygenatoren gegenübergestellt, die aufgrund von Komplikationen ausgewechselt werden mussten („Wechseloxys“) oder während deren Anwendung oder bis zu einem Tag nach Explantation die Patienten verstarben.



geweante Oxys vs. gewechselte Oxys und Oxys von verstorbenen Patienten

Abbildung 90: Untersuchung der Kerndichte an geweanten Oxygenatoren (n=12) gegenüber ausgewechselten Oxygenatoren und Oxygenatoren von unter ECMO verstorbenen Patienten (n=9): Ausschließlich Modell Quadrox: Der Unterschied verpasst knapp das Signifikanzniveau. (t-Test: p=0,09)



geweante Oxys vs. gewechselte Oxys und Oxys von verstorbenen Patienten

Abbildung 91: quantitative Untersuchung der NET-Anteile an Einzelkernen von geweanten Oxygenatoren (n=20) gegenüber ausgewechselten Oxygenatoren und Oxygenatoren von unter ECMO verstorbenen Patienten (n=14): Es besteht kein signifikanter Unterschied. (Mann-Whitney-U-Test: p=0,64)

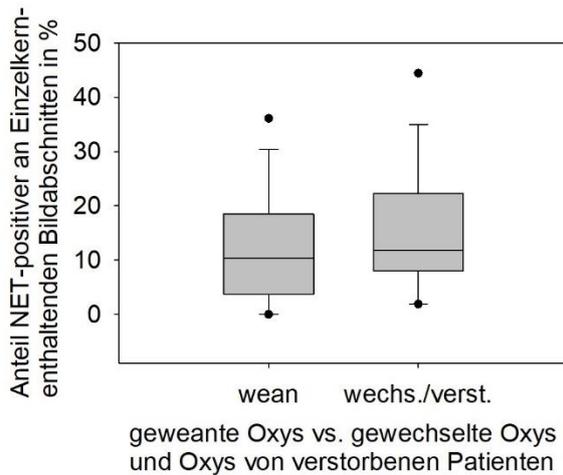


Abbildung 92: qualitative Untersuchung der Anteile NET-positiver Einzelkern-enthaltender Bildabschnitte geweanter Oxygenatoren (n=30) gegenüber ausgewechselten Oxygenatoren und Oxygenatoren von unter ECMO verstorbenen Patienten (n=19): Es besteht kein signifikanter Unterschied. (Mann-Whitney-U-Test: $p=0,26$)

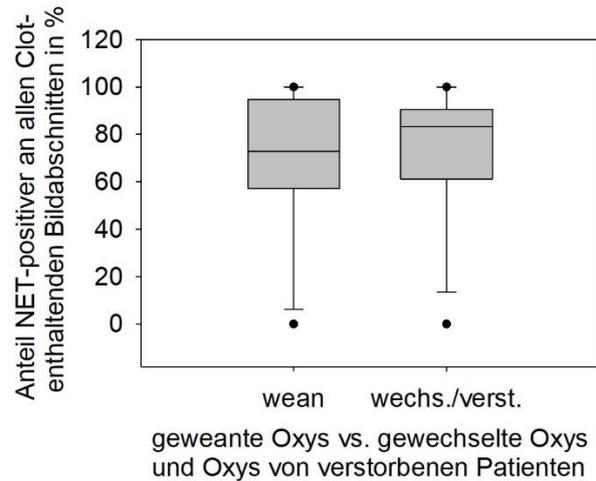


Abbildung 93: qualitative Untersuchung der Anteile NET-positiver Clot-enthaltender Bildabschnitte geweanter Oxygenatoren (n=30) gegenüber ausgewechselten Oxygenatoren und Oxygenatoren von unter ECMO verstorbenen Patienten (n=19): Es besteht kein signifikanter Unterschied. (Mann-Whitney-U-Test: $p=0,92$)

Bezüglich der Kerndichte und der quantitativen wie qualitativen NET-Anteile wurden zwischen den beiden Gruppen keine Unterschiede gefunden.

SOFA-Score

Es wurde ein möglicher Zusammenhang von Kerndichte und dem Auftreten von NET mit dem SOFA-Score (sepsis-related organ failure assessment score) untersucht. Bezüglich Kerndichte oder Auftreten von NETs konnte kein Unterschied zwischen Oxygenatoren von Patienten mit einem initialen SOFA-Score bis zu 12 Punkten und Oxygenatoren von Patienten mit mehr als 12 Punkten ermittelt werden (Siehe Abbildungen 94–97).

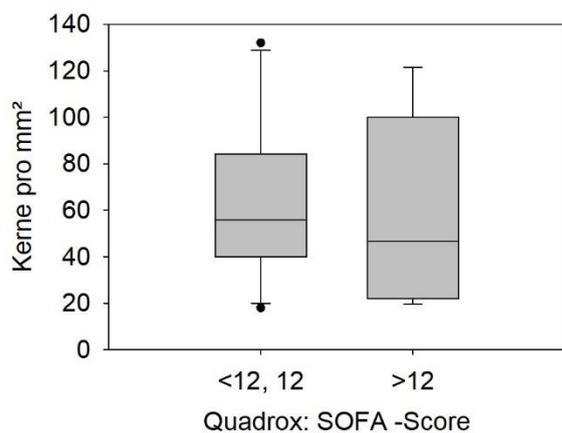


Abbildung 94: Untersuchung der Kerndichte in Oxygenatoren von Patienten mit einem initialen SOFA-Score bis 12 Punkte (n=10) gegenüber >12 Punkte (n=8); ausschließlich Modell Quadrox: Es lässt sich kein signifikanter Unterschied feststellen. (t-Test: p=0,73)

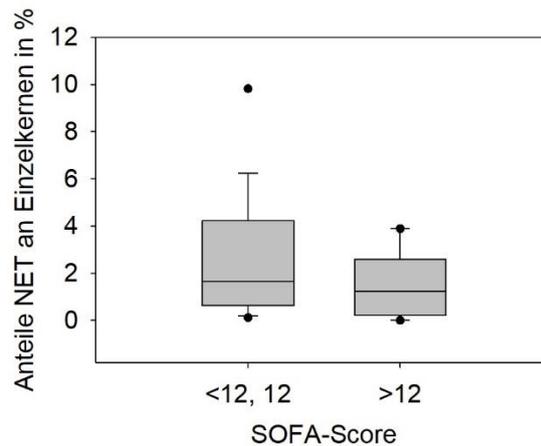


Abbildung 95: Untersuchung der NET-Anteile in Oxygenatoren von Patienten mit einem initialen SOFA-Score bis 12 Punkte (n=20) gegenüber >12 Punkte (n=9): Es lässt sich kein signifikanter Unterschied feststellen. (Mann-Whitney-U-Test: p=0,31)

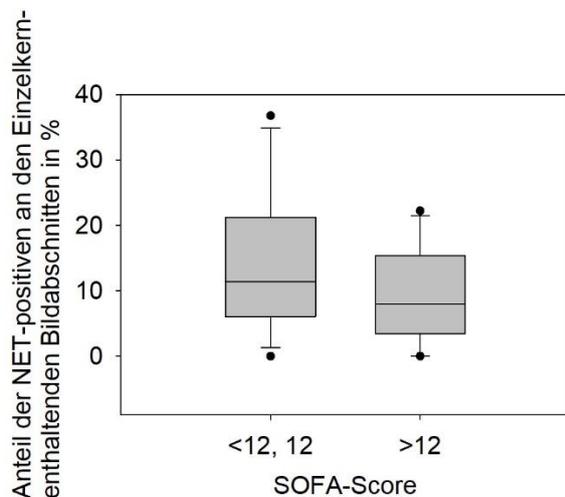


Abbildung 96: qualitative Bewertung Einzelkern-enthaltender Bildabschnitte in Oxygenatoren von Patienten mit einem initialen SOFA-Score bis 12 Punkte (n=26) gegenüber >12 Punkte (n=17): Zwischen den beiden Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied gefunden werden. (t-Test: p=0,11)

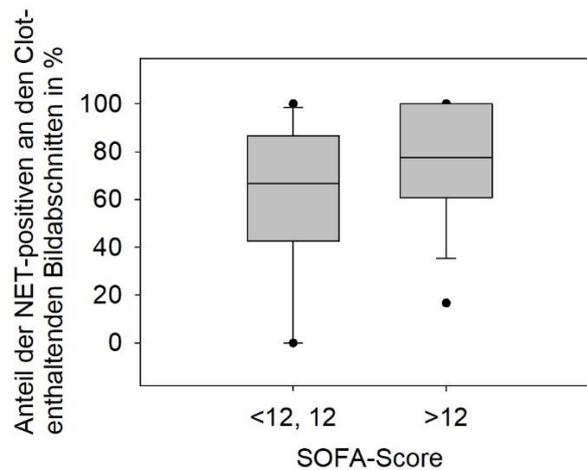


Abbildung 97: qualitative Bewertung Clot-enthaltender Bildabschnitte in Oxygenatoren von Patienten mit einem initialen SOFA-Score bis 12 Punkte (n=26) gegenüber >12 Punkte (n=17): Zwischen den beiden Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied gefunden werden. (Mann-Whitney-U-Test: p=0,24)

Überleben oder Versterben der Patienten an ECMO

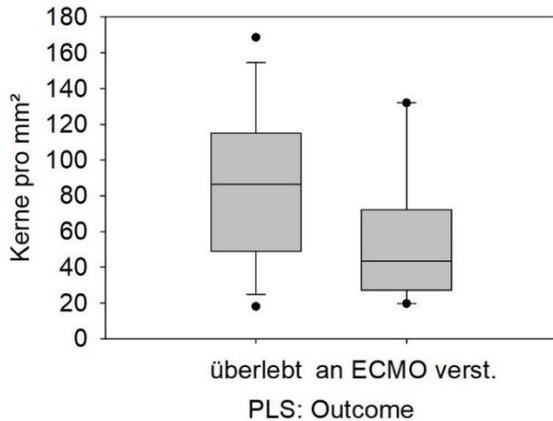


Abbildung 98: Quantitative Einzelkernbetrachtung von Oxygenatoren überlebt-habender Patienten (n=12) gegenüber Oxygenatoren verstorbener Patienten (n=6). Ausschließlich Modell Quadrox: Der Unterschied in der Kerndichte zwischen Präparaten von an-ECMO-überlebt-habenden gegenüber an-ECMO-verstorbenen Patienten ist statistisch nicht signifikant. (t-Test: $p=0,14$)

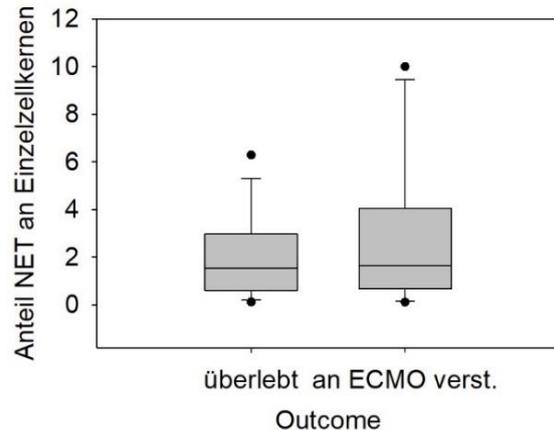


Abbildung 99: Quantitative Einzelkernbetrachtung von Oxygenatoren überlebt-habender Patienten (n=20) gegenüber Oxygenatoren verstorbener Patienten (n=10): Zwischen den Präparaten von an-ECMO-überlebt-habenden und an-ECMO-verstorbenen Patienten lässt sich bezüglich des Anteils des Auftretens der NETs an Einzelkernen kein Unterschied feststellen. (Mann-Whitney-U-Test: $p=0,64$)

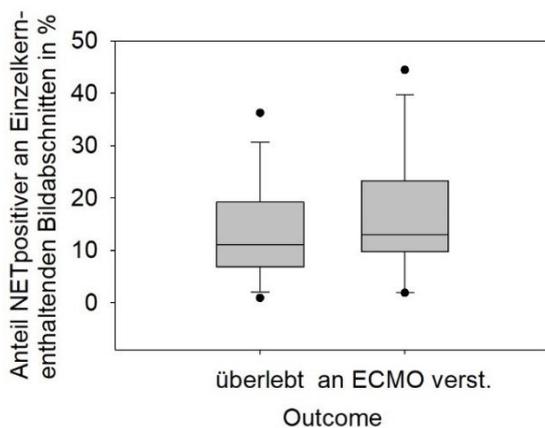


Abbildung 100: Qualitative Betrachtung Einzelkern-enthaltender Bildabschnitte von Oxygenatoren überlebt-habender Patienten (n=29) gegenüber Oxygenatoren verstorbener Patienten (n=14): Es besteht kein signifikanter Unterschied. (Mann-Whitney-U-Test: $p=0,35$)

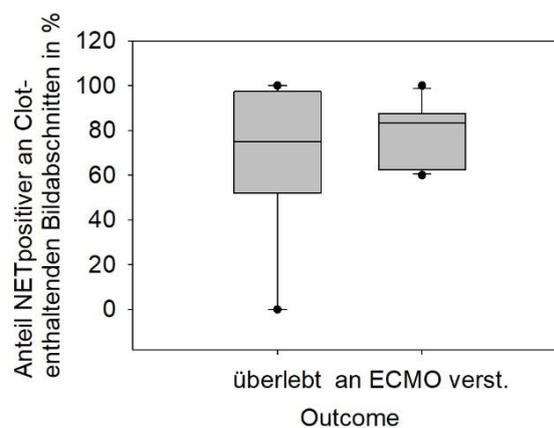


Abbildung 101: Qualitative Betrachtung Clot-enthaltender Bildabschnitte von Oxygenatoren überlebt-habender Patienten (n=29) gegenüber Oxygenatoren verstorbener Patienten (n=14): Es besteht kein signifikanter Unterschied. (Mann-Whitney-U-Test: $p=0,78$)

Zwischen den beiden Patientengruppen („an ECMO überlebt“ vs. „am System verstorben“) konnte bezüglich der ermittelten Kerndichten kein signifikanter Unterschied gefunden werden. (Abbildung 98)

Ebenso konnten abhängig vom Outcome keine signifikanten Unterschiede in den Anteilen der NET-positiven Zellkerne an Einzelzellkernen, sowie in den Anteilen der NET-positiven an den Einzelkern-enthaltenden Bildabschnitten und den Clot-enthaltenden Bildabschnitten gefunden werden (Abbildungen 99 - 101).

4. Diskussion

In der vorliegenden Studie wurden erstmals Neutrophil Extracellular Traps bei auf Gasfasermatten von gebrauchten ECMO-Oxygenatoren adhärierten Blutzellen nachgewiesen. Mit Hilfe einer archivierten Fotodokumentation einer Vorgängerarbeit, in der zelluläre Ablagerungen auf diesen Gasfasern mittels DAPI-Färbung dargestellt wurden, wurden NET-artige Strukturen identifiziert. Diese bestanden aus deutlich vergrößerten Zellkernen und faden-/netzartigen DNA-Strukturen. Neuerliche DNA-Färbungen von Präparaten aus denselben Oxygenatoren zeigten zwar signifikante Anhäufungen von Zellkernen um die Kreuzungspunkte, jedoch war der Anteil an NET-Strukturen entlang der Gasfaser gleichmäßig verteilt. Eine Quantifizierung war nur auf Einzelzelebene möglich, bei Zellaggregaten oder Pseudomembranen war nur eine qualitative Aussage möglich. Der Anteil an NET-positiven Kernen auf den Präparaten war unabhängig vom Oxygenatortyp, Kanülierung der ECMO (VV vs. VA), Überleben oder Versterben der Patienten am System, Oxygenatorlaufzeit, laufender Nummer des Oxygenators am Patienten und SOFA-Score.

4.1. Morphologische Identifizierung von NETs

In einigen Arbeiten wurden morphologische Charakteristika von NETs zur Identifikation und Quantifikation herangezogen (41,65,66,74–77,80). Meist wurde jedoch lediglich das gemeinsame Vorliegen freier DNA und Neutrophilen-spezifischer Proteine als NET identifiziert. Wenige Arbeiten beschränkten sich auf alleinige DNA-Anfärbungen (75,79,80), wobei bei den zwei letztgenannten automatisierte Verfahren zum Einsatz kamen.

In der vorliegenden Arbeit wurden NETs rein morphologisch mittels DAPI-Färbung identifiziert, wenn extrazelluläre DNA-Fäden mit einer Länge von mindestens 10µm vorlagen. Nachdem der primäre Verdacht auf das Vorkommen von NETs auf Gastauschermembranen in ECMO an vorbestehenden DAPI-Aufnahmen aufgekommen war, und weiterhin in einer Literaturrecherche kein anderer für DNA-Fäden verantwortlicher Mechanismus gefunden wurde, scheint die angewandte Methode der morphologischen NET-Identifikation mittels DAPI geeignet, NETs mit einer ausreichenden Spezifität zu identifizieren. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass schwach ausgeprägte NETs aufgrund einer Fadenlänge kleiner 10µm oder zu geringer Kontrastierung hierbei nicht erfasst wurden.

4.2. Färbetechnik und Fluoreszenzmikroskopie

Die verwendete DAPI-Kernfärbung und Visualisierung mittels Fluoreszenzmikroskopie erlaubt die Identifizierung von NET-Strukturen, wie in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden konnte (75,79). Ein Vorteil der alleinigen DNA-Färbung mit Eingrenzung auf DNA-Fäden/Netzen ist die kostengünstige Methode, da keine teuren Antikörper notwendig sind. Allerdings birgt diese Methodik auch Limitationen: Sie gilt als unspezifisch, da der Zellursprung nicht nachweisbar ist. Unter physiologischen Bedingungen machen Granulozyten etwa 60 % der kernhaltigen Blutzellen aus, wovon wiederum etwa 95% Neutrophile Granulozyten sind (92). Auch bei anderen weißen Blutzellen wie Monozyten, Mastzellen, Makrophagen und eosinophilen Granulozyten sind in der Literatur ähnliche Formen des Zelluntergangs beschrieben (93–95), die mit der angewandten Methode nicht von NETs differenziert werden können.

Als Goldstandard für die Identifikation und Quantifizierung von NETs gilt daher die Immunfluoreszenzfärbung bestehend aus Färbung von extrazellulärer DNA, Histonen und Neutrophilen-spezifischer Proteine wie Neutrophiler Elastase (NE) und Myeloperoxidase (MPO) (83,84,87,89). Marker wie NE und MPO sind allerdings nicht nur in NETs, sondern auch in intakten Neutrophilen Granulozyten anfärbbar, sodass auch hier nicht immer Spezifität für NETs gegeben scheint (80). Zudem ist die Anbindung granulärer Neutrophilenproteine an die DNA nicht notwendigerweise mit NETose verbunden.

Weiterhin ist die (Immun-) Fluoreszenzfärbung sehr zeitaufwendig (82,87) und die Analyse mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucherabhängig und anfällig gegenüber subjektiven

Unterschieden in der Bewertung (82,87,96). Diese Erkenntnis deckt sich mit eigenen Beobachtungen. Vier Präparate wurden sowohl von einer Mitarbeiterin aus dem Labor, als auch unabhängig davon vom Autor untersucht. Erstere Auswerterin identifizierte bei nahezu gleichen Kernzahlen systematisch deutlich mehr NETs als der Autor (siehe Abbildung 46).

Eine Alternative zur gängigen DNA-Anfärbung mittels HOECHST-Farbstoffen oder DAPI, die insbesondere intrazelluläre DNA anfärben, ist die Verwendung von Propidiumiodid (z.B. in (66)), SYTOX Green oder SYTOX Orange, die die intakte Kernmembran nicht passieren können und lediglich in extrazelluläre DNA interkalieren (82,83). In einer Vorstudie konnte gezeigt werden, dass SYTOX Green die Darstellung der NET-Strukturen erweitert, allerdings bleicht dieser Farbstoff sehr schnell aus, wodurch die systematische Untersuchung auf dem Präparat erschwert wurde (Daten nicht publiziert). Eine weitere Methode, freigesetzte DNA von NETs zu identifizieren, ist die Untersuchung auf citrullierte Histone, welche bei der NET-Entstehung mit der DNA freigesetzt werden (30,82,87). Die Probleme bezüglich Objektivierbarkeit und Quantifizierbarkeit blieben dabei ähnlich (83).

4.3. Unterscheidung verschiedener NET-Stadien

Neubert et al. definierten 2018 drei Stadien der NET-Freisetzung (88) anhand der Veränderung der chromatin-gefüllten Kernfläche nach Stimulation mit PMA: In der ersten Phase nach Stimulation bleibt die lobuläre Zellstruktur intakt und die chromatin-gefüllte Fläche konstant. Schließlich kommt es in der zweiten Phase zur Chromatinexpansion, bis sie die Zellmembran erreicht. Gleichzeitig verformt sich die ganze Zelle rundlich. In der dritten Phase rupturiert die Zellmembran, das Chromatin gelangt nach extrazellulär. Diese Umformung und Einnahme der Kugelform sei am ehesten auf die Anschwellung des Chromatins im Rahmen der Dekondensation zurückzuführen.

Diese Charakterisierung lag der vorliegenden Arbeit zugrunde (2.1.2.1). So wurden „geschwollene Zellkerne“, NET-II und NET-III definiert. Eine initial definierte Kategorie ‚NET-I‘ wurde aufgrund mangelnder Abgrenzbarkeit zu normal konfigurierten Neutrophilen Granulozyten nicht fortgeführt. Es wurden kontrastarme, blass angefärbte und über übliche Kerngrößen hinausgehende rundliche Zellkerne identifiziert (Abbildung 6). Diese könnten morphologisch einem Korrelat zur zweiten Phase nach den von Neubert et al. beschriebenen Stadien (Chromatinexpansion) entsprechen (88). In der Auswertung der vorbestehenden

Fotodokumentation wurden 1,5 % der Zellkerne als mögliche NET-Vorstufe diesem Stadium zugeordnet. Weiterhin wurden als „NET-II“ diejenigen Zellkerne identifiziert, die keine klassische lobuläre Kernstruktur neutrophiler Granulozyten aufwiesen, dagegen aber mit Ausbuchtungen versehen waren, die die halbe Kerngröße überstiegen, oder unscharf begrenzte Verformungen aufwiesen. Hier liegt, gerade bei unscharf begrenzten Zellkernen mit vergrößerter Chromatinfläche ebenfalls oftmals nahe, dass sich die Zellkerne im Stadium der Chromatinexpansion befinden. Alternativ könnte es sich hierbei auch um fortgeschrittene NET-Stadien handeln, etwa im Moment der DNA-Ausschleusung (vgl. Abbildungen 2B und 4C in (97)), oder bereits in einem späten Stadium, bei dem extrazelluläre DNA-Fäden bereits durch Abbau oder DNA-Fäden nicht mehr zur Darstellung gekommen sein könnten.

Eine sichere Differenzierung von geschwollenen Zellkernen und NET-II zu normal konfigurierten Zellkernen oder Zellkernen, die sich in einem anderen Zelltodprozess befinden, ist jedoch mit ausschließlich einer Chromatin-Anfärbung nicht möglich. Für eine sichere Identifikation als NET hätten hierzu spezifische NET-Marker eingesetzt werden müssen (82). Die beiden genannten Kategorien (geschwollene Zellkerne und NET-II) kamen deshalb in der NET-Bewertung eigens angefertigter Präparate nicht zur Anwendung.

Die Darstellung der „NET-III“ entsprach am ehesten der klassischen NETose. Diese Kernmorphologie erlaubt eine Abgrenzung zu anderen Arten des Zelluntergangs, der Apoptose bzw. Nekrose. Bei Apoptose kommt es zur nukleären Kondensation und Spaltung der DNA, es werden nur kleine, pyknotische Fragmente freigesetzt (98,99). Bei der Nekrose von Neutrophilen Granulozyten kommt es zu einer moderaten Chromatin-Kondensation und ebenfalls zu einer teilweisen DNA-Fragmentation unter anderem durch Reaktive Sauerstoff Species (ROS) (98,99). Lediglich im Rahmen von NETose sind extrazelluläre DNA-Fäden/Netze beschrieben. Folglich wurden in der vorliegenden Arbeit ausschließlich DNA-Fäden von mindestens 10 µm Länge und daraus bestehende Netzwerke als sicheres NET-Korrelat erfasst. In den eigens untersuchten Präparaten wurde lediglich diese Kategorie als NET, ohne den Zusatz „-III“ bezeichnet.

4.4. Existenz und Häufigkeit von NET-Strukturen auf Gasfasern von gebrauchten Oxygenatoren (Fotodokumentation einer Vorstudie)

Die primäre Sichtung NET-verdächtiger Strukturen auf Gastauschermembranen bei ECMO erfolgte als Zufallsbefund im Rahmen einer Arbeit von J. Wilm (90). Die dabei entstandenen Aufnahmen der Fotodokumentation, die im ersten Teil der vorliegenden Arbeit als Grundlage für NET-Klassifizierung (2.1.2.1.) und einer ersten Quantifizierung (3.1.2.2.) herangezogen wurden, sind deshalb mit Fokus auf andere Fragestellungen entstanden, und deshalb nicht als systematisch verzerrt bezüglich des Vorkommens von NETs zu betrachten. Diese 400x-Aufnahmen erlaubten die Identifizierung und Quantifizierung von NET-Strukturen (88). So wurden 7,2% der Zellkerne als NET-II und 1,5% aller fokussierten Zellkerne als mögliche NET-Vorstufe „aufgeblähte Zellkerne“ klassifiziert. Ca. 0,6% der Zellkerne wurden als NET-III kategorisiert. In 33 von 53 (=62%) Oxygenatorpräparaten waren NET-III nachweisbar.

Nachdem die Aufnahmen in der Bilddatenbank meist Aggregate von mehreren Zellkernen abbildeten, waren hierbei oft nicht alle Strukturen fokussiert in der Bildebene gelegen. Zudem war die Bildbelichtung nicht ideal zur NET-Identifikation ausgewählt. Aufgrund der im Vergleich zur starken Anfärbung von Zellkern-DNA oft nur schwach ausgeprägten Anfärbung der dekondensierten DNA-Fäden in NETs, wäre für die Detektion letzterer oft eine höhere Belichtung (mit daraus resultierender Überbelichtung der intakten Zellkerne) notwendig gewesen. Dies wurde in der Untersuchung eigens hergestellter Präparate berücksichtigt, sodass eine höhere Sensitivität in der Detektion von NETs erwartet werden konnte. Dies könnte der Grund sein, weshalb in der systematischen Untersuchung auf NETs an eigens hergestellten Präparaten ein wesentlich höherer Anteil von NETs an Einzelkernen (2,2%) identifiziert wurde, als in der Auswertung der Bilder der vorbestehenden Fotodokumentation (0,6%, hier noch als NET-III bezeichnet).

Aufgrund der hohen Vergrößerung aus der Aufnahmen aus (90) waren zwar die Zellstrukturen gut sichtbar, jedoch war keine Zuordnung zu definierten Bereichen auf der Gasfaser möglich. Von besonderem Interesse waren primär die Kreuzungspunkte übereinanderliegender Gasfasern. An diesen Stellen sind von den Zwischenräumen unterschiedliche Strömungsverhältnisse zu vermuten (14,100). Auffallend war, dass es dort zu einer Anhäufung von Zellkernen kommt (90).

4.5. Identifizierung von Kernablagerungen und von NET-Strukturen entlang der Gasfasern anhand neuer Präparate

Die Herstellung neuer Präparate derselben Oxygenatoren ermöglichte es, neben der NET-Analyse auch eine Aussage zur Zelldichte bzw. Verteilung der Auflagerungen auf dem gesamten Präparat zu machen.

Dabei zeichnete sich eine sehr heterogene Verteilung der Auflagerungen ab. Nach visuellem Eindruck war nur etwa auf einem Viertel der Präparate eine das ganze Präparat gleichmäßig bedeckende Zellkernadhäsion festzustellen. Außerdem war nur in 40 von 78 Präparaten (= 51%) mehr als die Hälfte der rechnerisch vorhandenen Kreuzungspunkte anhand der Zellkernadhäsion identifizierbar. Weiterhin zeigte sich, dass der vorherrschende Kernbesatz auf den Präparaten entweder aus streng auf den Gastauschermembranen adhärenen Einzelzellkernen (35 von 81 Präparaten) oder aus verschiedenartig ausgeprägten Zellkernkonglomeraten („Clots“) (35 von 81) bestand.

In 27 von 81 (= 34 %) Präparaten waren die Zellkerne überwiegend an Kreuzungspunkten adhäriert, in 45 (= 55%) Präparaten war eine zwischen den beiden Bildabschnitten gleichmäßige Zellkernverteilung festzustellen. Im Vergleich dazu identifizierte Wilm in 37% der untersuchten Oxygenatorpräparate eine starke Häufung von Zellkernen an Kreuzungspunkten, in 34% eine schwache Häufung, und in 29% diffuse Zellkernverteilung ohne Bezug zu Kreuzungspunkten aufeinanderliegender Gaskapillaren (90).

Unterschiedliche Gründe für die heterogene Zellkernadhäsion sind denkbar: 30 von 79 Präparaten wiesen einen plötzlichen Abbruch eines vorhandenen, regelmäßigen Kernbesatzes auf. Dieses Phänomen wird in vorliegender Arbeit als Leerbereich bezeichnet. Als mögliche Ursachen kommen eine fehlende Blutzelladhäsion im ECMO-Betrieb (u. U. durch fehlende Perfusion hinter Mikrothromben), punktuelle Abspülung der adhärenen Zellen im ECMO-Betrieb oder in der Oxygenator-Präparation, sowie Abriss von Kernverbänden in der Präparateherstellung in Betracht. Birkenmaier et al. untersuchten im Rahmen einer Machbarkeitsstudie einzelne gebrauchte Oxygenatoren mittels Mikro-Computertomographie auf ihre Thrombenbeladung (101). In den angefertigten Schnittbildern (Abbildung 102) kamen Leerbereich-ähnliche plötzliche Aussparungen weitgehend regelmäßiger Thrombenauflagerungen zur Darstellung, was nahelegt, dass für Leerbereiche nicht ausschließlich durch Abriss von Zellverbänden bei der Präparateherstellung ursächlich ist.

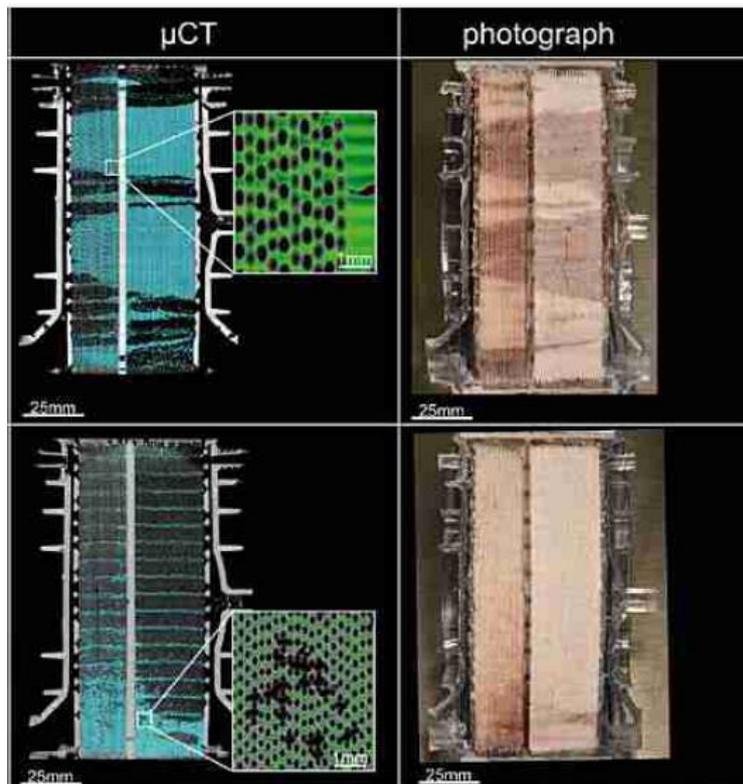


Abbildung 102: Birkenmaier et al. (101): Links: Mikro-Computertomographie gebrauchter ECMO-Oxygenatoren: Regelmäßige Thrombusadhäsionen weisen plötzliche Aussparungen auf; Rechts: vergleichend dazu Fotografie derselben Oxygenatoren nach Eröffnung und Anschnitt der Gasauschermembranen

Ferner traten in 56 von 81 (=69%) untersuchten Übersichtsaufnahmen relevante Mengen gasfaserüberspannende Zell- und Fibrinbeläge, sogenannte Pseudomembranen (14) auf. Diese Strukturen wurden bereits von Wilm et al. 2018 identifiziert, jedoch nur mit einer Frequenz von 14 % der Präparate (90). Sie scheinen durch das Verlängern der Diffusionsstrecke für eine Verschlechterung des Gasaustauschs des Oxygenators verantwortlich zu sein, ihr Vorliegen hat jedoch keinen Einfluss auf das Outcome (102). Dropco et al. identifizierten in (103) Pseudomembranen auf 22% der Präparate. Die Unterschiede dürften dadurch zustande kommen, dass nicht dieselben Präparate analysiert wurden, sondern nur Präparate aus denselben Oxygenatoren. Das heißt, die Präparate stammen aus unterschiedlichen Bereichen im Oxygenator, könnten also von „thrombenfreien“ Stellen oder aus „Thrombenauflagerungen“ stammen. Letzteres wurde in der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt.

In 2,2% aller einzeln betrachteter Zellkerne wurden NETs identifiziert. Im Mittel waren $3,3\% \pm 6,2\%$ der Zellkerne eines Oxygenators NET-positiv. Es erscheint sinnvoll, diese Ergebnisse mit dem Auftreten von NETs im Blut von ECMO-Patienten zu korrelieren.

4.5.1. Vergleich von Kernablagerungen und von NET-Strukturen entlang der Gasfasern von Präparaten mehrfach untersuchter Oxygenatoren

Vergleicht man verschiedene (stichprobenartig entnommene) Präparate aus einem Oxygenator (3.2.1.3), war nur in etwa der Hälfte der Fälle die Identifizierbarkeit der rechnerisch möglichen Kreuzungspunkte zwischen zwei verschiedenen Präparaten mehrfach untersuchter Oxygenatoren ähnlich. Weiterhin traten in etwa $2/3$ der Fälle zwischen zwei Präparaten selber Oxygenatoren ähnliche Anteile an Leerbereichen auf der Gasaustauschermembran auf. Daraus ist zu schließen, dass stichprobenhaft aus dem Oxygenator entnommene Proben bezüglich der Homogenität zellulärer Verbände nicht als repräsentativ für den untersuchten Oxygenator betrachtet werden können. Dagegen wurden in der quantitativen Einzelkernbewertung zwischen verschiedenen Präparaten derselben Oxygenatoren vergleichbare Kerndichten gefunden (3.2.2.2.), während sich die NET-Anteile deutlich unterschieden. Letzteres dürfte darauf zurückzuführen sein, dass nur eine sehr geringe NET-Frequenz auf den ECMO-Gasfasern ermittelt wurde, wodurch sich Unterschiede nur bedingt abbilden lassen. In der qualitativen Bewertung Clot-enthaltender Bildabschnitte (3.2.2.4.) fiel eine sehr unterschiedliche Verteilung von Clots zwischen verschiedenen Präparaten selber Oxygenatoren auf. Deren NET-Anteile waren wiederum meist ähnlich untereinander.

Zusammenfassend scheinen die Stichproben bezüglich des Vorkommens von Einzelzellkernablagerungen meist übereinzustimmen. Bezüglich des Auftretens von NET bei Einzelkernen besteht häufig keine Übereinstimmung. Clots sind ungleichmäßig verteilt. Clots enthielten meist NETs, wobei eine Quantifizierung hier nicht möglich war. In der Mikroskopie von aus dem Oxygenator gewonnenen Thromben identifizierten Staessens et al. im Median 4,1% für H3Cit als NET-Marker positive Fläche (55).

4.5.2. Identifizierung von Kernablagerungen und von NET-Strukturen an den Kreuzungspunkten und deren Zwischenräumen

Wie bereits in früheren Arbeiten (14,25,90) gezeigt, wurde die überwiegende Akkumulation von Zellkernen um die Kreuzungspunkte auch in der vorliegenden Studie bestätigt.

Eine mögliche Erklärung für die Häufung von Zellkernen an den Kreuzungspunkten im Vergleich zu den Zwischenräumen könnten unterschiedliche Strömungsverhältnisse darstellen. Birkenmeier et al. berechneten Strömungsverhältnisse um die Kreuzungspunkte (abgebildet in (100)). In der Simulation zeigten sich höchste Flussgeschwindigkeiten jeweils mittig im Zwischenraum zweier Kreuzungspunkte. Im direkten Umfeld der Kreuzungspunkte wäre hingegen mit niedrigeren Flussgeschwindigkeiten bis hin zur Blutstase zu rechnen. Dadurch könnte das Anhaften von Zellen u.U. erleichtert werden. Letzteres spielt beispielsweise auch bei der in-vitro-Endothelialisierung von synthetischen vaskulären Grafts mit Hilfe eines Bioreaktors eine wichtige Rolle (104). Hier zeigte sich eine stärkere Zelladhäsion bei niedrigen gegenüber hohen Flussgeschwindigkeiten. Entsprechende Biophysikalische Mechanismen zum Zell-Substrat-Kontakt unter Scherkräften sind bislang nur wenig untersucht (105). Hierzu sind weitere Strömungsanalysen nötig.

Yu et al. untersuchten 2018 in vitro den Einfluss von Scherkräften bei unterschiedlichen Strömungsverhältnissen auf die NET-Entstehung in Kollagen-beschichteten PDMS-Mikrofluidkanälen (49). Sowohl in Flussmodellen für arterielle als auch venöse Scherkräfte kam es zur raschen Thrombozytenadhäsion und Kanalokklusion, NETs waren hingegen nur im arteriellen Modell mit höheren Flussgeschwindigkeiten und damit einhergehend stärkeren Scherkräften identifizierbar. Es wäre daher denkbar, dass sich die NET-Anteile zwischen Kreuzungspunkten und Zwischenräumen aufgrund unterschiedlicher Scherkräfte unterscheiden. Im Gegensatz dazu war die NET-Verteilung an den Kreuzungspunkten und in den Zwischenräumen vergleichbar. Allerdings muss in der vorliegenden Studie berücksichtigt werden, dass die Frequenz von NET-Strukturen sehr niedrig ist, wodurch Unterschiede schwer abbildbar sind.

Weiterhin stellt sich die Frage, ob systematisch in verschiedenen Abschnitten der Oxygenatoren unterschiedlich hohe NET-Anteile auftreten. Hierfür erscheint die systematische Probenentnahme aus bei allen Oxygenatoren einheitlich festgelegten Abschnitten sinnvoll.

4.5.3. Korrelation von Kerndichte und NET-Frequenz

Es wurde untersucht, ob die Menge der Kernadhäsionen auf der Gastauschermembran mit dem Vorkommen von NETs korreliert.

In der quantitativen Einzelkernbewertung besteht eine negative Korrelation zwischen der Kerndichte und dem Auftreten von NETs. Mit zunehmender Kernzahl nimmt der Anteil der NET-III-positiven Zellkerne ab (Abbildungen 47 und 48).

Als mögliche Ursache ist hierbei eine zeitlich fortgeschrittene Zellkernadhäsion zu diskutieren, bei der ein Teil der NETs bereits wieder abgebaut war. Mehrere Arbeiten fanden so auch in älteren, organisierten Thromben weniger NETs als in frischen Thromben (34,40,41,73). Gegen diese Annahme spricht, dass kein Zusammenhang zwischen Laufzeit der Oxygenatoren im ECMO-Betrieb mit den NET-Anteilen an Einzelkernen gefunden wurde (3.2.2.5.).

4.6. Zusammenhang therapie- und patientenspezifischer Faktoren zu Kerndichte und NET-Frequenz

Für den Kliniker stellt sich die Frage, inwieweit Faktoren wie eingesetzter ECMO-Modus oder Laufzeit des eingesetzten Oxygenators Einfluss auf die NET-Häufigkeit haben.

Bezüglich der Bestimmung der Kerndichte in der vorliegenden Arbeit muss festgehalten werden, dass diese nur bei als „vollständig zählbar“ kategorisierten Präparaten erhoben wurde. Insbesondere Präparate ohne oder mit extrem ausgeprägter Zellkernadhäsion gingen folglich in die Auswertung der Kerndichten häufig nicht mit ein.

4.6.1. Verschiedene Oxygenatormodelle

Hilite-Oxygenatoren weisen im Schnitt eine höhere Zellkerndichte auf, als Quadrox- oder ILA-Oxygenatoren. Der Effekt ist nicht durch unterschiedliche laufende Nummer des Oxygenators am Patienten oder durch die Laufzeit des Oxygenators am Patienten zu erklären. Dieser Befund widerspricht den Beobachtungen von Dropco et al. in (103). Die Autoren führten unter anderem Messungen der DAPI-Fluoreszenzintensität als Maß der Zellkerndichte an Präparaten desselben Oxygenatorkollektivs durch. In Quadrox-Oxygenatoren sei eine im Median signifikant höhere DAPI-Fluoreszenz gemessen worden, als in Hilite-Oxygenatoren. Weiterhin sei auf Hilite-Oxygenatoren ausschließlich Einzelzellbeladung feststellbar gewesen.

Im Vergleich dazu waren in der vorliegenden Studie von 52 Präparaten des Oxygenatormodells Quadrox 24 (46,1%) “vollständig zählbar”, was eine fast ausschließliche Einzelzellkernbeladung bedeutet, beim Modell Hilite 8 von 15 Präparaten (53,3%).

Die Einzelkern-NET-Anteile unterscheiden sich nicht signifikant zwischen verschiedenen Oxygenatormodellen. Ebenso trat auch in der qualitativen Einzelkernabschnittsbetrachtung kein Unterschied bezüglich der gefundenen NET-Anteile auf.

Bei Quadrox-Oxygenatoren war der Anteil der NET-positiven Clot-enthaltenden Bildabschnitte signifikant höher, als bei Hilite- und ILA-Oxygenatoren. Bei der Betrachtung von einzelkernenthaltenden Abschnitten konnte hier kein Unterschied festgestellt werden. Am ehesten ist von einer zufälligen Häufung auszugehen.

Mögliche Erklärungen für die unterschiedliche Ausprägung zellulärer Ablagerungen liegen im unterschiedlichen Aufbau der Oxygenator-Modelle, mit daraus resultierenden unterschiedlichen Flusseigenschaften (106), sowie in unterschiedlichen antithrombotischen Membranbeschichtungen begründet.

4.6.2. ECMO-Modus

In der ECMO-Therapie werden im Wesentlichen drei unterschiedliche Kanülierungsarten angewandt, wobei sich die Patienten hinsichtlich der behandelten Krankheitsbilder unterscheiden. Bei isoliertem Kreislaufversagen oder kombiniertem Herz- und Lungenversagen kann Veno-Arterielle ECMO eingesetzt werden, bei ausschließlichem respiratorischem Versagen kommen VV-ECMO oder AV-ECMO (ILA) zum Einsatz. Letztere eignet sich besonders bei führender Decarboxylierungsstörung. Der Blutfluss durch den Membranoxygenator erfolgt hierbei ohne Pumpe, ausschließlich durch den Druckgradienten zwischen arteriellen und venösen Gefäßen angetrieben (107). Es werden bei ILA deshalb mit 1-2 l/min niedrigere Blutflüsse erreicht, als in VA- und VV-ECMO-Kreisläufen (VV: Zielwert ca. 4 l/min) (107,108). Reduzierter Blutfluss bis hin zur Stase kann im Oxygenator zu gesteigerter Thrombenentstehung beitragen (109). Aufgrund des niedrigeren Blutflusses wäre in ILA-Oxygenatoren gegenüber VV- und VA-Kreisläufen eine gesteigerte Zellkernadhäsion denkbar.

Weiterhin wäre auch aufgrund geringerer Scherkräfte eine geringere NET-Entstehung denkbar (vgl. 4.5.2.).

Lehle und Appelt zeigten in (110) und (111) eine sowohl in VV- als auch VA-ECMO bei höherem Blutfluss gesteigerte Hämolyse.

Weiterhin wären auch aufgrund der unterschiedlichen zugrundeliegenden Krankheitsbilder unterschiedliche NET-Anteile möglich. Während VA-ECMO hauptsächlich bei Patienten im kardiogenem Schock oder nach Operationen des Herzens verwendet wurde, kamen VV-ECMO und ILA meist aufgrund von ARDS, häufig aufgrund von Infektionen, zum Einsatz. Wie schon in 1.5. beschrieben, ist von einer maßgeblichen Mitwirkung von NETs an systemischen Infektionen auszugehen. Auch im Speziellen bei ARDS ist eine Beteiligung von NETs zu vermuten (57). Es wäre deshalb naheliegend, in VV- und ILA-Oxygenatoren aufgrund der häufigeren Infektionssituation mehr NETs zu erwarten, als in VA-Oxygenatoren.

Beide Hypothesen konnten in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Es fand sich kein Zusammenhang der ECMO-Kanülierung (VV vs. VA) zu Kerndichte oder NET-Häufigkeit.

Gegensätzlich zu genannten Vermutungen fanden Dropco et al. in Oxygenatoren aus VV-ECMO-Kreisläufen eine signifikant erhöhte DAPI-Fluoreszenz (als Maß für Ablagerung kernhaltiger Zellen) gegenüber Oxygenatoren aus VA-ECMO-Kreisläufen (103).

In den bereits in 4.5.2. erwähnten Strömungsmodellen von Yu et al. traten NETs ausschließlich im Modell für arteriellen Blutfluss, nicht jedoch im Modell für venösen Blutfluss auf (49). Auch hier sind gesteigerte Scherkräfte im arteriellen Modell gegenüber dem venösen Modell als ursächlich anzunehmen.

Auch Zhang et al. fanden im Tiermodell an Schafen signifikant erhöhte NET-Marker im Blut sechs Stunden nach ECMO-Initiierung bei VA-ECMO-Kreisläufen gegenüber VV-ECMO-Kreisläufen, wobei sich beide Marker (dsDNA und CitH3) in den weiteren Verlaufsuntersuchungen wieder dem Basalniveau annäherten (12).

Nachdem sich die Blutflüsse zwischen VV-ECMO und VA-ECMO im Membranoxygenator weniger stark unterscheiden als zwischen venösen und arteriellen Blutgefäßen, wäre es auch denkbar, dass deshalb kein Unterschied bezüglich auf Gastauschermembranen adhärerten NETs festgestellt werden konnte.

4.6.3. Laufzeit des Oxygenators

Es stellt sich die Frage, ob sich die NET-Raten der auf Gastauschermembranen adhären Granulozyten im Vergleich zu Granulozyten im Blut ebenfalls in solch kurzen Zeiträumen ändern. In der Untersuchung der NET-Rate bei Einzelkernen in Abhängigkeit von der Oxygenatorlaufzeit konnte keine Korrelation identifiziert werden (Abbildung 73).

DeBoer et al. fanden in älteren Koronararterienthromben weniger NETs, als in frischen (41). Dies legt nahe, dass sich auch auf der Gastauschermembran ein Gleichgewicht zwischen NET-Entstehung und Abbau, beispielsweise durch DNAsen einstellt. Möglicherweise konnten deshalb keine laufzeitabhängigen Unterschiede in den NET-Anteilen der adhären Zellkerne gefunden werden.

Denkbar wäre gewesen, dass zelluläre Ablagerungen auf Gastauschermembranen mit zunehmender Oxygenatorlaufzeit zunehmen. So fanden auch Gartner et al. einen signifikanten Zusammenhang zwischen Oxygenatorlaufzeit und thrombotischer Beladung (109). Auch Dropco et al. maßen eine niedrigere DAPI-Fluoreszenz als Maß für zelluläre Beladung in Oxygenatoren mit einer Laufzeit <9 Tage im Vergleich mit Oxygenatoren mit einer Laufzeit >9 Tage. Der Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant (103).

Lehle et al. (14) und Wilm et al. (90) fanden mit der vorliegenden Arbeit übereinstimmend keine oder keine signifikante Korrelation von Zellbeladung des Oxygenators zur Laufzeit. Auch das Volumen von mittels multi-detector-computed-tomography (MDCT) bestimmten Clots im Oxygenator ist unabhängig von der Oxygenatorlaufzeit (112).

Es ist daher anzunehmen, dass sich auch auf der Gastauschermembran rasch ein Gleichgewicht aus Zelladhäsion und Abräumung der adhären Zellen, zum Beispiel durch Abspülung und Fibrinolyse einstellt.

4.6.4. Wechsel des Oxygenators und laufende Oxygenatornummer

4.6.4.1. Laufende Nummer des Oxygenators

Erstoxygenatoren wiesen eine höhere Kerndichte auf, als Ersatzoxygenatoren (zweite und dritte Oxygenatoren nach einem Oxygenatorwechsel; Abbildung 78). Hierfür können unterschiedliche Gründe diskutiert werden. So wäre es z.B. möglich, dass die Patienten während des Einsatzes des ersten Oxygenators durchschnittlich noch schwerer erkrankt waren, als während des Einsatzes der folgenden Ersatzoxygenatoren, und sich die Thrombogenität

ihrer Blutzellen, bzw. deren Fähigkeit zur Adhäsion daher unterschied. Weiterhin ist auch ein direkter Einfluss des Oxygenatorwechsels auf die Gerinnungskaskade anzunehmen. Dornia et al. zeigten, dass Thrombozyten und Fibrinogen im Blut nach Oxygenatorwechsel ansteigen (112). Möglicherweise wird durch den Wechsel eine sich selbst verstärkende thrombogene Wirkung des ‚verclotteten‘ Oxygenators durchbrochen. Eine Abhängigkeit des Auftretens von NETs von der laufenden Oxygenatornummer war nicht feststellbar (Abbildungen 79 bis 71).

4.6.4.2. Geweante vs. ausgewechselte Oxygenatoren

Beim ECMO-Weaning wird der Blutfluss durch das System typischerweise reduziert, bis die Pumpe schließlich komplett abgeschaltet und die Kanülen explantiert werden. Bei Oxygenatoren aus geweanter ECMO-Therapie wären deshalb aufgrund des gegen Explantation niedrigeren Blutflusses eine stärkere Zellkernadhäsion und aufgrund niedrigerer Scherkräfte geringere NET-Raten denkbar, als bei ausgewechselten Oxygenatoren. In Abbildungen 86 bis 89 wurden deshalb Endoxygenatoren von erfolgreich von der ECMO geweanten Patienten ausgewechselten Oxygenatoren gegenübergestellt. Endoxygenatoren von verstorbenen Patienten wurden hierbei nicht berücksichtigt. Es konnten entgegen der Hypothese keine signifikanten Unterschiede in Zellkernbeladung sowie qualitativen und quantitativen NET-Anteilen gefunden werden.

4.6.4.3. Geweante vs. ausgewechselte und Oxygenatoren von verstorbenen Patienten

Weiterhin ist davon auszugehen, dass Patienten zum Zeitpunkt des ECMO-Weanings durchschnittlich weniger schwer krank waren, als Patienten, bei denen aufgrund von Komplikationen ein Oxygenatorwechsel notwendig wurde, oder die während der Therapie verstarben.

Aus diesem Grund erfolgte die Gegenüberstellung von geweanten Oxygenatoren zu Oxygenatoren, die ausgewechselt werden mussten und von verstorbenen Patienten stammende Oxygenatoren (Abbildungen 90 bis 93). Geweante Oxygenatoren wiesen eine durchschnittlich höhere Kerndichte auf als ausgewechselte und Oxygenatoren von verstorbenen Patienten, der Unterschied war allerdings nicht signifikant. Bezüglich des Auftretens von NETs ließen sich keine Unterschiede feststellen.

4.6.5. SOFA-Score

Nach der zuletzt 2016 aktualisierten Definition gilt eine lebensbedrohliche Organdysfunktion durch eine fehlregulierte Immunreaktion auf eine Infektion als Sepsis (113). Es wird angenommen, dass weltweit etwa 20% aller Todesfälle im Zusammenhang mit einer Sepsis stehen (114).

Mithilfe des SOFA-Score (Sequential Organ Failure Assessment- Score) kann die Schwere der Sepsis-assoziierten Organdysfunktion bestimmt werden (113). Der Score wurde speziell für Sepsis-Patienten entwickelt, ist aber auch für nicht an Sepsis erkrankte kritisch kranke Patienten auf Intensivstation anwendbar. Er bewertet mittels eines Punktesystems die Funktion der Organsysteme Atmung, Nervensystem, Herz-Kreislauf-System, Leber, Blutgerinnung sowie Niere. Ein initialer Punktwert >12 scheint mit einer Mortalitätsrate (Sterblichkeitsrate) von über 50% der Patienten einherzugehen (115).

Abrams et al. identifizierten eine lineare Korrelation zwischen im Blut zirkulierenden Histonen und SOFA-Scores bei Patienten mit akutem respiratorischen Versagen nach Trauma (116). Ebenfalls Abrams et al. untersuchten 2019 Blutserum und -Plasma von Patienten auf Intensivstation auf die Fähigkeit, isolierte Neutrophile Granulozyten zur NET-Bildung zu stimulieren (66). Hierbei seien zu allen Zeitpunkten (24, 48,72 Stunden nach Aufnahme) die medianen SOFA-Scores der Patienten, deren Blut eine moderate oder hohe NET-Stimulation bedingte, gegenüber Patienten, deren Blut keine oder nur geringe NET-Stimulation auslöste, signifikant erhöht gewesen. Weiter sei die Mortalität der Patienten mit moderater und hoher NET-Stimulation gegenüber den Patienten ohne oder mit geringer NET-Stimulation ebenfalls signifikant erhöht gewesen. Im Gegensatz zu diesen mittels Fluoreszenzmikroskopie morphologisch identifizierten NET- Häufungen hätten andere NET-Assays wie die Messung von cfDNA, MPO oder MPO-DNA-Komplexen keine Prädiktion von DIC oder Mortalität ermöglicht (66).

Nach beschriebener Datenlage (siehe 1.5.) wäre eine erhöhte NET-Inzidenz in Membranoxygenatoren bei Sepsis-Patienten zu vermuten gewesen. Dem gegenüber konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch keine Korrelation des vor ECMO-Implantation ermittelten SOFA-Score zum Auftreten von NET ermittelt werden. (Abbildungen 95-97) Hierzu ist zu beachten, dass die dokumentierten SOFA-Scores lediglich eine Momentaufnahme zu Beginn der ECMO-Therapie darstellten, und keine Verläufe untersucht wurden. Auch bezüglich der ermittelten Kerndichten konnte kein Zusammenhang zum SOFA-Score gefunden werden

(Abbildung 94). Wilm hingegen identifizierte eine nicht signifikante Korrelation des SOFA-Score zur Zellzahl (90), jedoch ausschließlich bei Maquet-Oxygenatoren (in dieser Arbeit als "Quadrox" bezeichnet).

4.6.6. Überleben oder Versterben der Patienten an ECMO

Wie in der Einleitung erwähnt, beschreiben mehrere Arbeiten eine Korrelation von NET-Inzidenz mit erhöhter Mortalität (64,66). Möglicherweise ist deren Quantifizierung auch als Prognosemarker sinnvoll.

In der bereits genannten Studie von Zhang et al. 2023 seien NET-Marker im Blut von am letzten Tag der ECMO-Therapie verstorbenen Patienten gegenüber den überlebt-habenden Patienten erhöht gewesen. Der Unterschied sei jedoch nicht signifikant gewesen., möglicherweise durch eine zu kleine Stichprobe bedingt (26).

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnte in der vorliegenden Arbeit kein Zusammenhang des Überlebens oder Versterbens der Patienten unter ECMO-Therapie zur NET-Häufigkeit auf Membranoxygenatoren gefunden werden.

Weiterhin konnte mit der Arbeit von Wilm (90) übereinstimmend kein Zusammenhang zwischen Zellbeladung und Überleben der Patienten identifiziert werden (Abbildung 98).

4.7. Limitationen der Studie

Die untersuchten Präparate bilden nur einen extrem kleinen, zufällig ausgewählten Bruchteil (ca. 0,5 cm²) der jeweiligen Oxygenatormembran (0,5-2,5 m²) (117) ab. In der vergleichenden Auswertung unterschiedlicher Präparate selber Oxygenatoren (Abbildung 50) konnte gezeigt werden, dass NETs nicht gleichmäßig auf der Gasauschermembran verteilt sind. Deshalb können von den untersuchten Stichproben nur bedingt Schlüsse auf die NET-Häufigkeit der Oxygenatoren im Gesamten geschlossen werden. Für die Quantifizierung auf der Oxygenatormembran adhärerter kernhaltiger Zellen erreicht die Methode eine höhere Repräsentativität (Abbildung 49).

Weiter kann mit der angewandten Methode nur der Endzustand des Oxygenators nach Therapieende oder Oxygenatortausch abgebildet werden. Die Verhältnisse bezüglich Kernablagerungen und Auftreten von NETs direkt nach dem ersten Blutkontakt, sowie ein engmaschiger zeitlicher Verlauf konnten im Design dieser Studie nicht untersucht werden.

Aufgrund der singulären DNA-Anfärbung ohne Zuhilfenahme NET-spezifischer Antikörper musste für die morphologische Identifizierung von NETs eine Mindestgröße der NET-Fäden festgelegt werden. Nur so konnte eine ausreichende Spezifität erreicht werden. In der Konsequenz wurden deshalb NETs mit Fadenlängen unter 10µm sowie Zellen, die sich möglicherweise in einem Vorstadium befanden, nicht erfasst. Es sind somit durchaus auch höhere NET-Raten als die gefundenen denkbar, die mittels angepasster Methodik erfasst werden könnten.

Eine weitere Limitation der vorliegenden Studie ist die für detailliertere Aufschlüsselungen zu kleine Stichprobe mit einer außerdem unterschiedlichen Verteilung der Oxygenatormodelle.

4.8. Ausblick

Möglicherweise könnte durch die Entwicklung noch besser hämokompatibler Membranoxygenatoren die NET-Rate und damit auch die Wahrscheinlichkeit einer Oxygenatorthrombose reduziert werden, was in ferner Zukunft beispielsweise auch die Implantierbarkeit einer artifiziellen Lunge ermöglichen könnte.

5. Zusammenfassung

Die Oxygenatorthrombose stellt eine wichtige Komplikation der ECMO-Therapie dar. Ein Mechanismus, der wesentlich an der Ausbildung von Thrombosen beteiligt ist, ist die Fähigkeit Neutrophiler Granulozyten, Neutrophil Extracellular Traps auszubilden.

In der vorliegenden Studie wurden erstmals Neutrophil Extracellular Traps bei auf Gasfasermatten von gebrauchten ECMO-Oxygenatoren adhärierten Blutzellen nachgewiesen.

Dazu wurde eine Methode zur morphologischen Identifikation von NETs erarbeitet.

Eine Quantifizierung von NETs konnte nur an einzelnen, nicht in Konglomeraten gelagerten Zellkernen erfolgen. NETs wurden dabei in insgesamt sehr niedriger Frequenz auf nahezu allen Präparaten identifiziert, wobei die Verteilung von NETs zwischen verschiedenen Präparaten selber Oxygenatoren sehr heterogen war. Lagen auf der Gastauschermembran Zellkernkonglomerate ("Clots") vor, so enthielten diese meist NETs. Es ließen sich keine signifikanten Zusammenhänge der verschiedenen quantitativen und qualitativen NET-Anteile zu ECMO-therapiespezifischen Faktoren wie Kanülierungsart, Oxygenatorlaufzeit, laufender Oxygenatornummer am Patienten, SOFA-Score oder Outcome identifizieren. Es zeigte sich eine negative Korrelation der Zellkerndichte zum Auftreten von NETs an Einzelkernen.

Im Vergleich dazu sind kernhaltige zelluläre Ablagerungen homogener zwischen verschiedenen Präparaten selber Oxygenatoren verteilt. Bezüglich der Dichte der auf der Gastauschermembran adhärierten Zellkerne konnten Unterschiede zwischen verschiedenen Oxygenatormodellen identifiziert werden. Die Kerndichte war in Erstoxygenatoren höher als in Ersatzoxygenatoren nach Oxygenatortausch. Zu anderen therapiespezifischen Faktoren fand sich keine Korrelation.

Zellkerne waren hauptsächlich um die Kreuzungspunkte übereinanderliegender Gasfasern adhäriert. Bezüglich des Auftretens von NETs ergaben sich zwischen den Kreuzungspunkten und deren Zwischenräumen keine Unterschiede.

Für eine weitere Untersuchung erscheint eine systematische Probenentnahme und Untersuchung festgelegter Stellen der Gastauschermembran, sowie eine direkte Korrelation zu im Blut gemessenen NET-Markern sinnvoll.

6. Anhang

6.1. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Gängige Methoden zur NET- Identifikation und Quantifikation	12
Tabelle 2:	Exemplarischer Ausschnitt der Tabelle zur Eingruppierung der Zellkerne mit allen Untersuchten Aufnahmen des Oxygenator Nr. 1	20
Tabelle 3:	Verwendete Filterblöcke im Fluoreszenzmikroskop	22
Tabelle 4:	Bewertung der Übersichtsaufnahmen nach der Homogenität der Kernablagerungen	57
Tabelle 5:	Bewertung der Übersichtsaufnahmen nach der Zelldichte	57
Tabelle 6:	Bewertung der Übersichtsaufnahmen nach Pseudomembranen	57
Tabelle 7:	unterschiedliche Auswertbarkeiten verschiedener Oxygenatormodelle	63
Tabelle 8:	Auswertbarkeit der Oxygenatoren abhängig von der laufenden Oxygenatornummer am Patienten	65

6.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Oxygenatorthrombose.....	8
Abbildung 2:	Schematische Darstellung möglicher Auslöser, des Ablaufes und möglicher Auswirkungen von NETs.....	9
Abbildung 3:	Heterogene Anordnung der Zellkerne auf den Gasfasern (200x Vergrößerung).....	15
Abbildung 4:	Beispielbilder für ‚NET-0‘ - Zellkerne in 400x Vergrößerung	17
Abbildung 5:	Beispiele für DAPI-gefärbte pyknotische Zellkerne	17
Abbildung 6:	Beispiele für DAPI-gefärbte aufgequollene, blass gefärbte Zellkerne	18
Abbildung 7:	Beispiele für atypische Zellkerne (‚NET-II‘)	18
Abbildung 8:	Beispiele für Merkmale der ‚NET-III‘.....	19
Abbildung 9:	Übersichtsaufnahme eines Oxygenatorpräparat aus Oxy #6	24
Abbildung 10:	Übersichtsaufnahme eines Oxygenatorpräparat aus Oxy #6	24
Abbildung 11:	Übersichtsaufnahme eines Oxygenatorpräparat aus Oxy #6	24
Abbildung 12:	Übersichtsaufnahme eines Oxygenatorpräparat aus Oxy #20	25
Abbildung 13:	Übersichtsaufnahme eines Oxygenatorpräparat aus Oxy #7	25
Abbildung 14:	Übersichtsaufnahme eines Oxygenatorpräparat aus Oxy #18	25
Abbildung 15:	Übersichtsaufnahme eines Oxygenatorpräparat aus Oxy #25	26
Abbildung 16:	Auswertesschema für Übersichts- und Einzelkernauswertung eines Oxygenators mit drei Kettfäden.....	28
Abbildung 17:	Beispiel für ein Oxygenatorpräparat ohne mittleren Kettfaden.....	29
Abbildung 18:	Repräsentativer Abschnitt ohne Zellbewuchs.....	30
Abbildung 19:	Repräsentativer Abschnitt für ‚Zellbewuchs streng adhärent auf Membranen‘	30

Abbildung 20:	Repräsentativer Abschnitt für „etwas Pseudomembran“	31
Abbildung 21:	Repräsentativer Abschnitt für „einzelne Pseudomembran-Fäden überspannen Gasfasern“	31
Abbildung 22 :	Repräsentativer Abschnitt für „einzelne Clots an den Gasfasern“	31
Abbildung 23:	Repräsentativer Abschnitt für „großflächige Clots über Membranen, weniger als die Hälfte der Gesamtfläche“	32
Abbildung 24:	Repräsentativer Abschnitt für „großflächige Clots über Membranen, mehr als die Hälfte der Gesamtfläche“	32
Abbildung 25:	Illustration Leerbereiche	33
Abbildung 26:	Pseudomembranen	36
Abbildung 27:	Illustration zur Bestimmung und Flächenberechnung der Bildabschnitte, Darstellung in 20-facher Vergrößerung	37
Abbildung 28:	Darstellung der Totbereiche bei 200x Vergrößerung	50
Abbildung 29:	Reduktion der Totbereiche bei 400x Vergrößerung	50
Abbildung 30:	Einzelkerne bei 200x Vergrößerung	51
Abbildung 31:	Einzelkerne bei 400x Vergrößerung	51
Abbildung 32:	Beispielbild mit verschiedenen Kernmorphologien und -Strukturen	53
Abbildung 33:	Mittlere Anzahl der je Aufnahme festgehaltenen Zellkerne für jedes Oxygenatorpräparat sowie deren Fokussierung	54
Abbildung 34:	Prozentualer Anteil der verschiedenen NET-Stadien an den fokussierten Einzelkernen je Oxygenatorpräparat	55
Abbildung 35:	Frequenz NET-III-positiver Aufnahmen je Oxygenatorpräparat	56
Abbildung 36:	Identifizierbarkeit von Kreuzungspunkten	58
Abbildung 37:	Kategorisierung des Kernbesatzes auf Oxygenatorpräparaten	59
Abbildung 38:	Verteilung der Zellkerne in den einzelnen Bildabschnitten.....	60
Abbildung 39:	Häufigkeitsverteilung der Leerbereiche.....	61
Abbildung 40:	Identifizierbarkeit KP: Vergleichende Übersichtsauswertung von Präparaten mehrfach ausgewerteter Oxygenatoren	62
Abbildung 41:	Leerbereiche: Vergleichende Übersichtsauswertung von Präparaten mehrfach ausgewerteter Oxygenatoren.....	62
Abbildung 42:	Darstellung der Oxygenatorlaufzeit von als „zählbar“ kategorisierten Präparaten gegenüber. als „nicht auswertbar“ kategorisierten Präparaten	64
Abbildung 43:	Darstellung der Kerndichte der unterschiedlichen Bildabschnitte bezogen auf die Fläche	66
Abbildung 44:	Mittlere Anzahl Kerne pro Bildabschnitt in „vollständig zählbaren“ Präparaten, n=40, aufgeschlüsselt in NET-freie Kerne und NETs	66
Abbildung 45:	NET-Anteile bei Einzelkernen in Kreuzungspunkten und Zwischenräumen	67
Abbildung 46:	von zwei verschiedenen Auswertern untersuchte Oxygenatorpräparate	68
Abbildung 47:	Kerndichte gegenüber dem Anteil an NET-positiven Zellkernen	69
Abbildung 48:	Kerndichte gegenüber dem Anteil an NET-positiven Zellkernen	69
Abbildung 49:	Kerndichte (Kerne pro mm ²) bei mehrfach ausgewerteten Oxygenatoren	70
Abbildung 50:	Anteile NET-positiver Einzelkerne bei mehrfach ausgewerteten Oxygenatoren.....	70

Abbildung 51:	Darstellung der jeweiligen Anzahl von Einzelkern-enthaltenden Bildabschnitten je Präparat, aufgeschlüsselt in NET-freie und NET-enthaltende	71
Abbildung 52:	Vergleich des Anteils NET-positiver einzelkernenthaltender Bildabschnitte zwischen KP und ZR	72
Abbildung 53:	Anteil der NET-positiven an allen Einzelkern-enthaltenden Bildabschnitten	73
Abbildung 54:	Einzelkern-enthaltende Bildabschnitte bei mehrfach ausgewerteten Oxygenatoren.....	74
Abbildung 55:	Anteile NET-positiver Einzelkern-enthaltender Bildabschnitte bei mehrfach ausgewerteten Oxygenatoren	74
Abbildung 56:	Darstellung der jeweiligen Anzahl Clot-enthaltender Bildabschnitte je Präparat, aufgeschlüsselt in NET-freie und NET-enthaltende.....	75
Abbildung 57:	Anteil NET-positiver Clot-enthaltender Bildabschnitte bei KP und ZR	76
Abbildung 58:	Anteil der NET-positiven an allen Clot-enthaltenden Bildabschnitten	77
Abbildung 59:	Clot-enthaltende Bildabschnitte bei mehrfach ausgewerteten Oxygenatoren	77
Abbildung 60:	Anteile NET-positiver Clot-enthaltender Bildabschnitte bei mehrfach ausgewerteten Oxygenatoren	77
Abbildung 61:	Quantitative Einzelkernbetrachtung	79
Abbildung 62:	Quantitative Einzelkernbetrachtung, nur Erstoxygenatoren	79
Abbildung 63:	Quantitative Einzelkernbetrachtung	79
Abbildung 64:	Qualitative Betrachtung Einzelkern-enthaltender Bildabschnitte.....	79
Abbildung 65:	Qualitative Betrachtung Clot-enthaltender Bildabschnitte	80
Abbildung 66:	Quantitative Einzelkernbetrachtung	81
Abbildung 67:	Quantitative Einzelkernbetrachtung	81
Abbildung 68:	Quantitative Einzelkernbetrachtung	82
Abbildung 69:	Qualitative Auswertung Einzelkern-enthaltender Bildabschnitte.....	82
Abbildung 70:	Qualitative Auswertung Clot-enthaltender Bildabschnitte	82
Abbildung 71:	Darstellung der Kerndichte auf Oxygenatorpräparaten vs. deren Laufzeit in Tagen	83
Abbildung 72:	Darstellung der Kerndichte auf Oxygenatorpräparaten vs. deren Laufzeit in Tagen. Ausschließlich Oxygenatoren des Modells Hilite	83
Abbildung 73:	Anteil von NETs an Einzelkernen gegenüber der Oxygenatorlaufzeit in Tagen	83
Abbildung 74:	Kerndichte auf Oxygenatorpräparaten gegen deren Laufzeit in Tagen in Gruppen kürzer (<9d) und länger als 9 Tage (>9d).....	84
Abbildung 75:	Quantitative NET-Auswertung an Einzelkernen	84
Abbildung 76:	Qualitative Betrachtung Einzelkern-enthaltender Bildabschnitte.....	84
Abbildung 77:	Qualitative Betrachtung Clot-enthaltender Bildabschnitte	84
Abbildung 78:	Untersuchung der Kerndichte an Erstoxygenatoren gegenüber Ersatzoxygenatoren.....	86
Abbildung 79:	Untersuchung der NET-Anteile an Einzelkernen bei Erstoxygenatoren gegenüber Ersatzoxygenatoren	86

Abbildung 80:	qualitative Untersuchung der Anteile NET-positiver Einzelkern-enthaltender Bildabschnitte von. Erstoxygenatoren (n=34) gegenüber Ersatzoxygenatoren (n=14)	86
Abbildung 81:	qualitative Untersuchung der Anteile NET-positiver Clot-enthaltender Bildabschnitte von. Erstoxygenatoren (n=34) gegenüber Ersatzoxygenatoren (n=14)	86
Abbildung 82:	Untersuchung der Kerndichte an Endoxygenatoren (n=17) gegenüber ausgewechselten Oxygenatoren (n=4). Ausschließlich Modell Quadrox.....	87
Abbildung 83:	Untersuchung der NET-Anteile an Einzelkernen von Endoxygenatoren (n=28) gegenüber ausgewechselten Oxygenatoren (n=6)	87
Abbildung 84:	qualitative Untersuchung der Anteile NET-positiver Einzelkern-enthaltender Bildabschnitte von. Endoxygenatoren (n=42) gegenüber Wechseloxygenatoren (n=7)	88
Abbildung 85:	qualitative Untersuchung der Anteile NET-positiver Clot-enthaltender Bildabschnitte von. Endoxygenatoren gegenüber Wechseloxygenatoren.....	88
Abbildung 86:	Untersuchung der Kerndichte an Endoxygenatoren nach Weaning (n=12) gegenüber ausgewechselten Oxygenatoren (n=4). Ausschließlich Modell Quadrox	89
Abbildung 87:	Untersuchung der NET-Anteile an Einzelkernen von Endoxygenatoren nach Weaning (n=20) gegenüber ausgewechselten Oxygenatoren (n=6)	89
Abbildung 88:	qualitative Untersuchung der Anteile NET-positiver Einzelkern-enthaltender Bildabschnitte von Endoxygenatoren nach Weaning (n=30) gegenüber Wechseloxygenatoren (n=7)	89
Abbildung 89:	qualitative Untersuchung der Anteile NET-positiver Clot-enthaltender Bildabschnitte von. Endoxygenatoren nach Weaning (n=30) gegenüber Wechseloxygenatoren (n=7)	89
Abbildung 90:	Untersuchung der Kerndichte an geweanten Oxygenatoren (n=12) gegenüber ausgewechselten Oxygenatoren und Oxygenatoren von unter ECMO verstorbenen Patienten (n=9): Ausschließlich Modell Quadrox	90
Abbildung 91:	quantitative Untersuchung der NET-Anteile an Einzelkernen von geweanten Oxygenatoren (n=20) gegenüber ausgewechselten Oxygenatoren und Oxygenatoren von unter ECMO verstorbenen Patienten (n=14)	90
Abbildung 92:	qualitative Untersuchung der Anteile NET-positiver Einzelkern-enthaltender Bildabschnitte geweanter Oxygenatoren (n=30) gegenüber ausgewechselten Oxygenatoren und Oxygenatoren von unter ECMO verstorbenen Patienten (n=19)	91
Abbildung 93:	qualitative Untersuchung der Anteile NET-positiver Clot-enthaltender Bildabschnitte geweanter Oxygenatoren (n=30) gegenüber ausgewechselten Oxygenatoren und Oxygenatoren von unter ECMO verstorbenen Patienten (n=19)	91
Abbildung 94:	Untersuchung der Kerndichte in Oxygenatoren von Patienten mit einem initialen SOFA-Score bis 12 Punkte (n=10) gegenüber >12 Punkte (n=8); ausschließlich Modell Quadrox:	92

Abbildung 95: Untersuchung der NET-Anteile in Oxygenatoren von Patienten mit einem initialen SOFA-Score bis 12 Punkte (n=20) gegenüber >12 Punkte (n=9) ...	92
Abbildung 96: qualitative Bewertung Einzelkern-enthaltender Bildabschnitte in Oxygenatoren von Patienten mit einem initialen SOFA-Score bis 12 Punkte (n=26) gegenüber >12 Punkte (n=17).....	92
Abbildung 97: qualitative Bewertung Clot-enthaltender Bildabschnitte in Oxygenatoren von Patienten mit einem initialen SOFA-Score bis 12 Punkte (n=26) gegenüber >12 Punkte (n=17)	92
Abbildung 98: Quantitative Einzelkernbetrachtung von Oxygenatoren überlebt-habender Patienten (n=12) gegenüber Oxygenatoren verstorbener Patienten (n=6). Ausschließlich Modell QuadroX	93
Abbildung 99: Quantitative Einzelkernbetrachtung von Oxygenatoren überlebt-habender Patienten (n=20) gegenüber Oxygenatoren verstorbener Patienten (n=10) ..	93
Abbildung 100: Qualitative Betrachtung Einzelkern-enthaltender Bildabschnitte von Oxygenatoren überlebt-habender Patienten (n=29) gegenüber Oxygenatoren verstorbener Patienten (n=14).....	93
Abbildung 101: Qualitative Betrachtung Clot-enthaltender Bildabschnitte von Oxygenatoren überlebt-habender Patienten (n=29) gegenüber Oxygenatoren verstorbener Patienten (n=14).....	93
Abbildung 102: Birkenmaier et al. (101): Links: Mikro-Computertomographie gebrauchter ECMO-Oxygenatoren	100

7. Literaturverzeichnis

1. Hill JD, O'Brien TG, Murray JJ, Dontigny L, Bramson ML, Osborn JJ, Gerbode F. Prolonged Extracorporeal Oxygenation for Acute Post-Traumatic Respiratory Failure (Shock-Lung Syndrome). *The New England journal of medicine*. 1972;286(12):629–34. doi:10.1056/NEJM197203232861204
2. Feldhaus D, Brodie D, Lemaitre P, Sonett J, Agerstrand C. The Evolution of the Use of Extracorporeal Membrane Oxygenation in Respiratory Failure. *Membranes*. 2021;11(7):491. doi:10.3390/membranes11070491
3. Tsangaris A, Alexy T, Kalra R, Kosmopoulos M, Elliott A, Bartos JA, Yannopoulos D. Overview of Venous-Arterial Extracorporeal Membrane Oxygenation (VA-ECMO) Support for the Management of Cardiogenic Shock. *Frontiers in cardiovascular medicine*. 2021;8:686558. doi:10.3389/fcvm.2021.686558
4. Lorusso R, Piero ME de, Mariani S, Di Mauro M, Folliguet T, Taccone FS, Camporota L, Swol J, Wiedemann D, Belliato M, Broman LM, Vuylsteke A, Kassif Y, Scandroglio AM, Fanelli V, Gaudard P, Ledot S, Barker J, Boeken U, Maier S, Kersten A, Meyns B, Pozzi M, Pedersen FM, Schellongowski P, Kirali K, Barrett N, Riera J, Mueller T, Belohlavek J. In-hospital and 6-month outcomes in patients with COVID-19 supported with extracorporeal membrane oxygenation (EuroECMO-COVID): a multicentre, prospective observational study. *The Lancet. Respiratory medicine*. 2023;11(2):151–62. doi:10.1016/S2213-2600(22)00403-9
5. Jacobs JP, Stammers AH, St Louis JD, Tesdahl EA, Hayanga JWA, Morris RJ, Lee RC, Sestokas AK, Badhwar V, Weinstein S. Variation in survival in patients with Coronavirus Disease 2019 supported with extracorporeal membrane oxygenation: A multi-institutional analysis of 594 consecutive patients with Coronavirus Disease 2019 supported with extracorporeal membrane oxygenation at 49 hospitals within 21 states. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2023;165(5):1837–48. doi:10.1016/j.jtcvs.2022.05.002
6. Vieira J, Frakes M, Cohen J, Wilcox S. Extracorporeal Membrane Oxygenation in Transport Part 1: Extracorporeal Membrane Oxygenation Configurations and Physiology. *Air Medical Journal*. 2020;39(1):56–63. doi:10.1016/j.amj.2019.09.008
7. Bein T, Müller T, Weber-Carstens S. Extrakorporale Lungenunterstützungsverfahren (ECMO/iLA) [Extracorporeal lung support procedures (ECMO/iLA)]. *Pneumologie*. 2008;62(3):137–42. ger. doi:10.1055/s-2008-1038119
8. Ratnani I, Tuazon D, Zainab A, Uddin F. The Role and Impact of Extracorporeal Membrane Oxygenation in Critical Care. 1947-6108. 2018;14(2):110–9. doi:10.14797/mdcj-14-2-110
9. Teijeiro-Paradis R, Gannon WD, Fan E. Complications Associated With Venovenous Extracorporeal Membrane Oxygenation-What Can Go Wrong? *Critical Care Medicine*. 2022;50(12):1809–18. doi:10.1097/CCM.0000000000005673
10. Abruzzo A, Gorantla V, Thomas SE. Venous thromboembolic events in the setting of extracorporeal membrane oxygenation support in adults: A systematic review. *Thrombosis Research*. 2022;212:58–71. doi:10.1016/j.thromres.2022.02.015

11. Yusuff H, Zochios V, Brodie D. Thrombosis and coagulopathy in COVID-19 patients receiving ECMO: A narrative review of current literature. *Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia*. 2022;36(8 Pt B):3312–7. doi:10.1053/j.jvca.2022.03.032
12. Jin Y, Zhang Y, Liu J, Zhou Z. Thrombosis and bleeding in patients with COVID-19 requiring extracorporeal membrane oxygenation: a systematic review and meta-analysis. *Research and practice in thrombosis and haemostasis*. 2023;7(2):100103. doi:10.1016/j.rpth.2023.100103
13. Nunez JI, Gosling AF, O'Gara B, Kennedy KF, Rycus P, Abrams D, Brodie D, Shaefi S, Garan AR, Grandin EW. Bleeding and thrombotic events in adults supported with venovenous extracorporeal membrane oxygenation: an ELSO registry analysis. *Intensive Care Med*. 2022;48(2):213–24. doi:10.1007/s00134-021-06593-x
14. Lehle K, Philipp A, Gleich O, Holzamer A, Müller T, Bein T, Schmid C. 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
15. Figueroa Villalba CA, McMullan DM, Reed RC, Chandler WL. Thrombosis in Extracorporeal Membrane Oxygenation (ECMO) Circuits. *ASAIO J*. 2022;68(8):1083–92. doi:10.1097/MAT.0000000000001605
16. Thomas J, Kostousov V, Teruya J. Bleeding and Thrombotic Complications in the Use of Extracorporeal Membrane Oxygenation. *Semin Thromb Hemost*. 2018;44(1):20–9. doi:10.1055/s-0037-1606179
17. Doyle AJ, Hunt BJ. Current Understanding of How Extracorporeal Membrane Oxygenators Activate Haemostasis and Other Blood Components. *Frontiers in Medicine*. 2018;5352. doi:10.3389/fmed.2018.00352
18. Lubnow M, Philipp A, Foltan M, Bull Enger T, Lunz D, Bein T, Haneya A, Schmid C, Riegger G, Müller T, Lehle K. Technical complications during veno-venous extracorporeal membrane oxygenation and their relevance predicting a system-exchange--retrospective analysis of 265 cases. *PLOS ONE*. 2014;9(12):e112316. doi:10.1371/journal.pone.0112316
19. Olson SR, Murphree CR, Zonies D, Meyer AD, Mccarty OJT, Deloughery TG, Shatzel JJ. Thrombosis and Bleeding in Extracorporeal Membrane Oxygenation (ECMO) Without Anticoagulation: A Systematic Review. *ASAIO J*. 2021;67(3):290–6. doi:10.1097/MAT.0000000000001230
20. Vaquer S, Haro C de, Peruga P, Oliva JC, Artigas A. Systematic review and meta-analysis of complications and mortality of veno-venous extracorporeal membrane oxygenation for refractory acute respiratory distress syndrome. *Ann. Intensive Care*. 2017;7(1):51. doi:10.1186/s13613-017-0275-4
21. Zangrillo A, Landoni G, Biondi-Zoccai G, Greco M, Greco T, Frati G, Patroniti N, Antonelli M, Pesenti A, Pappalardo F. A meta-analysis of complications and mortality of extracorporeal membrane oxygenation. *Critical care and resuscitation: journal of the Australasian Academy of Critical Care Medicine [Internet]*. 2013;15(3):172–8.
22. Ontaneda A, Annich GM. Novel Surfaces in Extracorporeal Membrane Oxygenation Circuits. *Front. Med*. 2018;5321. doi:10.3389/fmed.2018.00321

23. Roberts TR, Garren MRS, Handa H, Batchinsky AI. Toward an artificial endothelium: Development of blood-compatible surfaces for extracorporeal life support. *J Trauma Acute Care Surg.* 2020;89(2S Suppl 2):S59-S68. doi:10.1097/TA.0000000000002700
24. Sun W, Wang S, Chen Z, Zhang J, Li T, Arias K, Griffith BP, Wu ZJ. Impact of high mechanical shear stress and oxygenator membrane surface on blood damage relevant to thrombosis and bleeding in a pediatric ECMO circuit. *Artif Organs.* 2020;44(7):717–26. doi:10.1111/aor.13646
25. Steiger T, Foltan M, Philipp A, Mueller T, Gruber M, Bredthauer A, Krenkel L, Birkenmaier C, Lehle K. 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
26. Zhang Y, Peng R, Pei S, Gao S, Sun Y, Cheng G, Yu D, Wang X, Gao Z, Ji B, Zhou Z. Neutrophil extracellular traps are increased after extracorporeal membrane oxygenation support initiation and present in thrombus: A preclinical study using sheep as an animal model. *Thrombosis Research.* 2023;221173–82. doi:10.1016/j.thromres.2022.10.019
27. Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Laboratory Investigation.* 2000;80(5):617–53. doi:10.1038/labinvest.3780067
28. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science (New York, N.Y.).* 2004;303(5663):1532–5. doi:10.1126/science.1092385
29. Yipp BG, Kubes P. NETosis: how vital is it? *Blood.* 2013;122(16):2784–94. doi:10.1182/blood-2013-04-457671
30. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol.* 2018;18(2):134–47. doi:10.1038/nri.2017.105
31. Thomas GM, Carbo C, Curtis BR, Martinod K, Mazo IB, Schatzberg D, Cifuni SM, Fuchs TA, Andrian UH v., Hartwig JH, Aster RH, Wagner DD. Extracellular DNA traps are associated with the pathogenesis of TRALI in humans and mice. *Blood.* 2012;119(26):6335–43. doi:10.1182/blood-2012-01-405183
32. Hofbauer TM, Ondracek AS, Lang IM. Neutrophil Extracellular Traps in Atherosclerosis and Thrombosis. In: *Prevention and Treatment of Atherosclerosis: Springer, Cham; 2020. p. 405–25*
33. Zhou Y, Xu Z, Liu Z. Impact of Neutrophil Extracellular Traps on Thrombosis Formation: New Findings and Future Perspective. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2022;12910908. doi:10.3389/fcimb.2022.910908
34. Pfeiler S, Stark K, Massberg S, Engelmann B. Propagation of thrombosis by neutrophils and extracellular nucleosome networks. *Haematologica.* 2017;102(2):206–13. doi:10.3324/haematol.2016.142471
35. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD, Wroblewski SK, Wakefield TW, Hartwig JH, Wagner DD. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(36):15880–5. doi:10.1073/pnas.1005743107
36. Longstaff C, Varjú I, Sótonyi P, Szabó L, Krumrey M, Hoell A, Bóta A, Varga Z, Komorowicz E, Kolev K. Mechanical stability and fibrinolytic resistance of clots

- containing fibrin, DNA, and histones. *Journal of Biological Chemistry*. 2013;288(10):6946–56. doi:10.1074/jbc.M112.404301
37. Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS, Thomas GM, Martinod K, Meyer SF de, Bhandari AA, Wagner DD. Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2012;10(1):136–44. doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04544.x
 38. Fuchs TA, Brill A, Wagner DD. Neutrophil extracellular trap (NET) impact on deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(8):1777–83. doi:10.1161/ATVBAHA.111.242859
 39. Maugeri N, Campana L, Gavina M, Covino C, Metrio M de, Panciroli C, Maiuri L, Maseri A, D'Angelo A, Bianchi ME, Rovere-Querini P, Manfredi AA. 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
 40. Mangold A, Alias S, Scherz T, Hofbauer T, Jakowitsch J, Panzenböck A, Simon D, Laimer D, Bangert C, Kammerlander A, Mascherbauer J, Winter M-P, Distelmaier K, Adlbrecht C, Preissner KT, Lang IM. Coronary neutrophil extracellular trap burden and deoxyribonuclease activity in ST-elevation acute coronary syndrome are predictors of ST-segment resolution and infarct size. *Circ Res*. 2015;116(7):1182–92. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.304944
 41. Boer OJ de, Li X, Teeling P, Mackaay C, Ploegmakers HJ, van der Loos CM, Daemen MJ, Winter RJ de, van der Wal AC. Neutrophils, neutrophil extracellular traps and interleukin-17 associate with the organisation of thrombi in acute myocardial infarction. *Thromb Haemost*. 2013;109(2):290–7. doi:10.1160/TH12-06-0425
 42. Laridan E, Denorme F, Desender L, François O, Andersson T, Deckmyn H, Vanhoorelbeke K, Meyer SF de. Neutrophil extracellular traps in ischemic stroke thrombi. *Annals of Neurology*. 2017;82(2):223–32. doi:10.1002/ana.24993
 43. Genchi A, Semerano A, Gullotta GS, Strambo D, Schwarz G, Bergamaschi A, Panni P, Simionato F, Scomazzoni F, Michelozzi C, Pozzato M, Maugeri N, Comi G, Falini A, Roveri L, Filippi M, Martino G, Bacigaluppi M. Cerebral thrombi of cardioembolic etiology have an increased content of neutrophil extracellular traps. *Journal of the Neurological Sciences*. 2021;423117355. doi:10.1016/j.jns.2021.117355
 44. Tchouta LN, Bonde PN. The Quest for Nonthrombotic Surface Modifications to Achieve Hemocompatibility of Implantable Devices. *ASAIO J*. 2015;61(6):623–34. doi:10.1097/MAT.0000000000000283
 45. Kizhakkedathu JN, Conway EM. Biomaterial and cellular implants: foreign surfaces where immunity and coagulation meet. *Blood*. 2022;139(13):1987–98. doi:10.1182/blood.2020007209
 46. Meyer AD, Gelfond JAL, WILES AA, FREISHTAT RJ, RAIS-BAHRAMI K. Platelet-derived microparticles generated by neonatal extracorporeal membrane oxygenation systems. *ASAIO J*. 2015;61(1):37–42. doi:10.1097/MAT.0000000000000164
 47. Abaricia JO, Shah AH, Olivares-Navarrete R. Substrate stiffness induces neutrophil extracellular trap (NET) formation through focal adhesion kinase activation. *Biomaterials*. 2021;271120715. doi:10.1016/j.biomaterials.2021.120715

48. Abaricia JO, Shah AH, Musselman RM, Olivares-Navarrete R. Hydrophilic titanium surfaces reduce neutrophil inflammatory response and NETosis. *Biomater Sci.* 2020;8(8):2289–99. doi:10.1039/c9bm01474h
49. Yu X, Tan J, Diamond SL. Hemodynamic force triggers rapid NETosis within sterile thrombotic occlusions. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2018;16(2):316–29. doi:10.1111/jth.13907
50. Weber M, Steinle H, Golombek S, Hann L, Schlensak C, Wendel HP, Avci-Adali M. Blood-Contacting Biomaterials: In Vitro Evaluation of the Hemocompatibility. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology.* 2018;699. doi:10.3389/fbioe.2018.00099
51. Strohbach A, Busch R. Predicting the In Vivo Performance of Cardiovascular Biomaterials: Current Approaches In Vitro Evaluation of Blood-Biomaterial Interactions. *Int J Mol Sci.* 2021;22(21). doi:10.3390/ijms222111390
52. Korabecna M, Tesar V. NETosis provides the link between activation of neutrophils on hemodialysis membrane and comorbidities in dialyzed patients. *Inflamm. Res.* 2017;66(5):369–78. En;en. doi:10.1007/s00011-016-1010-6
53. Jeong JC, Kim J-E, Gu J-Y, Yoo HJ, Ryu JW, Kim DK, Joo KW, Kim HK. Significance of the DNA-Histone Complex Level as a Predictor of Major Adverse Cardiovascular Events in Hemodialysis Patients: The Effect of Uremic Toxin on DNA-Histone Complex Formation. *Blood Purif.* 2016;41(1-3):64–71. doi:10.1159/000440974
54. Bieber S, Muczynski KA, Lood C. Neutrophil Activation and Neutrophil Extracellular Trap Formation in Dialysis Patients. *Kidney Medicine.* 2020;2(6):692-698.e1. doi:10.1016/j.xkme.2020.06.014
55. Staessens S, Moussa MD, Pierache A, Rauch A, Rousse N, Boulleaux E, Ung A, Desender L, Pradines B, Vincentelli A, Mercier O, Labreuche J, Duhamel A, van Belle E, Vincent F, Dupont A, Vanhoorelbeke K, Corseaux D, Meyer SF de, Susen S. Thrombus formation during ECMO: Insights from a detailed histological analysis of thrombus composition. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2022;20(9):2058–69. doi:10.1111/jth.15784
56. Winnersbach P, Rossaint J, Buhl EM, Singh S, Lölsberg J, Wessling M, Rossaint R, Bleilevens C. Platelet count reduction during in vitro membrane oxygenation affects platelet activation, neutrophil extracellular trap formation and clot stability, but does not prevent clotting. *Perfusion.* 2022;37(2):134–43. doi:10.1177/0267659121989231
57. Scozzi D, Liao F, Krupnick AS, Kreisel D, Gelman AE. The role of neutrophil extracellular traps in acute lung injury. *Front. Immunol.* 2022;13953195. doi:10.3389/fimmu.2022.953195
58. Li RHL, Tablin F. A Comparative Review of Neutrophil Extracellular Traps in Sepsis. *Front. Vet. Sci.* 2018;5291. doi:10.3389/fvets.2018.00291
59. Gando S. Microvascular thrombosis and multiple organ dysfunction syndrome. *Critical Care Medicine.* 2010;38(2 Suppl):S35-42. doi:10.1097/CCM.0b013e3181c9e31d
60. Chen Z, Zhang H, Qu M, Nan K, Cao H, Cata JP, Chen W, Miao C. Review: The Emerging Role of Neutrophil Extracellular Traps in Sepsis and Sepsis-Associated Thrombosis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2021;11653228. doi:10.3389/fcimb.2021.653228

61. Mutua V, Gershwin LJ. A Review of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Disease: Potential Anti-NETs Therapeutics. *Clinic Rev Allerg Immunol.* 2021;61(2):194–211. doi:10.1007/s12016-020-08804-7
62. Li RHL, Tablin F. A Comparative Review of Neutrophil Extracellular Traps in Sepsis. *Front. Vet. Sci.* 2018;5291. doi:10.3389/fvets.2018.00291
63. Xu J, Zhang X, Pelayo R, Monestier M, Ammollo CT, Semeraro F, Taylor FB, Esmon NL, Lupu F, Esmon CT. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nature medicine.* 2009;15(11):1318–21. doi:10.1038/nm.2053
64. Dwivedi DJ, Toltl LJ, Swystun LL, Pogue J, Liaw K-L, Weitz JI, Cook DJ, Fox-Robichaud AE, Liaw PC. Prognostic utility and characterization of cell-free DNA in patients with severe sepsis. *Crit Care.* 2012;16(4):R151. doi:10.1186/cc11466
65. Hirose T, Hamaguchi S, Matsumoto N, Irisawa T, Seki M, Tasaki O, Hosotsubo H, Yamamoto N, Yamamoto K, Akeda Y, Oishi K, Tomono K, Shimazu T. Presence of neutrophil extracellular traps and citrullinated histone H3 in the bloodstream of critically ill patients. *PLOS ONE.* 2014;9(11):e111755. doi:10.1371/journal.pone.0111755
66. Abrams ST, Morton B, Alhamdi Y, Alsabani M, Lane S, Welters ID, Wang G, Toh C-H. A Novel Assay for Neutrophil Extracellular Trap Formation Independently Predicts Disseminated Intravascular Coagulation and Mortality in Critically Ill Patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 2019;200(7):869–80. doi:10.1164/rccm.201811-2111OC
67. Mai SHC, Khan M, Dwivedi DJ, Ross CA, Zhou J, Gould TJ, Gross PL, Weitz JI, Fox-Robichaud AE, Liaw PC. Delayed but not Early Treatment with DNase Reduces Organ Damage and Improves Outcome in a Murine Model of Sepsis. *Shock.* 2015;44(2):166–72. doi:10.1097/SHK.0000000000000396
68. Gupta AK, Hasler P, Holzgreve W, Gebhardt S, Hahn S. Induction of neutrophil extracellular DNA lattices by placental microparticles and IL-8 and their presence in preeclampsia. *Human Immunology.* 2005;66(11):1146–54. doi:10.1016/j.humimm.2005.11.003
69. Beiter K, Wartha F, Albiger B, Normark S, Zychlinsky A, Henriques-Normark B. An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. *Current Biology.* 2006;16(4):401–7. doi:10.1016/j.cub.2006.01.056
70. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönemarker U, Back W, Gross WL, Werb Z, Gröne H-J, Brinkmann V, Jenne DE. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med.* 2009;15(6):623–5. doi:10.1038/nm.1959
71. Delbosc S, Alsac J-M, Journe C, Louedec L, Castier Y, Bonnaure-Mallet M, Ruimy R, Rossignol P, Bouchard P, Michel J-B, Meilhac O. *Porphyromonas gingivalis* participates in pathogenesis of human abdominal aortic aneurysm by neutrophil activation. Proof of concept in rats. *PLOS ONE.* 2011;6(4):e18679. doi:10.1371/journal.pone.0018679
72. Oklu R, Albadawi H, Watkins MT, Monestier M, Sillesen M, Wicky S. Detection of extracellular genomic DNA scaffold in human thrombus: implications for the use of deoxyribonuclease enzymes in thrombolysis; 2012. (vol. 23)
73. Savchenko AS, Martinod K, Seidman MA, Wong SL, Borisssoff JI, Piazza G, Libby P, Goldhaber SZ, Mitchell RN, Wagner DD. Neutrophil extracellular traps form

- predominantly during the organizing stage of human venous thromboembolism development. *J Thromb Haemost.* 2014;12(6):860–70. doi:10.1111/jth.12571
74. Riegger J, Byrne RA, Joner M, Chandraratne S, Gershlick AH, Berg JM ten, Adriaenssens T, Guagliumi G, Godschalk TC, Neumann F-J, Trenk D, Feldman LJ, Steg PG, Desmet W, Alfonso F, Goodall AH, Wojdyla R, Dudek D, Philipp V, Opinaldo S, Titova A, Malik N, Cotton J, Jhagroe DA, Heestermans AACM, Sinnaeve P, Vermeersch P, Valina C, Schulz C, Kastrati A, Massberg S. Histopathological evaluation of thrombus in patients presenting with stent thrombosis. A multicenter European study: a report of the prevention of late stent thrombosis by an interdisciplinary global European effort consortium. *Eur Heart J.* 2016;37(19):1538–49. doi:10.1093/eurheartj/ehv419
 75. Baker VS, Imade GE, Molta NB, Tawde P, Pam SD, Obadofin MO, Sagay SA, Egah DZ, Iya D, Afolabi BB, Baker M, Ford K, Ford R, Roux KH, Keller TC. Cytokine-associated neutrophil extracellular traps and antinuclear antibodies in *Plasmodium falciparum* infected children under six years of age. *Malar J.* 2008;7(1):41. doi:10.1186/1475-2875-7-41
 76. Hamaguchi S, Hirose T, Akeda Y, Matsumoto N, Irisawa T, Seki M, Hosotsubo H, Tasaki O, Oishi K, Shimazu T, Tomono K. Identification of neutrophil extracellular traps in the blood of patients with systemic inflammatory response syndrome. *J Int Med Res.* 2013;41(1):162–8. doi:10.1177/0300060513475958
 77. Hamaguchi S, Hirose T, Matsumoto N, Akeda Y, Irisawa T, Seki M, Hosotsubo H, Yamamoto K, Tasaki O, Oishi K, Shimazu T, Tomono K. Neutrophil extracellular traps in bronchial aspirates: a quantitative analysis. *European Respiratory Journal.* 2014;43(6):1709–18. doi:10.1183/09031936.00139813
 78. Dweik RA. Dynamic Changes in the Expression of Neutrophil Extracellular Traps in Acute Respiratory Infections. *Am J Respir Crit Care Med* 2012 (185):1130–1
 79. Hoffmann JHO, Schaekel K, Gaiser MR, Enk AH, Hadaschik EN. Interindividual variation of NETosis in healthy donors: introduction and application of a refined method for extracellular trap quantification. *Experimental Dermatology.* 2016;25(11):895–900. doi:10.1111/exd.13125
 80. Rebernick R, Fahmy L, Glover C, Bawadekar M, Shim D, Holmes CL, Rademacher N, Potluri H, Bartels CM, Shelef MA. DNA Area and NETosis Analysis (DANA): a High-Throughput Method to Quantify Neutrophil Extracellular Traps in Fluorescent Microscope Images. *Biol Proced Online.* 2018;207.
 81. Boer OJ de, Li X, Goebel H, van der Wal AC. Nuclear smears observed in H&E-stained thrombus sections are neutrophil extracellular traps. *Journal of Clinical Pathology.* 2016;69(2):181–2. doi:10.1136/jclinpath-2015-203019
 82. Buhr N de, Köckritz-Blickwede M v. How Neutrophil Extracellular Traps Become Visible. *Journal of Immunology Research.* 2016;20164604713. doi:10.1155/2016/4604713
 83. Masuda S, Nakazawa D, Shida H, Miyoshi A, Kusunoki Y, Tomaru U, Ishizu A. NETosis markers: Quest for specific, objective, and quantitative markers. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry.* 2016;45989–93. doi:10.1016/j.cca.2016.05.029

84. Knaus UG, Leto TL, editors. *NADPH Oxidases: Methods and Protocols*. 1st ed. New York, NY: Humana; 2019. 111 p. (Springer eBooks Springer Protocols; vol. 1982)
85. Zhao W, Fogg DK, Kaplan MJ. A novel image-based quantitative method for the characterization of NETosis. *Journal of immunological methods*. 2015;423:104–110. doi:10.1016/j.jim.2015.04.027
86. Carmona-Rivera C, Kaplan MJ. Induction and Quantification of NETosis. *Curr Protoc Immunol*. 2016;115:14.41.1-14.41.14.
87. Gupta S, Chan DW, Zaal KJ, Kaplan MJ. A High-Throughput Real-Time Imaging Technique To Quantify NETosis and Distinguish Mechanisms of Cell Death in Human Neutrophils. *The Journal of Immunology*. 2018;200(2):869–79. doi:10.4049/jimmunol.1700905
88. Neubert E, Meyer D, Rocca F, Günay G, Kwaczala-Tessmann A, Grandke J, Senger-Sander S, Geisler C, Egner A, Schön MP, Erpenbeck L, Kruss S. Chromatin swelling drives neutrophil extracellular trap release. *Nat Commun*. 2018;9(1). doi:10.1038/s41467-018-06263-5
89. Quinn MT, DeLeo FR, editors. *Neutrophil: Methods and protocols*. 4030th ed. XVI, 470 Seiten; 2020. 468 p. (Springer protocols; vol. 2087).
90. Wilm JG. Charakterisierung zellulärer Ablagerungen auf Polymethylpenten-Gaskapillaren nach extrakorporaler Membranoxygenierung bei akutem Lungen- oder Herzversagen. Regensburg.
91. Masuda S, Shimizu S, Matsuo J, Nishibata Y, Kusunoki Y, Hattanda F, Shida H, Nakazawa D, Tomaru U, Atsumi T, Ishizu A. Measurement of NET formation in vitro and in vivo by flow cytometry. *Cytometry Part A*. 2017;91(8):822–9. doi:10.1002/cyto.a.23169
92. Brandes R, Lang F, Schmidt RF, editors. *Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie: mit 850 Farbbildungen*. 32nd ed. Berlin, Heidelberg: Springer; 2019. 1057 p. (Springer Lehrbuch)
93. Mukherjee M, Lacy P, Ueki S. Eosinophil Extracellular Traps and Inflammatory Pathologies-Untangling the Web! *Front Immunol*. 2018;9:2763. doi:10.3389/fimmu.2018.02763
94. Shin S-H, Ye M-K, Park J, Geum S-Y. Immunopathologic Role of Eosinophils in Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis. *Int J Mol Sci*. 2022;23(21):13313. doi:10.3390/ijms232113313
95. Liu Y, Chen J, Fu Z, Wang Y, Cao X, Sun Y. Enhanced Responsive Formation of Extracellular Traps in Macrophages Previously Exposed to *Porphyromonas gingivalis*. *Inflammation*. 2022;45(3):1174–85. doi:10.1007/s10753-021-01611-y
96. Brinkmann V, Goosmann C, Kühn LI, Zychlinsky A. Automatic quantification of in vitro NET formation. *Front. Immunol*. 2012;3:413. doi:10.3389/fimmu.2012.00413
97. Neubert E, Meyer D, Kruss S, Erpenbeck L. The power from within - understanding the driving forces of neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Sci*. 2020;133(5). doi:10.1242/jcs.241075
98. Leben R, Ostendorf L, van Koppen S, Rakhymzhan A, Hauser AE, Radbruch H, Niesner RA. Phasor-Based Endogenous NAD(P)H Fluorescence Lifetime Imaging

- Unravels Specific Enzymatic Activity of Neutrophil Granulocytes Preceding NETosis. *Int J Mol Sci.* 2018;19(4).
99. Pérez-Figueroa E, Álvarez-Carrasco P, Ortega E, Maldonado-Bernal C. Neutrophils: Many Ways to Die. *Front. Immunol.* 2021;12631821. doi:10.3389/fimmu.2021.631821
 100. Steiger TR. Die Beteiligung des von Willebrand Faktors an der Clotbildung in Membranoxygenatoren einer extrakorporalen Membranoxygenierung.
 101. Birkenmaier C, Dornia C, Lehle K, Müller T, Gruber M, Philipp A, Krenkel L. Analysis of Thrombotic Deposits in Extracorporeal Membrane Oxygenators by High-resolution Microcomputed Tomography: A Feasibility Study. *ASAIO J.* 2020;66(8):922–8. doi:10.1097/MAT.0000000000001089
 102. Wilm J, Philipp A, Müller T, Bredthauer A, Gleich O, Schmid C, Lehle K. Leukocyte Adhesion as an Indicator of Oxygenator Thrombosis During Extracorporeal Membrane Oxygenation Therapy? *ASAIO J.* 2018;64(1):24–30.
 103. Dropco I, Philipp A, Foltan M, Lunz D, Lubnow M, Lehle K. Extended Cellular Deposits on Gas Exchange Capillaries Are Not an Indicator of Clot Formation: Analysis of Different Membrane Oxygenators. *ASAIO J.* 2023;69(4):e134-e141. doi:10.1097/MAT.0000000000001892
 104. Melchiorri AJ, Bracaglia LG, Kimerer LK, Hibino N, Fisher JP. In Vitro Endothelialization of Biodegradable Vascular Grafts Via Endothelial Progenitor Cell Seeding and Maturation in a Tubular Perfusion System Bioreactor. *Tissue Engineering. Part C, Methods.* 2016;22(7):663–70. doi:10.1089/ten.tec.2015.0562
 105. Paddillaya N, Mishra A, Kondaiah P, Pullarkat P, Menon GI, Gundiah N. Biophysics of Cell-Substrate Interactions Under Shear. *Front. Cell Dev. Biol.* 2019;7251. doi:10.3389/fcell.2019.00251
 106. Lehle K, Philipp A, Müller T, Schettler F, Bein T, Schmid C, Lubnow M. Flow Dynamics of Different Adult ECMO Systems: A Clinical Evaluation. *Artif Organs.* 2014;38(5):391–8. doi:10.1111/aor.12180
 107. Müller T, Lubnow M, Philipp A, Pfeifer M, Maier LS. Extrakorporale Lungenunterstützungsverfahren in der Intensivmedizin 2014 [Extracorporeal pulmonary support procedures in intensive care medicine 2014]. *Internist (Berl).* 2014;55(11):1296–305. ger. doi:10.1007/s00108-014-3506-x
 108. Pilarczyk K, Trummer G, Jakob H-G, Dusse F, Marggraf G. Extrakorporale Herz- und Lungenersatzverfahren: „Extracorporeal membrane oxygenation“, „extracorporeal life support“ und „pumpless extracorporeal lung assist“ [Extracorporeal heart and lung replacement procedures]. *Zeitschrift Fur Herz-, Thorax- Und Gefasschirurgie.* 2013;27(1):37–48. ger. doi:10.1007/s00398-012-0984-9
 109. Gartner MJ, Wilhelm CR, Gage KL, Fabrizio MC, Wagner WR. Modeling flow effects on thrombotic deposition in a membrane oxygenator. *Artif Organs.* 2000;24(1):29–36. doi:10.1046/j.1525-1594.2000.06384.x
 110. Lehle K, Philipp A, Zeman F, Lunz D, Lubnow M, Wendel H-P, Göbölös L, Schmid C, Müller T. Technical-Induced Hemolysis in Patients with Respiratory Failure Supported with Venovenous ECMO - Prevalence and Risk Factors. *PLOS ONE.* 2015;10(11):e0143527. doi:10.1371/journal.pone.0143527

111. Appelt H, Philipp A, Mueller T, Foltan M, Lubnow M, Lunz D, Zeman F, Lehle K. Factors associated with hemolysis during extracorporeal membrane oxygenation (ECMO)-Comparison of VA- versus VV ECMO. *PLOS ONE*. 2020;15(1):e0227793. doi:10.1371/journal.pone.0227793
112. Dornia C, Philipp A, Bauer S, Stroszczyński C, Schreyer AG, Müller T, Koehl GE, Lehle K. 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
113. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche J-D, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent J-L, Angus DC. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016;315(8):801–10. doi:10.1001/jama.2016.0287
114. Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, Shackelford KA, Tsoi D, Kievlan DR, Colombara DV, Ikuta KS, Kissoon N, Finfer S, Fleischmann-Struzek C, Machado FR, Reinhart KK, Rowan K, Seymour CW, Watson RS, West TE, Marinho F, Hay SI, Lozano R, Lopez AD, Angus DC, Murray CJL, Naghavi M. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet*. 2020;395(10219):200–11. doi:10.1016/S0140-6736(19)32989-7
115. Ferreira FL, Bota DP, Bross A, Mélot C, Vincent JL. Serial evaluation of the SOFA score to predict outcome in critically ill patients. *JAMA*. 2001;286(14):1754–8. doi:10.1001/jama.286.14.1754
116. Abrams ST, Zhang N, Manson J, Liu T, Dart C, Baluwa F, Wang SS, Brohi K, Kipar A, Yu W, Wang G, Toh C-H. Circulating histones are mediators of trauma-associated lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;187(2):160–9. doi:10.1164/rccm.201206-1037OC
117. Keller Harald. der Oxygenator: oder die Frage: „Was haben Membranoxgenation und ein Designermöbelstück gemeinsam?“ [Internet]: Universitätsklinikum Frankfurt http://www.perfusio.de/e-learning/Perfusion;focus=CMTOI_de_dtag_hosting_hpcreator_widget_Download_16493161&path=download.action&frame=CMTOI_de_dtag_hosting_hpcreator_widget_Download_16493161?id=240401%3D240401&usg=AFQjCNE3WPq0U5A_MavWsLy02VcLZI5ZFQ

Danksagung

Zuerst gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Christof Schmid, für die Möglichkeit, an seiner Klinik für Herz-, Thorax-, und herznahe Gefäßchirurgie promovieren zu können.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Karla Lehle für die Überlassung des Themas, die intensive Betreuung der Arbeit, die Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten und ihre erwiesene Geduld bedanken. Ihre unermüdliche Unterstützung hat mich motiviert, die Arbeit zum Abschluss zu bringen.

Mein herzlicher Dank gilt weiter Frau Katrin Bielenberg für die Einarbeitung im Labor, die Vorbereitung der Untersuchungspräparate sowie die kompetente Unterstützung in deren Untersuchung.

Ferner gilt mein Dank Herrn Prof. Dr.-Ing. Lars Krenkel und Herrn Clemens Birkenmaier, Fakultät Maschinenbau an der Ostbayerischen Technischen Hochschule Regensburg, für die Erlaubnis Bildmaterial aus einer ihrer Publikationen in meiner Arbeit verwenden zu dürfen.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern und meinen Geschwistern für ihre immer fortwährende Unterstützung bei dieser Arbeit bedanken.

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.

Felix Martin Steinkirchner

Regensburg, Mai 2023