

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

Prospektive Analyse der Thrombozytenfunktion und Thrombozyten-Leukozyten-
Interaktion während veno-venöser extrakorporaler Membranoxygenierung

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Lukas Paschke

2024

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

Prospektive Analyse der Thrombozytenfunktion und Thrombozyten-Leukozyten-
Interaktion während veno-venöser extrakorporaler Membranoxygenierung

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Lukas Paschke

2024

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Karla Lehle

2. Berichterstatter: PD Dr. Matthias Lubnow

Tag der mündlichen Prüfung: 25.02.2025

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung.....	5
II	Methoden.....	9
II.1	Studienaufbau	9
II.2	Datenerhebung	9
II.2.1	ECMO-Datenbank	9
II.2.2	Probengewinnung Probanden.....	10
II.2.3	Probengewinnung Patienten	11
II.3	Durchflusszytometrie	13
II.3.1	Markierung mit Antikörper-Fluorochrom-Konjugaten.....	14
II.3.2	Geräteeinstellung und Kompensation	18
II.3.3	Antikörpertitration.....	20
II.3.4	Vorbereitung und Verarbeitung der Proben.....	21
II.4	Thrombozyten-Granulozyten-Koaggregate, Thrombozyten-Monozyten-Koaggregate.....	23
II.5	Fibrinogenbindung von Thrombozyten	24
II.6	P-Selektin-Expression von Thrombozyten	25
II.7	Myeloperoxidase	26
II.8	Auswerteregeln und Gatingstrategie für die Durchflusszytometrie.....	27
II.8.1	Gatingstrategie für Thrombozyten-Granulozyten-Koaggregate	28
II.8.2	Gatingstrategie für Thrombozyten-Monozyten-Koaggregaten.....	29
II.8.3	Gatingstrategie für Fibrinogenbindung von Thrombozyten	31
II.8.4	Gatingstrategie für P-Selektin-Expression von Thrombozyten	32
III	Statistik	34
IV	Ergebnisse	35
IV.1	Methodenentwicklung zur Darstellung von Thrombozyten- Granulozyten-Koaggregaten.....	35
IV.1.1	Probengewinnung	38
IV.1.2	Messgeschwindigkeit	39
IV.2	Methodenentwicklung zur Darstellung von Thrombozyten- Granulozyten-Koaggregaten.....	40
IV.3	Methodenentwicklung zur Darstellung von Fibrinogen-bindenden Thrombozyten	40
IV.4	Methodenentwicklung zur Darstellung von P-Selektin-Expression von Thrombozyten	42

IV.5	Methodenentwicklung zur Darstellung der Myeloperoxidase von Granulozyten.....	43
IV.6	Untersuchungsergebnisse	46
IV.6.1	Studienpopulation	46
IV.6.1.1	Probanden.....	46
IV.6.1.2	Patienten	46
IV.6.2	Thrombozyten-Granulozyten-Koaggregate (PNA).....	60
IV.6.3	Thrombozyten-Monozyten-Koaggregate (PMA).....	60
IV.6.4	Fibrinogenbindung von Thrombozyten	61
IV.6.5	P-Selektin-Expression von Thrombozyten	63
IV.6.6	Myeloperoxidase.....	64
IV.6.7	Systemwechsel.....	64
IV.6.8	Gerinnung.....	65
IV.6.9	Inflammation	68
V	Diskussion	69
VI	Zusammenfassung	74
VII	Anhang	75
VII.1	Abkürzungsverzeichnis	75
VII.2	Abbildungsverzeichnis	77
VII.3	Tabellenverzeichnis	80
VII.4	Laborgerät, -material, Antikörper, Chemikalien, Puffer	82
VII.5	Einstellungen Durchflusszytometer	84
VII.6	Poster Euro-ELSO 2018	86
VIII	Literaturverzeichnis.....	88

I Einleitung

Die extrakorporale Membranoxygenierung (ECMO) ist ein temporäres Organersatzverfahren, welches bei therapierefraktärem schwerem Herz-Kreislauf- oder Lungenversagen zum Einsatz kommt. Die erste erfolgreiche Anwendung der ECMO erfolgte im Jahr 1971 durch J. Donald Hill und sein Team bei einem jungen Mann, der im Rahmen eines Polytraumas ein akutes Atemnotsyndrom (Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS) entwickelte, welches mit konventioneller Beatmung nicht therapierbar war. Innerhalb eines Zeitraums von drei Tagen konnte die Entwöhnung des Patienten von der ECMO erfolgreich durchgeführt werden (1).

Bei einem akuten Lungenversagen mit eingeschränkter Oxygenierung und/oder Decarboxylierung, das mit konventioneller Beatmung nicht behoben werden kann, besteht die Möglichkeit, den Gasaustausch über eine veno-venöse ECMO (V-V ECMO) zu gewährleisten. Eine weitere Form der ECMO ist die veno-arterielle ECMO (V-A ECMO), welche neben der Unterstützung der Lungenfunktion vor allem eine Unterstützung des Herz-Kreislauf-Systems darstellt. Die Anwendung erfolgt als extrakorporale Kreislaufunterstützung (Extracorporeal Life Support, ECLS) vor allem bei therapierefraktärem kardiogenem Schock, extrakorporaler kardiopulmonaler Reanimation (extracorporeal cardiopulmonary resuscitation, eCPR) oder postoperativ bei persistierender Herzinsuffizienz (2–4).

Die beiden Therapieverfahren V-V ECMO und V-A ECMO bestehen technisch gesehen aus den gleichen Komponenten, allerdings unterscheiden sie sich in der Art der Kanülierung, das heißt in ihrer Verbindung des Unterstützungssystems mit dem Patienten (5). Im Rahmen einer V-V ECMO erfolgt die Entnahme des venösen (CO₂-reichen, Sauerstoff-armen) Blutes in der Regel über eine lange Kanüle, welche über die V. femoralis in die untere Hohlvene (V. cava inferior) eingebracht wurde, während die Rückführung des decarboxylierten, oxygenierten Blutes über die Vena jugularis interna erfolgt. Bei der V-A ECMO erfolgt die Entnahme des venösen Blutes am selben Ort wie bei der V-V ECMO jedoch die Rückgabe bei der peripheren V-A ECMO über die Arteria femoralis bzw. bei der zentralen V-A ECMO über einen arteriellen Ast der oberen Extremität oder direkt in den Aortenbogen über eine Minithorakotomie. Eine ECMO setzt sich aus einer Steuereinheit, einem

Membranoxygenator, einer Pumpe (Zentrifugal- oder Diagonalpumpe) dem alles verbindenden Schlauchsystem sowie den Kanülen zusammen, welche das System mit dem Gefäßsystem des Patienten verbinden. In der Regel wird das System um einen Wärmetauscher ergänzt. Eine ECMO stellt eine temporäre Therapie bis zur Erholung der Organfunktion (bridge to recovery) oder bis zum Einsatz eines Ersatzorgans oder weiterer Therapien (bridge to therapy) dar (2). Weite Verbreitung fand die V-V ECMO während der H1N1 (H1N1 Subtyp des Influenza-A-Virus)-Pandemie von 2009, wobei sie hier vor allem als Rescue-Therapie nach Versagen der konventionellen Therapie verwendet wurde (6). Die randomisierte Single-Center Kontrollstudie CESAR (Conventional ventilatory support vs. Extracorporeal membrane oxygenation for severe adult respiratory failure) konnte im Jahr 2009 zeigen, dass bei ARDS die Verlegung in ein ECMO-Zentrum positive Auswirkungen auf das Gesamtüberleben hatte. Nach sechs Monaten hatten mehr Patienten in der ECMO-Gruppe überlebt als in der Vergleichsgruppe, allerdings hatten nur 75% der Patienten in der ECMO-Gruppe tatsächlich eine ECMO erhalten, die restlichen Patienten wurden mit konventioneller Therapie behandelt (7). 2018 zeigte die randomisierte Multi-Center Kontrollstudie EOLIA (ECMO to rescue lung injury in severe ARDS) erstmals eine, jedoch nicht signifikante, Reduktion in der 60-Tages Mortalität bei Behandlung eines ARDS mit V-V ECMO gegenüber der konventionellen Behandlung (2). Spätere Metaanalysen dieser zwei randomisierten Kontrollstudien und dreier Observationsstudien konnten zeigen, dass die 60-Tage Mortalität in der V-V ECMO Gruppe signifikant geringer war als in der Kontrollgruppe (34% vs. 47%, RR 0,73 [95% Konfidenzintervall 0,58 – 0,92], $p = 0,008$) (8).

Im Laufe der Coronavirus-Krankheit-2019 (Coronavirus Disease 2019, COVID-19) Pandemie, ausgelöst durch das Schweres-akutes-Atemwegssyndrom-Coronavirus Typ 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2, SARS-CoV-2), kam es zu einem weltweiten Anstieg der Behandlungen eines ARDS mit V-V ECMO (9). Die Weltgesundheitsorganisation empfahl die Erwägung von ECMO bei anhaltender Hypoxämie trotz lungenprotektiver Beatmung (10). Während der Pandemie wurden weltweit keine randomisierten Kontrollstudien zur Behandlung eines durch COVID-19 ausgelösten ARDS mit V-V ECMO durchgeführt (11). Observationsstudien zeigten jedoch Vorteile einer ECMO im kurzfristigen Überleben (12,13). In einer großen Multi-Center Observationsstudie wurde das Überleben sechs Monate nach ECMO

zur Therapie von COVID-19 untersucht. Hier zeigte sich, dass 613 von 1215 Patienten die Therapie überlebten und das Krankenhaus lebend verließen, sechs Monate nach Therapie lebten noch 547 Patienten (13).

Obwohl Nebenwirkungen in den letzten Jahren durch technische Verbesserungen der ECMO-Systeme abgenommen haben, ist eine V-V ECMO weiterhin häufig mit Nebenwirkungen behaftet. Zu den häufigsten Nebenwirkungen gehören thromboembolische Ereignisse und Blutungen (14–17). Während der Therapie kommt das Blut des Patienten in Kontakt mit einer großen Anzahl und Fläche nicht-biologischen Fremdmaterials und wird hohen Scherkräften durch nichtlaminare Strömung im Membranoxygenator und der Blutpumpe ausgesetzt. Hierunter kommt es zur Aktivierung des Gerinnungssystems, von Thrombozyten, Leukozyten und Komplementfaktoren (18). Diese Aktivierung kann in der Folge zu Blutungen und thromboembolischen Ereignissen führen (15,19). Thromboembolische Ereignisse können sowohl in Form einer venösen Thrombose als auch einer Thrombose im ECMO-Kreislauf, am häufigsten als Thrombose des Membranoxygenators (oxygenator thrombosis) oder als Thrombose des Pumpenkopfes (pump head thrombosis) auftreten (15). Eine Thrombose innerhalb der ECMO wird in 10% – 50% der Fälle beschrieben und muss durch einen Wechsel des gesamten ECMO-Systems therapiert werden (14,15,20). Insbesondere der ungeplante Wechsel einer ECMO geht mit einer hohen Belastung für den Patienten einher. So kommt es unter anderem zu einem erheblichen Blutverlust (300-500ml) durch in den zu wechselnden Komponenten verbleibenden Blutes (5). Blutungen sind häufige Komplikationen einer V-V ECMO. In einer retrospektiven Analyse von mehr als 50.000 ECMO-Behandlungen zeigten sich Blutungen in 21,9% der V-V ECMO Therapien. Da es ohne Blutverdünnung zu hohen Raten an technischen Defekten, insbesondere Thrombosen in der Pumpe oder im Membranoxygenator kommt, sowie zu Thrombosen in den kanülierten Gefäßen werden Patienten unter ECMO therapeutisch antikoaguliert (4,5). Blutungen sind von hoher klinischer Relevanz, da sie zu einer erhöhten Mortalität führen (21). Insbesondere bei Blutungsarten, die mit einer erhöhten Mortalität verbunden sind, wie intrazerebrale Blutungen, konnte in den letzten Jahren kein Rückgang festgestellt werden (17).

Wie man aus vielen Biokompatibilitätsstudien weiß, kommt es nach Implantation der ECMO innerhalb von kurzer Zeit zur Anhaftung von Fibrinogen und weiteren

prokoagulatorischen Plasmaproteinen an die Oberfläche des körperfremden Materials der ECMO (15,22). Im Anschluss kommt es über den von-Willebrand-Rezeptor zur Aktivierung und Änderung der Morphologie von Thrombozyten und ihrer Adhäsion an die Membran (15). Leukozyten, insbesondere Granulozyten und Monozyten, verbinden sich wiederum mit Thrombozyten und formen dann Thrombozyten-Granulozyten-Koaggregate (platelet-leucocyte-aggregates, PLA), bei Verbindung von neutrophilen Granulozyten mit Thrombozyten als Thrombozyten-neutrophile-Granulozyten-Koaggregate (platelet-neutrophil-aggregates, PNA) und Thrombozyten-Monozyten-Koaggregate (platelet-monocyte-aggregates, PMA) (23). PNA stellen eine Subgruppe von PLA dar, da hier ausschließlich neutrophile Granulozyten, ohne eosinophile und basophile Granulozyten, untersucht werden. Mansour et. al befassten sich 2020 erstmals mit der Rolle von PLA während ECMO und schlugen ein Untersuchungsprotokoll vor, ihre genaue Rolle in der Entstehung von thromboembolischen Ereignissen während ECMO muss jedoch noch weiter untersucht werden (24).

Bei pädiatrischen Patienten wurde bereits gezeigt, dass es unter ECMO zu einem Abfall von Thrombozyten und zu einem Funktionsverlust von Thrombozyten kommt (25). Ob der gleiche Mechanismus bei Erwachsenen unter ECMO auftritt, und inwieweit diese eingeschränkte Thrombozytenfunktion eine Rolle in der vermehrten Entstehung von Blutungen spielt, ist noch nicht abschließend geklärt.

Ziele der vorliegenden prospektiven Datenanalyse waren:

- Die Thrombozytenfunktion über den zeitlichen Verlauf der ECMO-Therapie zu untersuchen. Hierzu sollte die Expression von P-Selektin und die Bindung von Fibrinogen an aktivierten und nicht aktivierten Thrombozyten untersucht werden.
- Die Interaktion zwischen Thrombozyten und Leukozyten über den zeitlichen Verlauf der ECMO-Therapie zu untersuchen. Von besonderer Bedeutung war die Detektion des Ausmaßes von PNA und PMA.

II Methoden

II.1 Studienaufbau

Die Daten für die vorliegende Untersuchung wurden prospektiv erhoben. Ein positives Votum der Ethikkommission des Universitätsklinikums Regensburg lag vor (#16-101-0322). Für die Etablierung der einzelnen Methoden wurden Vollblutproben von gesunden Probanden verwendet. Nach Etablierung der Methodik wurden die Versuche an einer Kontrollpopulation von gesunden Probanden und an Patienten, die eine V-V ECMO-Therapie erhielten, durchgeführt. Die Etablierung der Methodik an Probanden erfolgte von August 2017 bis November 2017. Die Untersuchung der etablierten Methoden an Probanden erfolgte von November 2017 bis Januar 2018. Der Einschluss von Patienten in die vorliegende Untersuchung erfolgte im Zeitraum von Dezember 2017 bis Mai 2018. Alle Teilnehmer erklärten sich nach Aufklärung über die Studie und die Risiken der Blutentnahme persönlich oder durch ihren gesetzlichen Vertreter mit der Blutentnahme einverstanden. Die Einverständniserklärungen werden in der Forschungsgruppe Prof. K. Lehle, Klinik für Herz-, Thorax- und herznahe Gefäßchirurgie, Universitätsklinikum Regensburg verwahrt. Alle verwendeten Gerätschaften, Einwegmaterialien, Antikörper, Chemikalien und Reagenzien sind im Anhang aufgelistet.

II.2 Datenerhebung

II.2.1 ECMO-Datenbank

Das ECMO-Zentrum am Universitätsklinikum Regensburg ist Mitglied der europäischen Sektion der Extrakorporalen Kreislaufunterstützungsorganisation (Extracorporeal Life Support Organisation, ELSO). Über alle ECMO-Behandlungsfälle werden in der Regensburger ECMO-Datenbank umfangreiche Daten gesammelt, unter anderem:

- Patientendaten (Geschlecht, Alter, Gewicht, Indikation zur ECMO-Anlage, Outcome-Daten)

- Unterstützungsdaten (Ort der Implantation, Dauer der Unterstützung, Art der ECMO inkl. Hersteller, Ort und Art der Kanülierung, Verlauf der Therapie, Verwendung von Nierenersatzverfahren, Anzahl an verabreichten Blutprodukten, Unterstützungsparameter wie Blutfluss, Druckdifferenz vor und hinter Membranoxygenator (Δ pressure membrane oxygenator, dPMO) und weitere.
- Labordaten vor, während und nach ECMO-Therapie: Potential des Wasserstoffs (pH), Arterieller Sauerstoffpartialdruck (p_{aO_2}), Arterieller Kohlenstoffdioxidpartialdruck (p_{aCO_2}), Leukozytenzahl, Thrombozytenzahl, Hämoglobin (Hb), Procalcitonin (PCT), C-reaktives Protein (CRP), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8), Harnstoff, Kreatinin, Bilirubin, Creatininkinase (CK), International Normalized Ratio (INR), Fibrinogen, Aktivierte partielle Thromboplastinzeit (activated partial thromboplastin time, aPTT), Fibrinogen, D-Dimer, freies Hämoglobin (fHb), Aktivität von Antithrombin III (ATIII) und weitere
- Beatmungsparameter: Inspiratorische Sauerstoff-Fraktion (FiO_2), Oxygenierungsindex (p_{aO_2}/FiO_2), Atemminutenvolumen (AMV), Atemzugvolumen (AZV), Atemfrequenz (AF), maximaler inspiratorischer Atemwegdruck (peak inspiratory pressure, PIP), Positiver endexpiratorischer Atemwegdruck (positive endexpiratory pressure, PEEP) und weitere.

Für die vorliegende Untersuchung notwendige Daten wurden aus der ECMO-Datenbank verwendet.

II.2.2 Probengewinnung Probanden

Die Probengewinnung an gesunden Probanden erfolgte nach unten genanntem Protokoll.

- Vorbereitung aller benötigten Materialien auf einem wischdesinfizierten Tablett: Untersuchungshandschuhe, Desinfektionsspray, Stauschlauch, Tupfer, Blutentnahmesystem, Blutentnahmeröhrchen, Pflaster
- Händedesinfektion, Anlegen von unsterilen Untersuchungshandschuhen
- Stauung im Oberarmbereich mittels Stauschlauches

- Identifizieren einer geeigneten Punktionsstelle im Bereich der Vena mediana cubiti
- Lösen des Stauschlauches
- Sprühdesinfektion, Abwischen der Punktionsstelle mittels Kompresse
- Sprühdesinfektion und Abwarten der Einwirkzeit
- Stauung im Oberarmbereich mittels Stauschlauches
- Punktion mittels 20G Blutentnahmesystem
- Lösen des Stauschlauches
- Abnahme der Blutentnahmeröhrchen unter Vermeidung nichtlaminarer, turbulenter Strömung durch langsames und gleichmäßiges Zurückziehen des Stempels am Blutentnahmeröhrchen
- Verwerfen des ersten Blutentnahmeröhrchens
- Abnahme der benötigten Blutentnahmeröhrchen: 4,3ml 3,2%-Citrat Blutentnahmeröhrchen; 2,7ml K3 Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Blutentnahmeröhrchen
- Langsames Überkopfschwenken (3x) der Blutentnahmeröhrchen unmittelbar nach Entnahme
- Entfernen des Entnahmesystems und Kompression der Punktionsstelle
- Schonende Lagerung der Proben bei Raumtemperatur bis zur weiteren Verarbeitung

II.2.3 Probengewinnung Patienten

Eingeschlossen in die Studie wurden alle Patienten,

- die persönlich oder durch ihren gesetzlichen Vertreter der Teilnahme an der Studie zustimmten,
- die in diesem Zeitraum eine V-V ECMO-Therapie erhielten und
- bei denen eine Blutentnahme vor Implantation der ECMO erfolgen konnte.

Es wurden zehn (n=10) Patienten in die Studie eingeschlossen. Da das Ziel der Studie die Untersuchung der genannten Biomarker im Zeitverlauf der ECMO-Therapie war, erfolgten die Blutentnahmen zu folgenden festgelegten Zeitpunkten: Vor Implantation der ECMO, zwei Stunden, sechs Stunden, 24 Stunden, 48 Stunden,

fünf Tage und zehn Tage nach Implantation der ECMO. Die Blutproben wurden innerhalb von zwei Stunden nach Abnahme verarbeitet. Falls während der Therapie ein Systemwechsel erfolgte, wurde, soweit technisch und logistisch umsetzbar, erneut in den oben genannten Intervallen Blut abgenommen. Die Systemwechsel wurden aufgrund von technischen Komplikationen durchgeführt (14).

Die Probengewinnung an Patienten erfolgte nach unten genanntem Protokoll.

- Vorbereitung der Materialien auf einem wischdesinfizierten Tablett
- Händedesinfektion, Anlegen von unsterilen Untersuchungshandschuhen
- Identifikation, ob Abnahme durch arteriellen Zugang oder am Oxygenator erfolgt
- Sprühdesinfektion des Verschlussstopfens
- Entfernen des Verschlussstopfens, Sprühdesinfektion des Lumens, Ausschütteln des Desinfektionsmittels, Abwarten der Einwirkzeit
- Entnahme und Verwerfen von 5ml Blut mittels steriler Spritze
- Aufsetzen eines Luer-Multiadapters
- Abnahme der Blutentnahmeröhrchen unter Vermeidung nichtlaminarer, turbulenter Strömung durch langsames und gleichmäßiges Zurückziehen des Stempels am Blutentnahmeröhrchen: 4,3ml 3,2%-Citrat Blutentnahmeröhrchen; 2,7ml K3 EDTA Blutentnahmeröhrchen
- Langsames Überkopfschwenken (3x) der Blutentnahmeröhrchen unmittelbar nach Entnahme
- Bei arteriellem Zugang: Spülen der Zugangsleitung mit 0,9% Natriumchloridlösung
- Sprühdesinfektion des Lumens, Ausschütteln des Desinfektionsmittels, Abwarten der Einwirkzeit
- Aufsetzen eines Luer-Lock-Verschlussstopfens
- Schonender Transport der Blutproben ins Untersuchungslabor
- Schonende Lagerung der Proben bis zur weiteren Verarbeitung

In einzelnen Fällen erfolgte die Blutgewinnung bei Patienten analog zum Probandenprotokoll. Dies war der Fall bei der Abnahme des Prä-Wertes (Die Blutprobe, die vor Beginn der Therapie abgenommen wurde), sowie bei Fällen, bei denen keine arterielle Blutdruckmessung etabliert war.

II.3 Durchflusszytometrie

Antikörpermarkierte Zellpopulationen wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Das Design und die Auswertung des durchflusszytometrischen Experiments erfolgte unter Berücksichtigung der Empfehlungen zur Durchführung eines Experiments mittels Durchflusszytometrie (26).

Mittels Durchflusszytometrie kann in kurzer Zeit eine große Anzahl von Zellen auf verschiedene Eigenschaften untersucht werden. Ein Durchflusszytometer besteht aus einer Lichtquelle, verschiedenen Detektoren, einer datenverarbeitenden Einheit und einer Trägerflüssigkeit. Durch die Trägerflüssigkeit wird die zu testende Zellsuspension so fokussiert, dass nur eine Zelle gleichzeitig die Lichtquelle passiert. Das Gerät sendet einen Laserstrahl aus, der von Zellen, während sie diesen einzeln passieren, gebrochen wird. Anhand des Beugungs- und Brechungsmusters können Aussagen über die Größe und Granularität einer Zelle getroffen werden. Die Beugung des Lichtstrahls wird als Forward Scatter (FSC), die Brechung als Sideward Scatter (SSC) bezeichnet. Die Beugung ist abhängig vom Volumen der Zelle, die Brechung abhängig von der Granularität der Zelle (27). Schon anhand dieser Parameter können Zellen voneinander differenziert werden. Abbildung 1 zeigt ein Beispiel für ein Streudiagramm zur Darstellung verschiedener Blutzellpopulationen, die sich je nach Größe und Granularität unterscheiden.

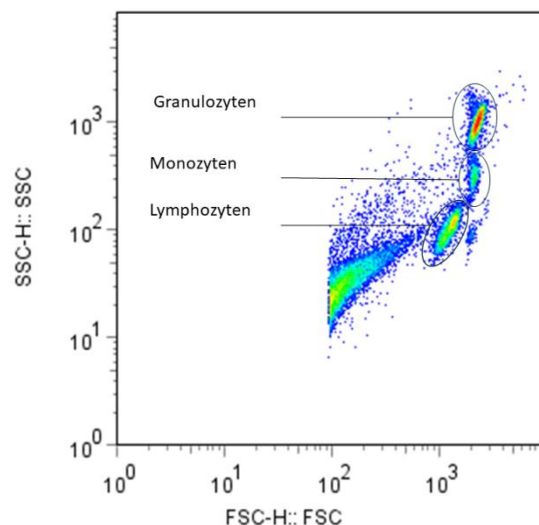


Abbildung 1: **Vollblutprobe eines gesunden Probanden in der Durchflusszytometrie.** 2D-Scatterplot (FSC / SSC) mit Populationen von Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten (Eigene Darstellung).

Zusätzlich wird über verschiedene Detektoren fluoreszierendes Licht gemessen (27). Keine für diese Untersuchung relevanten Zellen emittieren selbst fluoreszierendes

Licht. Die Zellen von Interesse wurden mit spezifischen Antikörper-Fluoreszenz-Konjugaten gefärbt. Die konjugierten Fluoreszenzfarbstoffe werden durch verschiedene Laser angeregt (excitation) und emittieren Licht (emission) wiederum auf einer spezifischen Wellenlänge. Verschiedene Farben mit ihrer jeweils spezifischen Wellenlänge werden über verschiedene Detektoren erkannt und in ein elektronisches Signal verarbeitet. Abbildung 2 zeigt die Anordnung von Lasern und Detektoren in einem Durchflusszytometer.

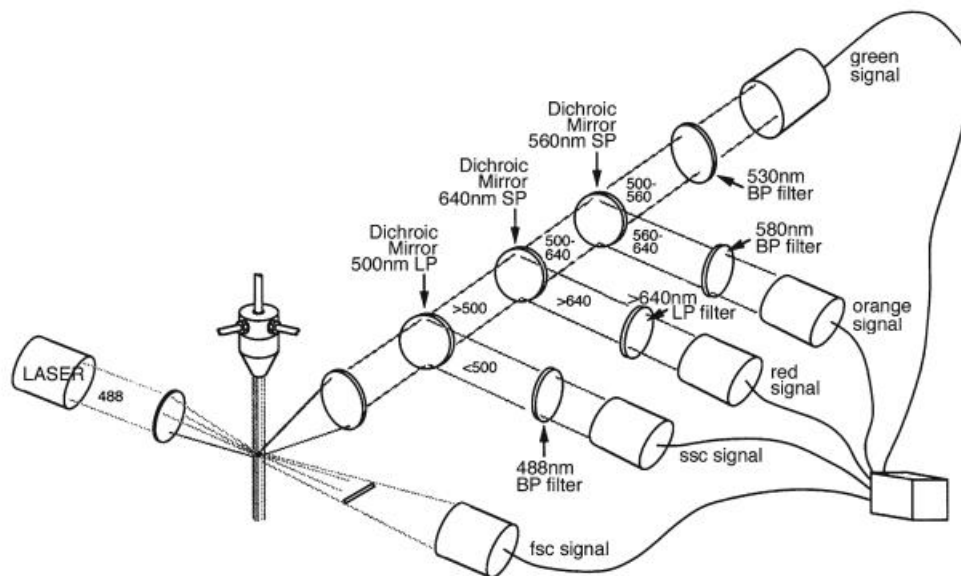


Abbildung 2: **Anordnung von Laser und Detektoren** in einem Durchflusszytometer (aus (27)).

II.3.1 Markierung mit Antikörper-Fluorochrom-Konjugaten

Die Identifizierung von verschiedenen Zellpopulationen erfolgte wie oben beschrieben neben Größe und Granularität über fluoreszenzmarkierte monoklonale Antikörper. Zellen haben immunphänotypische Oberflächenmerkmale, die sich in Gruppen einteilen lassen, die sogenannten Cluster of Differentiation (CD) (27,28). Verschiedene CD-Moleküle können durch fluoreszenzmarkierte monoklonale Antikörper erkannt werden und somit zur Identifizierung von verschiedenen Zelltypen oder verschiedenen Aggregatzuständen des gleichen Zelltyps eingesetzt werden (28,29). Die Fluoreszenzfarbstoffe müssen so ausgewählt werden, dass die verschiedenen Zielpopulationen mit ausreichend großer Trennschärfe voneinander unterschieden werden können (30) (vergleiche Abbildung 3).

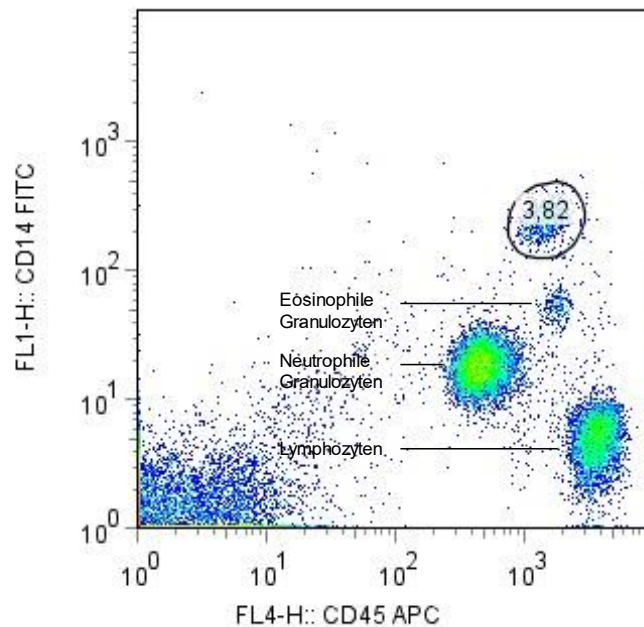


Abbildung 3: **Vollblutprobe mit verschiedenen Leukozytenpopulationen.** 2D-Scatterplot (CD45 / CD14), CD14+ / CD45+ Monozyten ausgewählt und mit „3,82“ markiert, entsprechend 3,82% aller gemessenen Ereignisse. Unterhalb davon weitere Leukozytenpopulationen markiert (Eigene Darstellung).

Zur Identifizierung von neutrophilen Granulozyten wurden die Epitope CD45 und CD66b verwendet (23,31,32). Zur Identifizierung von Monozyten wurden die Epitope CD45 und CD14 verwendet (23,32). Zur Identifizierung von Thrombozyten wurde das Epitop CD61 verwendet (33,34). Zur Identifizierung der Aktivitätszustände von Thrombozyten wurden das Epitop CD62p (P-Selektin) sowie die Bindung von fluoreszenz-markiertem Fibrinogen verwendet (32,35,36). In Tabelle 1 ist die Spezifität der genannten Epitope dargestellt.

Verwendete Antikörper / Substrate	Spezifität
Maus-Anti-Human-CD14	Monozyten
Maus-Anti-Human-CD45	Leukozyten
Maus-Anti-Human-CD61	Thrombozyten
Maus-Anti-Human-CD62p (P-Selektin)	Aktivierte Thrombozyten
Maus-Anti-Human-CD66b	Granulozyten
Human-Fibrinogen	Aktivierte Thrombozyten

Tabelle 1: **Verwendete Antikörper / Substrate und Ihre Spezifität** (Eigene Darstellung, modifiziert nach (37)).

Für jede zu untersuchende Zellpopulation wurde anhand ihrer Oberflächenmoleküle und / oder ihrer exkretorischen Aktivität eine Antikörperkombination festgelegt, anhand derer sie identifiziert werden konnte. In Tabelle 2 sind die jeweiligen Antikörperkombinationen dargelegt.

Bei der Auswahl der Antikörper wurden als Primärpopulationen PNA und Fibrinogen-bindende Thrombozyten festgelegt, als Sekundärpopulationen PMA und P-Selektin-exprimierende Thrombozyten.

gesuchte Zellpopulation	Spezifisches Erkennungsmuster
Koaggregate aus Thrombozyten und Granulozyten = Platelet-neutrophil-aggregates (PNA)	CD45+/CD14-/CD66b+/CD61+ Granulozyten
Koaggregate aus Thrombozyten und Monozyten = Platelet-monocyte-aggregates (PMA)	CD45+/CD14+/CD66b-/CD61+ Monozyten
P-Selektin-exprimierende Thrombozyten	CD61+/CD62p+ Thrombozyten
Fibrinogen-bindende Thrombozyten	CD61+/Fibrinogen+ Thrombozyten

Tabelle 2: **Zielpopulationen der Untersuchung und ihr spezifisches Erkennungsmuster** (Eigene Darstellung).

Die Auswahl der Antikörper muss unter Berücksichtigung der verfügbaren Fluoreszenzfarbstoffe erfolgen, da nicht jede Antikörper-Farbstoff-Kombination verfügbar ist und die Farbstoffe zur Messfähigkeit der Photodetektoren des Durchflusszytometers passen müssen. Tabelle 3 stellt die verfügbaren Kanäle im Durchflusszytometer FACSCalibur™ (BD Biosciences; Becton, Dickinson and Company Biosciences) mit den entsprechenden Wellenlängen und die möglichen Fluoreszenzfarbstoffe dar.

Kanal	Detektierte Wellenlänge in nm	Mögliche Fluorochrome (Auswahl)
FL-1	530	Fluorescein Isothiocyanat (FITC)
FL-2	585	Phycoerythrin (PE)
FL-3	>670	Peridinin Chlorophyll Protein-Cyanine5.5 (PerCP-Cy5.5)
FL-4	661	Allophycocyanin (APC)

Tabelle 3: **Photodetektoren im FACSCalibur**. Ausgewählte Fluorochrome, die im Bereich der angegebenen Wellenlänge Licht emittieren und erkannt werden können. (Eigene Darstellung).

In einem modernen Durchflusszytometer werden die Untersuchungszellen nicht nur durch einen Laser, typischerweise einen Argon-Ion-Laser mit türkisfarbigem Licht mit einer Wellenlänge von 488nm, angeregt, sondern nacheinander von zwei oder mehr Lasern angeregt. Durch diesen Aufbau können Zellen mit verschiedenen Fluorochromen gleichzeitig gefärbt werden. So fließt eine Zelle im FACSCalibur™ zunächst durch den Lichtstrahl des Argon-Ion-Laser, wird mit Licht der Wellenlänge 488nm angeregt und emittiert durch alle Fluorochrome, die bei 488nm angeregt

werden, ein spezifisches Fluoreszenzmuster, welches von den Photodetektoren erkannt wird. Anschließend fließt die Zelle durch den Lichtstrahl des roten Lasers, wird mit Licht der Wellenlänge 635nm angeregt und diejenigen Fluorochrome, die bei 635nm angeregt werden, emittieren ihrerseits ein spezifisches Fluoreszenzmuster. Das emittierte Licht kommt zeitversetzt bei den Photodetektoren an und kann so den jeweiligen Lasern zugeordnet werden. Auf diese Art und Weise kann eine Zelle auf zahlreiche Eigenschaften gleichzeitig untersucht werden (27).

Die für diese Untersuchung gewählten Konjugate sind in den Tabellen 4 - 6 dargestellt.

Antikörper-Fluorochrom-Konjugat	Laser	Emittierte Wellenlänge (nm)	Kanal
Anti-Human CD14-FITC	Argon 488	530	FL-1
Anti-Human CD66b-PE	Argon 488	585	FL-2
Anti-Human CD61-PerCP-Cy5.5	Argon 488	>670	FL-3
Anti-Human CD45-APC	Red 635	661	FL-4

Tabelle 4: Antikörper-Fluorochrom-Kombination zur Darstellung von PNA und PMA (Eigene Darstellung).

Antikörper-Fluorochrom-Konjugat	Laser	Emittierte Wellenlänge (nm)	Kanal
Fibrinogen Alexa Fluor 488 Konjugat	Argon 488	519	FL-1
Anti-Human CD61-PerCP-Cy5.5	Argon 488	>670	FL-3

Tabelle 5: Antikörper-Fluorochrom-Kombination zur Darstellung der Fibrinogenbindung von Thrombozyten (Eigene Darstellung).

Antikörper-Fluorochrom-Konjugat	Laser	Emittierte Wellenlänge (nm)	Kanal
Anti-Human CD62p-Dylight 488 (P-Selektin)	Argon 488	518	FL-1
Anti-Human CD61-PerCP-Cy5.5	Argon 488	>670	FL-3

Tabelle 6: Antikörper-Fluorochrom-Kombination zur Darstellung der P-Selektin-Expression von Thrombozyten (Eigene Darstellung).

II.3.2 Geräteeinstellung und Kompensation

Vor Beginn des Versuches wurden die verschiedenen Kanäle des Durchflusszytometers auf die zu untersuchende Population eingestellt. Über die angelegte Spannung (voltage) kann das Signal der Photodetektoren amplifiziert werden. Darüber wird die Darstellung auf die Zielpopulation fokussiert. In Vorversuchen wurde die korrekte Spannung für die jeweilige Zielpopulation eingestellt. Eine korrekt eingestellte Probe zeigt die Zielpopulation in ihrer Gesamtheit inklusive aller möglicher Aggregatzustände (vgl. Abbildung 4).

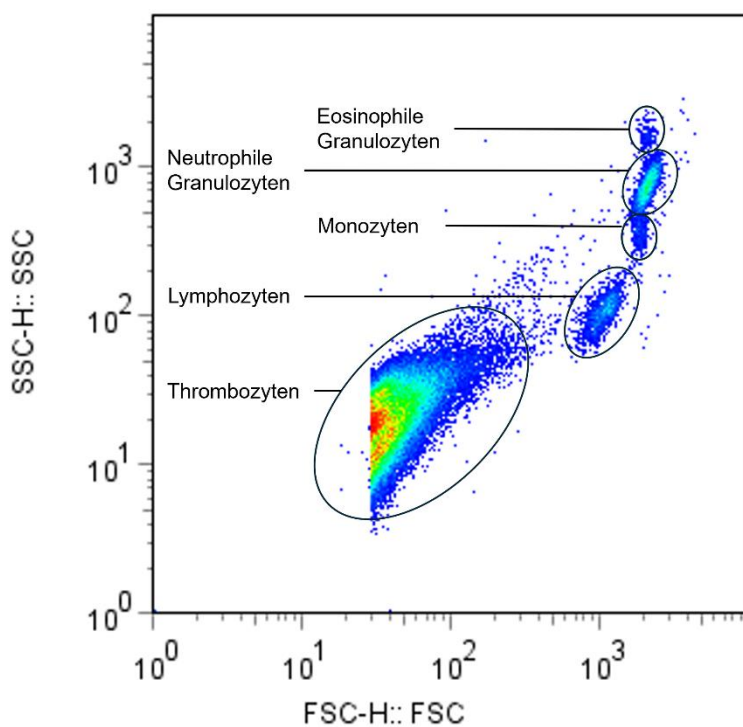


Abbildung 4: **Vollblutprobe nach korrekter Geräteeinstellung.** 2D-Scatterplot (FSC/SSC), Zellpopulationen beschriftet (Eigene Darstellung).

Alle Geräteeinstellungen sind ausführlich im Anhang dargestellt. Mit diesen Einstellungen wurden alle weiteren Untersuchungen durchgeführt. Im Anschluss werden die Photodetektoren (FL1-FL4) auf das zu messende Fluorochrom eingestellt. Dazu werden zunächst ungefärbte Zellen als Negativprobe gemessen. Dann werden mithilfe von einfach gefärbten Zellen die jeweiligen Photomultiplier auf dieses spezifische Fluorochrom eingestellt. Der Fluoreszenzfarbstoff wird nicht nur von demjenigen Messkanal, der diesen Farbstoff misst, sondern auch von benachbarten Kanälen detektiert (spillover). Dieser spillover wird mittels

Kompensation mathematisch herausgerechnet. Die korrekte Berechnung der Kompensation ist unerlässlich für die Erlangung von validen Untersuchungsergebnissen, da sonst unklar ist, ob die gemessene Fluoreszenz von dem Fluorochrom von Interesse stammt oder durch spillover verursacht ist. Kompensation kann auf zwei Wegen durchgeführt werden. Bei Kompensation direkt am Gerät (hardware compensation), wird mittels Testzellen oder einfach-gefärbten Zellen mithilfe des Scatterplots die Kompensation der benachbarten Kanäle durchgeführt. Alternativ können die Ergebnisse als Rohdatensatz ohne Kompensation gespeichert werden und im Anschluss durch ein Auswerteprogramm korrigiert werden (software compensation) (26,27,30). Für die vorliegende Untersuchung wurde aufgrund der vorliegenden Technik hardware compensation verwendet. Die Kompensation muss immer für beide benachbarten Kanäle erfolgen. Beispielhaft ist die Kompensation für die PNA- und PMA-Versuche in Abbildung 5 dargestellt. PNA und PMA treten sowohl bei einer niedrigen als auch einer erhöhten absoluten Anzahl an Leukozyten in einer Probe auf, deshalb wurde auf eine Quantifizierung der Leukozytenzahl verzichtet (23). Es wurden pro Probe 20.000 Events gezählt.

Die Wahrscheinlichkeit, dass pro Event mehr als eine Zelle pro Analysepunkt vom Gerät gezählt wird, steigt mit der Durchflussgeschwindigkeit (Flow Rate) an. Bei einer Messgeschwindigkeit von weniger als 1000 events / Sekunde ist die Wahrscheinlichkeit für solche messinduzierten Koaggregate (pseudo clumps) mit unter 0,1% gering (27). Die Flow Rate im Durchflusszytometer FACSCalibur™ kann in drei Stufen („slow“ – „medium“ – „fast“) eingestellt werden. Durch Verdünnung der Proben und langsames Ansaugen der Trägerflüssigkeit mit der Probenflüssigkeit wurde eine Flow Rate von <500 events/ Sekunde gewährleistet.

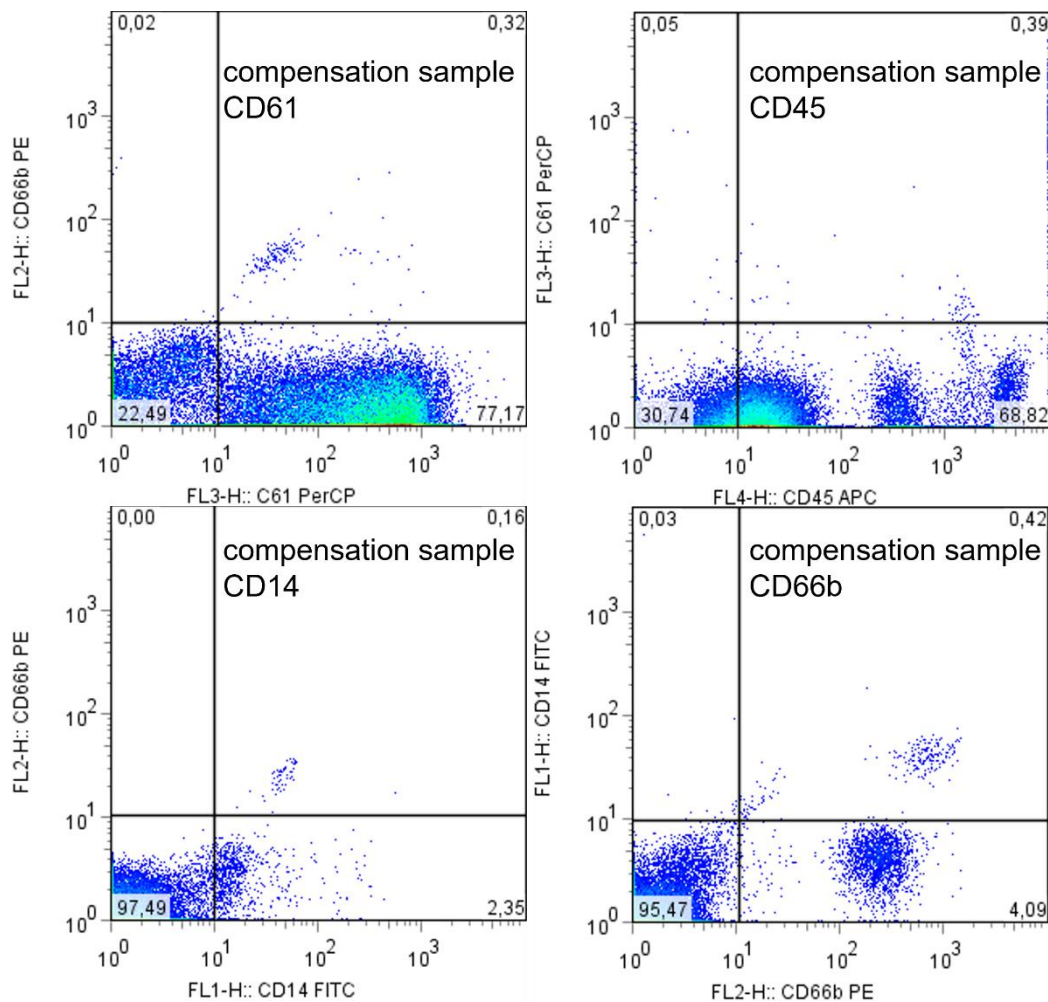


Abbildung 5 **Vollblutprobe nach korrekter Kompensation.** Oben Links 2D-Scatterplot (CD61/CD66b). Einfach CD61-gefärbte Kompensationsprobe für Kanal FL3-CD61-PerCP-Cy5.5, Zielpopulation zeigt nur im Kanal FL3 positives Signal, nach erfolgter Kompensation kein positives Signal im benachbarten Kanal FL2. Oben rechts 2D-Scatterplot (CD45/CD61). Einfach CD45-gefärbte Kompensationsprobe für Kanal FL4-CD45-APC, Zielpopulationen zeigen nur im Kanal FL4 positives Signal, nach erfolgter Kompensation kein positives Signal im benachbarten Kanal FL3. Unten Links 2D-Scatterplot (CD14/CD66b). Einfach CD14-gefärbte Kompensationsprobe für Kanal FL1-CD14-FITC, Zielpopulation zeigt nur im Kanal FL1 positives Signal, nach erfolgter Kompensation kein positives Signal im benachbarten Kanal FL2. Unten rechts 2D-Scatterplot (CD66b/CD14). Einfach CD66b-gefärbte Kompensationsprobe für Kanal FL2-CD66b-PE, Zielpopulation zeigt nur im Kanal FL2 positives Signal, nach erfolgter Kompensation kein positives Signal im benachbarten Kanal FL1. Events im oberen rechten Quadranten sind jeweils als Doubletten / Artefakte zu werten (Eigene Darstellung).

II.3.3 Antikörpertitration

Für jeden Antikörper musste mittels Titration das beste Färbeergebnis in Hinsicht auf ausreichende Markierung im Gegensatz zu Überfärbung etabliert werden. In Vorversuchen wurde die optimale Antikörpermenge ermittelt. In Tabelle 7 werden die benötigten Antikörpervolumina dargestellt.

Untersucher / (s) Antikörper, /Konjugat	Originallösung in μl
Anti-Human CD14	10
Anti-Human CD45	10
Anti-Human CD66b	2,5
Anti-Human CD61	2,5 (PNA, PMA); 5 (Fibrinogen, P-Selektin)
Anti-Human P-Selektin	1
Fibrinogenkonjugat	1,5

Tabelle 7: Benötigte Menge der Antikörper nach Titration. Es ist das Volumen der Originallösungen angegeben, welches in der Antikörpertitration zu den besten Färbeergebnissen von 50 μl Vollblut geführt hat (Eigene Darstellung).

II.3.4 Vorbereitung und Verarbeitung der Proben

Zur Untersuchung der Proben war ein Puffer nötig, in welchem die Blutproben zur Analyse stabil gehalten werden konnten. Als Puffer wurde eine Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) versetzt mit 0,5% bovinem Serumalbumin (PBS/0,5% BSA) verwendet (35,38).

In einem Mikroliter (μl) Blut sind durchschnittlich $3.500-5.900 \times 10^3$ Erythrozyten, $4-10 \times 10^3$ Leukozyten und $0,0015-0,004 \times 10^3$ Thrombozyten vorhanden (39). Da die gesuchten Populationen aus Leukozyten und Thrombozyten bestanden, mussten die Erythrozyten entfernt werden, da diese ansonsten die Untersuchung der zahlenmäßig deutlich kleineren Populationen unmöglich gemacht hätten. Dies geschah durch Lysierung, d.h. durch Herbeiführung des Zelluntergangs durch Zerstörung der Zellmembran, der Erythrozyten. Zur Lysierung und gleichzeitigen Fixierung der verbleibenden Zellen wurde BD FACS™-Lyse verwendet (40). Gleichzeitige Lysierung und Fixierung ist der zweizeitigen Lysierung und anschließenden Fixierung überlegen, da es bei zeitversetzter Fixierung zu artifizieller Aktivierung von Thrombozyten und Leukozyten durch freigesetztes Adenosindiphosphat (ADP) aus Erythrozyten kommt (38). Ohne Lysierung der Erythrozyten besteht der weit überwiegende Teil der Probe aus Erythrozyten und es werden nicht genügend Leukozyten und Thrombozyten gemessen (41).

Für die Untersuchung der Thrombozyten (Fibrinogenbindung und P-Selektin-Expression) wurde thrombozytenreiches Plasma (platelet rich plasma, PRP)

hergestellt, um damit eine ausreichend große Zahl an Thrombozyten untersuchen zu können (siehe II.4) (35). Für die durchflusszytometrische Analyse wurde eine Verdünnung von PRP 1:10 mit PBS/0,5%BSA verwendet.

Aus Vorversuchen war bekannt, dass unter Kühlung bei 4°C die fixierten Proben 24h stabil sind. Die durchflusszytometrische Untersuchung der Proben musste deshalb innerhalb von 24h nach Fixierung erfolgen (23,38).

II.4 Thrombozyten-Granulozyten-Koaggregate, Thrombozyten-Monozyten-Koaggregate

Im Folgenden wird die Versuchsanordnung für die Darstellung von PNA und PMA gezeigt. Es wurde mit Citrat antikoaguliertes Blut verwendet.

- Beschriftung der Probengefäße: „1“ (Kontrolle) und „2“ (Probe).
- Antikörper: Vorlegen der Antikörper in Probengefäß 2.
 - CD14 10µl
 - CD45 10µl
 - CD66b 2,5µl
 - CD61 2,5µl
- Blut: 50µl Citratvollblut in Probengefäße 1 und 2 hinzugeben. Falls die Innenseite des Probengefäß mit Blut verunreinigt wird, dieses mit Wattestäbchen entfernen.
- Inkubieren: Proben für 45 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubieren.
- BD-Lyse vorbereiten: Im Verhältnis 1:10 mit a.d. verdünnen. 200µl BD-Lyse mit 1800µl a.d. verdünnen.
- Erythrozytenlyse und Fixierung: Je Probe 2ml 1:10-BD-Lyse hinzugeben.
- Inkubieren: Probengefäße für 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubieren.
- Waschen: Je Probengefäß 2ml PBS/0,5%BSA hinzugeben.
- Zentrifugieren: Probengefäße mit 520g für 10 Minuten bei 22°C zentrifugieren.
- Überstand abkippen und abtropfen auf Zellstoff.
- Resuspendieren: Je Probengefäß 500µl PBS/0,5%BSA hinzugeben.
- Lagern: Bei 4 Grad dunkel lagern bis zur durchflusszytometrischen Analyse.

II.5 Fibrinogenbindung von Thrombozyten

Im Folgenden wird die Versuchsanordnung für die Darstellung von Thrombozyten, die Fibrinogen binden, gezeigt. Es wurde mit Citrat antikoaguliertes Blut verwendet.

- Vorbereitung: 10µl einer 100µM ADP-Lösung auftauen und mit 90µl a.d. verdünnen. (entspricht 10µM)
- 1%-ige Formaldehydlösung bereitstellen.
- Beschriftung von vier Probengefäßen: „1“ (Kontrolle), „2“ (Probe unstimuliert), „3“ (Probe stimuliert), „4“ (Plasma).
- Reserve: 500µl Citratvollblut in Mikroreaktionsgefäß überführen und beiseitestellen.
- Zentrifugieren: Vollblut in Citrat-Blutentnahmeröhrchen mit 190g für 10 Minuten bei 22°C zentrifugieren.
- Aliquotieren: Vorsichtig 100µl PRP aus zentrifugierter Citrat-Blutentnahmeröhrchen in Probengefäß 4 überführen.
- Verdünnen: 1:10 verdünntes PRP (1:10-PRP) herstellen. Dazu 100µl PRP in Probengefäß 4 mit 900µl PBS/0,5%BSA Puffer verdünnen.
- Aliquotieren: 100µl 1:10-PRP aus Probengefäß 4 in Probengefäß 1 aliquotieren.
- Markieren: 1,5µl Fibrinogen-Konjugat in Probengefäße 2 und 3 vorlegen.
- Plasma: 100µl 1:10-PRP aus Probengefäß 4 in Probengefäße 2 und 3 hinzugeben.
- Inkubieren: Proben für 4 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubieren.
- Stimulieren: 5µl ADP in Probengefäß 3 hinzugeben.
- Inkubieren: Proben 1, 2 und 3 für 4 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubieren.
- Fixieren: 100µl 1%-Formaldehyd in Probengefäße 1, 2 und 3 hinzugeben.
- Inkubieren: Proben für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubieren.
- Waschen: 2ml PBS/0,5%BSA in Probengefäße 1, 2 und 3 hinzugeben.

- Zentrifugieren: Proben 1, 2 und 3 mit 520g für 10 Minuten bei 22°C zentrifugieren.
- Überstand abkippen und abtropfen auf Zellstoff.
- Antikörper: 5µl CD-61-Konjugat in Probengefäße 2 und 3 hinzugeben.
- Inkubieren: Proben 1, 2 und 3 für 45 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubieren.
- Waschen: Jeweils 1ml PBS/BSA0,5% in Probengefäße 1, 2 und 3 hinzugeben.
- Zentrifugieren: Proben mit 520g für 10 Minuten bei 22°C zentrifugieren.
- Überstand abkippen und abtropfen auf Zellstoff.
- Resuspendieren: Jeweils 1ml PBS/0,5%BSA in Probengefäße 1, 2 und 3 hinzugeben.
- Lagern: Bei 4 Grad dunkel lagern bis zur durchflusszytometrischen Analyse.

II.6 P-Selektin-Expression von Thrombozyten

Im Folgenden wird die Versuchsanordnung für die Darstellung von Thrombozyten, die P-Selektin exprimieren, gezeigt.

- Vorbereitung: 12,5 µl einer 5mM-TRAP6-Lösung (Thrombinrezeptor-Aktivator Peptid 6, Thrombin Receptor Activator Peptide 6) im Verhältnis 1:10 mit 112,5µl a.d. verdünnen (entspricht 500 µM)
- Beschriftung dreier Probengefäße: „1“ (Kontrolle), „2“ (Probe unstimuliert), „3“ (Probe stimuliert)
- Stimulieren: 5µl TRAP6 in Probengefäß 3 vorlegen.
- Plasma: 100µl 1:10-PRP in Probengefäße 1, 2 und 3 hinzugeben. (entspricht 25µM TRAP-6 Endkonzentration in der Probe)
- Inkubieren: Proben für 2 Minuten bei 37°C inkubieren.
- Fixieren: 100µl 1%-Formaldehyd in Probengefäße 1, 2 und 3 hinzugeben.
- Inkubieren: Proben für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubieren.
- Waschen: 2ml PBS/0,5%BSA in Probengefäße 1, 2 und 3 hinzugeben.
- Zentrifugieren: Proben mit 520g für 10 Minuten bei 22°C zentrifugieren.

- Überstand abkippen und abtropfen auf Zellstoff.
- Antikörper: 5µl CD61-Konjugat und 1µl CD62p-Konjugat in Probengefäße 2 und 3 hinzugeben.
- Inkubieren: Probengefäße für 45 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubieren.
- Waschen: Jeweils 1ml PBS/BSA0,5% in Probengefäße 1, 2 und 3 hinzugeben.
- Zentrifugieren: Proben mit 520g für 10 Minuten bei 22°C zentrifugieren.
- Überstand abkippen und abtropfen auf Zellstoff.
- Resuspendieren: Je Probengefäß 500µl PBS/0,5%BSA hinzugeben.
- Lagern: Bei 4 Grad dunkel lagern bis zur durchflusszytometrischen Analyse.

II.7 Myeloperoxidase

Dieser Versuch wurde nur an Vorprobanden durchgeführt, da, wie in Kapitel IV.5 dargestellt, keine reproduzierbaren Ergebnisse erreicht werden konnten. Die zuletzt verwendete Versuchsanordnung wird hier dargestellt.

- Beschriftung der Probengefäße: „1“ (Kontrolle), „2“ (Probe).
- Antikörper: Vorlegen von 2,5µl CD66b-Antikörper-Konjugat in Probengefäß 2.
- Blut: 50µl EDTA-Blut in Probengefäß 1 und 2 hinzugeben. Falls die Innenseite des Probengefäß mit Blut verunreinigt wird, dieses mit Wattestäbchen entfernen.
- Inkubieren: Proben für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubieren.
- Erythrozytenlyse und Fixierung: 2ml 1:10-verdünnte BD-Lyse in Probengefäß 1 und 2 hinzugeben.
- Inkubieren: Proben für 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubieren.
- Waschen: Jeweils 2ml PBS/0,5%BSA zu Proben 1 und 2 hinzugeben.
- Zentrifugieren: Proben mit 520g für 10 Minuten bei 22°C zentrifugieren.
- Überstand abkippen und abtropfen auf Zellstoff.

- Antikörper und Permeabilisierung: 5µl Myeloperoxidase (MPO)-Antikörper-Konjugat und 100µl Saponinpuffer (0,5g Saponin in 100ml PBS/0,5% BSA) in Probengefäß 2 hinzugeben.
- Inkubieren: Proben für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubieren.
- Waschen: Jeweils 1ml Saponinpuffer zu Probengefäß 1 und 2 hinzugeben.
- Zentrifugieren: Proben mit 520g für 10 Minuten bei 22°C zentrifugieren.
- Überstand abkippen und abtropfen auf Zellstoff.
- Resuspendieren: Je Probengefäß 500µl Saponinpuffer hinzugeben.
- Lagern: Bei 4 Grad dunkel lagern bis zur durchflusszytometrischen Analyse.

II.8 Auswerteregeln und Gatingstrategie für die Durchflusszytometrie

Die erhobenen Daten des Durchflusszytometers wurden mit dem Programm FlowJo (FlowJo LLC, Ashland, USA) ausgewertet (42). Die vom Durchflusszytometer ausgegebenen Daten wurden hier grafisch dargestellt und als 2D-Plots dargestellt. Um die verschiedenen Untersuchungspopulationen analysieren zu können, wurden Auswerteregeln zur Identifizierung der relevanten Populationen festgelegt. Gating beschreibt in der Durchflusszytometrie die Auswahl von Subpopulationen anhand ihrer spezifischen Merkmale (27). Im Folgenden werden die spezifischen Subpopulationen definiert und angegeben, wie die Gates in den 2D-Scatterplots gesetzt wurden.

II.8.1 Gatingstrategie für Thrombozyten-Granulozyten-Koaggregate

Ziel des Versuches war es, die prozentuale Anzahl von PNA im Verhältnis zu allen CD45-positiven / CD66b-positiven neutrophilen Granulozyten zu messen. Dazu erfolgte in einem ersten Schritt die Identifikation der zu untersuchenden Population mittels Gating in 2D-Scatterplots. In einem zweiten Schritt wurde die Subpopulation auf die Eigenschaft „Thrombozytenbindung“ untersucht.

1. Darstellung der CD45-positiven, CD66b-positiven neutrophilen Granulozyten:

Scatterplot: Anti-CD45 (FL-4) vs. Anti-CD66b (FL-2).

Mit dieser Darstellung können alle Leukozytenpopulationen anhand der beiden Oberflächenmerkmale CD45 und CD66b untersucht werden. Alle Leukozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche CD45, wohingegen nur neutrophile und eosinophile Granulozyten CD66b exprimieren.

Ziel: CD45-positive, CD66b-positive homogene Population

2. Darstellung der CD45-positiven, CD66b-positiven, CD61-positiven

Thrombozyten-Granulozyten-Koaggregate:

Scatterplot: Anti-CD66b (FL-2) vs. Anti-CD61 (FL-3).

Dargestellt wird die CD45-positive, CD66b-positive Population aus dem vorangegangenen Schritt. Granulozyten exprimieren das Oberflächenmolekül CD61 nicht. Demnach sind alle CD45-positiven, CD66b-positiven, CD61-positiven Zellen als PNA zu werten. Durch Setzen der Quadranten zwischen die beiden Populationen kann der Anteil von Thrombozyten-Granulozyten-Koaggregaten an allen CD45-positiven, CD66b-positiven neutrophilen Granulozyten bestimmt werden (vgl. Abbildung 6).

Ziel: CD45-positive, CD66b-positive, CD61-positive Population.

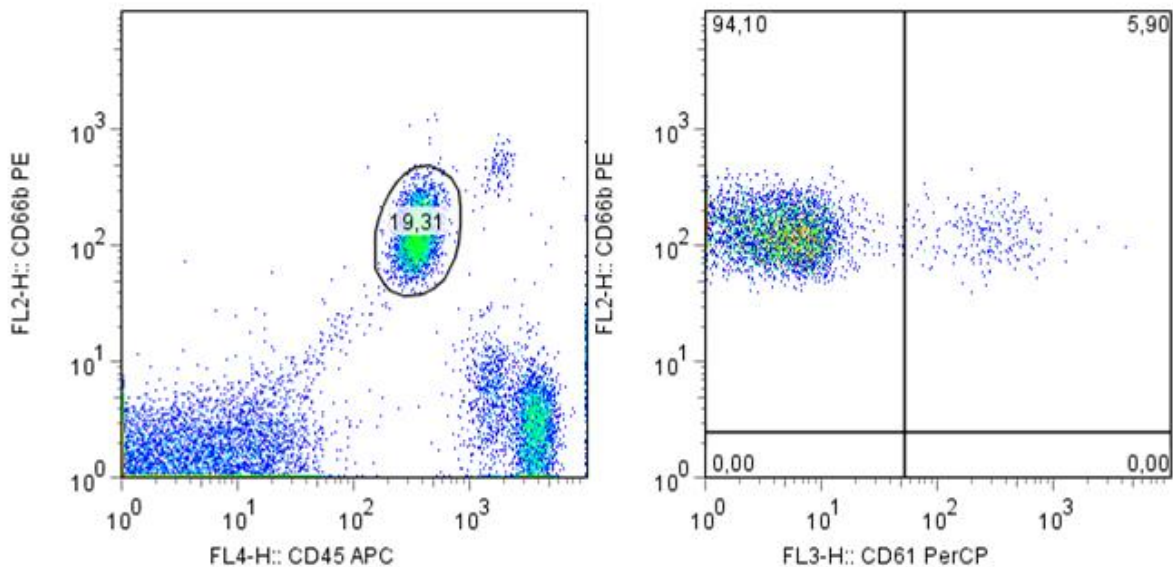


Abbildung 6: **Darstellung der durchflusszytometrischen Messung von PNA.** Vollblutprobe eines Probanden. Links 2D-Scatterplot (CD45/CD66b) CD45+/CD66b+ neutrophile Granulozyten durch Gate ausgewählt (schwarze Umrandung, mit „19,31“ beschriftet). Rechts 2D-Scatterplot (CD61/CD66b) Darstellung der CD45+/CD66b+ Granulozyten, Überprüfung auf Anwesenheit von CD61+ Thrombozyten = PNA im rechten oberen Quadranten (Eigene Darstellung).

II.8.2 Gatingstrategie für Thrombozyten-Monozyten-Koaggregaten

Ziel des Versuches war es, den prozentuellen Anteil von PMA im Verhältnis zu allen CD45+/CD66b+ Monozyten zu messen. Dazu erfolgte in einem ersten Schritt die Identifikation der zu untersuchenden Population mittels Gating in 2D-Scatterplots. In einem zweiten Schritt wurde die Subpopulation auf die Eigenschaft „Thrombozytenbindung“ untersucht.

1. Darstellung der CD45-positiven, CD14-positiven Monozyten:
Scatterplot: Anti-CD45 (FL-4) vs. Anti-CD14 (FL-1).
Mit dieser Darstellung können alle Leukozytenpopulationen anhand der beiden Oberflächenmerkmale CD45 und CD14 untersucht werden. Alle Leukozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche CD45. CD14 wird nur schwach von Granulozyten, aber stark von Monozyten exprimiert.
Ziel: CD45-positive, CD14-positive homogene Population
2. Abgrenzung der CD45-positiven, CD14-positiven Monozyten gegenüber CD66b-positiven Granulozyten und Dubletten:
Scatterplot: Anti-CD66b (FL-2) vs. Anti-CD14 (FL-1)

Mit dieser Darstellung können CD14-positive Monozyten von schwach CD-14-positiven, CD66b positiven Granulozyten und Dubletten abgegrenzt werden.

Ziel: CD66b-negative, CD14-positive homogene Population.

3. Darstellung der CD45-positiven, CD66b-negativen; CD14-positiven, CD61-positiven Thrombozyten-Monozyten-Koaggregate:

Scatterplot: Anti-CD14 (FL-1) vs. Anti-CD61 (FL-3).

Dargestellt wird die CD45-positive, CD66b-negative, CD14-positive Population aus dem vorangegangenen Schritt. Monozyten exprimieren das Oberflächenmolekül CD61 nicht. Demnach sind alle CD45-positiven, CD66b-negativen, CD14-positiven, CD61-positiven Zellen als Thrombozyten-Monozyten-Koaggregate zu werten. Durch Setzen der Quadranten zwischen die beiden Populationen kann der Anteil von Thrombozyten-Monozyten-Koaggregaten an allen Monozyten bestimmt werden (vgl. Abbildung 7).

Ziel: CD45-positive, CD66b-negative, CD14-positive, CD61-positive Population.

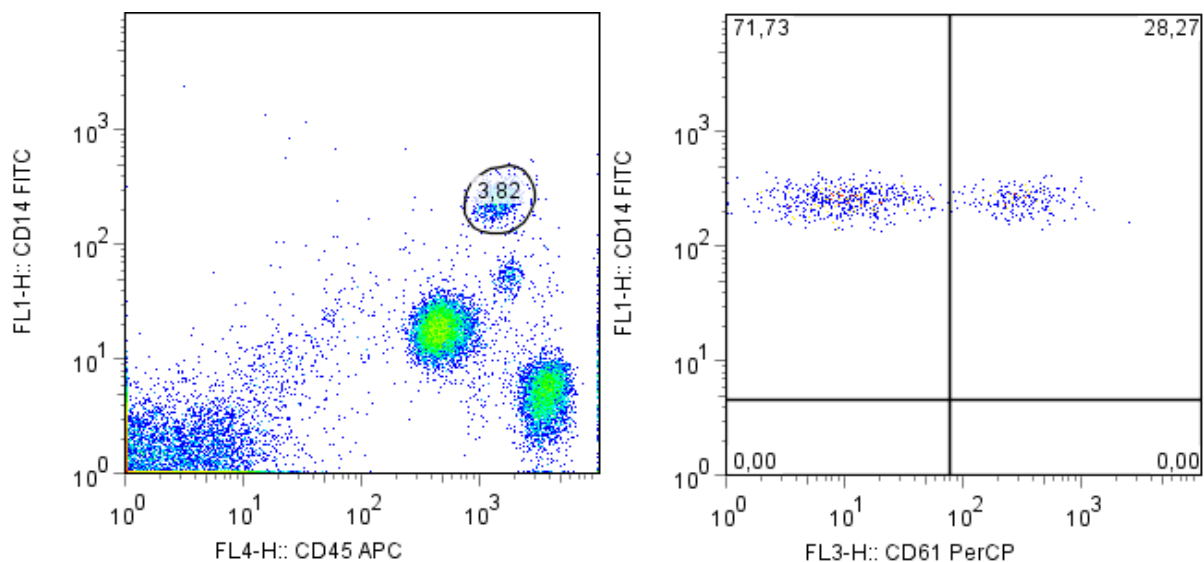


Abbildung 7: **Darstellung der durchflusszytometrischen Messung von PMA.** Vollblutprobe eines Probanden. Links 2D-Scatterplot (CD45/CD14) CD45+/CD14+ Monozyten durch Gate ausgewählt (schwarze Umrandung, mit „3,82“ markiert). Rechts 2D-Scatterplot (CD61/CD14) Darstellung der CD45+/CD14+ Monozyten, Überprüfung auf Anwesenheit von CD61+ Thrombozyten = PMA im rechten oberen Quadranten (Eigene Darstellung).

II.8.3 Gatingstrategie für Fibrinogenbindung von Thrombozyten

Ziel des Versuches war es, den prozentualen Anteil an Thrombozyten, der fluoreszenzmarkiertes externes Fibrinogen bindet, im Verhältnis zu allen CD61-positiven Thrombozyten zu messen. Zusätzlich wurde der gleiche Anteil nach Stimulierung der Thrombozyten durch ADP bestimmt.

I Darstellung der CD-61 positiven Thrombozyten

Scatterplot: Anti-CD61 (FL-3) vs. Granularität (SSC)

Mit dieser Darstellung können alle vitalen, CD61-positiven Thrombozyten detektiert werden.

Ziel: CD61-positive Thrombozyten

II Darstellung der Fibrinogen-positiven, CD-61 positiven Thrombozyten

Scatterplot: Anti-CD61 (FL-3) vs. Fibrinogen-FITC (FL-1)

Dargestellt wird der Anteil an CD61-positiven Thrombozyten, der Fibrinogen-positiv ist. Die Quadranten werden so gesetzt, dass links oben CD61-positive, Fibrinogen-negative Thrombozyten liegen und im rechten oberen Quadranten die Zielpopulation von CD61-positiven, Fibrinogen-positiven Thrombozyten. Das Gate wird an den äußeren Rand der nicht stimulierten CD61-positiven Thrombozyten gesetzt. CD61-positive, Fibrinogen-positive Thrombozyten entsprechen aktivierten Thrombozyten.

Ziel: CD61-positive, Fibrinogen-positive Thrombozyten

III Darstellung der Fibrinogen-positiven, CD-61 positiven Thrombozyten nach Stimulierung mit ADP

Scatterplot: Anti-CD61 (FL-3) vs. Fibrinogen-FITC (FL-1)

Die Quadranten aus Schritt 2 werden auf die stimulierte Probe angewandt.

Dargestellt wird der Anteil an CD61-positiven Thrombozyten, der Fibrinogen-positiv ist, nachdem diese mit ADP aktiviert wurden (vgl. Abbildung 8). CD61-positive, Fibrinogen-positive Thrombozyten entsprechen aktivierten Thrombozyten.

Ziel: CD61-positive, Fibrinogen-positive Thrombozyten

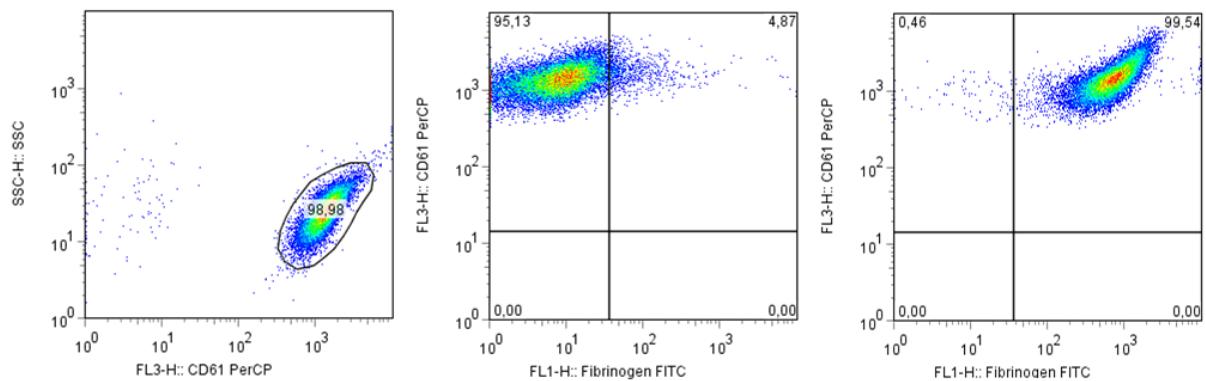


Abbildung 8: **Darstellung der durchflusszytometrischen Messung der Fibrinogenbindung von Thrombozyten.** Vollblutprobe eines Probanden. Links 2D-Scatterplot (CD61/SSC) CD61+ Thrombozyten durch Gate ausgewählt. Mitte 2D-Scatterplot (Fibrinogen/CD61) Darstellung der CD61+ Thrombozyten, Überprüfung auf Anwesenheit von CD61+/Fibrinogen + Thrombozyten = Fibrinogenbindende Thrombozyten im rechten oberen Quadranten. Rechts 2D-Scatterplot (Fibrinogen/CD61) Darstellung der mit ADP stimulierten CD61+ Thrombozyten, Überprüfung auf Anwesenheit von CD61+/Fibrinogen + Thrombozyten = Fibrinogenbindende Thrombozyten im rechten oberen Quadranten (Eigene Darstellung).

II.8.4 Gatingstrategie für P-Selektin-Expression von Thrombozyten

Ziel des Versuches war es, den prozentualen Anteil an Thrombozyten, der P-Selektin exprimiert, im Verhältnis zu allen CD61-positiven Thrombozyten zu messen.

Zusätzlich wurde derselbe Anteil nach Stimulierung der Thrombozyten durch TRAP6 bestimmt.

1. Darstellung der CD-61 positiven Thrombozyten

Scatterplot: Anti-CD61 (FL-3) vs. Granularität (SSC)

Mit dieser Darstellung können alle CD61-positiven Thrombozyten detektiert werden.

Ziel: CD61-positive Thrombozyten

2. Darstellung der P-Selektin-positiven, CD-61 positiven Thrombozyten

Scatterplot: Anti-CD61 (FL-3) vs. Anti-P-Selektin (CD62p) (FL-1)

Dargestellt wird der Anteil an CD61-positiven Thrombozyten, der P-Selektin-positiv ist. Die Quadranten werden so gesetzt, dass links oben CD61-positive, P-Selektin-negative Thrombozyten liegen und im rechten oberen Quadranten die Zielpopulation von CD61-positiven, P-Selektin-positiven Thrombozyten.

Das Gate wird an den äußeren Rand der nicht stimulierten CD61-positiven Thrombozyten gesetzt. CD61-positive, P-Selektin-positive Thrombozyten entsprechen aktivierten Thrombozyten.

Ziel: CD61-positive, P-Selektin-positive Thrombozyten

3. Darstellung der P-Selektin-positiven, CD-61 positiven Thrombozyten nach Stimulierung mit TRAP6

Scatterplot: Anti-CD61 (FL-3) vs. Anti-P-Selektin (FL-1)

Die Quadranten aus Schritt 2 werden auf die stimulierte Probe angewandt.

Dargestellt wird der Anteil an CD61-positiven Thrombozyten, der P-Selektin-positiv ist, nachdem diese mit TRAP6 aktiviert wurden (vgl. Abbildung 9).

CD61-positive, P-Selektin-positive Thrombozyten entsprechen aktivierten Thrombozyten.

Ziel: CD61-positive, P-Selektin-positive Thrombozyten

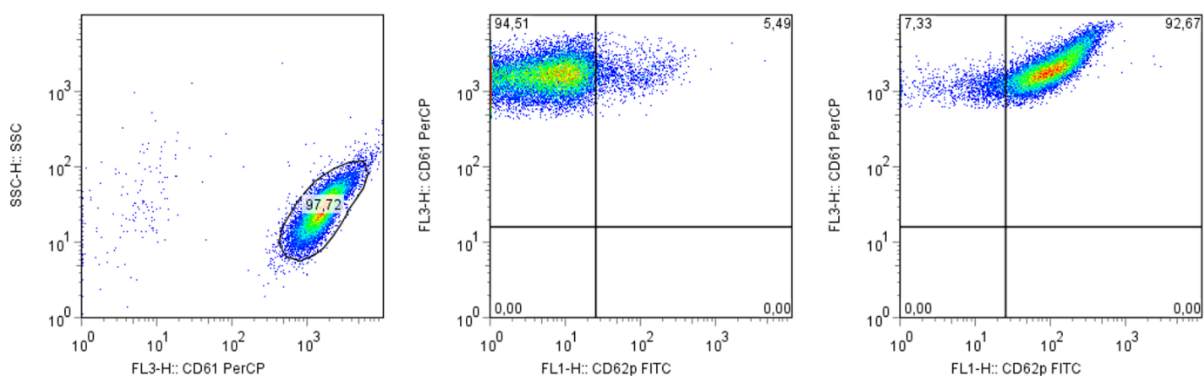


Abbildung 9: **Darstellung der durchflusszytometrischen Messung der P-Selektin-Expression von Thrombozyten.** Vollblutprobe eines Probanden. Links 2D-Scatterplot (CD61/SSC) CD61+ Thrombozyten durch Gate ausgewählt. Mitte 2D-Scatterplot (CD62p/CD61) Darstellung der CD61+ Thrombozyten, Überprüfung auf Anwesenheit von CD61+/CD62p+ Thrombozyten = aktivierte Thrombozyten im rechten oberen Quadranten. Rechts 2D-Scatterplot (CD62p/CD61) Darstellung der mit TRAP-6 aktivierten CD61+ Thrombozyten, Überprüfung auf Anwesenheit von CD61+/CD62p+ Thrombozyten = aktivierte Thrombozyten im rechten oberen Quadranten (Eigene Darstellung).

III Statistik

Alle Daten wurden prospektiv erhoben und pseudonymisiert gespeichert. Zur Datenbankverwaltung wurde Microsoft Excel 365 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) verwendet. Statistische Analysen wurden mit SigmaStat 3.5 (SYSTAT Software, San José, USA) erstellt.

Metrische Variable sind als Median (Interquartilsabstand, IQR) angegeben, kategoriale Variable als Frequenzen (Prozent). Eine einfaktorielle Varianzanalyse mit wiederholten Messungen (oneway ANOVA (Analysis of Variance) repeated measures) wurde zum Vergleich der Parameter über den Verlauf der Therapie durchgeführt. Für die Überprüfung zweier Parameter, die nicht aus der gleichen Zeitreihe stammten, wurde der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Ein p-Wert $<0,05$ wurde als Grenze für statistische Signifikanz festgelegt.

IV Ergebnisse

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifikation und anschließende quantitative Messung von den Parametern PNA, PMA, Fibrinogen-positive Thrombozyten und P-Selektin-Expression von Thrombozyten.

Im ersten Teil der Arbeit wurden PNA, PMA, Fibrinogenbindung von Thrombozyten und P-Selektion-Expression von Thrombozyten als Untersuchungsparameter definiert und ihre quantitative Bestimmung mittels Durchflusszytometrie anhand von gesunden Probanden entwickelt. In einem zweiten Teil der Arbeit wurden die genannten Parameter bei ECMO-Patienten im Verlauf der ECMO-Therapie sequenziell bestimmt.

IV.1 Methodenentwicklung zur Darstellung von Thrombozyten-Granulozyten-Koaggregaten

Das zur Messung von PNA verwendete Protokoll ist in II.3 beschrieben. Die wesentlichen Schritte der Entwicklung des Protokolls sind im Folgenden beschrieben.

Passende Fluorochrome wurden mittels der BD Guided Panel Solution Software (43) und der Spectra Viewer Software (44) ermittelt. In Abbildung 10 ist die Komptabilität der gewählten Konjugate mit den technischen Fähigkeiten des verwendeten Durchflusszytometers FACSCalibur™ dargestellt.

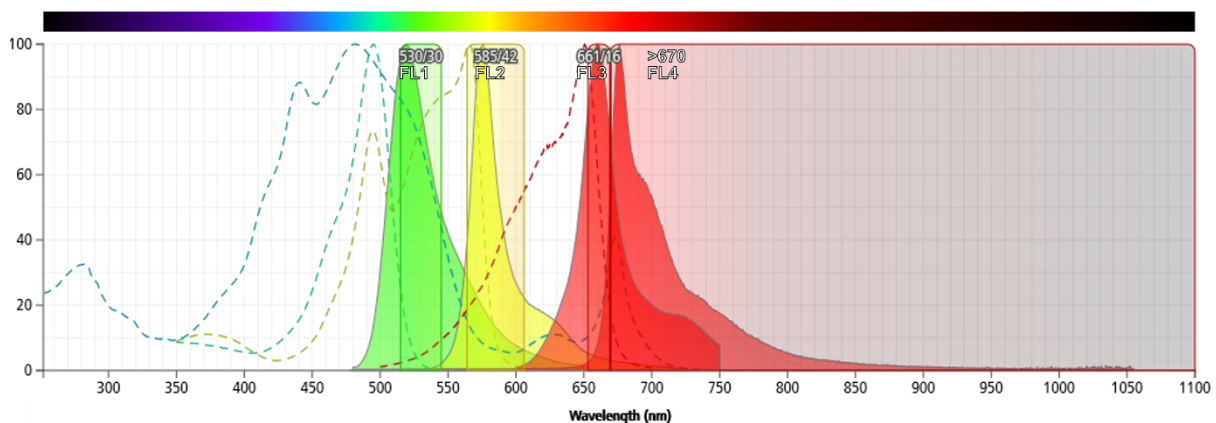


Abbildung 10: **Emissionsspektren der ausgewählten Fluorochrome und Detektionsfähigkeit des FACSCalibur Durchflusszytometers.** Emissionsspektren als farbig markierte Fläche unter der Kurve, Exzitationsspektren als gestrichelte Linie, Detektionsfähigkeit der Kanäle als farbige durchsichtige Rechtecke (Eigene Darstellung, modifiziert nach (43)).

Wie in II.2.1 dargelegt, musste vor Durchführung des Versuches das Durchflusszytometer auf die zu messende Zielpopulation eingestellt und die überlappende Fluoreszenz aus benachbarten Kanälen (=spillover) durch Kompensation herausgerechnet werden.

Die Geräteeinstellung und Kompensation wurden nach Lee et al. (26) und Roederer et al. (30) durchgeführt. Für benachbarte Kanäle mussten Kompensationsproben hergestellt werden. Diese Kompensationsproben bestanden aus einfach gefärbten Zellen, beispielsweise FITC-CD14 für die Kompensation des Kanals FL-1. Die Fluoreszenz der Kompensationsprobe wurde neben der beabsichtigten Messung im eigenen Kanal ebenfalls in den beiden benachbarten Kanälen gemessen. Bei Messung einer mehrfach gefärbten Probe ohne adäquate Kompensation wäre sonst nicht zu unterscheiden gewesen, ob ein gemessenes Signal durch das Fluorochrom von Interesse verursacht wird, oder durch spillover von Fluoreszenzfarbstoffen aus benachbarten Kanälen (26,30). Es wurden Kompensationsproben für jedes verwendete Fluorochrom erstellt und die Kompensation als hardware compensation am Durchflusszytometer für die jeweils beiden benachbarten Kanäle durchgeführt. Hardware compensation wurde verwendet, da für die vorliegende Arbeit im Untersuchungslabor nicht die technischen Voraussetzungen für software compensation vorhanden war.

Um PNA-Level von ECMO-Patienten und gesunden Probanden vergleichen zu können, wurden zunächst eine Negativkontrolle und eine Positivkontrolle mit dem Versuchsprotokoll durchgeführt, um zu überprüfen, ob PNA mit dem entwickelten Untersuchungsprotokoll zuverlässig nachgewiesen werden können.

Als Negativkontrolle dienten gesunde Probanden. Initial zeigten sich die PNA-Level bei den Probanden unplausibel erhöht (vergleiche Abbildung 11). Daraufhin wurde das Versuchsprotokoll wie unter IV.1.1 und IV.1.2 dargestellt optimiert.

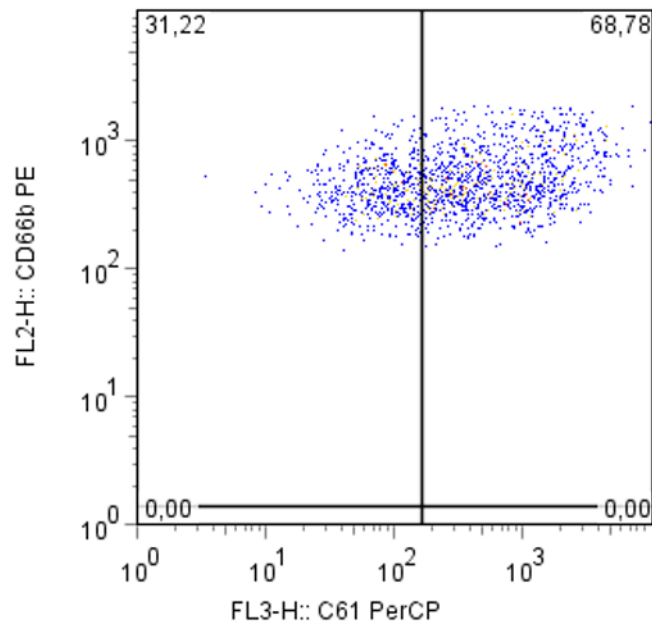


Abbildung 11: **Darstellung der durchflusszytometrischen Messung der PNA-Level. Negativkontrolle.** Vollblutprobe eines Probanden. 2D-Scatterplot (CD61/CD66b) Untersuchungspopulation sind CD45+/CD66b+ Granulozyten. Überprüfung auf Anwesenheit von CD61+ Thrombozyten = PNA im rechten oberen Quadranten. Hoher Anteil an PNA mit 68,78% an allen CD45/CD66b+ Granulozyten, homogene Population ohne klare Unterteilung in CD61- und CD61+ Zellen (Eigene Darstellung).

Für die Positivkontrolle wurde getestet, ob durch Aktivierung der Thrombozyten eine Induktion von PNA ausgelöst werden kann. Hierzu wurden die Proben mit TRAP-6 behandelt. TRAP-6 aktiviert Thrombozyten über den Thrombinrezeptor (45). Nach Aktivierung mit TRAP-6 zeigte sich eine deutliche Induktion von PNA (siehe Abbildung 12).

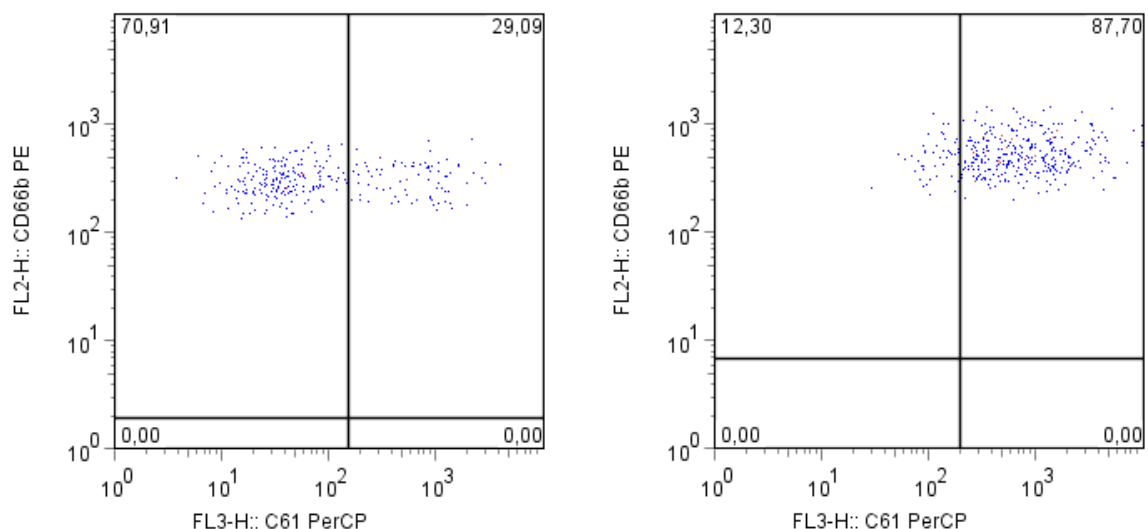


Abbildung 12: **Darstellung der durchflusszytometrischen Messung der PNA-Level nach Stimulierung mit TRAP-6 = Positivkontrolle.** Vollblutprobe eines Probanden. Links 2D-Scatterplot (CD61/CD66b) Untersuchungspopulation sind CD45+/CD66b+ Granulozyten. Überprüfung auf Anwesenheit von CD61+ Thrombozyten = PNA im rechten oberen Quadranten. Links 2D-Scatterplot (CD61/CD66b) Untersuchungspopulation sind CD45+/CD66b+ Granulozyten nach Stimulation mit TRAP-6. Überprüfung auf Anwesenheit von CD61+ Thrombozyten = PNA im rechten oberen Quadranten. Deutliche Induktion von PNA nach Stimulation von 87,70% zu 29,09% (Eigene Darstellung).

IV.1.1 Probengewinnung

Aus der Literatur ergaben sich Hinweise, dass eine nicht optimierte Blutabnahme zu falsch positiven Ergebnissen führen kann. Unter anderem kommt es zu einer Beeinflussung von PNA- und PMA-Leveln durch die Entnahmestelle, die Abnahmegeschwindigkeit, das Lumen der Blutentnahmekanüle, die Verarbeitungszeit der Probe und durch Manipulation an der Probe während der Weiterverarbeitung (35,38,46). Diese Parameter können durch verschiedene Mechanismen zu einer Aktivierung von Thrombozyten führen, wodurch es wiederum zur Ausbildung von PNA und PMA kommt (35). Ziel bei der Optimierung des Blutabnahmeprotokolls war deshalb die Vermeidung von nichtlaminarer Strömung, um die Aktivierung von Thrombozyten zu vermeiden. Das präanalytische Handling wurde wie folgt angepasst. Dem gängigen Standard entsprechend wurde als komplikationsarme Entnahmestelle die Vena mediana cubiti zur Punktion ausgewählt (38). Das Lumen der Blutentnahmekanüle wurde von 21G (Gauge, = 0,8mm Außendurchmesser) auf 20G (0,9mm Außendurchmesser) vergrößert. Es wurden nur Proben verwendet, bei der die Punktion komplikationslos durchgeführt werden konnte. Nach Stauung und Punktion der Vene erfolgte die Blutentnahme ungestaut. Die Blutentnahme erfolgte durch langsames und kontrolliertes Zurückziehen des Stempels des Blutentnahmeröhrchens. Das erste Blutentnahmeröhrchen wurde nicht für die hier vorliegenden Versuche verwendet. Im Anschluss wurde das Blutentnahmeröhrchen langsam dreimal über Kopf geschwenkt, um das Antikoagulans gleichmäßig zu verteilen. Die Proben wurden während der Methodenentwicklung innerhalb von zwei Stunden nach Entnahme weiterverarbeitet. Die Vollblutproben wurden mittels Natriumcitrat antikoaguliert, da durch andere Antikoagulanzen eine Aktivierung von Thrombozyten ausgelöst werden kann (38). Dies entspricht dem gängigen Standard bei Thrombozytenfunktionsuntersuchungen (23).

IV.1.2 Messgeschwindigkeit

Auch nach Optimierung der Probengewinnung zeigten sich regelmäßig erhöhte PNA-Level. Als Fehlerquelle wurde die Messgeschwindigkeit identifiziert. Wie bereits beschrieben (II.2.1) kann die Ansauggeschwindigkeit und somit auch die Durchflussgeschwindigkeit (Flow Rate) am Durchflusszytometer eingestellt werden. Am vorliegenden FACSCalibur™ kann die Flow Rate in drei Stufen („slow“ – „medium“ – „fast“) eingestellt werden. Die Wahrscheinlichkeit, dass pro Event mehr als eine Zelle pro Analysepunkt vom Gerät gezählt wird, steigt mit der Durchflussgeschwindigkeit an. Bei weniger als 1000 Ereignissen / Sekunde ist die Wahrscheinlichkeit für solche messinduzierten Koaggregate / pseudo clumps unter 0,1% (27). Es wurde die Flow Rate untersucht, diese lag bei deutlich über 1000 Ereignissen / Sekunde. Durch Verdünnung der Proben wurde eine Flow Rate von <500 Ereignissen / Sekunde eingestellt. Hiernach zeigten sich, wie in Abbildung 13 dargestellt, PNA-Level von 5,83% - 15,58%, was der in der Literatur beschriebenen Höhe entspricht (23).

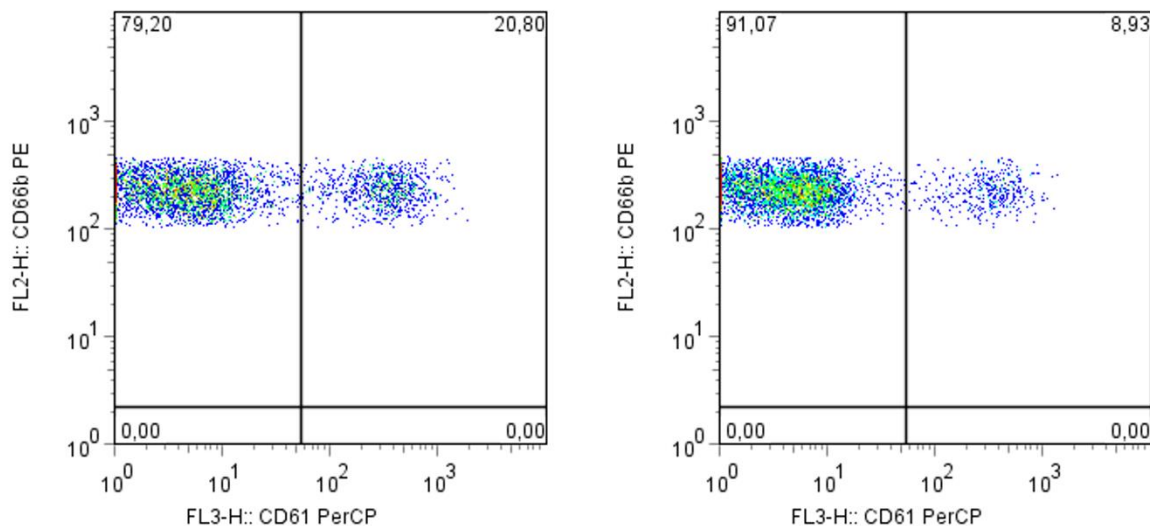


Abbildung 13: **Effekt der Messgeschwindigkeit auf PNA-Level.** Vollblutprobe eines Probanden. Links 2D-Scatterplot (CD61/CD66b). Messgeschwindigkeit „fast“. Untersuchungspopulation sind CD45+/CD66b+ neutrophile Granulozyten. Überprüfung auf Anwesenheit von CD61+ Thrombozyten = PNA im rechten oberen Quadranten. Rechts 2D-Scatterplot (CD61/CD66b). Messgeschwindigkeit „slow“. Untersuchungspopulation sind CD45+/CD66b+. Überprüfung auf Anwesenheit von CD61+ Thrombozyten = PNA im rechten oberen Quadranten. PNA 20,80% bei „fast“, 8,93% bei „slow“ (Eigene Darstellung).

IV.2 Methodenentwicklung zur Darstellung von Thrombozyten-Granulozyten-Koaggregaten

Das in II.3 und IV.1.1 dargestellte Untersuchungsprotokoll wurde auch für den Nachweis von PMA verwendet. Die primäre Zielpopulation in der vorliegenden Arbeit waren PNA. Durch die Auswahl von CD14 als Monozytenmarker wurde ebenfalls auf die Anwesenheit von PMA untersucht. Positiv- und Negativkontrolle wurden analog zu IV.1 durchgeführt.

IV.3 Methodenentwicklung zur Darstellung von Fibrinogen-bindenden Thrombozyten

Das zur Messung der Fibrinogenbindung von Thrombozyten verwendete Protokoll ist in II.4 beschrieben. Die wesentlichen Schritte der Entwicklung des Protokolls sind im Folgenden beschrieben.

Für die durchflusszytometrische Analyse von Thrombozyten wurde PRP verwendet, um andere zelluläre Bestandteile zu exkludieren. PRP musste verdünnt werden, da das Durchflusszytometer bei zu dichten Flüssigkeiten nicht genau zwischen zwei Zellen unterscheiden kann und miteinander verbundene Zellen irrtümlich als eine große Zelle gemessen werden können (33). Zudem aggregierten Thrombozyten bei zu hoher Konzentration untereinander, so dass ein Event zwei oder mehr Thrombozyten darstellen kann. Dies war an einer im FSC- und SSC-Kanal verbreiterten Population zu erkennen (vergleiche Abbildung 14).

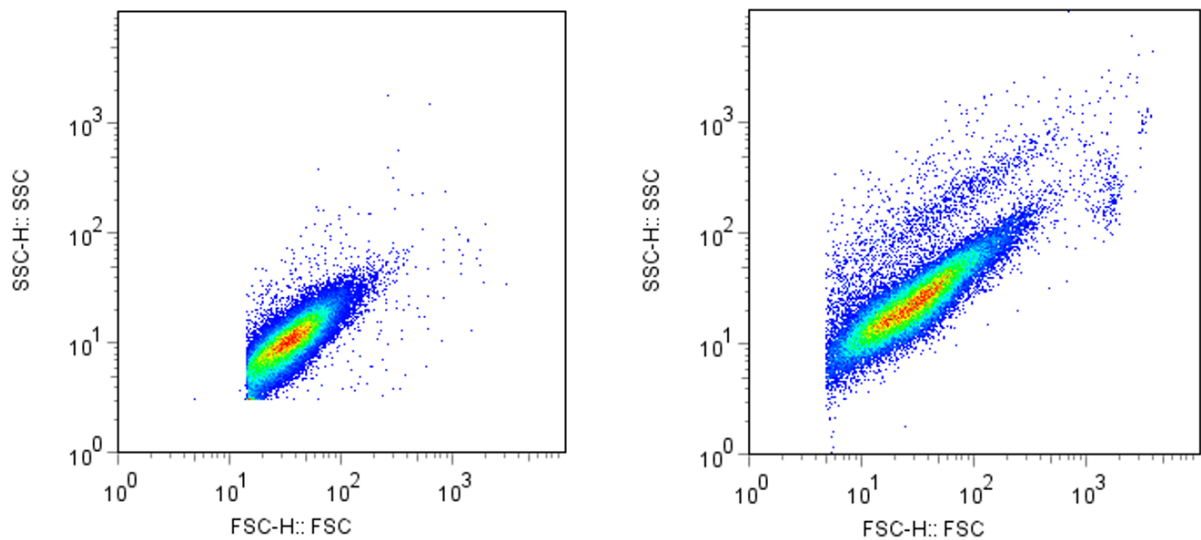


Abbildung 14: **Verdünntes und unverdünntes PRP.** Vollblutprobe eines Probanden. Links 2D-Scatterplot (FSC/SSC) PRP 1:10 verdünnt mit PBS / 0,5% BSA. Rechts 2D-Scatterplot (FSC/SSC) PRP unverdünnt. Links homogene Thrombozytenpopulation mit ähnlicher Größe und Granularität, rechts verbreiterte (=größere Streuung in Bezug auf Größe) inhomogene Thrombozytenpopulation mit Artefaktpopulationen bei FSC = 10^3 und SSC = $10^2 - 10^3$ (Eigene Darstellung).

In Verdünnungsreihen wurden verschiedene Verdünnungen des PRP hergestellt und durchflusszytometrisch untersucht. Bei einer Verdünnung des PRP im Verhältnis 1:10 mit PBS/0,5%BSA-Puffer gelang die Unterscheidung der relevanten Populationen am besten. Bei einer größeren Verdünnung waren zu wenige Zellen für die Untersuchung vorhanden. Bei einer geringeren Verdünnung war keine klare Unterscheidung zwischen einzelnen Zellen möglich.

Zur Überprüfung, ob die untersuchten Thrombozyten in der Lage waren, Fibrinogen nach Aktivierung zu binden, wurden diese mit ADP behandelt. In Verdünnungsreihen wurde die optimale Dauer der Inkubation und Konzentration von ADP zur Stimulierung festgelegt. Abbildung 15 stellt die Verdünnungsreihe dar. Die Stimulation wurde für die folgenden Versuche mit 50µM ADP-Endkonzentration in der Probe über vier Minuten durchgeführt.

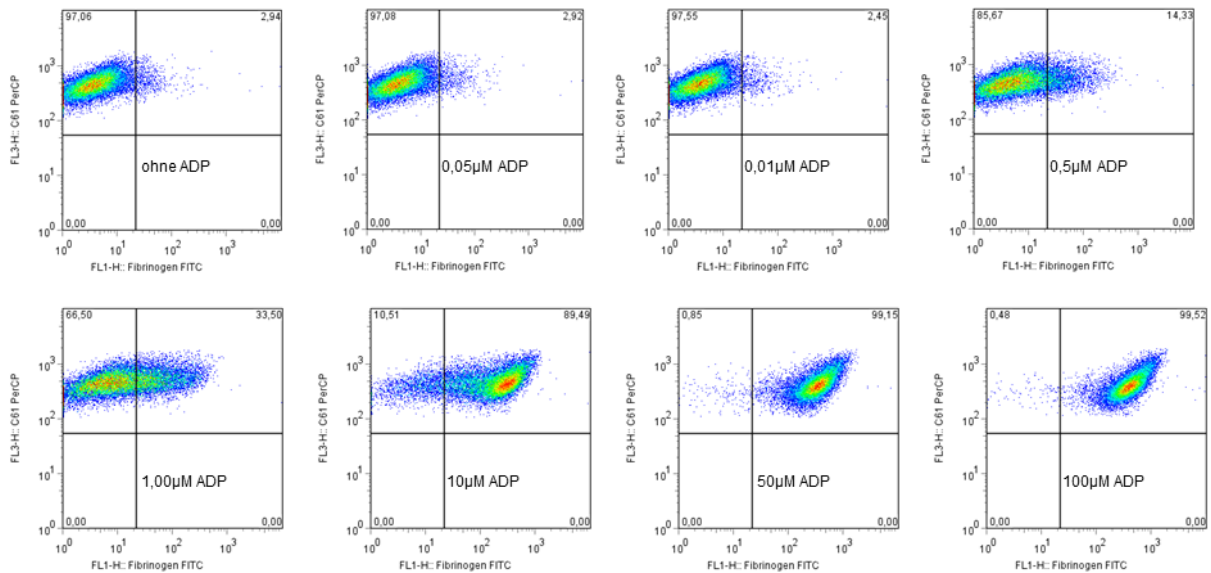


Abbildung 15: **Verdünnungsreihe ADP.** 100µl 1:10 verdünntes PRP aus Vollblutprobe eines Probanden. 2D-Scatterplot (Fibrinogen/CD61). Darstellung von CD61+ Thrombozyten. In aufsteigender Reihenfolge von oben links nach unten rechts wurden jeweils 100µl PRP, 1:10 verdünnt mit PBS/0,5%, eines Probanden für vier Minuten mit der angegebenen Konzentration von ADP (Endkonzentration in der Probe) bei Raumtemperatur inkubiert. Zunehmende Aktivierung der Thrombozyten mit zunehmender Konzentration von ADP, ab 50µM Endkonzentration in der Probe Aktivierung von 99,15% der Thrombozyten (Eigene Darstellung).

IV.4 Methodenentwicklung zur Darstellung von P-Selektin-Expression von Thrombozyten

Das zur Messung der P-Selektin-Expression von Thrombozyten verwendete Protokoll ist in II.5 beschrieben. Die wesentlichen Schritte der Entwicklung des Protokolls sind im Folgenden beschrieben.

Die Herstellung und Verdünnung von PRP erfolgte analog wie in IV.1.4 beschrieben. Zur Überprüfung, ob die untersuchten Thrombozyten in der Lage waren, P-Selektin nach Aktivierung zu exprimieren, wurden diese mit TRAP-6 behandelt. TRAP-6 ist ein geeigneter Thrombozytenagonist (47). In Verdünnungsreihen wurde die optimale Dauer und Konzentration von TRAP-6 zur Stimulierung analog wie in IV.3 beschrieben untersucht. Optimale Ergebnisse zeigten sich bei Stimulierung mit 25 µM TRAP-6 Endkonzentration in der Probe für 2 Minuten. Diese Konzentration und Dauer wurden für die folgenden Versuche verwendet.

IV.5 Methodenentwicklung zur Darstellung der Myeloperoxidase von Granulozyten

Wie beschrieben war das Ziel dieses Versuchs die Messung des MPO-Gehaltes von Granulozyten. Bei der Etablierung des Versuchs kam es zu den im folgenden Kapitel dargestellten Problemen, die nicht vollständig gelöst werden konnten. Das zuletzt verwendete Protokoll ist in II.6 beschrieben.

Bei unbehandelten Proben gesunder Probanden sollte eine homogene MPO-positive Granulozytenpopulation darzustellen sein (48). Dies gelang im vorliegenden Versuch nicht. Obwohl die Probengewinnung nach dem schonenden, standardisierten Abnahmeprotokoll wie unter II.1 beschrieben erfolgte, zeigten sich fortwährend zwei MPO-Populationen (siehe Abbildung 16).

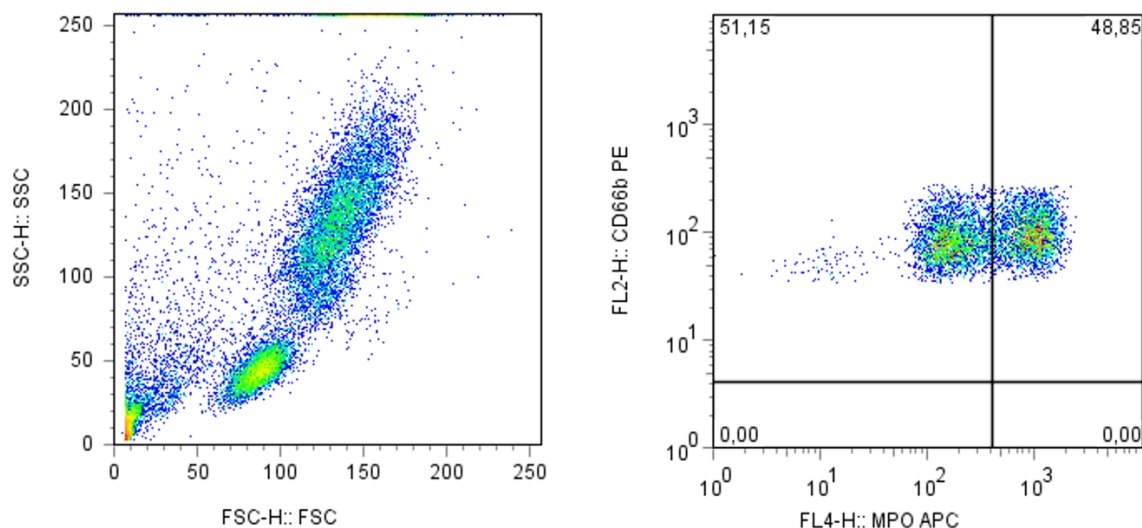


Abbildung 16: **MPO-Depletion von Granulozyten, Negativkontrolle.** Vollblutprobe eines Probanden. Links 2D-Scatterplot (FSC/SSC). Rechts 2D-Scatterplot (CD66b/MPO). Untersuchungspopulation CD66b+ Granulozyten. Anteil an Granulozyten ohne Depletion von MPO im rechten oberen Quadranten. Trotz fehlendem Agonisten zwei MPO-Populationen, 51,15% der Granulozyten mit MPO-Depletion, 48,85% ohne MPO-Depletion (Eigene Darstellung).

Das Untersuchungsprotokoll wurde anhand von bereits vorliegenden Arbeiten (48–51) mehrfach angepasst, um die oben beschriebene paradoxe Degranulation zu vermeiden. Es wurde untersucht, ob statt der Fixierung der Leukozyten und gleichzeitigen Lyse der Erythrozyten ein zweizeitiges Verfahren mit getrennter Lyse und Fixierung zu den gewünschten Ergebnissen führen würde, dies war aber nicht der Fall. Der Grund für die paradoxe Degranulation blieb unklar.

Als weiteres Problem zeigte sich, dass Zellen, die eine schwächere Expression von MPO aufwiesen, ebenso eine geringere Expression von CD66b aufwiesen (vergleiche Abbildung 17). Durch zweizeitige Antikörpermarkierung der Zellen, mit CD66b-Markierung vor der Fixierung und Lyse und MPO-Markierung danach, gelang die adäquate Darstellung der Zellen.

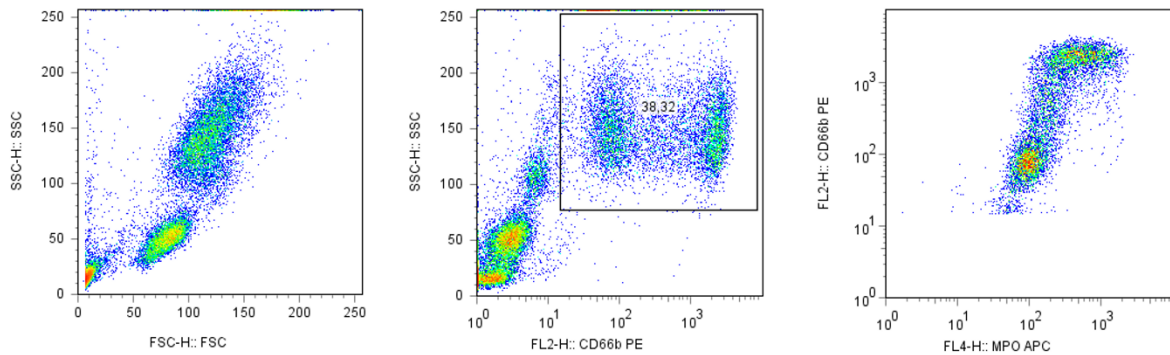


Abbildung 17: MPO-Depletion. Schwächere CD66b-Affinität bei MPO-Depletion. Vollblutprobe eines Probanden. Links 2D-Scatterplot (FSC/SSC). Mitte 2D-Scatterplot (CD66b/SSC). Untersuchungspopulation CD66b+ Granulozyten. Rechts 2D-Scatterplot (MPO/CD66b) Untersuchungspopulation CD66b+ Granulozyten. Zellen mit einer schwächeren MPO-Expression zeigen ebenfalls eine geringere Expression von CD66b (Eigene Darstellung).

Als weiteres Problem zeigte sich, dass keine adäquate Degranulation der Granulozyten zu erreichen war. Granulozyten depletieren das in azurophilen Granula gespeicherte MPO nach Aktivierung (48). Als Agonisten für die Aktivierung kamen Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP) und Cytochalasin B in Betracht (52–54). fMLP ist eine Aminosäuresequenz, die nur bei Prokaryonten vorkommt, in vivo Makrophagen aktiviert und chemotaktisch wirksam ist (52). Cytochalasin B stammt aus Pilzen und ist ein starkes Mykotoxin. Es führt durch Chemotaxis zur Aktivierung und Degranulation von Makrophagen (50,51). Es wurden zahlreiche Untersuchungsprotokolle mit unterschiedlich langen Inkubationszeiten von fünf bis 45 Minuten und unterschiedlichen Konzentrationen der Agonisten durchgeführt. Keines der Protokolle führte zur adäquaten Degranulation der Granulozyten. Teilweise kam es im Gegenteil zu einer paradoxen Vermehrung der MPO-positiven Zellen nach Behandlung mit fMLP oder Cytochalasin B (vergleiche Abbildung 18).

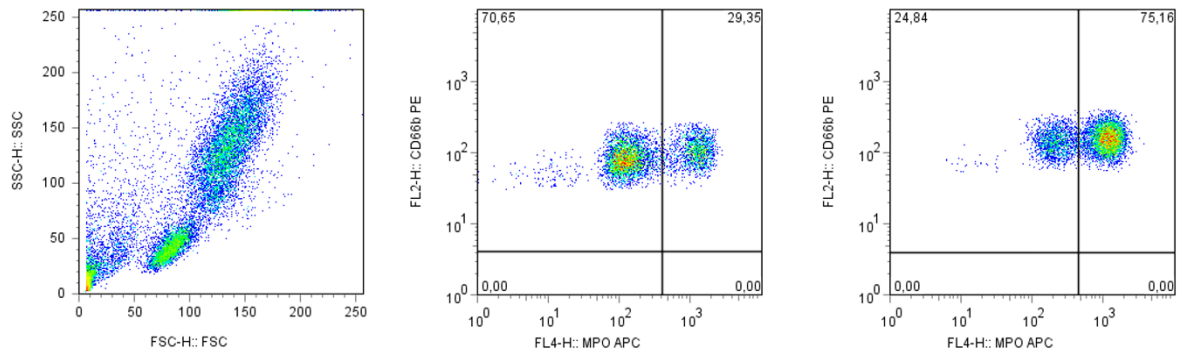


Abbildung 18: **MPO-Depletion. Paradoxe Depletion nach Stimulation mit fMLP.** Vollblutprobe eines Probanden. Links 2D-Scatterplot (FSC/SSC). Mitte 2D-Scatterplot (CD66b/MPO). Untersuchungspopulation CD66b+ Granulozyten. Keine Stimulation. Rechts 2D-Scatterplot (MPO/CD66b) Untersuchungspopulation CD66b+ Granulozyten. Stimulation mit 10µM fMLP für 15min. Trotz Stimulation zur Degranulation erhöhter Anteil an MPO+ Granulozyten (Eigene Darstellung).

Nachdem die oben beschriebenen Probleme im Versuchsdesign nicht gelöst werden konnten, wurde der Versuch nicht fortgeführt.

IV.6 Untersuchungsergebnisse

Nach erfolgter Methodenentwicklung wurden die Versuche an gesunden Probanden als Kontrollpopulation und an Patienten, die eine ECMO-Therapie erhielten, durchgeführt. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Versuche dargestellt.

IV.6.1 Studienpopulation

IV.6.1.1 Probanden

Als Kontrollgruppe dienten elf gesunde Probanden. Tabelle 8 zeigt ausgewählte Charakteristika der Probanden. Die Probanden hatten in den 14 Tagen vor der Blutabnahme keine Medikamente eingenommen.

Probanden (n)	11
Alter (Jahre)	24 (22-25)
Weibliche Probanden (n, %)	5, 46
Medikamenteneinnahme (n)	0
Vorerkrankungen (n)	0

Tabelle 8: **Probandencharakteristika**. Alter als Median (Interquartilsabstand) (Eigene Darstellung).

IV.6.1.2 Patienten

Tabelle 9 zeigt, modifiziert nach Lubnow, ausgewählte Charakteristika, Laborwerte und Scoringparameter der in die vorliegende Untersuchung eingeschlossenen Patienten (14). In den Tabelle 10 bis 19 sind alle eingeschlossenen Patienten schematisch mit ihrem jeweiligen Krankheitsverlauf dargestellt. Der überwiegende Teil der Patienten war männlich und übergewichtig. Die eingeschlossenen Patienten erhielten eine V-V ECMO Therapie aufgrund von primärem Lungenversagen. Bei allen Patienten lag ein schweres ARDS vor, das mit konventioneller Therapie nicht mehr behandelt werden konnte.

	Alle Patienten	Referenzbereich (wo anwendbar) (55,56)
Patienten (n)	10	
Alter (Jahre)	57 (47/62)	
Weibliches Geschlecht (n; %)	2; 20	
BMI (kg/m ²)	27,8 (23,4/30,5)	18,5-24,9 kg/m ²
Dauer ECMO-Therapie (d)	11,5 (7,5/18,3)	
SOFA score (sequential-organ failure-assessment-score, Sequentieller Organversagen Score)	11 (10,0/14,3)	0
Lung Injury Score nach Murray (LIS)	3,33 (3,33/3,67)	0
Argatroban / Heparin (n)	5 / 5	
Noradrenalin (µg/kg/min)	0,38 (0,17/0,85)	0
p _a O ₂ /FiO ₂ (mmHg)	73 (57/90)	>300 mmHg
p _a CO ₂ (mmHg)	58 (47/66)	35-45 mmHg
aPH	7,29 (7,17/7,31)	7,35-7,45
TV (ml)	450 (419/560)	
TV / geschätztes Körpergewicht (ml/kg)	5,45 (4,74/7,5)	6-8 ml/kg
AMV (l/min)	8,9 (7,0/11,0)	
PIP (cm H ₂ O))	35 (31/35)	
PEEP (cm H ₂ O)	16 (15/16)	
Fibrinogen (mg/dl)	504 (397/584)	200-400 mg/dl
D-Dimer (mg/dl)	7 (4/12)	< 0,05 mg /dl
Quick (%)	80 (76/94)	70-130 %
INR	1,1 (1,0/1,2)	0,8-1,1
ATIII Aktivität (%)	56 (49/72)	80-120 %
aPTT (Sekunden)	38,5 (34,3/43,0)	25-35 s
Thrombozyten (/nl)	233 (154/259)	150-450/nl
Leukozyten (/nl)	13,8 (10,1/14,5)	4-11/nl
CRP (mg/l)	256 (149/306)	<5 mg/l
Interleukin-6 (IL-6) (ng/l)	598 (259/6389)	< 10 ng/l
Interleukin-8 (IL-8) (ng/l)	226 (43/610)	<10 ng/l

Laktatdehydrogenase (LDH) (U/l)	331 (231/506)	80-225 (U/l)
Freies Hämoglobin (mg/l)	30 (27/53)	<20 mg/l

Tabelle 9: **Patientencharakteristika.** Werte als Median mit Interquartilsabstand. Patienten, weibliches Geschlecht als absolute Werte n (Verhältnis in %). Argatroban / Heparin als absolute Werte n (Eigene Darstellung).

Patient 1	Geschlecht ♂		Alter 41 Jahre	
Hauptdiagnose	Schweres ARDS (J80.03) nach ambulant erworbener Legionellen Pneumonie (A48.1); Sepsis			
Nebendiagnosen	Akutes Nierenversagen; Lungenarterienembolie linker Unterlappen; pulmonale Abszesse; Perikarderguss (hämodynamisch relevant)			
Keimnachweis	Legionellen, Stenothrophomonas maltophilia, Epstein Barr Virus (10 ²)			
Vorerkrankungen	Ventrikelseptumdefekt; schwere Hypothyreose; Zustand nach (Z.n.) Orchitis; Z.n. Suizidversuch; Nikotinabusus; Alkoholabusus			
Therapeutische Maßnahmen	Antibiotische Therapie; Endotracheale Intubation & invasive Beatmung; dilatative Tracheotomie; V-V ECMO; Thoraxdrainage links; Perikardpunktion			
Ausgewählte Scoring-Parameter	SOFA score	LIS	p _a O ₂ /FiO ₂ (mmHg)	Noradrenalin (NE) (µg/kg/min)
	11	3,3	63	1,00
Besonderheiten	Lungenarterienembolien während ECMO-Therapie			
Verwendete ECMO	Cardiohelp (Maquet) *			

Tabelle 10 **Behandlungsverlauf Patient 1.** Keimnachweis beschreibt nur die Keime, die im respiratorischen System nachgewiesen wurden, die Scoring-Parameter wurden vor Beginn der ECMO erfasst, * = weitere Systeme wurden verwendet (Eigene Darstellung).

Patient 2	Geschlecht ♂		Alter 56 Jahre	
Hauptdiagnose	ARDS (J80.02) nach aufsteigender Pneumonie des rechten Unterlappens (J85.1) mit Pleuraempyem rechts und offener Resektion des rechten Unterlappens; Sepsis			
Nebendiagnosen	Thrombose V. jugularis rechts nach ECMO-Therapie; Hypoaktives Delir, normochrome, normozytäre Anämie			
Keimnachweis	Candida albicans			
Vorerkrankungen	Arterielle Hypertonie; Z.n. thorakaler Myelopathie nach intraspinalem Hämatom; Chronische Schmerzstörung bei neuropathischen Rückenschmerzen und spastischer Lähmung, Z.n. Entfernung eines gutartigen Tumors mit Laminektomie BWK 6, Z.n. Beinbeckenvenenthrombose; Rezidivierend depressive Episode, VRE-Besiedelung perianal			
Therapeutische Maßnahmen	Endotracheale Intubation & invasive Beatmung; thorakoskopische Pleuraempyemausräumung; antibiotische Therapie; V-V ECMO; operative Entfernung des rechten Lungenunterlappens; Thoraxdrainage rechts; Bronchoskopie mit Bronchialtoilette; Antikoagulation			
Ausgewählte Scoring-Parameter	SOFA score	LIS	p _a O ₂ /FiO ₂ (mmHg)	NE (µg/kg/min)
	7	3,3	144	0,00
Besonderheiten	Thrombose V. jugularis rechts nach ECMO-Therapie, Z.n. Beinbeckenvenenthrombose			
Verwendete ECMO	DP3 System (Fresenius Medical Care)			

Tabelle 11 **Behandlungsverlauf Patient 2**. Keimnachweis beschreibt nur die Keime, die im respiratorischen System nachgewiesen wurden, die Scoring-Parameter wurden vor Beginn der ECMO erfasst (Eigene Darstellung).

Patient 3	Geschlecht ♂		Alter 65 Jahre	
Hauptdiagnose	ARDS (J80.03) nach Pneumonie des rechten Mittel- und Unterlappens (J13), Pneumokokkensepsis (A40.3)			
Nebendiagnosen	Akutes Nierenversagen; Critical-Illnes-Polyneuropathie, tachykardes Vorhofflimmern; Thrombose V. jugularis rechts nach ECMO-Therapie			
Keimnachweis	Streptococcus pneumoniae			
Vorerkrankungen	Diabetes Mellitus Typ II; Diabetische Retinopathie; Diabetische Nephropathie; Z.n. Nierentransplantation			
Therapeutische Maßnahmen	Antibiotische Therapie; Endotracheale Intubation & invasive Beatmung; V-V ECMO; Bronchoskopie mit Bronchialtoilette; Pleuradrainagen; Aszitesdrainage; Tracheotomie; SLED-Dialyse; elektrische Kardioversion, Transfusion von Erythrozytenkonzentraten & Thrombozytenkonzentraten; Antikoagulation			
Ausgewählte Scoring-Parameter	SOFA score	LIS	p _a O ₂ /FiO ₂ (mmHg)	NE (µg/kg/min)
	15	3,7	50	2,00
Besonderheiten	Thromben V. jugularis rechts nach ECMO-Therapie; Vorhofflimmern; Thrombus Dialyseshunt			
Verwendete ECMO	DP3 System (Fresenius Medical Care)			

Tabelle 12 **Behandlungsverlauf Patient 3**. Keimnachweis beschreibt nur die Keime, die im respiratorischen System nachgewiesen wurden, die Scoring-Parameter wurden vor Beginn der ECMO erfasst (Eigene Darstellung).

Patient 4	Geschlecht ♂		Alter 61 Jahre	
Hauptdiagnose	Schweres ARDS (J80.03) nach Pneumonie des rechten Mittel- und Unterlappens (J18.1); Lungenemphysem, Sepsis			
Nebendiagnosen	Thrombose V. jugularis rechts nach ECMO-Therapie; Akutes Nierenversagen, nicht dialysepflichtig			
Keimnachweis	Coronavirus OC43			
Vorerkrankungen	Z.n. Kehlkopfkarzinom; Diabetes Mellitus Typ II; Z.n. großflächiger Exzision nach nekrotisierender Faszitis; Nikotinabusus; Arterielle Hypertonie mit Cor hypertonicum			
Therapeutische Maßnahmen	Antibiotische Therapie; Endotracheale Intubation & invasive Beatmung; V-V ECMO, Antikoagulation			
Ausgewählte Scoring-Parameter	SOFA score	LIS	p _a O ₂ /FiO ₂ (mmHg)	NE (µg/kg/min)
	10	3,3	83	2,00
Besonderheiten	Thrombus V. jugularis rechts nach ECMO-Therapie;			
Verwendete ECMO	Cardiohelp HLS (Maquet)			

*Tabelle 13 **Behandlungsverlauf Patient 4.** Keimnachweis beschreibt nur die Keime, die im respiratorischen System nachgewiesen wurden, die Scoring-Parameter wurden vor Beginn der ECMO erfasst (Eigene Darstellung).*

Patient 5	Geschlecht ♂		Alter 61 Jahre	
Hauptdiagnose	Schweres ARDS (J80.03) bei Z.n. Influenza A Pneumonie, Pneumonie durch sonstige Viren (J11.1), Sepsis			
Nebendiagnosen	Harnwegsinfekt; Antibiotika-assoziierte Diarrhoe; Hyperkaliämie; normochrome, normozytäre Anämie			
Keimnachweis	Humanes Metapneumonievirus A/B			
Vorerkrankungen	COPD; Leberzirrhose; Portal hypertensive Gastropathie; Diabetes Mellitus Typ II; Chronisch venöse Insuffizienz; Ulcus cruris beidseits, infiziert mit E. faecalis und Klebsiella oxytoca; Z.n. Resektion mediastinale Zyste und Bullaresektion der Lunge; Z.n. Tuberkulose als Kleinkind; Z.n. tiefer Beinvenenthrombose			
Therapeutische Maßnahmen	Antibiotische Therapie; Endotracheale Intubation & invasive Beatmung; V-V ECMO, Hochfrequenz-Beatmung; Antikoagulation; Ulcus-Debridement			
Ausgewählte Scoring-Parameter	SOFA score	LIS	p _a O ₂ /FiO ₂ (mmHg)	NE (µg/kg/min)
	13	3,3	84	0,80
Besonderheiten	Keine			
Verwendete ECMO	Life-Box (Liva Nova)			

Tabelle 14 **Behandlungsverlauf Patient 5**. Keimnachweis beschreibt nur die Keime, die im respiratorischen System nachgewiesen wurden, die Scoring-Parameter wurden vor Beginn der ECMO erfasst (Eigene Darstellung).

Patient 6	Geschlecht ♀		Alter 47 Jahre	
Hauptdiagnosen	Schweres ARDS (J80.03) nach Aspirationspneumonie (J69.0) Sepsis mit septischem Schock; im Verlauf Influenza A Pneumonie; Darmperforation durch Fremdkörper; Ileus durch multiple entzündliche / ischämische Darmstenosierung bei Morbus Crohn; Chronische hyperkapnische respiratorische Insuffizienz			
Nebendiagnosen	Segmentale Lungenembolie links; Rezidivierende gastrointestinale Blutungen; Pneumothorax beidseits; Thrombose V. jugularis rechts nach ECMO-Therapie; Hydropische Dekompensation; Hyperfibrinolyse unter ECMO-Therapie; Perikarderguss; Aszites; Akute Belastungsreaktion; Harnwegsinfekt; Abdominelle Wundheilungsstörung; Kurzdarmsyndrom			
Keimnachweis	Influenza A, Candida albicans (3x), Cytomegalievirus (2x), E. faecium, Hafnia alvei			
Vorerkrankungen	Morbus Crohn mit multipler Fistelung, Z.n. nach Magenantrumresektion mit Y-Roux-Rekonstruktion, Z.n. Hemikolektomie rechts, Z.n. mehrfacher Adhäsiolektomie, Z.n. mehrfachem Subileus; Z.n. Bauchdeckenabszess; Pansinusitis; Steatosis hepatis; regressiv veränderte Struma; Ovarialzysten links			
Therapeutische Maßnahmen	Antibiotische Therapie, endotracheale Intubation & invasive Beatmung; Resektion Ileorektostomie mit Restsigma und 30cm Dünndarm und Anlage endständiges Ileostoma; Übernähung Dünndarmperforation; Exzision Darmleckage; Resektion von 30cm Dünndarm und Neuanlage endständiges Stoma; Epithelialisierte Tracheotomie; V-V ECMO, mehrfache Oxgenator- und Pumpenkopfwechsel; intermittierende nichtinvasive Beatmung,			
Ausgewählte Scoring-Parameter	SOFA score	LIS	p _a O ₂ /FiO ₂ (mmHg)	NE (µg/kg/min)
	10	3,3	103	0,00

Besonderheiten	Prolongierte Behandlungsdauer; Lungenembolie während ECMO-Therapie; Hyperfibrinolyse unter ECMO-Therapie; Mehrfacher Wechsel (12x) der ECMO
Verwendete ECMO	PLS (Maquet) *

*Tabelle 15 **Behandlungsverlauf Patient 6.** Keimnachweis beschreibt nur die Keime, die im respiratorischen System nachgewiesen wurden, die Scoring-Parameter wurden vor Beginn der ECMO erfasst, * = weitere Systeme wurden verwendet (Eigene Darstellung).*

Patient 7	Geschlecht ♂		Alter 71 Jahre	
Hauptdiagnose	Exitus letalis bei großem Mediainfarkt mit Einblutung links (I61.9); Schweres ARDS (J80.03) nach Influenza A Pneumonie (J10.0), Sepsis			
Nebendiagnosen	Z.n. intrahospitaler Reanimation bei Asystolie, am ehesten hypoxisch bedingt; Pankreatitis			
Keimnachweis	Influenza A			
Vorerkrankungen	2-Gefäß-Koronare-Herzkrankheit (KHK) mit eingeschränkter linksventrikulärer Funktion; Z.n. perkutaner transluminaler Koronarangioplastie und Stenting des Ramus interventricularis anterior, des Ramus marginalis und des Ramus posterolateralis sinister; Diabetes Mellitus Typ II; Arterielle Hypertonie; Hypercholesterinämie; Niereninsuffizienz; Hypothyreose; benigne Prostatahyperplasie			
Therapeutische Maßnahmen	Antibiotische Therapie, endotracheale Intubation & invasive Beatmung; V-V ECMO			
Ausgewählte Scoring-Parameter	SOFA score	LIS	p _a O ₂ /FiO ₂ (mmHg)	NE (µg/kg/min)
	14	3,7	57	0,00
Besonderheiten	Hyperfibrinolyse unter ECMO-Therapie; Blutung unter ECMO-Therapie; Mehrfacher Wechsel (2x) des ECMO-Oxygenator; Exitus letalis			
Verwendete ECMO	Cardiohelp HLS (Maquet) *			

Tabelle 16 **Behandlungsverlauf Patient 7**. Keimnachweis beschreibt nur die Keime, die im respiratorischen System nachgewiesen wurden, die Scoring-Parameter wurden vor Beginn der ECMO erfasst, * = weitere Systeme wurden verwendet (Eigene Darstellung).

Patient 8	Geschlecht ♀		Alter 58 Jahre	
Hauptdiagnose	ARDS (J80.09) nach Influenza A Pneumonie (J10.0), Sepsis mit septischem Schock			
Nebendiagnosen	Pleuraerguss; Thrombose V. jugularis rechts nach ECMO-Therapie; Thrombose V. femoralis rechts nach ECMO-Therapie; Pleuraerguss beidseits			
Keimnachweis	Influenza A, MRSA			
Vorerkrankungen	Hypothyreose; Paroxysmales Vorhofflattern; Z.n. erfolgreicher Ablation; Immunsuppression bei Chronisch-lymphatischer-Leukämie			
Therapeutische Maßnahmen	Antibiotische Therapie, endotracheale Intubation & invasive Beatmung; V-V ECMO; Pleuradrainage rechts; dilatative Tracheotomie			
Ausgewählte Scoring-Parameter	SOFA score	LIS	p _a O ₂ /FiO ₂ (mmHg)	NE (µg/kg/min)
	10	3,7	57	5,00
Besonderheiten	Thrombose V. jugularis rechts nach ECMO-Therapie; Thrombose V. femoralis rechts nach ECMO-Therapie; Blutung unter ECMO-Therapie			
Verwendete ECMO	Life-Box (Liva Nova)			

Tabelle 17 **Behandlungsverlauf Patient 8**. Keimnachweis beschreibt nur die Keime, die im respiratorischen System nachgewiesen wurden, die Scoring-Parameter wurden vor Beginn der ECMO erfasst (Eigene Darstellung).

Patient 9	Geschlecht ♂		Alter 61 Jahre	
Hauptdiagnosen	Exitus letalis bei septischem Kreislaufversagen bei Candidämie; Kardiale Dekompensation bei 3-Gefäß-KHK;			
Nebendiagnosen	Sekundär sklerosierende Cholangitis			
Keimnachweis	Candida albicans, Enterobacter cloacae			
Vorerkrankungen	Z.n. NSTEMI bei Verschluss des RCA; Z.n. Herzkatheteruntersuchung mit Stenting; Ischämische Kardiomyopathie mit hochgradig eingeschränkter LV-Funktion; Herzinsuffizienz NYHA III; Hypercholesterinämie; Nikotinabusus			
Therapeutische Maßnahmen	Endotracheale Intubation und invasive Beatmung; Operative Myokardrevaskularisation mittels mehrfachem (arteriellem und venösem) aortokoronarem Bypass; zentrale V-A ECMO und intraaortaler Ballonpumpe, periphere V-A ECMO; Linksventrikuläres Unterstützungssystem; Rechtsventrikuläres Unterstützungssystem; Dilatative Tracheotomie; V-V ECMO; Antibiotische Therapie;			
Ausgewählte Scoring-Parameter	SOFA score	LIS	p _a O ₂ /FiO ₂ (mmHg)	NE (µg/kg/min)
	Fehlt	2	63	3,00
Besonderheiten	Blutung unter ECMO-Therapie; Exitus letalis			
Verwendete ECMO	Life-Box (Liva Nova)			

*Tabelle 18 **Behandlungsverlauf Patient 9.** Keimnachweis beschreibt nur die Keime, die im respiratorischen System nachgewiesen wurden, die Scoring-Parameter wurden vor Beginn der ECMO erfasst (Eigene Darstellung).*

Patient 10	Geschlecht ♂		Alter 54 Jahre	
Hauptdiagnosen	Schweres ARDS (J80.03) nach Aspirationspneumonie (J69.0), Sepsis			
Nebendiagnosen	Z.n. Bridenileus-OP; V.a. HSV-Pneumonie; Postoperative Dysphagie mit Aspirationsgefahr; Thrombose V. jugularis interna rechts nach ECMO-Therapie			
Keimnachweis	Candida albicans, Staphylococcus epidermidis; Herpes-simplex-Virus			
Vorerkrankungen	Symptomatische Epilepsie mit komplexen fokalen Anfällen; organische schizophreniforme Störung; arterielle Hypertonie; V.a. HOCM			
Therapeutische Maßnahmen	Endotracheale Intubation und Beatmung; Bridenileus-OP; V-V ECMO; Antibiotische Therapie			
Ausgewählte Scoring-Parameter	SOFA score	LIS	p _a O ₂ /FiO ₂ (mmHg)	NE (µg/kg/min)
	11	3,7	90	0,70
Besonderheiten	Thrombose V. jugularis interna rechts nach ECMO-Explantation			
Verwendete ECMO	DP3 System (Fresenius Medical Care)			

Tabelle 19: **Behandlungsverlauf Patient 10.** Keimnachweis beschreibt nur die Keime, die im respiratorischen System nachgewiesen wurden, die Scoring-Parameter wurden vor Beginn der ECMO erfasst (Eigene Darstellung).

In Tabelle 20 sind Daten der ECMO-Verläufe zusammengefasst. Vier der Patienten benötigten einen Systemwechsel. Eine Patientin mit einer ungewöhnlich langen ECMO-Therapie erhielt 12 Systemwechsel. Ein Patient starb an einer intrazerebralen Hirnblutung während der ECMO, ein Patient starb an septischem Schock 8 Tage nachdem die ECMO-Therapie, primär erfolgreich, beendet wurde.

	Alle Patienten
Patienten (n)	10
ECMO-Behandlungstage insgesamt (d)	299
Durchschnittl. ECMO-Behandlungstage (d)	11,5 (7,5/18,3)
Patienten mit einem Systemwechsel, n (%)	4 (40)
Anzahl der ECMO-Systeme pro Patienten, n (Anzahl Wechsel)	6 (0), 2 (2), 1 (3), 1 (12)
Primär verwendetes ECMO-System, n (%)	
DP3 (Fresenius Medical Care)	3 (30)
Cardiohelp HLS (Maquet)	3 (30)
PLS (Maquet)	1 (10)
Life-Box (Liva Nova)	3 (30)
Art der Kanülierung, Ein-Lumen-Kanüle / Doppellumenkanüle (n)	9/1
Ort der entnehmenden Kanüle	V. femoralis (80%), V. subclavia (20%)
Ort der rückführenden Kanüle	V. jugularis (90%), V. subclavia (10%)
Akutes Nierenversagen während ECMO, n (%)	4 (40)
Überlebensrate, n (%)	8 (80)
Transfusionen	
Erythrozytenkonzentrate / Tag	0,42 (0,30/0,50)
Plasmakonzentrate / Tag	0,00 (0,00/0,00)
Thrombozytenkonzentrate / Tag	0,00 (0,00/0,03)

*Tabelle 20: **ECMO-Behandlungsdaten.** In absoluten Zahlen n (Für Systemwechsel, ECMO-Systeme, Ort der Kanülierung, Akutes Nierenversagen und Überlebensrate mit Verhältnis in %). ECMO-Behandlungstage und Transfusionsdaten als Median (Interquartilsabstand) (Eigene Darstellung).*

IV.6.2 Thrombozyten-Granulozyten-Koaggregate (PNA)

Aus Abbildung 19 wird ersichtlich, dass ein statistisch signifikanter Unterschied an PNA in der Kontrollpopulation und der Patientenpopulation vor Implantation der ECMO bestand. Zwei Stunden nach Beginn der ECMO-Therapie waren die PNA-Level signifikant niedriger als vor Implantation der ECMO. Im Verlauf der Therapie zeigte sich kein Anstieg der PNA-Level, die Werte lagen im Bereich der Kontrollpopulation.

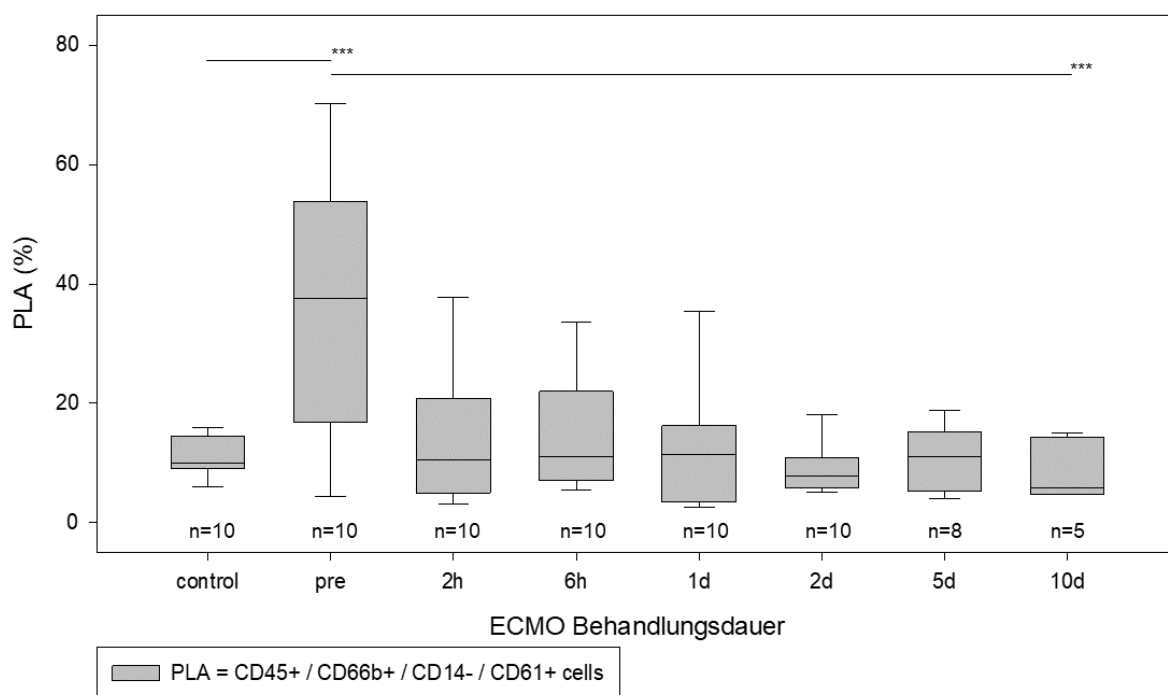


Abbildung 19: **PNA-Level in Kontrollpopulation und ECMO-Patienten** im zeitlichen Verlauf der Therapie. PNA in % an allen CD45+/CD66b+/CD14- Granulozyten. Median als Querstrich. Anzahl der untersuchten Personen = n. Werte mit *** markiert unterscheiden sich statistisch signifikant ($p < 0,001$, One-Way-ANOVA for repeated measures für Zeitverlauf an ECMO, Mann-Whitney-U-Test für Kontrollgruppe gegen Prä-Wert) (Eigene Darstellung).

IV.6.3 Thrombozyten-Monozyten-Koaggregate (PMA)

Wie in Abbildung 20 dargestellt zeigte sich ein signifikant erhöhter PMA-Anteil in der Patientengruppe vor Beginn der ECMO-Therapie. Nach Beginn der ECMO zeigte sich innerhalb von zwei Stunden ein signifikanter Abfall der PMA-Level. PMA-Level während ECMO unterschieden sich nicht signifikant von der Kontrollgruppe, es

zeigte sich keine signifikante Änderung der PMA-Level während der ECMO-Therapie.

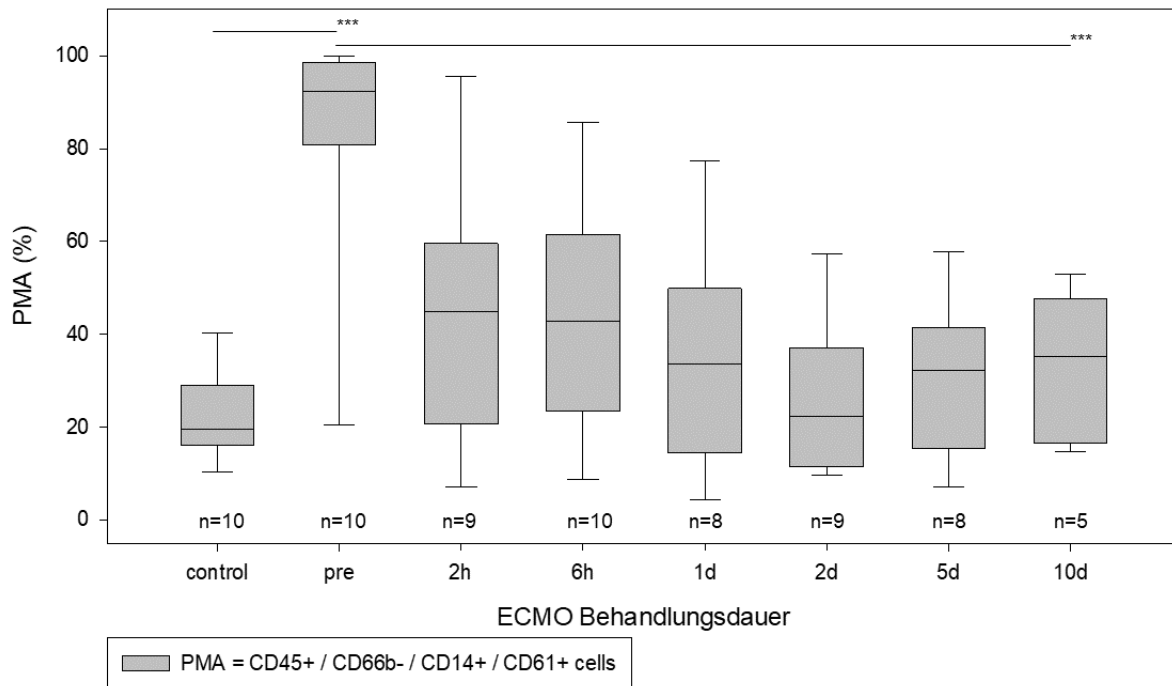


Abbildung 20: **PMA-Level in Kontrollpopulation und ECMO-Patienten im zeitlichen Verlauf der Therapie.** PMA in % an allen CD45+/CD66b-/CD14+ Monozyten. Median als Querstrich. Anzahl der untersuchten Personen = n. Werte mit *markiert unterscheiden sich statistisch signifikant ($p < 0,001$, One-Way-ANOVA for repeated measures für Zeitverlauf an ECMO, Mann-Whitney-U-Test für Kontrollgruppe gegen Prä-Wert) (Eigene Darstellung).

IV.6.4 Fibrinogenbindung von Thrombozyten

Aus Abbildung 21 wird ersichtlich, dass sich im Verlauf der ECMO-Therapie keine statistisch signifikante Veränderung in der Fibrinogenbindung von Thrombozyten nachweisen ließ.

Im Anschluss wurde untersucht, in welchem Maße Thrombozyten durch Stimulation mit ADP zur Bindung von Fibrinogen aktiviert werden konnten. Abbildung 22 zeigt, dass der Anteil an aktivierten, Fibrinogen-bindenden Thrombozyten nach Stimulierung mit ADP bei Patienten, die eine ECMO-Therapie erhielten, vor Beginn der Therapie statistisch signifikant geringer war als in der Kontrollpopulation.

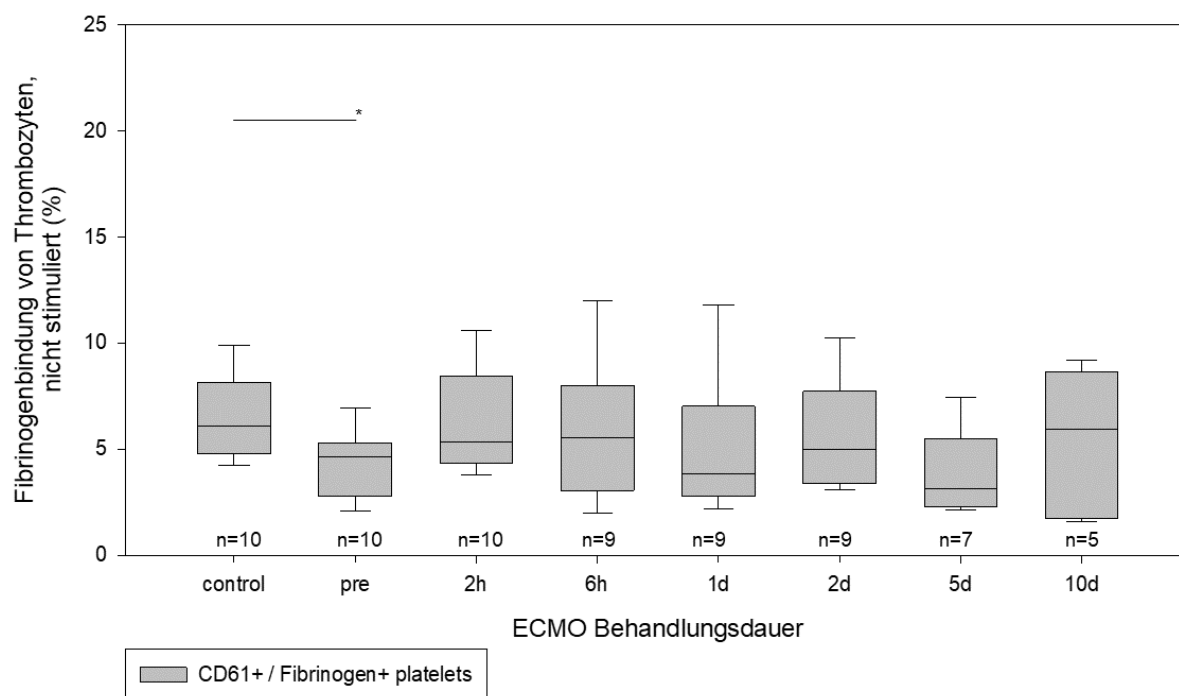


Abbildung 21: **Fibrinogenbindung von nicht-stimulierten Thrombozyten in Kontrollpopulation und ECMO-Patienten** im zeitlichen Verlauf der Therapie. Fibrinogen+ Thrombozyten als Anteil an allen CD61+ Thrombozyten. Median als Querstrich. Anzahl der untersuchten Personen = n. Werte mit * markiert unterscheiden sich statistisch signifikant ($p=0,023$, Mann-Whitney-U-Test) (Eigene Darstellung).

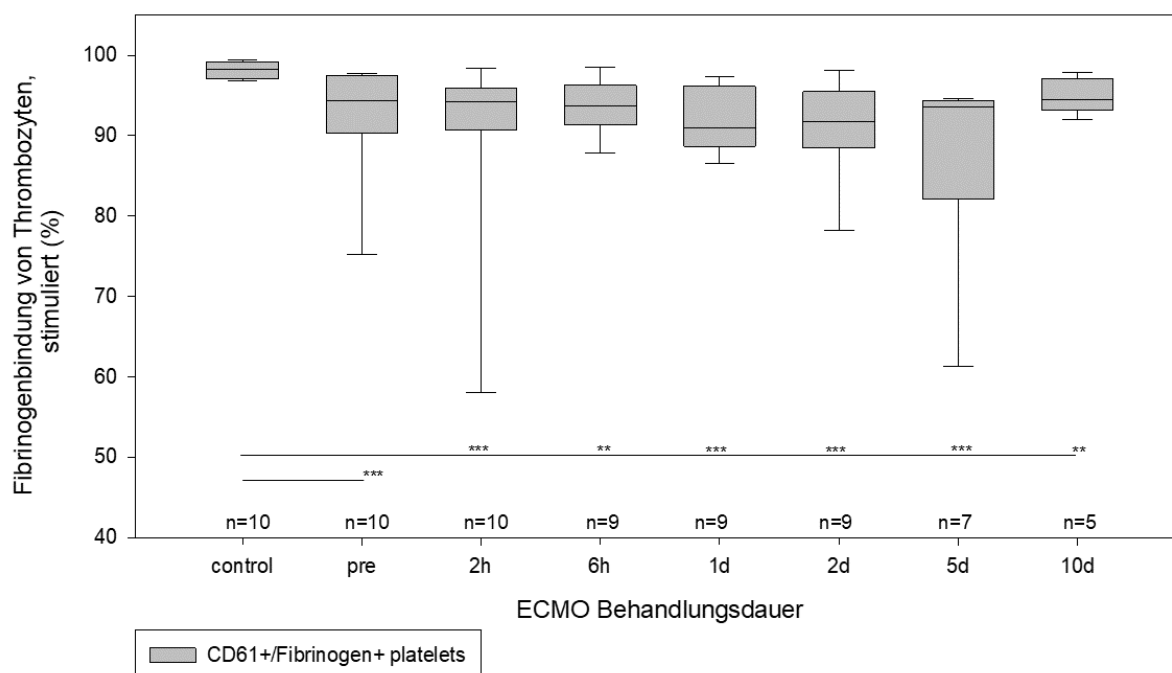


Abbildung 22: **Fibrinogenbindung von Thrombozyten in Kontrollpopulation und ECMO-Patienten nach Stimulation mit ADP** im zeitlichen Verlauf der Therapie. Fibrinogen+ Thrombozyten als Anteil an allen CD61+ Thrombozyten. Median als Querstrich. Anzahl der untersuchten Personen = n. Werte mit ** ($p<0,01$) / *** ($p<0,001$) markiert unterscheiden sich statistisch signifikant (Mann-Whitney-U-Test) (Eigene Darstellung).

IV.6.5 P-Selektin-Expression von Thrombozyten

Thrombozyten von ECMO-Patienten zeigten vor Beginn der Therapie eine höhere Expression von P-Selektin als die Kontrollpopulation. Nach Implantation der ECMO zeigte sich eine gleichbleibend erhöhte P-Selektin-Expression, wobei sich keine weitere Dynamik zeigte. Thrombozyten von ECMO-Patienten waren somit bereits vor Implantation der ECMO in höherem Maße aktiviert als die Kontrollpopulation. Die Thrombozyten zeigten auch im weiteren Verlauf der Therapie eine erhöhte Expression von P-Selektin (vergleiche Abbildung 23).

Im Anschluss wurde untersucht, in welchem Maße Thrombozyten durch Stimulation mit TRAP-6 zur Expression von P-Selektin aktiviert werden konnte. Abbildung 24 zeigt, dass der Anteil an aktivierten, P-Selektin exprimierenden Thrombozyten nach Stimulierung mit TRAP-6 bei ECMO-Patienten bereits vor Beginn der Therapie statistisch signifikant geringer war als in der Kontrollpopulation. Über die Dauer der Therapie kam es zu keiner Erholung der Thrombozytenfunktion, der Anteil an P-Selektin exprimierenden Thrombozyten blieb erniedrigt.

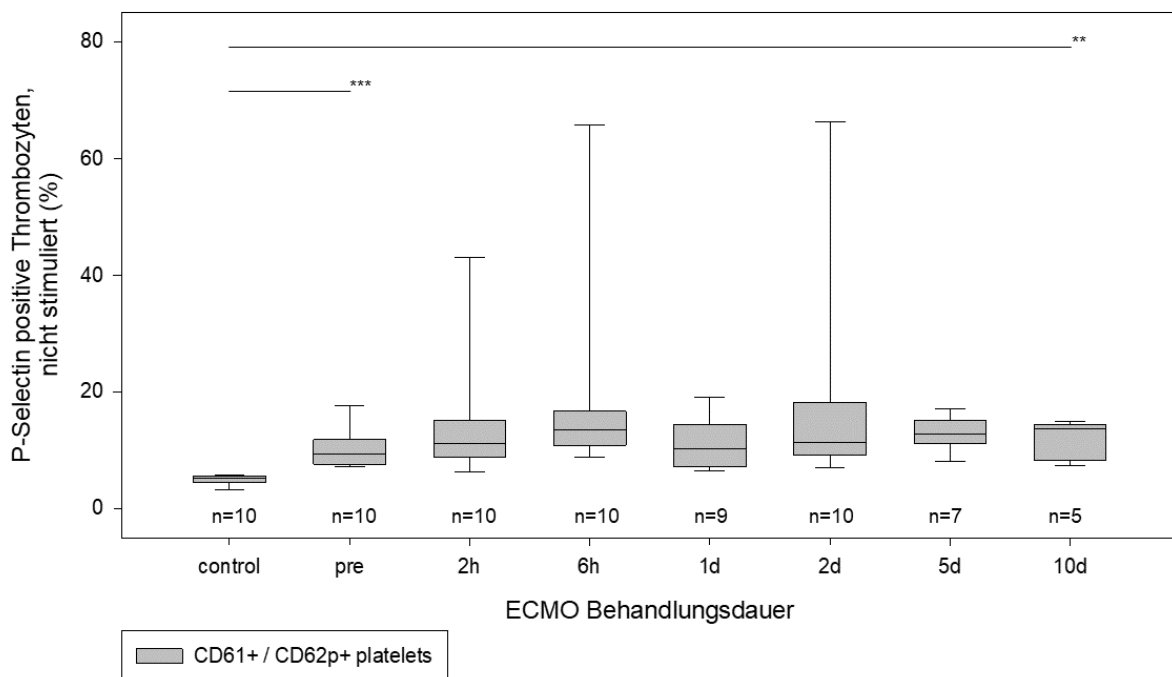


Abbildung 23: **P-Selektin-Expression von Thrombozyten in Kontrollpopulation und ECMO-Patienten** im zeitlichen Verlauf der Therapie. P-Selektin+ Thrombozyten als Anteil an allen CD61+ Thrombozyten in %. Median als Querstrich. Anzahl der untersuchten Personen = n. Werte mit ** ($p < 0,01$) / *** ($p < 0,001$) markiert unterscheiden sich statistisch signifikant (Mann-Whitney-U-Test) (Eigene Darstellung).

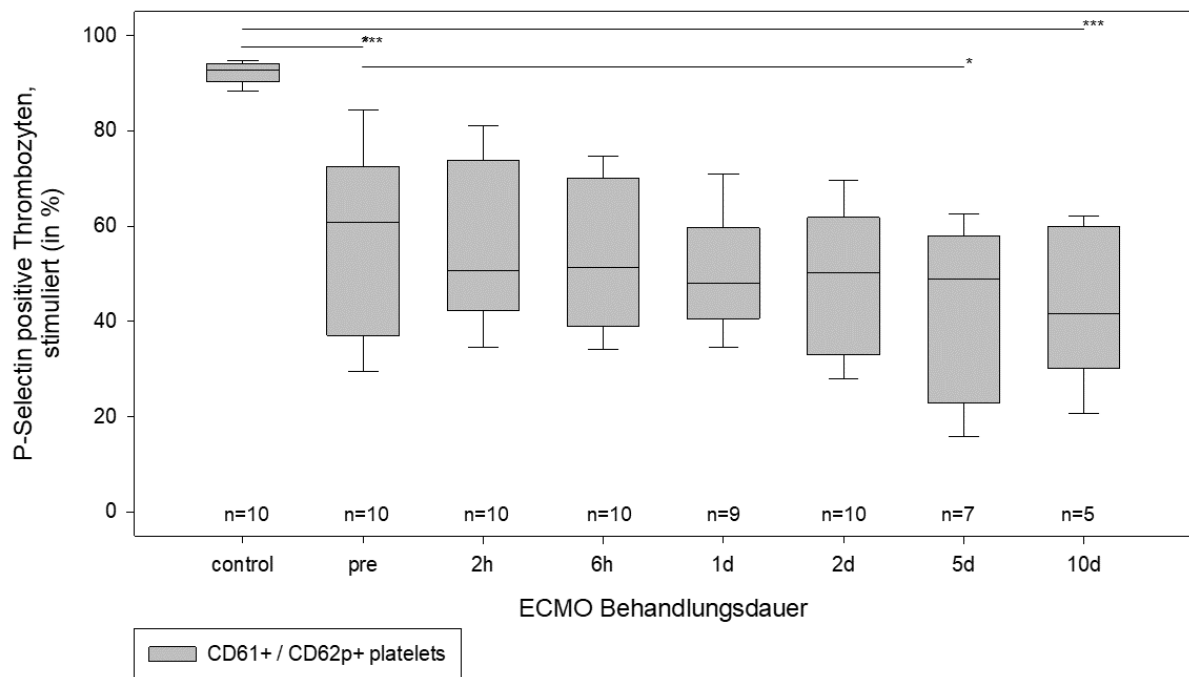


Abbildung 24: **P-Selektin-Expression von Thrombozyten in Kontrollpopulation und ECMO-Patienten nach Stimulation mit TRAP-6** im zeitlichen Verlauf der Therapie. P-Selektin + Thrombozyten als Anteil an allen CD61+ Thrombozyten in %. Median als Querstrich. Anzahl der untersuchten Personen = n. Werte mit * ($p=0,015$) / *** ($p<0,001$) markiert unterscheiden sich statistisch signifikant, für * One-Way-ANOVA for repeated measures, für *** Mann-Whitney-U-Test (Eigene Darstellung).

IV.6.6 Myeloperoxidase

Der Versuch konnte nicht an der Studienpopulation durchgeführt werden, da er nicht erfolgreich etabliert werden konnte. Wie unter II.6 und IV.5 beschrieben, konnten keine reproduzierbaren Ergebnisse in den Vorversuchen erzielt werden.

IV.6.7 Systemwechsel

Bei vier der Patienten musste ein Teil der ECMO mindestens einmal gewechselt werden, da es zu technischen Komplikationen kam. Gründe für die Wechsel waren durch die ECMO bedingte Gerinnungsstörungen, akute Pumpenkopfthrombose, akute Oxygenatorthrombose und eine Verschlechterung des Gasaustauschs. In einem Fall ließ sich der Grund für den Wechsel nicht mehr nachvollziehen. Es zeigten sich keine Unterschiede in den untersuchten Parametern vor der ECMO-Implantation zwischen den Patienten, bei denen es zu einem Systemwechsel kam, und den Patienten, die keinen Systemwechsel benötigten. Eine Analyse der Untersuchungsparameter vor und nach den jeweiligen Wechseln war aufgrund von

hohem logistischem Aufwand und der Unvorhersehbarkeit der Wechsel nicht möglich.

Untersuchungsparameter	Keine Systemwechsel	Systemwechsel	p-Wert
n	6	4	
PNA (%)	31 (17-56)	51 (14-68)	0.610
PMA (%)	89 (81-100)	96 (34-98)	1.00
P-Selektin, nicht stimulierte Thrombozyten (%)	8.5 (7.5-13.1)	10.3 (8.1-12.4)	0.762
P-Selektin, ADP-stimulierte Thrombozyten (%)	63 (52-72)	48 (30-79)	0.610
Fibrinogenbindung, nicht stimulierte Thrombozyten (%)	5.1 (4.0-6.0)	3.1 (2.6-5.1)	0.476
Fibrinogenbindung, TRAP-6-stimulierte Thrombozyten (%)	95 (93-98)	91 (77-96)	0.171

Tabelle 21: Untersuchungsparameter vor ECMO-Implantation bei Patienten mit und ohne Systemwechsel. Werte angegeben als Median (Interquartilsabstand) (Eigene Darstellung).

IV.6.8 Gerinnung

Während der ECMO-Therapie wurde die Gerinnungsaktivität der Patienten überwacht (14,57). Hierfür wurden Fibrinogenlevel, D-Dimer-Level, Thrombozytenzahlen, Quick-Wert, aPTT und ATIII-Aktivität erfasst. Wie aus Abbildung 25 und Abbildung 26 hervorgeht, kam es fünf Tage nach Beginn der ECMO zu einem Abfall von Fibrinogen, der sich an Tag zehn fortsetzte. D-Dimer und ATIII zeigten am fünften Behandlungstag gestiegene Werte, bei ATIII setzte sich dies am zehnten Behandlungstag fort. Die aPTT stieg innerhalb eines Tages signifikant an aufgrund der der Antikoagulation mit Heparin oder Argatroban. Es zeigte sich keine signifikante Änderung von LDH, fHb und Blutfluss der ECMO.

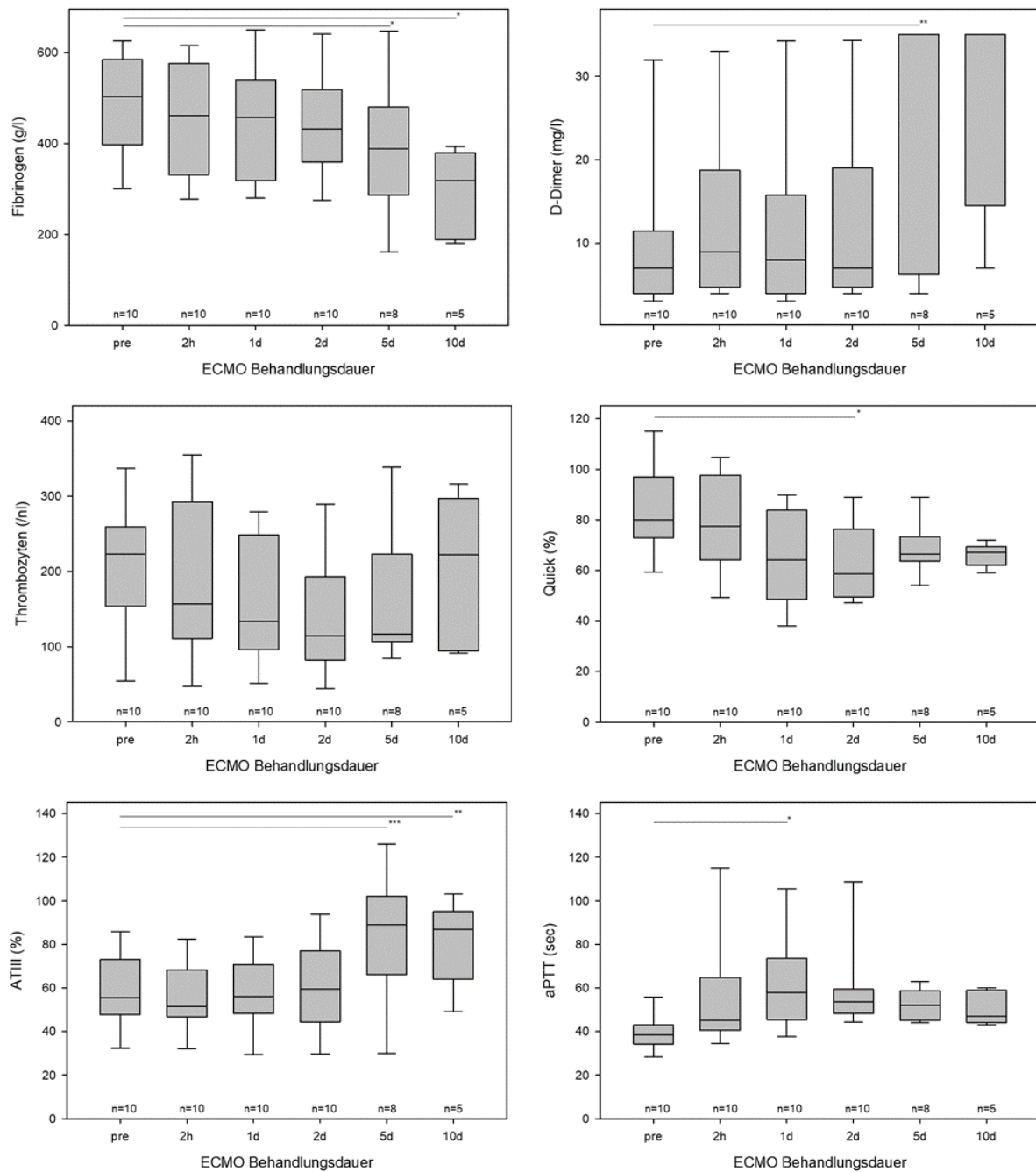


Abbildung 25: **Ausgewählte Gerinnungsparameter von ECMO-Patienten im zeitlichen Verlauf der Therapie.** Median als Querstrich. Anzahl der untersuchten Personen = n. Werte mit * ($p < 0,05$) / ** ($p < 0,01$) / *** ($p < 0,001$) markiert unterscheiden sich statistisch signifikant, One-Way-ANOVA for repeated measures, (Eigene Darstellung).

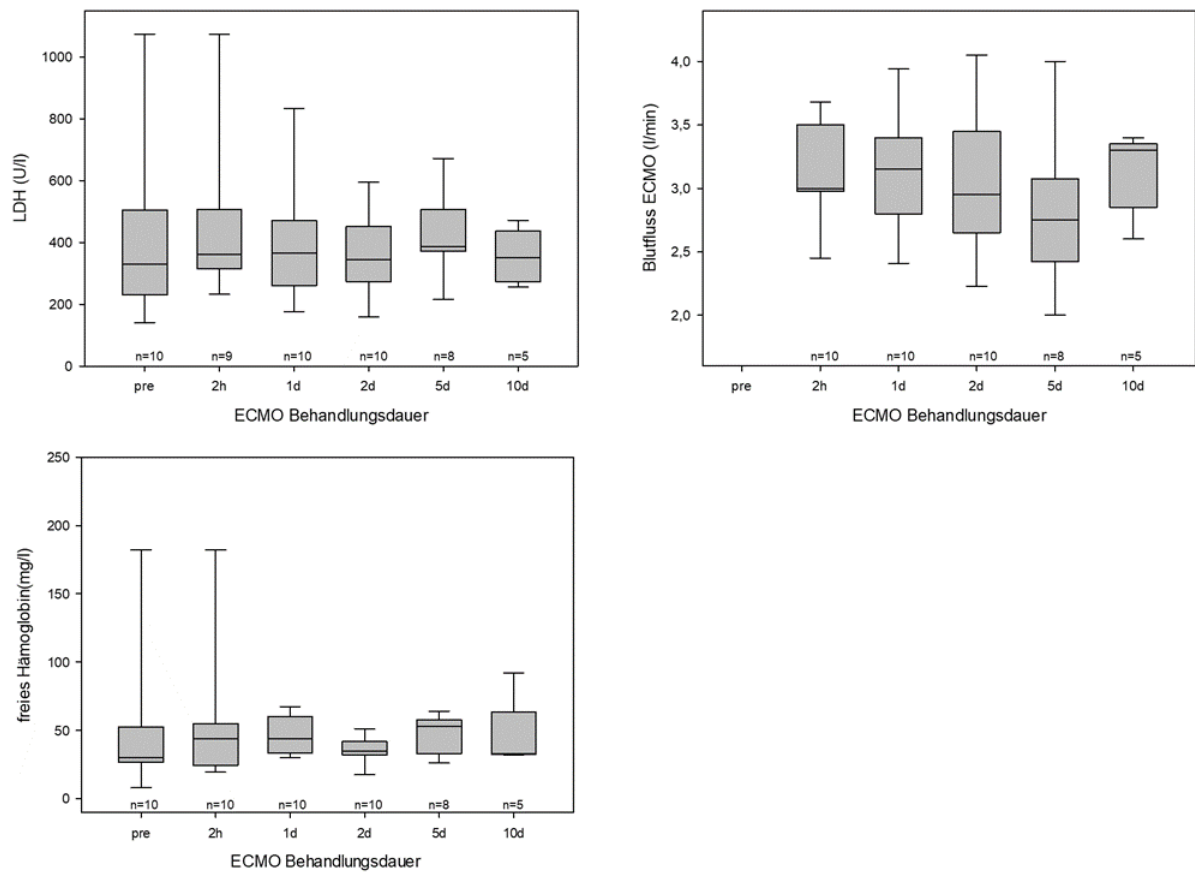


Abbildung 26: **Plasmalevel von LDH und freiem Hämoglobin, sowie Blutfluss der ECMO im zeitlichen Verlauf der Therapie.** Median als Querstrich. Anzahl der untersuchten Personen = n. (Eigene Darstellung).

IV.6.9 Inflammation

Während der ECMO-Therapie wurde die inflammatorische Aktivität der Patienten überwacht. Hierfür wurden Leukozytenzahl, CRP, IL-6 und IL-8 regelmäßig bestimmt. Während der Therapie kam es zu keiner signifikanten Änderung der Parameter.

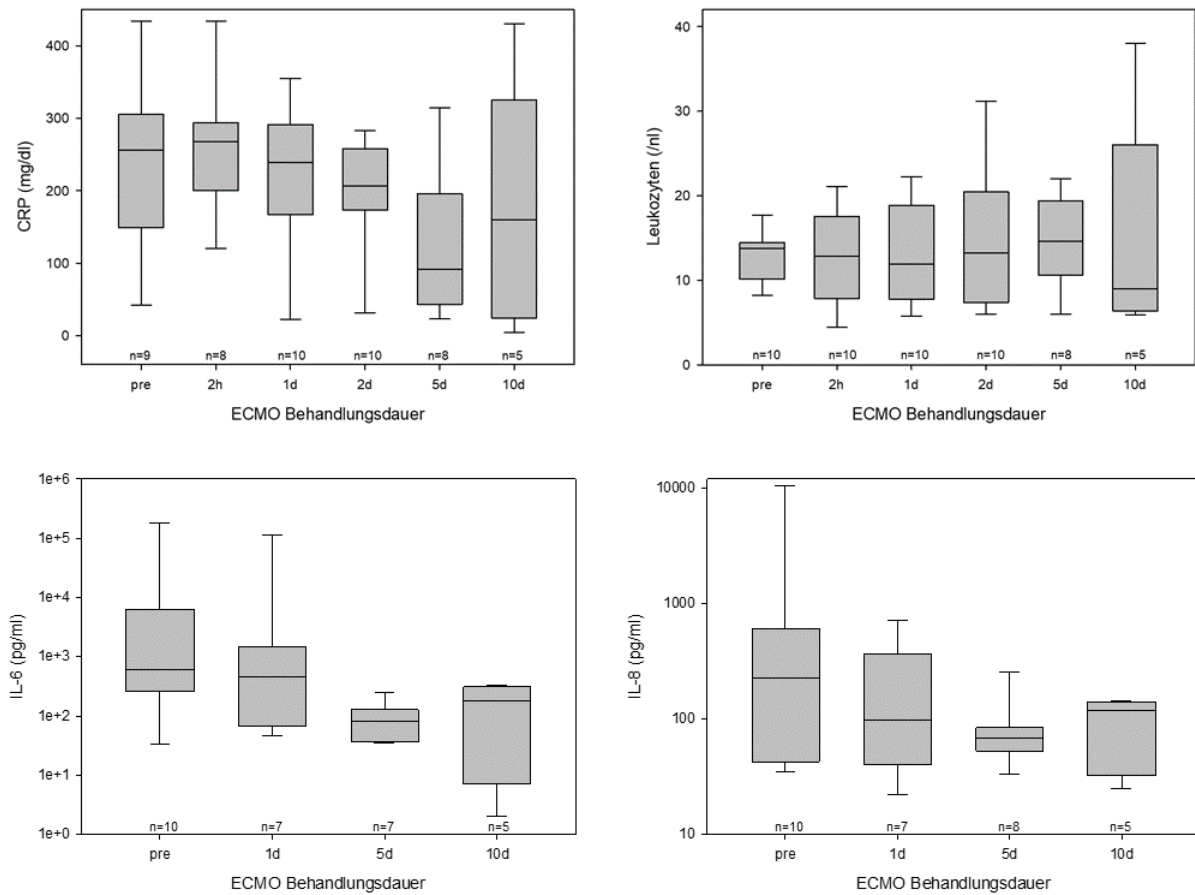


Abbildung 27: **Ausgewählte Inflammationsmarker der ECMO-Patienten im zeitlichen Verlauf.** Median als Querstrich. Anzahl der untersuchten Personen = n. (Eigene Darstellung).

V Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde das Blut von kritisch erkrankten Patienten, die eine V-V ECMO erhielten, vor und im Verlauf der ECMO-Therapie untersucht. Vor dem Beginn der ECMO-Therapie zeigten sich PNA- und PMA-Level signifikant erhöht (PNA: $p=0,012$, PMA: $p=0,001$), nicht stimulierte Thrombozyten zeigten eine erhöhte Expression von P-Selektin ($p<0,001$) und eine reduzierte Bindung von Fibrinogen ($p=0,023$). Nach Stimulation mit TRAP-6 oder ADP zeigten die Thrombozyten eine reduzierte Aktivierungsfähigkeit im Vergleich zur Kontrollpopulation mit reduzierter Expression von P-Selektin ($p<0,001$) und Bindung von Fibrinogen ($p=0,001$). Die P-Selektin-Expression und Fibrinogenbindung nicht stimulierter Thrombozyten änderte sich nicht im Verlauf der ECMO. Zwei Stunden nach ECMO-Implantation kam es zu einem signifikanten Abfall von PNA ($p<0,001$) und PMA ($p<0,001$). Fünf Tage nach Beginn der ECMO kam es zu einem weiteren signifikanten ($p=0,007$) Abfall der Expression von P-Selektin auf stimulierten Thrombozyten. Das Ausmaß der Fibrinogenbindung bei nicht stimulierten und bei stimulierten Thrombozyten änderte sich im Verlauf der Therapie nicht.

Die Patienten, die in die vorliegende Studie eingeschlossen wurden, litten zum Zeitpunkt der Implantation der ECMO alle unter einem septischen Krankheitsbild mit deutlich erhöhten SOFA-Scores, erhöhten Entzündungswerten und erhöhten Gerinnungsparametern. Hierdurch zeigte sich eine deutlich erhöhte P-Selektin-Expression, eine geringere Fibrinogenbindungsfähigkeit, eine geringere Expression von P-Selektin nach Stimulation mit TRAP-6 und erhöhte PNA und PMA. Frühere Studien konnten bereits zeigen, dass sich der Thrombozytenphänotyp und die Thrombozytenfunktion bei kritisch kranken Patienten von gesunden Kontrollen unterscheidet (58,59). Wie von Finsterbusch et al. dargelegt, sind PNA und PMA schon früh während einer Sepsis deutlich erhöht (23). Sie bewirken die Freisetzung von Zytokinen (60), die Rekrutierung weiterer Leukozyten (61,62), die Bildung von neutrophilen extrazellulären Fallen (neutrophil extracellular traps, NETs) (63) und spielen damit eine wichtige Rolle in der Entzündungsreaktion. NETs sind neben ihrer Rolle in der Entzündungsreaktion auch in hohem Maße thrombogen, sie sind in der Lage Thrombozyten zu aktivieren, erhöhen Thrombinlevel, können damit die Gerinnungskaskade auslösen und erhöhen insgesamt die Wahrscheinlichkeit für eine

Phlebothrombose (64). Haus et al. untersuchte am gleichen Patientenkollektiv der vorliegenden Arbeit das Vorliegen von NETs im Blut der Patienten während der ECMO-Therapie anhand von Immunofluoreszenzfärbungen von Blutaussstrichen. Hier zeigten sich bei vier von zehn der Patienten erhöhte NET-Raten vor Beginn der ECMO. Bei dem Patientenkollektiv mit erhöhten NETs zeigten sich vor Beginn der Therapie signifikant erhöhte Level an IL-6 und Tumornekrosefaktor (TNF). Bei diesen Patienten kam es unter ECMO zu einem früheren und ausgeprägterem Abfall von Thrombozyten und von ATIII-Aktivität, verglichen mit den sechs Patienten, die keine erhöhten NETs vor Beginn der ECMO zeigten (65). Erhöhte NETs korrelierten nicht mit erhöhten PNA ($p=0,27$) und erhöhten PMA ($p=0,43$). Lingel et al. untersuchten mittels des Nachweises von zellfreier Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid, DNA) am gleichen Patientenkollektiv der vorliegenden Arbeit das Vorliegen von NETs im Blut der Patienten. Passend zu den erhöhten PNA und PMA in der vorliegenden Untersuchung zeigten sich hier vor Beginn der Therapie signifikant erhöhte Spiegel an zellfreier DNA im Vergleich zu gesunden Probanden. Durch den Beginn der ECMO oder durch folgende Systemwechsel zeigte sich keine Änderung in der Höhe der zellfreien DNA (66).

Rondina et al. konnten zeigen, dass PMA und aktivierte Thrombozyten, gemessen über P-Selektin-Expression und Expression von GPIIb/IIIa, erhöht waren bei Patienten mit ARDS und ALI. Ferner konnten sie zeigen, dass die Höhe von PMA beeinflusst war von Blutabnahmetechnik, Verarbeitungszeit der Proben und Thrombozytenlevel (35). Die Notwendigkeit eines rigorosen Abnahmeprotokolls zeigte sich in der vorliegenden Untersuchung ebenfalls.

Im Gegensatz zu vorherigen Studien zeigte sich die Bindung von FITC-konjugiertem Fibrinogen an Thrombozyten bei den Patienten der vorliegenden Untersuchung reduziert im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Andere Studien konnten zeigen, dass bei septischen Patienten eine erhöhte Bindung von Fibrinogen auftritt im Vergleich zu anderen Patienten (67). Dies lag wahrscheinlich an dem vorliegenden Untersuchungsprotokoll. Unberücksichtigt blieben hier diejenigen GPIIb/IIIa, deren Bindungsstellen bereits belegt waren durch intravasal zirkulierendes Fibrinogen. Hierunter kann es zu einer Unterrepräsentation von aktivierten Thrombozyten gekommen sein. Layios et al. verwendeten einen Anti-Fibrinogen-Antikörper (67).

PNA und PMA sind neben ihrer Rolle während inflammatorischer Krankheitsbilder ein sehr sensibler Marker für Thrombozytenaktivierung (23,35). PMA sind länger im Blut nachweisbar, als die Expression von P-Selektin, dadurch sind sie besser zur Messung von Thrombozytenaktivierung geeignet (68). Mehrere Studien konnten zudem zeigen, dass die Interaktion zwischen Thrombozyten und Leukozyten eine wichtige Rolle in der Frühphase von Atherosklerose spielt, indem sie zu Leukozytenaktivierung, Leukozyteninfiltration, Endothelinflammation und Lipidanreicherung führen (61,69,70). Maugeri et al. konnten zeigen, dass Koronarthromben zu einem großen Teil aus aktivierten Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten und NETs bestehen (63). Jurk et al. untersuchten die Rolle von PMA bei der Entstehung von akuter cerebrovaskulärer Ischämie: Sie fanden heraus, dass PMA und aktivierte Thrombozyten bei symptomatischen Patienten mit Stenose der Aa. carotidae signifikant erhöht waren im Vergleich zu asymptomatischen Patienten und stellten die Hypothese auf, dass durch Inflammation aktivierte Monozyten, und nicht Thrombozyten, am Beginn der Gerinnungskaskade bei der Entstehung atherothrombotischer zerebraler Ischämien stehen (71). Steiger et al. konnten zuletzt zeigen, dass PLA auch eine Rolle bei Thrombosen während ECMO haben. Sie untersuchte die thrombotischen Ablagerungen auf den Gasfasern von Membranoxygenatoren von 21 ECMO-Patienten nach Beendigung der Therapie und konnte histologisch PLA auf diesen nachweisen, wobei die Quantität unabhängig vom Ausmaß der Besiedelung mit vWF war (72). Wagner et al. untersuchten einen Membranoxygenator nach Therapieende auf das Vorhandensein von Thrombosen mittels bildgebender Verfahren, Mikrocomputertomographie, Multidetector-Computertomographie und Fotografien der Gewebematten, und histologischer Färbungen. Auch hier zeigte sich das ubiquitäre Vorhandensein von kernhaltigen Zellen, wovon die meisten PLA waren, auf den Fasern des Membranoxygenators. PLA zeigten sich sowohl in den Regionen mit Thrombosen als auch in den thrombosefreien Bereichen des Membranoxygenators. Es zeigte sich ein erhöhtes Auftreten von PLA bei erhöhter Thrombuslast am Eingang des Membranoxygenators. Die Autoren werteten dies als frühe Reaktion in der Gerinnungskaskade auf die körperfremden Materialien und die hohe Scherbelastung (73). In der vorliegenden Untersuchung zeigte sich keine Korrelation zwischen PLA und PMA vor Beginn der ECMO-Therapie mit einem späteren Systemwechsel. Bei vier der zehn untersuchten Patienten mussten Teile der ECMO ausgetauscht

werden. Die Gründe hierfür waren systembedingte Gerinnungsstörungen, akute Pumpenkopfthrombosen, akute Oxygenatorthrombosen oder eine Verschlechterung des Gasaustauschs. Eine Bestimmung der Parameter direkt vor und nach einem Systemwechsel wäre für folgende Untersuchungen, ob sie eine Rolle bei der Entstehung von Thrombosen innerhalb der ECMO, sinnvoller.

Zuletzt haben sich einige Arbeiten mit der Rolle von PLA und PMA während ECMO beschäftigt. Mansour et al. konnten zeigen, dass PLA auch während ECMO-Therapie ein sensibler Marker für Thrombozytenaktivierung sind, im Unterschied zur vorliegenden Arbeit wurden allerdings keine Werte vor Beginn der ECMO erhoben (24). In der vorliegenden Untersuchung kam es innerhalb von zwei Stunden zu einem Abfall der vorher erhöhten PLA- und PMA-Level. Dies lag möglicherweise an einer Filterfunktion des Membranoxygenators. Wie in vorherigen Untersuchungen gezeigt akkumulieren PLA an den Fasern des Membranoxygenators und in dort anliegendem Thrombusmaterial (72). Siegel et al. stellten fest, dass Thrombozyten von ECMO-Patienten eine hochgradig eingeschränkte Funktionsfähigkeit haben. Wie in der vorliegenden Untersuchung zeigte sich eine reduzierte Aktivierungsfähigkeit von Thrombozyten nach Aktivierung mit TRAP-6 oder ADP, gemessen an der P-Selektin-Expression und der Expression von GPIIb/IIIa. Anders als in der vorliegenden Arbeit zeigten sich dort bei ECMO-Patienten reduzierte PLA-Level, die Autoren werteten dies im Rahmen der Thrombozytendysfunktion. Übereinstimmend zur vorliegenden Arbeit zeigten sich erhöhte Entzündungswerte und SOFA-Scores, allerdings wurden in die Studie 10 V-V ECMO und 20 V-A ECMO eingeschlossen, die Übertragbarkeit auf die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung sind dadurch eingeschränkt (74).

In einer Untersuchung von Manu et al. zeigten sich ebenfalls erhöhte PMA- und PLA-Level. Es zeigte sich eine Erhöhung für über 24 Stunden nach Aufnahme auf die Intensivstation, die Werte fielen innerhalb von 48h auf das Niveau der Kontrollpopulation oder niedriger ab. In unserer Untersuchung zeigte sich die Sekretionsfähigkeit der Thrombozyten reduziert, dies zeigte sich ebenso bei septischen Patienten in der Untersuchung von Manu. (75). Dies liegt wahrscheinlich an einer zunehmenden Erschöpfung der Sekretionsfähigkeit der Thrombozyten im Verlauf einer Sepsis (75). In der vorliegenden Untersuchung ergaben sich keine Anhalte dafür, dass dieser Prozess von ECMO beeinflusst wird. Schopka et al.

konnten zeigen, dass IL-6 und IL-8 zu Beginn der V-A ECMO Therapie bei nicht überlebenden Patienten deutlich erhöht waren im Vergleich zu überlebenden Patienten (76). Kozakov et al. zeigten, dass IL-6 und IL-8 Level signifikant erhöht waren bei Patienten mit Multiorganversagen, während der ECMO-Therapie und weiter anstiegen mit der Anzahl an betroffenen Organen. Die Erhöhung dieser Interleukine vor dem Beginn oder am ersten Tag der ECMO war ein zuverlässiger prädiktiver Marker für das Auftreten für Multiorganversagen (77). Über den IL-6 Rezeptor kann IL-6 Leukozyten aktivieren, in der vorliegenden Untersuchung zeigte sich jedoch keine Korrelation von PLA und PMA mit IL-6, IL-8 oder CRP. Allerdings war insbesondere die Datenlage für IL-6 und IL-8 stark eingeschränkt.

Balle et al. haben festgestellt, dass es bei der Implantation der ECMO zur übermäßigen Aktivierung von Thrombozyten kommt, dies führt zu mindestens teilweise degranulierten Thrombozyten, die in der Folge durch Aktivierung nicht mehr im gleichen Maße stimuliert werden können (19). Dies könnte ebenfalls eine Erklärung für die eingeschränkte Aktivierbarkeit der Thrombozyten an V-V EMCO sein, die in der vorliegenden Untersuchung festgestellt wurde. Thrombozyten bleiben auch nach der Degranulation noch vital und sind durch Durchflusszytometrie detektierbar, so dass in der Durchflusszytometrie degranulierte Thrombozyten über CD61 weiter erkannt werden, aber nicht mehr durch ein zugesetztes Agens (ADP / TRAP-6) stimuliert werden (78). Van den Helm et al. konnten bei pädiatrischen Patienten (0 Jahre bis 17 Jahre (IQR 7 Tage - 4 Jahre) zeigen, dass im Verlauf der ECMO-Therapie die Thrombozytenfunktion abnimmt, dort zeigte sich eine reduzierte Expression des Fibrinogenrezeptors und von P-Selektin (25).

Als Limitationen für die vorliegende Untersuchung sind anzuführen, dass die Kontrollgruppe nicht auf Geschlecht, Alter und Vorerkrankungen der Untersuchungspopulation angepasst war. Ferner war die Fallzahl mit zehn eingeschlossenen Patienten sehr gering. Durch hohen logistischen Aufwand konnten keine zeitnahen Proben vor und nach Systemwechseln untersucht werden. Die vorliegende Untersuchung war außerdem eine single-center-Studie, andere ECMO-Layouts, Antikoagulationsregime und Transfusionstrigger könnten einen Einfluss auf die Studienergebnisse haben.

VI Zusammenfassung

Thromboembolische Ereignisse sind eine häufige Nebenwirkung von V-V ECMO. Die Interaktion zwischen Leukozyten und Thrombozyten in PNA und PMA spielen eine Rolle in der Entstehung von Thrombosen. Die Thrombozytenaktivierungsmarker P-Selektin-Expression und Fibrinogenbindung könnten neben PNA und PMA als Indikatoren für die Entstehung von Thrombosen innerhalb der ECMO verwendet werden. Um diese Marker unter ECMO nachzuweisen, wurden Blutproben von 10 ECMO-Patienten vor und während der Therapie und von elf gesunden Probanden untersucht. Durch septische Krankheitsbilder zeigten sich PNA und PMA vor Beginn der ECMO erhöht, es zeigte sich eine erhöhte P-Selektin-Expression, eine reduzierte Bindung von Fibrinogen und eine reduzierte Aktivierungsfähigkeit von Thrombozyten. Innerhalb von zwei Stunden nach Beginn der Therapie zeigte sich ein Abfall der PNA- und PMA-Level, zu einer weiteren Änderung unter ECMO kam es nicht. Die basale Bindung von Fibrinogen und P-Selektin-Expression veränderte sich nicht unter ECMO. Unter ECMO zeigten die Thrombozyten eine geringere Aktivierungsfähigkeit, innerhalb von fünf Tagen kam es zum Abfall der P-Selektin-Expression nach Stimulation. Die Untersuchungsparameter unterschieden sich vor Beginn der Therapie nicht zwischen Patienten, die einen Wechsel der ECMO erhielten, verglichen mit denen, die keinen Wechsel erhielten. In der vorliegenden Untersuchung konnte keine Eignung von PNA, PMA, P-Selektin-Expression und Fibrinogenbindung als Marker für das Auftreten einer Thrombose während einer Therapie mit ECMO festgestellt werden.

VII Anhang

VII.1 Abkürzungsverzeichnis

20G	0,9mm Außendurchmesser
21G	0,8mm Außendurchmesser
a.d.	aqua destillata = destilliertes Wasser
ADP	Adenosindiphosphat
AF	Atemfrequenz
AMV	Atemminutenvolumen (l/min)
ANOVA	Varianzanalyse = Analysis of Variance
APC	Allophycocyanin
aPH	Arterieller pH
aPTT	Aktivierte partielle Thromboplastinzeit = activated partial thromboplastin time
aqua bidest.	aqua bidestillata = zweifach destilliertes Wasser
ARDS	Akutes Atemnotsyndrom = acute respiratory distress syndrome
ATIII	Antithrombin III
AZV	Atemzugvolumen = Tidalvolumen (ml)
BD	Becton, Dickinson and Company
BMI	Body-Maß-Index = body mass index (kg/m ²)
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of Differentiation, Unterscheidungsgruppen nach immunphänotypischen Oberflächenmerkmalen
CESAR	Conventional ventilatory support vs. Extracorporeal membrane oxygenation for severe adult respiratory failure
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung = chronic obstructive pulmonary disease
COVID-19	Coronavirus-Krankheit-2019 = Coronavirus Disease 2019
CRP	C-reaktives Protein
DNA	Desoxyribonukleinsäure = deoxyribonucleic acid
dpMO	Druckdifferenz am Membranoxygenator = Δ pressure membrane oxygenator
ECLS	Extrakorporale Lebenserhaltung = extracorporeal life support
ECMO	Extrakorporale Membranoxygenierung
eCPR	Extrakorporale kardiopulmonale Reanimation = extracorporeal cardiopulmonary resuscitation
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure = ethylendiamintetraacetat
EOLIA	ECMO to rescue lung injury in severe ARDS
FACS™	Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung = fluorescence-activated cell sorting = Bezeichnung für Durchflusszytometrie, eingetragtes Warenzeichen der Firma BD Biosciences
FACSCalibur™	Durchflusszytometer der Firma BD Biosciences
fHb	Freies Hämoglobin

FiO ₂	Inspiratorische Sauerstoff-Fraktion
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FL	Fluoreszenzkanal
fMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
FSC	Forward Scatter
G	Birmingham Gauge = Maß für Außendurchmesser von Kanülen
H1N1	H1N1 Subtyp des Influenza-A-Virus, "Schweinegrippe"
Hb	Hämoglobin
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
INR	International Normalized Ratio
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDH	Laktatdehydrogenase
LIS	Lungenversagen Score nach Murray = lung injury score
MPO	Myeloperoxidase
n	Anzahl
NE	Noradrenalin = Norepinephrine
NET	Neutrophile extrazelluläre Falle = neutrophil extracellular trap
paCO ₂	Arterieller Kohlenstoffdioxidpartialdruck (mmHg)
paO ₂	Arterieller Sauerstoffpartialdruck (mmHg)
paO ₂ /FiO ₂	Arterieller Sauerstoffpartialdruck / inspiratorische Sauerstoffkonzentration, Oxygenierungsindex = Horowitz-Index
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung = phosphate buffered saline
PCT	Procalcitonin
PE	Phycoerythrin
PEEP	Positiver endexpiratorischer Druck = positive endexpiratory pressure (mm H ₂ O)
PerCP-Cy5.5	Peridin Chlorophyll Protein-Cyanine5.5
pH	Potential des Wasserstoffs
PIP	Maximaler inspiratorischer Druck = peak inspiratory pressure (mm H ₂ O)
PLA	Thrombozyten-Granulozyten-Koaggregate = platelet-leucocyte-aggregates
PMA	Thrombozyten-Monozyten-Koaggregate = platelet-monocyte-aggregates
PNA	Thrombozyten-neutrophile Granulozyten-Koaggregate = platelet-neutrophil-aggregates
SARS-CoV-2	Schweres-akutes-Atemwegssyndrom-Coronavirus Typ 2 = severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2
SOFA-Score	Sequentieller Organversagen Score = sequential organ failure assesment-Score
SSC	Sideward Scatter
TNF	Tumornekrosefaktor = tumor necrosis faktor
TRAP-6	Thrombinrezeptor-Aktivator Peptid 6 = Thrombin Receptor Activator Peptide 6

TV	Tidalvolumen (ml)
V-A ECMO	Veno-arterielle extrakorporale Membranoxygenierung
V-V ECMO	Veno-venöse extrakorporale Membranoxygenierung
Z.n.	Zustand nach

VII.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vollblutprobe eines gesunden Probanden in der Durchflusszytometrie. 2D-Scatterplot (FSC / SSC) mit Populationen von Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten (Eigene Darstellung).....	13
Abbildung 2: Anordnung von Laser und Detektoren in einem Durchflusszytometer (aus (27)).	14
Abbildung 3: Vollblutprobe mit verschiedenen Leukozytenpopulationen. 2D-Scatterplot (CD45 / CD14), CD14+ / CD45+ Monozyten ausgewählt und mit „3,82“ markiert, entsprechend 3,82% aller gemessenen Ereignisse. Unterhalb davon weitere Leukozytenpopulationen markiert (Eigene Darstellung).	15
Abbildung 4: Vollblutprobe nach korrekter Geräteeinstellung. 2D-Scatterplot (FSC/SSC), Zellpopulationen beschriftet (Eigene Darstellung).....	18
Abbildung 5 Vollblutprobe nach korrekter Kompensation. Oben Links 2D-Scatterplot (CD61/CD66b). Einfach CD61-gefärbte Kompensationsprobe für Kanal FL3-CD61-PerCP-Cy5.5, Zielpopulation zeigt nur im Kanal FL3 positives Signal, nach erfolgter Kompensation kein positives Signal im benachbarten Kanal FL2. Oben rechts 2D-Scatterplot (CD45/CD61). Einfach CD45-gefärbte Kompensationsprobe für Kanal FL4-CD45-APC, Zielpopulationen zeigen nur im Kanal FL4 positives Signal, nach erfolgter Kompensation kein positives Signal im benachbarten Kanal FL3. Unten Links 2D-Scatterplot (CD14/CD66b). Einfach CD14-gefärbte Kompensationsprobe für Kanal FL1-CD14-FITC, Zielpopulation zeigt nur im Kanal FL1 positives Signal, nach erfolgter Kompensation kein positives Signal im benachbarten Kanal FL2. Unten rechts 2D-Scatterplot (CD66b/CD14). Einfach CD66b-gefärbte Kompensationsprobe für Kanal FL2-Cd66b-PE, Zielpopulation zeigt nur im Kanal FL2 positives Signal, nach erfolgter Kompensation kein positives Signal im benachbarten Kanal FL1. Events im oberen rechten Quadranten sind jeweils als Doubletten / Artefakte zu werten (Eigene Darstellung).	20
Abbildung 6: Darstellung der durchflusszytometrischen Messung von PNA. Vollblutprobe eines Probanden. Links 2D-Scatterplot (CD45/CD66b) CD45+/CD66b+ neutrophile Granulozyten durch Gate ausgewählt (schwarze Umrandung, mit „19,31“ beschriftet). Rechts 2D-Scatterplot (CD61/CD66b) Darstellung der CD45+/CD66b+ Granulozyten, Überprüfung auf Anwesenheit von CD61+ Thrombozyten = PNA im rechten oberen Quadranten (Eigene Darstellung).....	29
Abbildung 7: Darstellung der durchflusszytometrischen Messung von PMA. Vollblutprobe eines Probanden. Links 2D-Scatterplot (CD45/CD14) CD45+/CD14+ Monozyten durch Gate ausgewählt (schwarze Umrandung, mit „3,82“ markiert). Rechts 2D-Scatterplot (CD61/CD14) Darstellung der CD45+/CD14+ Monozyten, Überprüfung auf Anwesenheit von CD61+ Thrombozyten = PMA im rechten oberen Quadranten (Eigene Darstellung).	30
Abbildung 8: Darstellung der durchflusszytometrischen Messung der Fibrinogenbindung von Thrombozyten. Vollblutprobe eines Probanden. Links 2D-Scatterplot (CD61/SSC) CD61+ Thrombozyten durch Gate ausgewählt. Mitte 2D-Scatterplot	

(Fibrinogen/CD61) Darstellung der CD61+ Thrombozyten, Überprüfung auf Anwesenheit von CD61+/Fibrinogen + Thrombozyten = Fibrinogenbindende Thrombozyten im rechten oberen Quadranten. Rechts 2D-Scatterplot (Fibrinogen/CD61) Darstellung der mit ADP stimulierten CD61+ Thrombozyten, Überprüfung auf Anwesenheit von CD61+/Fibrinogen + Thrombozyten = Fibrinogenbindende Thrombozyten im rechten oberen Quadranten (Eigene Darstellung).	32
Abbildung 9: Darstellung der durchflusszytometrischen Messung der P-Selektin-Expression von Thrombozyten. Vollblutprobe eines Probanden. Links 2D-Scatterplot (CD61/SSC) CD61+ Thrombozyten durch Gate ausgewählt. Mitte 2D-Scatterplot (CD62p/CD61) Darstellung der CD61+ Thrombozyten, Überprüfung auf Anwesenheit von CD61+/CD62p+ Thrombozyten = aktivierte Thrombozyten im rechten oberen Quadranten. Rechts 2D-Scatterplot (CD62p/CD61) Darstellung der mit TRAP-6 aktivierten CD61+ Thrombozyten, Überprüfung auf Anwesenheit von CD61+/CD62p+ Thrombozyten = aktivierte Thrombozyten im rechten oberen Quadranten (Eigene Darstellung).	33
Abbildung 10: Emissionsspektren der ausgewählten Fluorochrome und Detektionsfähigkeit des FACSCalibur Durchflusszytometers. Emissionsspektren als farbig markierte Fläche unter der Kurve, Exzitationsspektren als gestrichelte Linie, Detektionsfähigkeit der Kanäle als farbige durchsichtige Rechtecke (Eigene Darstellung, modifiziert nach (43)).	35
Abbildung 11: Darstellung der durchflusszytometrischen Messung der PNA-Level. Negativkontrolle. Vollblutprobe eines Probanden. 2D-Scatterplot (CD61/CD66b) Untersuchungspopulation sind CD45+/CD66b+ Granulozyten. Überprüfung auf Anwesenheit von CD61+ Thrombozyten = PNA im rechten oberen Quadranten. Hoher Anteil an PNA mit 68,78% an allen CD45/CD66b+ Granulozyten, homogene Population ohne klare Unterteilung in CD61- und CD61+ Zellen (Eigene Darstellung).	37
Abbildung 12: Darstellung der durchflusszytometrischen Messung der PNA-Level nach Stimulierung mit TRAP-6 = Positivkontrolle. Vollblutprobe eines Probanden. Links 2D-Scatterplot (CD61/CD66b) Untersuchungspopulation sind CD45+/CD66b+ Granulozyten. Überprüfung auf Anwesenheit von CD61+ Thrombozyten = PNA im rechten oberen Quadranten. Links 2D-Scatterplot (CD61/CD66b) Untersuchungspopulation sind CD45+/CD66b+ Granulozyten nach Stimulation mit TRAP-6. Überprüfung auf Anwesenheit von CD61+ Thrombozyten = PNA im rechten oberen Quadranten. Deutliche Induktion von PNA nach Stimulation von 87,70% zu 29,09% (Eigene Darstellung).	37
Abbildung 13: Effekt der Messgeschwindigkeit auf PNA-Level. Vollblutprobe eines Probanden. Links 2D-Scatterplot (CD61/CD66b). Messgeschwindigkeit „fast“. Untersuchungspopulation sind CD45+/CD66b+ neutrophile Granulozyten. Überprüfung auf Anwesenheit von CD61+ Thrombozyten = PNA im rechten oberen Quadranten. Rechts 2D-Scatterplot (CD61/CD66b). Messgeschwindigkeit „slow“. Untersuchungspopulation sind CD45+/CD66b+. Überprüfung auf Anwesenheit von CD61+ Thrombozyten = PNA im rechten oberen Quadranten. PNA 20,80% bei „fast“, 8,93% bei „slow“ (Eigene Darstellung).	39
Abbildung 14: Verdünntes und unverdünntes PRP. Vollblutprobe eines Probanden. Links 2D-Scatterplot (FSC/SSC) PRP 1:10 verdünnt mit PBS / 0,5% BSA. Rechts 2D-Scatterplot (FSC/SSC) PRP unverdünnt. Links homogene Thrombozytenpopulation mit ähnlicher Größe und Granularität, rechts verbreiterte (=größere Streuung in Bezug auf Größe) inhomogene Thrombozytenpopulation mit Artefaktpopulationen bei FSC = 10^3 und SSC = $10^2 - 10^3$ (Eigene Darstellung).	41
Abbildung 15: Verdünnungsreihe ADP. 100µl 1:10 verdünntes PRP aus Vollblutprobe eines Probanden. 2D-Scatterplot (Fibrinogen/CD61). Darstellung von CD61+ Thrombozyten. In aufsteigender Reihenfolge von oben links nach unten rechts wurden jeweils 100µl PRP, 1:10 verdünnt mit PBS/0,5%, eines Probanden für vier Minuten mit der angegebenen Konzentration von ADP (Endkonzentration in der Probe) bei Raumtemperatur inkubiert. Zunehmende	

Aktivierung der Thrombozyten mit zunehmender Konzentration von ADP, ab 50µM Endkonzentration in der Probe Aktivierung von 99,15% der Thrombozyten (Eigene Darstellung).	42
Abbildung 16: MPO-Depletion von Granulozyten, Negativkontrolle. Vollblutprobe eines Probanden. Links 2D-Scatterplot (FSC/SSC). Rechts 2D-Scatterplot (CD66b/MPO). Untersuchungspopulation CD66b+ Granulozyten. Anteil an Granulozyten ohne Depletion von MPO im rechten oberen Quadranten. Trotz fehlendem Agonisten zwei MPO-Populationen, 51,15% der Granulozyten mit MPO-Depletion, 48,85% ohne MPO-Depletion (Eigene Darstellung).	43
Abbildung 17: MPO-Depletion. Schwächere CD66b-Affinität bei MPO-Depletion. Vollblutprobe eines Probanden. Links 2D-Scatterplot (FSC/SSC). Mitte 2D-Scatterplot (CD66b/SSC). Untersuchungspopulation CD66b+ Granulozyten. Rechts 2D-Scatterplot (MPO/CD66b) Untersuchungspopulation CD66b+ Granulozyten. Zellen mit einer schwächeren MPO-Expression zeigen ebenfalls eine geringere Expression von CD66b (Eigene Darstellung).	44
Abbildung 18: MPO-Depletion. Paradoxe Depletion nach Stimulation mit fMLP. Vollblutprobe eines Probanden. Links 2D-Scatterplot (FSC/SSC). Mitte 2D-Scatterplot (CD66b/MPO). Untersuchungspopulation CD66b+ Granulozyten. Keine Stimulation. Rechts 2D-Scatterplot (MPO/CD66b) Untersuchungspopulation CD66b+ Granulozyten. Stimulation mit 10µM fMLP für 15min. Trotz Stimulation zur Degranulation erhöhter Anteil an MPO+ Granulozyten (Eigene Darstellung).	45
Abbildung 19: PNA-Level in Kontrollpopulation und ECMO-Patienten im zeitlichen Verlauf der Therapie. PNA in % an allen CD45+/CD66b+/CD14- Granulozyten. Median als Querstrich. Anzahl der untersuchten Personen = n. Werte mit *** markiert unterscheiden sich statistisch signifikant ($p < 0,001$, One-Way-ANOVA for repeated measures für Zeitverlauf an ECMO, Mann-Whitney-U-Test für Kontrollgruppe gegen Prä-Wert) (Eigene Darstellung). ...	60
Abbildung 20: PMA-Level in Kontrollpopulation und ECMO-Patienten im zeitlichen Verlauf der Therapie. PMA in % an allen CD45+/CD66b-/CD14+ Monozyten. Median als Querstrich. Anzahl der untersuchten Personen = n. Werte mit * markiert unterscheiden sich statistisch signifikant ($p < 0,001$, One-Way-ANOVA for repeated measures für Zeitverlauf an ECMO, Mann-Whitney-U-Test für Kontrollgruppe gegen Prä-Wert) (Eigene Darstellung). ...	61
Abbildung 21: Fibrinogenbindung von nicht-stimulierten Thrombozyten in Kontrollpopulation und ECMO-Patienten im zeitlichen Verlauf der Therapie. Fibrinogen+ Thrombozyten als Anteil an allen CD61+ Thrombozyten. Median als Querstrich. Anzahl der untersuchten Personen = n. Werte mit * markiert unterscheiden sich statistisch signifikant ($p = 0,023$, Mann-Whitney-U-Test) (Eigene Darstellung).	62
Abbildung 22: Fibrinogenbindung von Thrombozyten in Kontrollpopulation und ECMO-Patienten nach Stimulation mit ADP im zeitlichen Verlauf der Therapie. Fibrinogen+ Thrombozyten als Anteil an allen CD61+ Thrombozyten. Median als Querstrich. Anzahl der untersuchten Personen = n. Werte mit ** ($p < 0,01$) / *** ($p < 0,001$) markiert unterscheiden sich statistisch signifikant (Mann-Whitney-U-Test) (Eigene Darstellung).	62
Abbildung 23: P-Selektin-Expression von Thrombozyten in Kontrollpopulation und ECMO-Patienten im zeitlichen Verlauf der Therapie. P-Selektin+ Thrombozyten als Anteil an allen CD61+ Thrombozyten in %. Median als Querstrich. Anzahl der untersuchten Personen = n. Werte mit ** ($p < 0,01$) / *** ($p < 0,001$) markiert unterscheiden sich statistisch signifikant (Mann-Whitney-U-Test) (Eigene Darstellung).	63
Abbildung 24: P-Selektin-Expression von Thrombozyten in Kontrollpopulation und ECMO-Patienten nach Stimulation mit TRAP-6 im zeitlichen Verlauf der Therapie. P-Selektin + Thrombozyten als Anteil an allen CD61+ Thrombozyten in %. Median als Querstrich. Anzahl der untersuchten Personen = n. Werte mit * ($p = 0,015$) / *** ($p < 0,001$)	

markiert unterscheiden sich statistisch signifikant, für * One-Way-ANOVA for repeated measures, für *** Mann-Whitney-U-Test (Eigene Darstellung).	64
Abbildung 25: Ausgewählte Gerinnungsparameter von ECMO-Patienten im zeitlichen Verlauf der Therapie. Median als Querstrich. Anzahl der untersuchten Personen = n. Werte mit * ($p < 0,05$) / ** ($p < 0,01$) / *** ($p < 0,001$) markiert unterscheiden sich statistisch signifikant, One-Way-ANOVA for repeated measures, (Eigene Darstellung).	66
Abbildung 26: Plasmalevel von LDH und freiem Hämoglobin, sowie Blutfluss der ECMO im zeitlichen Verlauf der Therapie. Median als Querstrich. Anzahl der untersuchten Personen = n. (Eigene Darstellung).	67
Abbildung 27: Ausgewählte Inflammationsmarker der ECMO-Patienten im zeitlichen Verlauf. Median als Querstrich. Anzahl der untersuchten Personen = n. (Eigene Darstellung).	68

VII.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Antikörper / Substrate und Ihre Spezifität (Eigene Darstellung, modifiziert nach (37)).	15
Tabelle 2: Zielpopulationen der Untersuchung und ihr spezifisches Erkennungsmuster (Eigene Darstellung).	16
Tabelle 3: Photodetektoren im FACSCalibur. Ausgewählte Fluorochrome, die im Bereich der angegebenen Wellenlänge Licht emittieren und erkannt werden können. (Eigene Darstellung).	16
Tabelle 4: Antikörper-Fluorochrom-Kombination zur Darstellung von PNA und PMA (Eigene Darstellung).	17
Tabelle 5: Antikörper-Fluorochrom-Kombination zur Darstellung der Fibrinogenbindung von Thrombozyten (Eigene Darstellung).	17
Tabelle 6: Antikörper-Fluorochrom-Kombination zur Darstellung der P-Selektin-Expression von Thrombozyten (Eigene Darstellung).	17
Tabelle 7: Benötigte Menge der Antikörper nach Titration. Es ist das Volumen der Originallösungen angegeben, welches in der Antikörpertitration zu den besten Färbeergebnissen von 50µl Vollblut geführt hat (Eigene Darstellung).	21
Tabelle 8: Probandencharakteristika. Alter als Median (Interquartilsabstand) (Eigene Darstellung).	46
Tabelle 9: Patientencharakteristika. Werte als Median mit Interquartilsabstand. Patienten, weibliches Geschlecht als absolute Werte n (Verhältnis in %). Argatroban / Heparin als absolute Werte n (Eigene Darstellung).	48
Tabelle 10 Behandlungsverlauf Patient 1. Keimnachweis beschreibt nur die Keime, die im respiratorischen System nachgewiesen wurden, die Scoring-Parameter wurden vor Beginn der ECMO erfasst, * = weitere Systeme wurden verwendet (Eigene Darstellung).	48
Tabelle 11 Behandlungsverlauf Patient 2. Keimnachweis beschreibt nur die Keime, die im respiratorischen System nachgewiesen wurden, die Scoring-Parameter wurden vor Beginn der ECMO erfasst (Eigene Darstellung).	49
Tabelle 12 Behandlungsverlauf Patient 3. Keimnachweis beschreibt nur die Keime, die im respiratorischen System nachgewiesen wurden, die Scoring-Parameter wurden vor Beginn der ECMO erfasst (Eigene Darstellung).	50
Tabelle 13 Behandlungsverlauf Patient 4. Keimnachweis beschreibt nur die Keime, die im respiratorischen System nachgewiesen wurden, die Scoring-Parameter wurden vor Beginn der ECMO erfasst (Eigene Darstellung).	51

Tabelle 14 Behandlungsverlauf Patient 5. Keimnachweis beschreibt nur die Keime, die im respiratorischen System nachgewiesen wurden, die Scoring-Parameter wurden vor Beginn der ECMO erfasst (Eigene Darstellung).	52
Tabelle 15 Behandlungsverlauf Patient 6. Keimnachweis beschreibt nur die Keime, die im respiratorischen System nachgewiesen wurden, die Scoring-Parameter wurden vor Beginn der ECMO erfasst, * = weitere Systeme wurden verwendet (Eigene Darstellung).	54
Tabelle 16 Behandlungsverlauf Patient 7. Keimnachweis beschreibt nur die Keime, die im respiratorischen System nachgewiesen wurden, die Scoring-Parameter wurden vor Beginn der ECMO erfasst, * = weitere Systeme wurden verwendet (Eigene Darstellung).	55
Tabelle 17 Behandlungsverlauf Patient 8. Keimnachweis beschreibt nur die Keime, die im respiratorischen System nachgewiesen wurden, die Scoring-Parameter wurden vor Beginn der ECMO erfasst (Eigene Darstellung).	56
Tabelle 18 Behandlungsverlauf Patient 9. Keimnachweis beschreibt nur die Keime, die im respiratorischen System nachgewiesen wurden, die Scoring-Parameter wurden vor Beginn der ECMO erfasst (Eigene Darstellung).	57
Tabelle 19: Behandlungsverlauf Patient 10. Keimnachweis beschreibt nur die Keime, die im respiratorischen System nachgewiesen wurden, die Scoring-Parameter wurden vor Beginn der ECMO erfasst (Eigene Darstellung).	58
Tabelle 20: ECMO-Behandlungsdaten. In absoluten Zahlen n (Für Systemwechsel, ECMO-Systeme, Ort der Kanülierung, Akutes Nierenversagen und Überlebensrate mit Verhältnis in %). ECMO-Behandlungstage und Transfusionsdaten als Median (Interquartilsabstand) (Eigene Darstellung).	59
Tabelle 21: Untersuchungsparameter vor ECMO-Implantation bei Patienten mit und ohne Systemwechsel. Werte angegeben als Median (Interquartilsabstand) (Eigene Darstellung).	65

VII.4 Laborgerät, -material, Antikörper, Chemikalien, Puffer

Antikörper, Konjugate, Reagenzien

Beschreibung	Hersteller	Artikelnummer
Anti-Human CD14-FITC	Becton, Dickinson and Company	555397
Anti-Human CD45-APC	Becton, Dickinson and Company	555485
Mouse-Anti-Human CD66b-PE	Becton, Dickinson and Company	561650
Human CD61-PerCP-Cy5.5	Becton, Dickinson and Company	564173
N-Formyl-Met-Leu-PHE (FMLP)	Sigma Aldrich	F3506
Fibrinogen Alexa Fluor 488 Conjugate	Invitrogen	F13191
Adenosine 5'-diphosphate sodium salt	Sigma Aldrich	A2754
BD FACS Lysing solution	Becton, Dickinson and Company	349202
Anti-Human CD62p-Dylight 488 (P-Selectin)	Novusbio	NBP2-22046G
TRAP6	Abcam	ab120801
Anti-Human MPO-APC	Miltenyi Biotec	130-107-179

Laborgeräte

Beschreibung	Herstellerbezeichnung	Hersteller
Abzug	Waldner Secuflow	WALDNER Laboreinrichtungen SE & Co. KG
Brutschrank	Memmert ICO50	Memmert GmbH + Co. KG
Durchflusszytometer	FACSCalibur 4CA-E1913	BD Biosciences
Gefrierschrank	Liebherr Medical	Liebherr-Hausgeräte Lienz GmbH
Kleinschüttler	Vibrax VXR	IKA-Werke GmbH & CO. KG
Kühlschrank	TP1710	Liebherr-Hausgeräte Lienz GmbH
Magnetrührer	MR2002 Heidolph Elektro	Heidolph Scientific Products GmbH
Mechanische Pipette	Research Plus	Eppendorf SE
pH-Messgerät	pH-Metter HI2213 Hanna HI1131	Hanna Instruments Deutschland GmbH
Sterilbank	Herasafe	Heraeus GmbH (übernommen von Thermo Fisher Scientific Inc.)
Tiefkühlschrank	Liebherr	Liebherr-Hausgeräte Lienz GmbH

Tiefkühlschrank -80°	Forma Scientific 923	Forma Scientific (übernommen von Thermo Fisher Scientific Inc.)
Vortexmischer	7-2020 Vortex Mixer	neoLab Migge GmbH
Waage	Precisa 310M Pesa	Precisa Gravimetrics AG
Zentrifuge	Megafuge 1.0 R	Heraeus Sepatech GmbH (übernommen von Thermo Fisher Scientific Inc.)
Zentrifuge	Multifuge 1 L-R	Heraeus GmbH (übernommen von Thermo Fisher Scientific Inc.)
Zentrifuge	Centrifuge 5810 R	Eppendorf SE

Verbrauchsmaterialien

Beschreibung	Herstellerbezeichnung	Hersteller
Mikroreaktionsgefäß	Safe-Lock Tubes 0,5ml	Eppendorf SE
Blutentnahmekanüle	Safety-Multifly-Kanüle 20G x $\frac{3}{4}$ ", gelb	Sarstedt AG & Co. KG
Blutentnahmekanüle	Safety-Multifly-Kanüle 21G x $\frac{3}{4}$ ", grün	Sarstedt AG & Co. KG
Blutentnahmeröhrchen	S-Monovette Citrat 9NC 4,3ml	Sarstedt AG & Co. KG
Blutentnahmeröhrchen	S-Monovette EDTA K3, 2,7ml	Sarstedt AG & Co. KG
Luer Multi-Adapter	Multi-Adapter, Luer	Sarstedt AG & Co. KG
Durchflusszytometrie-Probengefäß	Röhre, Arbeitsvolumen: 5 ml, (LxØ): 75 x 12 mm, Material: PP, Rundboden, transparent	Sarstedt AG & Co. KG
Hautantiseptikum	Octeniderm farblos	Schülke & Mayr GmbH
Venenstaubinde	Venenstaubinde	Sarstedt AG & Co. KG
Pipettenspitze 10µl	Sapphire Pipettenspitze 10µl	Greiner Bio-One GmbH
Pipettenspitze 20µl	Sapphire Pipettenspitze 20µl	Greiner Bio-One GmbH
Pipettenspitze 200µl	Sapphire Pipettenspitze 200µl	Greiner Bio-One GmbH
Pipettenspitze 1000µl	Sapphire Pipettenspitze 1000µl	Greiner Bio-One GmbH
Pipettenspitze 1250µl	Sapphire Pipettenspitze 1250µl	Greiner Bio-One GmbH
Kompressen	ES-Kompressen 5cm x 5cm	Paul Hartmann AG

Puffer / Lösungen

Alle Medien wurden steril filtriert mittels eines 0,22µm Flaschenaufsatzfilter.

Herstellung PBS-Puffer (Stammlösung 10fach konzentriert):

Stammlösung, 10fach konzentriert: NaCl 80g, Na₂HPO₄ 11,5g, KCl 2g, KH₂PO₄ 2g, Auffüllen mit aqua bidest. bis zu einem Volumen von 1000ml.

Gebrauchslösung, einfach konzentriert: Stammlösung 1:10 mit aqua bidest. verdünnen. pH messen und einstellen auf 7,4 mit HCl/NaOH

Herstellung PBS/0,5%BSA-Puffer:

1000ml PBS-Puffer Gebrauchslösung versetzen 5g BSA.

Herstellung 4%-ige Formaldehydlösung:

400ml aqua bidest. mit 40g Paraformaldehyd und 2 NaOH Plättchen (40 g/mol) unter Abzug auf 60°C erhitzen bis Flüssigkeit geklärt. Dann Abkühlen lassen. Im Anschluss 100ml PBS-Puffer (10fach konzentrierte Stammlösung) zugeben, pH einstellen auf 7,3 mit HCl/NaOH und mit aqua bidest. auf 1000ml Gesamtvolumen auffüllen.

VII.5 Einstellungen Durchflusszytometer

Gerät: FACSCalibur 4CA-E1913

Grundeinstellungen

Aquisition Gate	No Gate
Collection Criteria	Event Count
Aquisition Stop	20.000 of all Events
Storage Gate	All Events
Resolution	256 Parameters saved

Für P-Selectin und Fibrinogen:

Detectors/Amplifiers

Parameter	Detector	Voltage	AmplitudeGain	Mode
P1	FSC	E00	2,09	Log
P2	SSC	398	3,11	Log
P3	FL1	723	1,00	Log
P4	FL2	631	1,00	Log
P5	FL3	798	1,00	Log
P6	FL2-A		1,00	Lin
P7	FL4	655		Log

Threshold

Primary Parameter	FSC
Value	166
Secondary Parameter	SSC
Value	13

Compensation

FL1	-0,0% FL2
FL2	-9,0% FL1
FL2	-0,0% FL3
FL3	-0,0% FL2
FL3	-0,0% FL4
FL4	-1,8% FL3

Für PLA und PMA:

Detectors / Amplifiers

Parameter	Detector	Voltage	AmplitudeGain	Mode
P1	FSC	E00	2,09	Log
P2	SSC	360	3,11	Log
P3	FL1	599	1,00	Log
P4	FL2	566	1,00	Log
P5	FL3	652	1,00	Log
P6	FL2-A		1,00	Lin
P7	FL4	630		Log

Treshold

Primary Parameter	FSC
Value	500
Secondary Parameter	SSC
Value	13

Compensation

FL1	-1,3% FL2
FL2	-19,5% FL1
FL2	-0,0% FL3
FL3	-12,8% FL2
FL3	-1,4% FL4
FL4	-6,0% FL3

Biomarkers for platelet activation as an indicator for clot formation during ECMO



Paschke L.¹, Philipp A.¹, Müller T.², Lubnow M.², Bredthauer A.³, Lehle K.¹

Departments of ¹Cardiothoracic Surgery, ²Internal Medicine II, ³Anesthesiology,
University Medical Center Regensburg, Regensburg, Germany.

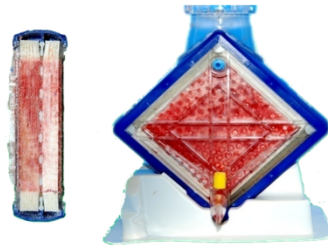
Background and Aims

Thrombosis remains a serious complication of extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) (1).

In vascular diseases, specific platelet activation markers were identified as valuable prognosis markers for thrombogenesis (2).

The aim was to analyse alterations in blood cell activities in ECMO patients to predict thrombogenesis within the oxygenators.

Methods



Clot formation within ECMO-Oxygenators

Blood from 10 healthy volunteers and 10 patients with veno-venous ECMO were analyzed.

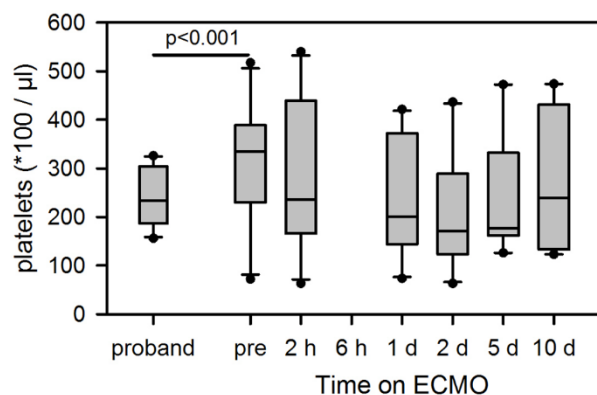
Platelet activation markers (*platelet-neutrophil-coaggregates, fibrinogen binding to platelets, platelet P-selectin expression*) were assayed by flow cytometry before and during ECMO support.

Platelet counts were also documented.

Patients (n)	10
Male / female (n)	8/2
Age (years)	57 (47-62)
BMI (kg * m ⁻²)	28 (24-31)
SOFA score	11 (10-14)
Lung Injury Score	3.3 (3-4)
ECMO time (days)	15 (8-25)

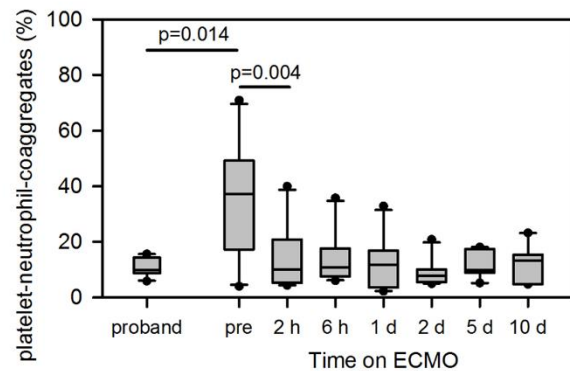
Results

ECMO support initiated a decrease in platelet counts within 2 days. Platelets from patients requiring veno-venous ECMO showed significantly higher activation levels compared to healthy volunteers. The high proportion of P-selectin-expressing platelets and the high fibrinogen-binding activity of platelets remained elevated during ECMO therapy. Only the levels of coaggregates decreased within 2 hours after ECMO initiation and remained low during therapy.



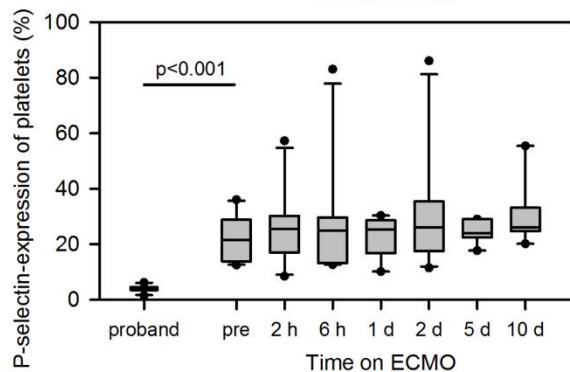
Thrombocytopenia on ECMO

- Higher platelet count of patients before ECMO compared to healthy volunteers.
- Decrease in platelet count within 2 days after ECMO initiation.



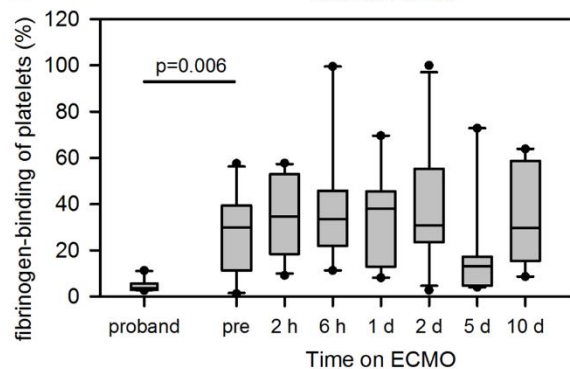
Platelet-neutrophil-coaggregates

- Higher proportion of coaggregates of patients before ECMO compared to healthy volunteers.
- Significant decrease within 2 h after ECMO initiation.
- Low levels of coaggregates during ECMO support.



P-selectin expression on platelets

- Higher expression of P-selectin on platelets from patients before ECMO compared to healthy volunteers.
- Maintenance of high expression of P-selectin on platelets during ECMO support.



Fibrinogen binding to platelets

- Higher fibrinogen binding of platelets from patients before ECMO compared to healthy volunteers.
- Maintenance of high fibrinogen binding of platelets during ECMO support.

Conclusions

Thrombocytopenia on ECMO was accompanied by a pre-existing difference in platelet phenotype and by higher platelet activation levels compared to healthy volunteers. ECMO did not influence the activation status of platelets (exception coaggregates).



Literature:

1. Lubnow M et al., PLoS ONE. 2014;9(12):e112316.
2. Maugeri N et al., Am. J. Hematol. 2000;65(2):93-8

Contact: Lukas.Paschke@stud.uni-regensburg.de



VIII 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). Use of the Bramson membrane lung. *N Engl J Med*. 1972;286(12):629–34. doi:10.1056/NEJM197203232861204 Cited in: PubMed; PMID 5060491.
2. Combes A, Hajage D, Capellier G, Demoule A, Lavoué S, Guervilly C, Da Silva D, Zafrani L, Tirot P, Veber B, Maury E, Levy B, Cohen Y, Richard C, Kalfon P, Bouadma L, Mehdaoui H, Beduneau G, Lebreton G, Brochard L, Ferguson ND, Fan E, Slutsky AS, Brodie D, Mercat A. Extracorporeal Membrane Oxygenation for Severe Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med*. 2018;378(21):1965–75. doi:10.1056/NEJMoa1800385 Cited in: PubMed; PMID 29791822.
3. Michels G, Wengenmayer T, Hagl C, Dohmen C, Böttiger BW, Bauersachs J, Markewitz A, Bauer A, Gräsner J-T, Pfister R, Ghanem A, Busch H-J, Kreimeier U, Beckmann A, Fischer M, Kill C, Janssens U, Kluge S, Born F, Hoffmeister HM, Preusch M, Boeken U, Riessen R, Thiele H. Empfehlungen zur extrakorporalen kardiopulmonalen Reanimation (eCPR). *Kardiologe*. 2018;12(5):332–41. De;de. doi:10.1007/s12181-018-0268-z
4. Tonna JE, Abrams D, Brodie D, Greenwood JC, Rubio Mateo-Sidron JA, Usman A, Fan E. Management of Adult Patients Supported with Venovenous Extracorporeal Membrane Oxygenation (VV ECMO): Guideline from the Extracorporeal Life Support Organization (ELSO). *ASAIO J*. 2021;67(6):601–10. doi:10.1097/MAT.0000000000001432 Cited in: PubMed; PMID 33965970.
5. Räpple D. ECMO. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2022.
6. Davies A, Jones D, Bailey M, Beca J, Bellomo R, Blackwell N, Forrest P, Gattas D, Granger E, Herkes R, Jackson A, McGuinness S, Nair P, Pellegrino V, Pettilä V, Plunkett B, Pye R, Torzillo P, Webb S, Wilson M, Ziegenfuss M. Extracorporeal Membrane Oxygenation for 2009 Influenza A(H1N1) Acute Respiratory Distress Syndrome. *JAMA*. 2009;302(17):1888–95. doi:10.1001/jama.2009.1535 Cited in: PubMed; PMID 19822628.
7. Peek GJ, Mugford M, Tiruvoipati R, Wilson A, Allen E, Thalanany MM, Hibbert CL, Truesdale A, Clemens F, Cooper N, Firmin RK, Elbourne D. Efficacy and economic assessment of conventional ventilatory support versus extracorporeal membrane oxygenation for severe adult respiratory failure (CESAR): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet*. 2009;374(9698):1351–63. doi:10.1016/S0140-6736(09)61069-2 Cited in: PubMed; PMID 19762075.
8. Munshi L, Walkey A, Goligher E, Pham T, Uleryk EM, Fan E. Venovenous extracorporeal membrane oxygenation for acute respiratory distress syndrome: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Respiratory Medicine*. 2019;7(2):163–72. doi:10.1016/S2213-2600(18)30452-1 Cited in: PubMed; PMID 30642776.

9. Tonna JE, Boonstra PS, MacLaren G, Paden M, Brodie D, Anders M, Hoskote A, Ramanathan K, Hyslop R, Fanning JJ, Rycus P, Stead C, Barrett NA, Mueller T, Gómez RD, Malhotra Kapoor P, Fraser JF, Bartlett RH, Alexander PMA, Barbaro RP. Extracorporeal Life Support Organization Registry International Report 2022: 100,000 Survivors. *ASAIO J.* 2024;70(2):131–43. doi:10.1097/MAT.0000000000002128 Cited in: PubMed; PMID 38181413.
10. World Health Organization. Clinical management of severe acute respiratory infection (SARI) when COVID-19 disease is suspected: interim guidance, 13 March 2020: World Health Organization; World Health Organization; 15.03.2020: WHO/2019-nCoV/clinical/2020.4. en;ru;ar;zh;en.
11. Grasselli G, Calfee CS, Camporota L, Poole D, Amato MBP, Antonelli M, Arabi YM, Baroncelli F, Beitler JR, Bellani G, Bellingan G, Blackwood B, Bos LDJ, Brochard L, Brodie D, Burns KEA, Combes A, D'Arrigo S, Backer D de, Demoule A, Einav S, Fan E, Ferguson ND, Frat J-P, Gattinoni L, Guérin C, Herridge MS, Hodgson C, Hough CL, Jaber S, Juffermans NP, Karagiannidis C, Kesecioglu J, Kwizera A, Laffey JG, Mancebo J, Matthay MA, McAuley DF, Mercat A, Meyer NJ, Moss M, Munshi L, Myatra SN, Ng Gong M, Papazian L, Patel BK, Pellegrini M, Perner A, Pesenti A, Piquilloud L, Qiu H, Ranieri MV, Riviello E, Slutsky AS, Stapleton RD, Summers C, Thompson TB, Valente Barbas CS, Villar J, Ware LB, Weiss B, Zampieri FG, Azoulay E, Cecconi M. ESICM guidelines on acute respiratory distress syndrome: definition, phenotyping and respiratory support strategies. *Intensive Care Med.* 2023;49(7):727–59. doi:10.1007/s00134-023-07050-7 Cited in: PubMed; PMID 37326646.
12. Urner M, Barnett AG, Bassi GL, Brodie D, Dalton HJ, Ferguson ND, Heinsar S, Hodgson CL, Peek G, Shekar K, Suen JY, Fraser JF, Fan E. Venovenous extracorporeal membrane oxygenation in patients with acute covid-19 associated respiratory failure: comparative effectiveness study. *BMJ.* 2022;377e068723. doi:10.1136/bmj-2021-068723 Cited in: PubMed; PMID 35508314.
13. 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 Cited in: PubMed; PMID 36402148.
14. Lubnow M, Philipp A, Foltan M, Bull Enger T, Lunz D, Bein T, Haneya A, Schmid C, Riegger G, Muller T, Lehle K. Technical complications during venovenous 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 Cited in: PubMed; PMID 25464516.

15. Doyle AJ, Hunt BJ. Current Understanding of How Extracorporeal Membrane Oxygenators Activate Haemostasis and Other Blood Components. *Front. Med.* 2018;5352. doi:10.3389/fmed.2018.00352 Cited in: PubMed; PMID 30619862.
16. 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 Cited in: PubMed; PMID 28500585.
17. Rali AS, Abbasi A, Alexander PMA, Anders MM, Arachchillage DJ, Barbaro RP, Fox AD, Friedman ML, Malfertheiner MV, Ramanathan K, Riera J, Rycus P, Schellongowski P, Shekar K, Tonna JE, Zaaqoq AM. Adult Highlights From the Extracorporeal Life Support Organization Registry: 2017-2022. *ASAIO J.* 2024;70(1):1–7. doi:10.1097/MAT.0000000000002038 Cited in: PubMed; PMID 37755405.
18. Chen Z, Mondal NK, Zheng S, Koenig SC, Slaughter MS, Griffith BP, Wu ZJ. High shear induces platelet dysfunction leading to enhanced thrombotic propensity and diminished hemostatic capacity. *Platelets.* 2019;30(1):112–9. doi:10.1080/09537104.2017.1384542 Cited in: PubMed; PMID 29182470.
19. Balle CM, Jeppesen AN, Christensen S, Hvas A-M. Platelet Function During Extracorporeal Membrane Oxygenation in Adult Patients. *Frontiers in cardiovascular medicine.* 2019;6114. doi:10.3389/fcvm.2019.00114 Cited in: PubMed; PMID 31440518.
20. Lehle K, Philipp A, Foltan M, Schettler F, Ritzka M, Müller T, Lubnow M. Coagulation abnormalities in patients with COVID-19 on venovenous ECLS increased risk for technical complications and support times but had no impact on survival. *Artif Organs.* 2022;46(8):1669–81. doi:10.1111/aor.14218 Cited in: PubMed; PMID 35192198.
21. Ried M, Sommerauer L, Lubnow M, Müller T, Philipp A, Lunz D, Hofmann H-S. Thoracic Bleeding Complications in Patients With Venovenous Extracorporeal Membrane Oxygenation. *Ann Thorac Surg.* 2018;106(6):1668–74. doi:10.1016/j.athoracsur.2018.07.020 Cited in: PubMed; PMID 30193999.
22. Valladolid C, Yee A, Cruz MA. von Willebrand Factor, Free Hemoglobin and Thrombosis in ECMO. *Front. Med.* 2018;5228. doi:10.3389/fmed.2018.00228 Cited in: PubMed; PMID 30175099.
23. Finsterbusch M, Schrottmaier WC, Kral-Pointner JB, Salzmann M, Assinger A. Measuring and interpreting platelet-leukocyte aggregates. *Platelets.* 2018;29(7):677–85. doi:10.1080/09537104.2018.1430358 Cited in: PubMed; PMID 29461910.
24. Mansour A, Roussel M, Gaussem P, Nédelec-Gac F, Pontis A, Flécher E, Bachelot-Loza C, Guin-Thibault I. Platelet Functions During Extracorporeal Membrane Oxygenation. Platelet-Leukocyte Aggregates Analyzed by Flow Cytometry as a Promising Tool to Monitor Platelet Activation. *J Clin Med.* 2020;9(8). doi:10.3390/jcm9082361 Cited in: PubMed; PMID 32718096.
25. van den Helm S, Yaw HP, Letunica N, Barton R, Weaver A, Newall F, Horton SB, Chiletti R, Johansen A, Best D, McKittrick J, Butt W, d'Udekem Y,

- MacLaren G, Linden MD, Ignjatovic V, Monagle P. Platelet Phenotype and Function Changes With Increasing Duration of Extracorporeal Membrane Oxygenation. *Crit Care Med*. 2022;50(8):1236–45. doi:10.1097/CCM.0000000000005435 Cited in: PubMed; PMID 35020670.
26. Lee JA, Spidlen J, Boyce K, Cai J, Crosbie N, Dalphin M, Furlong J, Gasparetto M, Goldberg M, Goralczyk EM, Hyun B, Jansen K, Kollmann T, Kong M, Leif R, McWeeney S, Moloshok TD, Moore W, Nolan G, Nolan J, Nikolich-Zugich J, Parrish D, Purcell B, Qian Y, Selvaraj B, Smith C, Tchuvatkina O, Wertheimer A, Wilkinson P, Wilson C, Wood J, Zigon R, Scheuermann RH, Brinkman RR. MIFlowCyt: The minimum information about a flow cytometry experiment. *Cytometry Part A*. 2008;73A(10):926–30. doi:10.1002/cyto.a.20623
 27. Givan AL. Flow cytometry: an introduction. *Methods Mol Biol*. 2011;6991–29. doi:10.1007/978-1-61737-950-5_1 Cited in: PubMed; PMID 21116976.
 28. Engel P, Boumsell L, Balderas R, Bensussan A, Gattei V, Horejsi V, Jin B-Q, Malavasi F, Mortari F, Schwartz-Albiez R, Stockinger H, van Zelm MC, Zola H, Clark G. CD Nomenclature 2015: Human Leukocyte Differentiation Antigen Workshops as a Driving Force in Immunology. *J Immunol*. 2015;195(10):4555–63. doi:10.4049/jimmunol.1502033 Cited in: PubMed; PMID 26546687.
 29. Michelson AD. Flow cytometry: a clinical test of platelet function. *Blood*. 1996;87(12):4925–36. doi:10.1182/blood.V87.12.4925.bloodjournal87124925
 30. Roederer M. Compensation in flow cytometry. *Curr Protoc Cytom*. 2002;Chapter 1Unit 1.14. doi:10.1002/0471142956.cy0114s22 Cited in: PubMed; PMID 18770762.
 31. Lakschevitz FS, Hassanpour S, Rubin A, Fine N, Sun C, Glogauer M. Identification of neutrophil surface marker changes in health and inflammation using high-throughput screening flow cytometry. *Exp Cell Res*. 2016;342(2):200–9. doi:10.1016/j.yexcr.2016.03.007 Cited in: PubMed; PMID 26970376.
 32. Nagasawa A, Matsuno K, Tamura S, Hayasaka K, Shimizu C, Moriyama T. The basis examination of leukocyte-platelet aggregates with CD45 gating as a novel platelet activation marker. *Int J Lab Hematol*. 2013;35(5):534–41. doi:10.1111/ijlh.12051 Cited in: PubMed; PMID 23356866.
 33. Harrison P, Ault KA, Chapman S, Charie L, Davis B, Fujimoto K, Houwen B, Kunicka J, Lacombe F, Machin S, Raynor R, van Hove L, van Assendelft OW. An Interlaboratory Study of a Candidate Reference Method for Platelet Counting. *Am J Clin Pathol*. 2001;115(3):448–59. doi:10.1309/91PR-E4G6-XBAF-N8DY
 34. Cid J, Nascimento JD, Vicent A, Aguinaco R, Escoda L, Ugarriza A, Llorente A. Evaluation of low platelet counts by optical, impedance, and CD61-immunoplatelet methods: Estimation of possible inappropriate platelet transfusion. *Transfusion*. 2010;50(4):795–800. doi:10.1111/j.1537-2995.2009.02504.x
 35. Rondina MT, Grissom CK, Men S, Harris ES, Schwertz H, Zimmerman GA, Weyrich AS. Whole blood flow cytometry measurements of in vivo platelet activation in critically-ill patients are influenced by variability in blood sampling

- techniques. *Thromb Res.* 2012;129(6):729–35.
doi:10.1016/j.thromres.2011.11.031 Cited in: PubMed; PMID 22178064.
36. Jurk K, Kehrel BE. Pathophysiologie und Biochemie der Thrombozyten [Pathophysiology and biochemistry of platelets]. *Internist (Berl)*. 2010;51(9):1086, 1088-92, 1094. ger. doi:10.1007/s00108-010-2595-4 Cited in: PubMed; PMID 20700569.
 37. Kalina T, Fišer K, Pérez-Andrés M, Kuzílková D, Cuenca M, Bartol SJW, Blanco E, Engel P, van Zelm MC. CD Maps-Dynamic Profiling of CD1-CD100 Surface Expression on Human Leukocyte and Lymphocyte Subsets. *Front Immunol.* 2019;10:2434. doi:10.3389/fimmu.2019.02434 Cited in: PubMed; PMID 31708916.
 38. Harding SA, Din JN, Sarma J, Jessop A, Weatherall M, Fox KAA, Newby DE. Flow cytometric analysis of circulating platelet-monocyte aggregates in whole blood: methodological considerations. *Thromb Haemost.* 2007;98(2):451–6. Cited in: PubMed; PMID 17721630.
 39. Pötzsch B, editor. Hämostaseologie: Mit 163 Tabellen ; [Grundlagen, Diagnostik, Therapie]. 2nd ed. Heidelberg: Springer; 2010, c 2010. XXV, 972 S.
 40. Becton Dickinson and Company. BD FACS™ Lysing Solution. San Jose, CA: Becton, Dickinson and Company; 2015.
 41. Brodde MF, Kehrel BE. Thrombozytenfunktionsuntersuchungen. In: Pötzsch B, editor. Hämostaseologie, Mit 163 Tabellen ; [Grundlagen, Diagnostik, Therapie]. Heidelberg: Springer; 2010, c 2010. p. 845–50. [cited 2018 Jan 2].
 42. FlowJo LL. FlowJo: Becton, Dickinson and Company; 2011.
 43. Becton DaC. BD Horizon Guided Panel Solution (GPS) tool: [software]: Becton, Dickinson and Company; 2016 [cited 2021 Mar 28].
 44. Meade S, Young D, Marshall WS, Allen J, Marcus R. Spectra Viewer: [software]: FluoroFinder [cited 2022 Feb 15].
 45. Gremmel T, Calatzis A, Steiner S, Kaider A, Seidinger D, Koppensteiner R, Kopp CW, Panzer S. Is TRAP-6 suitable as a positive control for platelet reactivity when assessing response to clopidogrel? *Platelets.* 2010;21(7):515–21. doi:10.3109/09537104.2010.493587 Cited in: PubMed; PMID 20624009.
 46. Maqbool M, Vidyadaran S, George E, Ramasamy R. Optimisation of laboratory procedures for isolating human peripheral blood derived neutrophils. *Med J Malaysia.* 2011;66(4):296–9. Cited in: PubMed; PMID 22299545.
 47. Kestin AS, Ellis PA, Barnard MR, Errichetti A, Rosner BA, Michelson AD. Effect of strenuous exercise on platelet activation state and reactivity. *Circulation.* 1993;88(4 Pt 1):1502–11. doi:10.1161/01.cir.88.4.1502 Cited in: PubMed; PMID 8403298.
 48. Maugeri N, Rovere-Querini P, Evangelista V, Godino C, Demetrio M, Baldini M, Figini F, Coppi G, Slavich M, Camera M, Bartorelli A, Marenzi G, Campana L, Baldissera E, Sabbadini MG, Cianflone D, Tremoli E, D'Angelo A, Manfredi AA, Maseri A. An intense and short-lasting burst of neutrophil activation differentiates early acute myocardial infarction from systemic inflammatory

- syndromes. PLoS ONE. 2012;7(6):e39484. doi:10.1371/journal.pone.0039484 Cited in: PubMed; PMID 22761804.
49. Burchert D. Der Einfluß von Taurin und beta-Alanin auf die Pools primärer Amino- und alpha-Ketosäuren sowie ausgewählte Immunfunktionen in menschlichen polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten. 1st ed. Giessen: VVB Lauferweiler; 2011. 90 Seiten. (Edition scientifique).
 50. Krumholz W, Demel C, Jung S, Meuthen G, Hempelmann G. The influence of intravenous anaesthetics on polymorphonuclear leukocyte function. *Can J Anaesth*. 1993;40(8):770–4. doi:10.1007/BF03009774 Cited in: PubMed; PMID 8403161.
 51. Sebastian Georg Christopher Strobel. Bestimmung von sphingolipidabbauenden Enzymen in Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten zur Optimierung der Labordiagnostik bei Sphingolipid-Speichererkrankungen: Universität Tübingen; 2005. Available from: https://publikationen.uni-tuebingen.de/xmlui/bitstream/10900/44648/1/pdf/Doktorarbeit_gesamt.pdf de_DE.
 52. Williams JD, Robin JL, Lewis RA, Lee TH, Austen KF. Generation of leukotrienes by human monocytes pretreated with cytochalasin B and stimulated with formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *J Immunol*. 1986;136(2):642–8. Cited in: PubMed; PMID 3001181.
 53. Honeycutt PJ, Nidel JE. Cytochalasin B enhancement of the diacylglycerol response in formyl peptide-stimulated neutrophils. *J Biol Chem*. 1986;261(34):15900–5. Cited in: PubMed; PMID 3782096.
 54. Bignold LP, Ferrante A. Effects of cytochalasin B, N-formyl peptide and plasma on polarisation, zeiosis (blebbing) and degranulation of polymorphonuclear leukocytes in suspension. *Cell Biology International Reports*. 1988;12(3):195–203. doi:10.1016/0309-1651(88)90096-3
 55. Lothar Thomas. Labor und Diagnose. 8th ed. Frankfurt, M.: TH-Books-Verl.-Ges; 2012. S. 1165 - 2360.
 56. Wilhelm W, Sakka SG, editors. Praxis der Intensivmedizin: Konkret, Kompakt, Interdisziplinär. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin / Heidelberg; 2023. 1160 p.
 57. 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 Cited in: PubMed; PMID 31986168.
 58. Gawaz M, Fateh-Moghadam S, Pilz G, Gurland HJ, Werdan K. Platelet activation and interaction with leucocytes in patients with sepsis or multiple organ failure. *European Journal of Clinical Investigation*. 1995;25(11):843–51. doi:10.1111/j.1365-2362.1995.tb01694.x Cited in: PubMed; PMID 8582450.
 59. Zhang Y, Ma Z, Liu Q, Qiao Q, Wu Q, Zou X, Xing Y, Zhang B. Clinical Significance of PAC-1, CD62P, and Platelet-Leukocyte Aggregates in Acute

- Ischemic Stroke. *Bull Exp Biol Med.* 2022;172(5):543–8. doi:10.1007/s10517-022-05429-y Cited in: PubMed; PMID 35348954.
60. Christersson C, Johnell M, Siegbahn A. Tissue factor and IL8 production by P-selectin-dependent platelet-monocyte aggregates in whole blood involves phosphorylation of Lyn and is inhibited by IL10. *J Thromb Haemost.* 2008;6(6):986–94. doi:10.1111/j.1538-7836.2008.02956.x Cited in: PubMed; PMID 18363812.
 61. Badrnya S, Schrottmaier WC, Kral JB, Yaiw K-C, Volf I, Schabbauer G, Söderberg-Nauclér C, Assinger A. Platelets mediate oxidized low-density lipoprotein-induced monocyte extravasation and foam cell formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34(3):571–80. doi:10.1161/ATVBAHA.113.302919 Cited in: PubMed; PMID 24371083.
 62. Schrottmaier WC, Kral JB, Badrnya S, Assinger A. Aspirin and P2Y12 Inhibitors in platelet-mediated activation of neutrophils and monocytes. *Thromb Haemost.* 2015;114(3):478–89. doi:10.1160/TH14-11-0943 Cited in: PubMed; PMID 25904241.
 63. 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 Cited in: PubMed; PMID 25163512.
 64. Koupenova M, Kehrel BE, Corkrey HA, Freedman JE. Thrombosis and platelets: an update. *Eur Heart J.* 2017;38(11):785–91. doi:10.1093/eurheartj/ehw550 Cited in: PubMed; PMID 28039338.
 65. Haus M, Foltan M, Philipp A, Mueller T, Gruber M, Lingel MP, Krenkel L, Lehle K. Neutrophil extracellular traps - a potential trigger for the development of thrombocytopenia during extracorporeal membrane oxygenation. *Front Immunol.* 2024;151339235. doi:10.3389/fimmu.2024.1339235 Cited in: PubMed; PMID 38449869.
 66. Lingel MP, Haus M, Paschke L, Foltan M, Lubnow M, Gruber M, Krenkel L, Lehle K. Clinical relevance of cell-free DNA during venovenous extracorporeal membrane oxygenation. *Artif Organs.* 2023. doi:10.1111/aor.14616 Cited in: PubMed; PMID 37525949.
 67. Layios N, Delierneux C, Hego A, Huart J, Gosset C, Lecut C, Maes N, Geurts P, Joly A, Lancellotti P, Albert A, Damas P, Gothot A, Oury C. Sepsis prediction in critically ill patients by platelet activation markers on ICU admission: a prospective pilot study. *Intensive care medicine experimental.* 2017;5(1):32. doi:10.1186/s40635-017-0145-2 Cited in: PubMed; PMID 28699088.
 68. Michelson AD, Furman MI. Laboratory markers of platelet activation and their clinical significance. *Current Opinion in Hematology.* 1999;6(5):342–8. doi:10.1097/00062752-199909000-00012 Cited in: PubMed; PMID 10468151.
 69. Willecke F, Tiwari S, Rupprecht B, Wolf D, Hergeth S, Hoppe N, Dufner B, Schulte L, Anto Michel N, Bukosza N, Marchini T, Jäckel M, Stachon P, Hilgendorf I, Zeschky K, Schleicher R, Langer HF, zur Muhlen C v., Bode C,

- Peter K, Zirlik A. Interruption of classic CD40L-CD40 signalling but not of the novel CD40L-Mac-1 interaction limits arterial neointima formation in mice. *Thromb Haemost.* 2014;112(2):379–89. doi:10.1160/TH13-08-0653 Cited in: PubMed; PMID 24652469.
70. Cerletti C, Tamburrelli C, Izzi B, Gianfagna F, Gaetano G de. Platelet-leukocyte interactions in thrombosis. *Thromb Res.* 2012;129(3):263–6. doi:10.1016/j.thromres.2011.10.010 Cited in: PubMed; PMID 22075180.
 71. Jurk K, Ritter MA, Schriek C, van Aken H, Droste DW, Ringelstein EB, Kehrel BE. Activated monocytes capture platelets for heterotypic association in patients with severe carotid artery stenosis. *Thromb Haemost.* 2010;103(6):1193–202. doi:10.1160/TH09-09-0620 Cited in: PubMed; PMID 20352160.
 72. 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 Cited in: PubMed; PMID 31192471.
 73. Wagner MS, Kranz M, Krenkel L, Pointner D, Foltan M, Lubnow M, Lehle K. Computer based visualization of clot structures in extracorporeal membrane oxygenation and histological clot investigations for understanding thrombosis in membrane lungs. *Front. Med.* 2024;111416319. doi:10.3389/fmed.2024.1416319 Cited in: PubMed; PMID 38962744.
 74. Siegel PM, Chalupsky J, Olivier CB, Bojti I, Pooth J-S, Trummer G, Bode C, Diehl P. Early platelet dysfunction in patients receiving extracorporeal membrane oxygenation is associated with mortality. *J Thromb Thrombolysis.* 2022;53(3):712–21. doi:10.1007/s11239-021-02562-9 Cited in: PubMed; PMID 34529213.
 75. Manu V, Chakrabarty BK, Singh S. Analysis of platelet-activating factors in severe sepsis by flow cytometry and its correlation with clinical sepsis scoring system: A pilot study. *Med J Armed Forces India.* 2019;75(4):429–36. doi:10.1016/j.mjafi.2018.06.012 Cited in: PubMed; PMID 31719738.
 76. Schopka S, Philipp A, Müller T, Lubnow M, Lunz D, Unterbuchner C, Rupprecht L, Keyser A, Schmid C. The impact of interleukin serum levels on the prognosis of patients undergoing venoarterial extracorporeal membrane oxygenation. *Artif Organs.* 2020;44(8):837–45. doi:10.1111/aor.13666 Cited in: PubMed; PMID 32043591.
 77. Kozakov K, Philipp A, Lunz D, Lubnow M, Provaznik Z, Keyser A, Rupprecht L, Schmid C, Schopka S. Multi-organ dysfunction syndrome in patients undergoing extracorporeal life support. *Artif Organs.* 2022;46(9):1912–22. doi:10.1111/aor.14272 Cited in: PubMed; PMID 35470442.
 78. Michelson AD, Barnard MR, Hechtman HB, MacGregor H, Connolly RJ, Loscalzo J, Valeri CR. In vivo tracking of platelets: Circulating degranulated platelets rapidly lose surface P-selectin but continue to circulate and function. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1996;93(21):11877–82. doi:10.1073/pnas.93.21.11877

