

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

Histologische Aufarbeitung von Pumpenkopfthromben nach
Extrakorporaler Membranoxygenierung (ECMO)

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Leonie Köster

2025

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

Histologische Aufarbeitung von Pumpenkopfthromben nach
Extrakorporaler Membranoxygenierung (ECMO)

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Leonie Köster

2025

Dekan:	Prof. Dr. Dirk Hellwig
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Karla Lehle
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Lars Krenkel
3. Berichterstatter:	Prof. Dr. Marianne Federlin
Tag der mündlichen Prüfung:	21.01.2025

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Extrakorporale Membranoxygenierung.....	7
1.1.1	Klinische Bedeutung.....	8
1.1.2	Aufbau des Systems	9
1.1.3	ECMO und Gerinnung	10
1.2	Physiologie der Hämostase	12
1.3	Bestandteile eines Thrombus.....	12
1.3.1	Fibrinogen/ Fibrin.....	13
1.3.2	Von Willebrand Faktor	13
1.3.3	Thrombozyten	14
1.3.4	Leukozyten	14
1.3.5	Kollagen I / III	15
1.4	Hinführung zum Thema	15
2	Methoden	17
2.1	Vorbereitung.....	17
2.2	Histologie	19
2.2.1	Reihenfolge	20
2.2.2	Immunhistochemie	20
2.2.3	Sirius-Resorcin-Fuchsin Kombifärbung	21
2.2.4	Martius-Scarlet-Blue	21
2.2.5	Carstairs Method for Fibrin and Platelets	22
2.2.6	Hämatoxylin-Eosin Färbung	22
2.3	Auswertung der Bilder	22
2.3.1	Bildformate	23
2.3.2	Quantitative Analyse mit Case Viewer: Messung der Ringdicke.....	23
2.3.3	Quantitative Analyse mit ImageJ: Colour Deconvolution Plugin.....	26
2.3.4	Quantifizierung der Thrombusbestandteile.....	35
2.3.5	Einteilung der Thromben in zwei Gruppen	38
2.3.6	Statistische Analyse.....	39
3	Ergebnisse	40
3.1	Makroskopischer und mikroskopischer Überblick.....	40
3.2	Beobachtungen bei der Mikroskopie.....	47
3.2.1	Beurteilung der Färbeergebnisse	47

3.2.2	Kollagen.....	50
3.2.3	Kolokalisationen.....	52
3.2.4	Besondere morphologische Strukturen	54
3.2.5	Verteilungsmuster der Thrombusbestandteile	60
3.3	Einteilung der Thromben in zwei Gruppen	62
3.3.1	Makroskopische Gruppeneinteilung an Ort A.....	62
3.3.2	Ortsunabhängige Einteilung in die Gruppen „Weiß“ und „Rot“	63
3.4	Quantifizierung	66
3.4.1	Messung der Ringdicke	66
3.4.2	Quantifizierung der Flächenanteile.....	67
3.4.3	Quantifizierung der Gesamtfläche	69
3.4.4	Quantitative Analyse an Ort A.....	71
3.4.5	Quantitative Analyse an den Orten B und C	72
3.4.6	Unterschiede der zwei Gruppen in der Quantifizierung	74
3.5	Ortsabhängige allgemeine Beobachtungen	74
3.5.1	Zusammensetzung der Thromben an den Orten B und C.....	74
3.5.2	Spezifische Beobachtungen bei der Mikroskopie an Ort A	76
3.6	Analyse der Patientendaten.....	79
3.6.1	Gruppenunabhängige Analyse	79
3.6.2	Gruppenabhängige Analyse	81
3.6.3	Gruppenabhängige Verlaufsanalyse	82
3.6.4	Vergleich mit den Quantifizierungsdaten	85
3.6.5	Sonderfall der Pumpen 44 und 45	87
4	Diskussion	92
4.1	Methodendiskussion.....	92
4.2	Charakterisierung der Thromben.....	96
4.3	Aus der Charakterisierung abgeleitete Mechanismen.....	101
4.4	Gruppeneinteilung in weiße und rote Thromben	104
4.5	Einfluss von Patientencharakteristika auf die Zusammensetzung der Thromben	105
4.6	Limitationen der Studie.....	106
4.7	Ausblick	107
5	Zusammenfassung	108
6	Anhang.....	110
6.1	Färbeprotokolle	110
6.1.1	Immunhistochemie	110

6.1.2	Sirius-Resorcin-Fuchsin-Färbung.....	112
6.1.3	Martius Scarlet Blue	113
6.1.4	Carstairs Method for Fibrin and Platelets	115
6.1.5	Hämatoxylin Eosin.....	116
6.2	Materialien.....	118
6.2.1	Geräte	118
6.2.2	Verbrauchsmaterial.....	119
6.2.3	Chemikalien.....	119
6.2.4	Software.....	121
6.2.5	Antikörper	121
6.3	Patientendaten	123
6.4	Abbildungsverzeichnis	126
6.5	Tabellenverzeichnis.....	131
7	Literaturverzeichnis	132

Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin Complex
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
BMI	Body Mass Index
CD	Cluster of Differentiation
Covid-19	SARS-CoV-2, Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Type 2
CRP	C-reaktives Protein
DAB	3'3'Diaminobenzidin
ECLS	Extracorporeal Life Support
ECMO	Extracorporeal Membrane Oxygenation
ELSO	Extracorporeal Life Support Organisation
GP	Glykoprotein
HE	Hämatoxylin Eosin
IL-6	Interleukin-6
LDH	Laktat-Dehydrogenase
MSB	Martius Scarlet Blue
NET	Neutrophil Extracellular Trap
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PBST	Phosphate-Buffered Saline mit Triton
P-Selektin	Platelet-Selektin
PTT	Partielle Thromboplastinzeit
VA-ECMO	Veno-Arterielle Extrakorporale Membranoxygenierung
VE	Vollentsalztes Wasser
VV-ECMO	Veno-Venöse Extrakorporale Membranoxygenierung
vWF	Von Willebrand Faktor

1 Einleitung

1.1 Extrakorporale Membranoxygenierung

Die extrakorporale Membranoxygenierung stellt seit über 50 Jahren ein wichtiges intensivmedizinisches Therapieverfahren dar (1). ECMO (extracorporeal membrane oxygenation) bzw. ECLS (extracorporeal life support) ist ein Organersatzsystem für Lunge und/oder Herz und wird somit vorwiegend bei schweren respiratorischen oder kardiovaskulären Erkrankungen eingesetzt. Die ECMO soll nicht als alleinige Beatmungsform verwendet werden, sondern als ergänzende Entlastung zur Ermöglichung der lungenprotektiven Beatmung mit moderaten Beatmungsdrücken. Das System besteht aus Kanülen, dem Schlauchsystem, einer Pumpe, einem Oxygenator und einem Wärmetauscher (s. Abb. 1). Dabei wird das Blut aus der kanülierten Vene in das ECMO-System geleitet und von einer Pumpe in Richtung des Oxygenators beschleunigt. Im Membranoxygenator wird das Blut mit Sauerstoff angereichert sowie Kohlenstoffdioxid aus dem Blut entfernt. Dies geschieht mittels Gasaustauschmembranen und der Zufuhr eines Gasgemischs, es werden üblicherweise Bündel von hohlen, aus Polymethylpenten gefertigten Fasern verwendet. (2) Im Wärmetauscher kann die Temperatur des Blutes reguliert werden. Im Anschluss wird das Blut dem Körper wieder zugeführt. Bei ausschließlichem Ersatz der Lunge wird das Blut in eine Vene zurückgeführt (s. Abb. 1), man spricht von VV-ECMO (veno-venös). Wenn die Pumpleistung des Herzens nicht ausreicht, wird das Blut in eine Arterie zurückgeführt, man spricht von VA-ECMO (veno-arteriell) bzw. ECLS. Die intensivmedizinische Therapie mit einer ECMO kann Tage bis Monate fortgeführt werden, um Herz bzw. Lunge zu entlasten und die Regeneration zu ermöglichen oder die Wartezeit auf ein Transplantat zu überbrücken. (3)

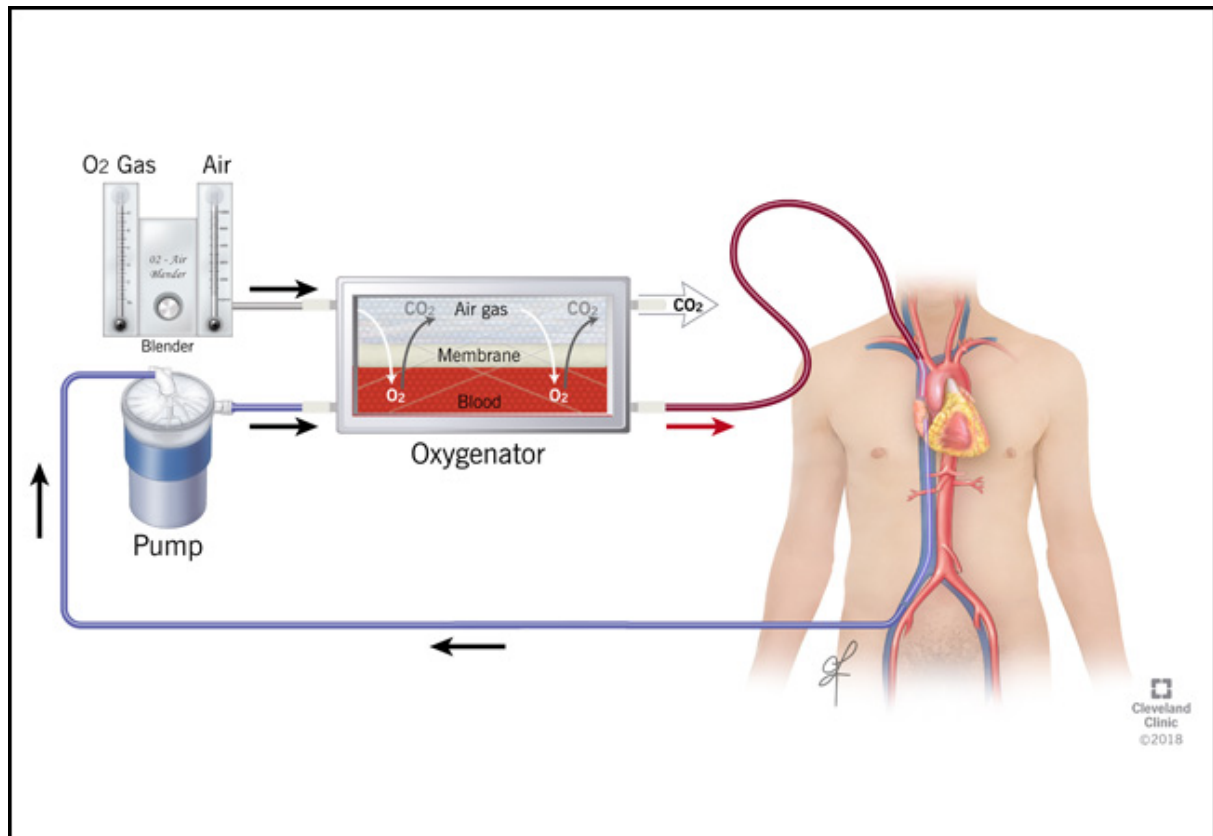


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines VV-ECMO Kreislaufs (4).

1.1.1 Klinische Bedeutung

Im Jahr 2014 wurden in Deutschland bei über 2500 Patientinnen und Patienten jährlich ECMO- oder ECLS-Systeme implantiert (5).

Klare Indikationen oder Kontraindikationen für die Implantation von ECLS/ECMO gibt es laut der S3-Leitlinie von 2021 aufgrund mangelnder Datenlage noch nicht. Es empfiehlt sich daher die klinische Beurteilung der Patientinnen und Patienten und individueller Einsatz der extrakorporalen Systeme. Außerdem spielt die Erfahrung des behandelnden Teams eine große Rolle bei der Indikationsstellung. (5,6)

Seit der Covid-19 Pandemie (SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2) hat der Stellenwert der ECMO-Therapie im klinischen Alltag deutlich an Bedeutung gewonnen. Anfang August 2023 berichtete die Extracorporeal Life Support Organization (ELSO) von 17013 Fällen von Covid-19 erkrankten Patientinnen und Patienten mit ECMO-Therapie seit Beginn der Pandemie (7).

Die aktuelle Empfehlung der WHO für Patientinnen und Patienten mit ARDS (acute respiratory distress syndrome) im Rahmen einer Covid-19-Infektion beinhaltet die Therapie mit ECMO in einem qualifizierten Zentrum, falls Kapazitäten bestehen. Es konnte jedoch im Gegensatz zur MERS-Epidemie (Middle East respiratory syndrome-related coronavirus) noch keine signifikante Verbesserung der Mortalität durch ECMO-Therapie nachgewiesen werden. (8,9) Auffälligkeiten im Gerinnungssystem und daraus resultierende Wechsel des Systems bei Covid-19-Infizierten an venovenöser ECMO führten nicht zu einem kürzeren Überleben, jedoch kamen signifikant längere Liegezeiten auf der Intensivstation vor (10).

Um gesundheitlichen und wirtschaftlichen Komplikationen vorzubeugen ist es daher wichtig, die zugrunde liegenden Mechanismen der Gerinnungskomplikationen zu verstehen.

1.1.2 Aufbau des Systems

Das ECMO-System wird gebildet aus dem Schlauchsystem, der Pumpe, dem Oxygenator und einem Wärmetauscher, welcher häufig im Oxygenator integriert ist. Es können nach Belieben andere Bestandteile ergänzt werden, wie z.B. die Hämofiltration.

Es werden sowohl Rollerpumpen als auch Zentrifugalpumpen verwendet (s. Abb. 2 und 3), wobei die Letzteren überwiegen. Insbesondere im Bereich der neonatalen ECMO-Therapie werden Rollerpumpen verwendet (11). In dieser Arbeit werden ausschließlich Zentrifugalpumpen von adulten Patientinnen und Patienten analysiert. Bei der Zentrifugalpumpe strömt das Blut durch eine mittig im Gehäuse gelegene Öffnung in die Pumpe und wird durch einen magnetisch angetriebenen Rotor bewegt. So wird es über einen randständigen Auslass aus dem Gehäuse in das darauffolgende Schlauchsystem oder direkt in den Oxygenator ausgeworfen (s. Abb. 3). Die Auswurfleistung ist unter anderem abhängig von der Drehzahl des Rotors und der Füllung der Pumpe. (12)

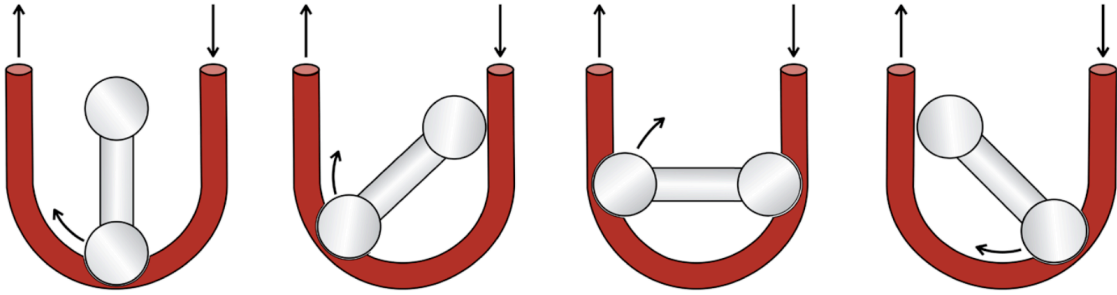


Abbildung 2: Rollerpumpe (12). Das Blut im Schlauch wird durch Kompression der Schlauchabschnitte bewegt.

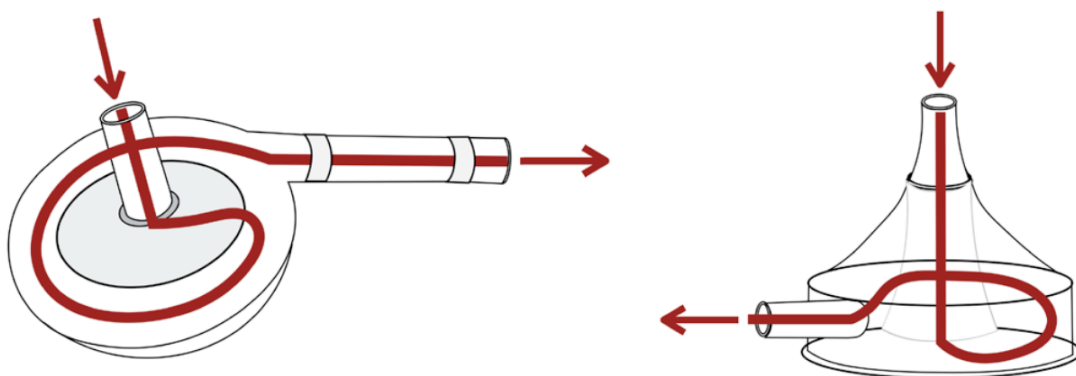


Abbildung 3: Zentrifugalpumpe (12). Das Blut wird durch die Bewegung des Rotors in das weiterführende Schlauchsystem ausgeworfen.

1.1.3 ECMO und Gerinnung

Bei der ECMO-Therapie muss sowohl der aktivierten Gerinnung als auch der erhöhten Blutungsneigung entgegengewirkt werden.

Die ELSO beschreibt in ihren allgemeinen Richtlinien zu Patientenmanagement bei ECMO-Therapie das Gerinnungsmanagement: Thrombusbildung ist in einem ECMO-System zu erwarten und zu tolerieren, solange die Thromben eine Größe von 5mm nicht überschreiten und nicht im Kreislauf hinter dem Oxygenator gebildet werden und wachsen. Man unterscheidet bereits makroskopisch zwischen weißen und roten Thromben. Weiße Thromben bestehen überwiegend aus Fibrin und Thrombozyten und werden in Regionen mit hohen Flussraten gebildet, rote Thromben enthalten Erythrozyten und entstehen bei niedrigem Fluss. Auch größere rote Thromben können toleriert werden, solange die weißen Thromben die 5mm-Marke nicht überschreiten. Wenn zu große Thromben im System sind, sollte der entsprechende Abschnitt oder,

wenn erforderlich, das ganze System ausgetauscht werden. Thrombosen auf den Membranen des Oxygenators können zu vermindertem und eventuell nicht ausreichendem Gasaustausch führen. (13)

Um Thrombosen im System zu vermeiden, gibt es verschiedene Beschichtungen für die Innenseite der ECMO-Systeme. Man kann Albumin-Beschichtungen sowie Heparin-basierte und nicht Heparin-basierte Beschichtungen verwenden. Ein guter Überwachungsparameter für Thrombenbildung im System ist der Druckgradient zwischen Anfang und Ende des Systems, insbesondere in Zusammenschau mit der Flussrate. Bei gleichbleibender Pumpenrotation, sinkendem Fluss und wachsendem Druckgradienten kann eine Thrombose oder Embolie im System verantwortlich sein. Wenn keine andere Ursache gefunden werden kann, sind schnell steigende D-Dimer-Werte ebenfalls ein Hinweis auf Thrombenbildung. (12)

Die Studie von Sun et al. lässt vermuten, dass die große Oberfläche des Oxygenators eine zu vernachlässigende Rolle bei hämorrhagischen und thrombotischen Komplikationen und der Beschädigung verschiedener Blutbestandteile darstellt, wohingegen die Strömungsverhältnisse in Pumpe und Schlauchsystem hierfür ursächlich zu sein scheinen (14).

Eine weitere, ebenso in den ELSO-Guidelines thematisierte Komplikation ist die Hämolyse. Die Werte des freien Hämoglobins sollten 10 mg/dl nicht überschreiten. Neben patientenbezogenen Ursachen müssen verschiedene Bestandteile des ECMO-Systems als Ursache ausgeschlossen werden. Wenn der Druck beim Einstrom des Blutes in die Pumpe zu sehr fällt oder der Druck in der Pumpe zu sehr steigt, kann das eine Ursache für Hämolyse in der Pumpe sein. Dies kann von einer Thrombosierung der Pumpe und den daraus resultierenden veränderten Druck- und Strömungsverhältnissen kommen. Man spricht in diesem Fall von einer Pumpenkopfthrombose. Eine weitere mögliche Ursache für Hämolyse sind Engstellen im Schlauchsystem. (13)

Um Hämolyse im Schlauchsystem zu verhindern, gibt es einen optionalen Bestandteil des ECMO-Systems, den sogenannten „Bladder“. Durch ein vor die Pumpe geschaltetes Reservoir können Füllungsengpässe und Druckunterschiede ausgeglichen werden. (12)

Patientinnen und Patienten mit ECMO-Therapie erhalten in den meisten Zentren eine medikamentöse Antikoagulation. Hierbei handelt es sich meistens um Heparine. Die Übersichtsarbeit von Olson et al. konnte jedoch zeigen, dass bei Therapieregimen ohne Antikoagulation kein signifikanter Unterschied bezüglich des Endpunktes der Thrombose bestand (15).

1.2 Physiologie der Hämostase

Verschiedene Initiatoren können den Vorgang der Hämostase in Gang bringen. In vivo dient dieser Vorgang dem Verschluss eines verletzten Gefäßes und somit zum Erhalt eines intakten Gefäßsystems. Durch freiliegendes subendotheliales Kollagen bei der Verletzung einer Gefäßwand werden Thrombozyten aktiviert und zum Ort der Gefäßverletzung rekrutiert, der Prozess der primären Hämostase beginnt. Die primäre Hämostase stellt den schnellen Erstverschluss des Defekts dar, wobei Thrombozyten und von Willebrand Faktor an das freiliegende Kollagen binden. Im Gegensatz dazu stellt die sekundäre Hämostase mit Netzen aus Fibrin als Endprodukt der Gerinnungskaskade einen deutlich stabileren und langfristigeren Verschluss des Defektes dar, dauert jedoch länger als die primäre Hämostase. Diese Kaskade der Fibrinbildung im Rahmen der sekundären Hämostase kann unter anderem durch den in der Gefäßwand exprimierten Tissue Factor ausgelöst werden. (16) Tissue Factor kann über die Bildung von Thrombin nicht nur die Bildung von Fibrin initiieren, sondern auch eine Aktivierung der Thrombozyten auslösen. (17) Im Rahmen der Thrombozytenaktivierung werden ADP, Thromboxan A₂ und Serotonin ausgeschüttet, welche wiederum neue Thrombozyten aktivieren und somit die Reaktion verstärken. (16) Die Vernetzung der Thrombozyten erfolgt durch Fibrin oder vWF, wobei letzterer insbesondere bei hohen Scherkräften eine Rolle spielt. (18)

1.3 Bestandteile eines Thrombus

Im Folgenden werden einzelne Thrombusbestandteile und deren Antigene genauer besprochen, welche im Rahmen der Immunhistochemie dieser Arbeit angefärbt wurden.

1.3.1 Fibrinogen/ Fibrin

Fibrinogen (Gerinnungsfaktor I) wird in der Leber synthetisiert und gelangt von dort ins Blutplasma. Es wird im Rahmen der Gerinnungskaskade von der Serinprotease Thrombin kalziumabhängig gespalten und in Fibrin umgewandelt. Die Fibrillen lagern sich zusammen und bilden Netze aus. Fibrin kann an der Thrombozytenoberfläche binden und bewirkt sowohl eine Aktivierung der Blutplättchen als auch deren Quervernetzung. Neben zellulären Bestandteilen ist das Fibrinnetz Hauptbestandteil eines Thrombus. (19,20) Die Eigenschaften des Fibrins sind abhängig von den jeweiligen Bindungspartnern und der Struktur, in welcher sich das Fibrin anlagert. So kann es zum Beispiel in Faserbündeln oder Netzen mit unterschiedlich starker Verzweigung vorliegen. Unter den Bindungspartnern des Fibrins sind beispielsweise Endothelzellen, Leukozyten sowie andere Proteine, welche über unterschiedliche Rezeptoren an Fibrin binden können. (21)

Obwohl die Struktur der beiden Proteine zu 98% übereinstimmt, konnte zusätzlich zu einem schon zuvor etablierten Antikörper, der sowohl an Fibrinogen als auch an Fibrin bindet, ein für Fibrin spezifischer Antikörper gefunden werden. (22)

1.3.2 Von Willebrand Faktor

Der von Willebrand Faktor (vWF) ist ein großmolekulares Glykoprotein, welches zwei Funktionen bei der Blutgerinnung übernimmt. Einerseits ist er beteiligt an der primären Hämostase durch die Brückenbildung zwischen extrazellulärer Matrix und Thrombozyten. Andererseits dient er als Trägerprotein für den Gerinnungsfaktor VIII, welcher dadurch vor dem proteolytischen Abbau geschützt ist. (23,24)

Der vWF bindet an Kollagen I, III und VI, GP (Glykoprotein) IIb/IIIa, sowie den Rezeptorkomplex GP 1b/IX/V auf der Thrombozytenoberfläche. (25–27) Durch die anschließende Thrombozytenaktivierung kann Fibrinogen an GP IIb/IIIa binden und somit zusammen mit dem vWF ein Thrombozytenaggregat bilden. (28,29)

Die Spaltung des von Willebrand Faktors unterliegt dem Einfluss von Scherstress (28,30). Durch die Entfaltung der Multimere erfolgt die Spaltung durch die Metalloprotease ADAMTS13 (a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin-1-like domains 13). (31,32) Physiologischerweise besteht ein Gleichgewicht dieser Prozesse. Durch zu hohe Scherkräfte, z.B. bei künstlichen Herzklappen oder bei

ECMO-Therapie kann es durch übermäßige Spaltung zur hämorrhagischen Diathese kommen (33). Das sogenannte acquired von-Willebrand-Syndrom mit einem Verlust von hochmolekularem von Willebrand Faktor ist eine mögliche Komplikation der ECMO-Therapie. Der Mangel an vWF kann zusätzlich durch mechanische Zerstörung des Moleküls sowie durch Verbrauch bei aktivierter Gerinnung bzw. Scherstress-induzierte Freilegung der Thrombozytenbindungsstellen zustande kommen. (34)

1.3.3 Thrombozyten

Zahlreiche Glykoproteine werden auf der Oberfläche der Blutplättchen präsentiert, insbesondere in deren aktivierter Form.

CD 42b (Cluster of Differentiation 42b), auch unter dem Namen GP IbA bekannt, stellt als alpha-Untereinheit des Glykoproteins GP Ib einen Bestandteil des von-Willebrand-Rezeptorkomplexes auf der Thrombozytenoberfläche dar. Weitere Bestandteile sind die beta-Untereinheit sowie GP IX und GP V. (35) Unter ECMO-Therapie konnte ein signifikanter Verlust von GP IbA sowie anderer Thrombozyten-Oberflächenantigene nachgewiesen werden (36).

CD 62p, auch P-Selektin (platelet-Selektin) ist ein Oberflächenantigen auf aktivierten Thrombozyten und Endothelzellen. Vor Aktivierung wird es in den alpha-Granulae der Thrombozyten bzw. in den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen gespeichert. Es dient als Adhäsionsmolekül primär für den Liganden PSGL-1 (p-selectin glycoprotein ligand-1). PSGL-1 wird auf Leukozyten exprimiert und bindet nicht spezifisch an P-Selektin. (37,38)

1.3.4 Leukozyten

Leukozyten können eine große Rolle bei der Thrombenbildung spielen. Sie fördern die Plättchenaktivierung und -aggregation sowie den extrinsischen und den intrinsischen Weg der Gerinnungskaskade. Außerdem werden bei einer Thrombose Leukozyten aktiv durch Thrombozyten und Endothelzellen rekrutiert. Im Prozess der Organisation des Thrombus spielen vor allem die phagozytierenden Zellen eine Rolle. (39)

Das Oberflächenantigen CD 31 (PECAM-1, Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1) wird auf Granulozyten, Monozyten und Thrombozyten exprimiert. Man

findet es außerdem in endothelialen Zell-Zell-Kontakten, zum Beispiel bei Neovaskularisierung. (40,41)

CD 45 wird als transmembranes Glykoprotein auf der Membran aller Leukozyten exprimiert. (42)

1.3.5 Kollagen I / III

Als mögliche Bindungspartner für den von-Willebrand-Faktor spielen Kollagen I und III eine herausragende Rolle bei der Initiation des Gerinnungsvorgangs (43). Außerdem ist das subendotheliale Kollagen, welches bei Verletzung der Gefäßwand freiliegt, ein wichtiger Aktivator und Bindungspartner der Thrombozyten im Vorgang der primären Hämostase. (44) Obwohl in der freien Blutbahn und somit im ECMO-System kein Kollagen zu erwarten ist, fanden sich im Rahmen der Vorversuche bei einigen Thromben in histochemischen Färbungen Hinweise auf das Vorhandensein von Kollagen in den Thromben. Das Kollagen kann als Embolie seinen Weg in die Pumpe gefunden haben oder im Rahmen der Organisation des Thrombus vor Ort neu gebildet worden sein.

1.4 Hinführung zum Thema

Das Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung von aus ECMO-Pumpenköpfen entnommenen Thromben. Dies soll Rückschlüsse auf die Ursachen der Thrombenbildung in den Pumpen erlauben. Es erfolgte die Färbung der entnommenen Thromben mit den histochemischen Übersichtsfärbungen HE (Hämatoxylin Eosin), Carstairs (Carstairs Method for Fibrin and Platelets), Sirius-Resorcin-Fuchsin und MSB (Martius Scarlet Blue) sowie die immunhistologische Anfärbung einzelner Komponenten der Thromben. Anschließend wurden die Flächen der Thromben und Flächenanteile der einzelnen Bestandteile gemessen. Im Anschluss erfolgte die Analyse ausgewählter klinischer Daten in Zusammenschau mit den histologischen Ergebnissen. Bis dato gibt es wenige Arbeiten zu einem ähnlichen Thema. Hervorzuheben sind die Arbeiten von Hastings et al. (2016 und 2017), Baumann Kreuziger et al. (2018), Staessens et al. (2022) und Figueroa Villalba et al. (2022). (45–49)

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Regensburg genehmigt, das Ethikvotum (20-2061-104) liegt vor.

2 Methoden

2.1 Vorbereitung

Es erfolgte die Anonymisierung und Eingrenzung der zu untersuchenden Pumpen nach Modell und Betriebsart, um eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erreichen.

Die VV-ECMO und zwei verschiedene Modelle der Firma Maquet wurden aufgrund der Häufigkeit ausgesucht. In beiden Modellen werden nahezu baugleiche Zentrifugalpumpen verwendet. Im System HLS/Cardiohelp befindet sich die Pumpe direkt neben dem Oxygenator, im System PLS befindet sich zwischen Pumpe und Oxygenator ein Schlauch (s. Abb. 4). Es wurden insgesamt 13 Pumpen untersucht, wobei aus den Pumpen 22 Thromben gewonnen werden konnten, von denen ein Thrombus aufgrund seiner Größe auf 5 Paraffinblöcke verteilt werden musste.



Abbildung 4: Linkes Bild: HLS Set Advanced (Cardiohelp) (50), rechtes Bild PLS-System (51) von Maquet/Getinge, beide mit Rotaflow-Zentrifugalpumpe. Im linken Bild sieht man das durchsichtige Gehäuse der Pumpe direkt auf dem roten Oxygenator und den zuführenden Schenkel mit einer blauen Kappe. Das rechte Bild zeigt ein blutgefülltes System mit Schlauchsystem, Pumpe und Oxygenator in blauer Hülle.

Es folgte unmittelbar nach Ausbau des Systems bei Therapieende oder Systemwechsel die Spülung mit 10l Natriumchlorid-Lösung und anschließend mit 1l 4% Formaldehyd in PBS (phosphate-buffered saline, Phosphatgepufferte Salzlösung) mit 10% Methanol (pH 7,3), sodass ein Gemisch beider Lösungen im luftleer

verschlossenen System verblieb. So konnten die Pumpen bei 4°C im Kühlraum gelagert werden bis zur weiteren Analyse.

Nach der Auswahl der Pumpen erfolgte die Eröffnung, fotografische Dokumentation (s. Abb. 5) und Entnahme der Thromben sowie Lagerung in Formaldehyd-Lösung bis zur Einbettung in Paraffin durch das Institut für Pathologie der Universität Regensburg. Die Pumpen wurden in 3 Orte eingeteilt, an denen sich häufig Thromben befanden (s. Abb. 6) und die entnommenen Thromben entsprechend beschriftet.

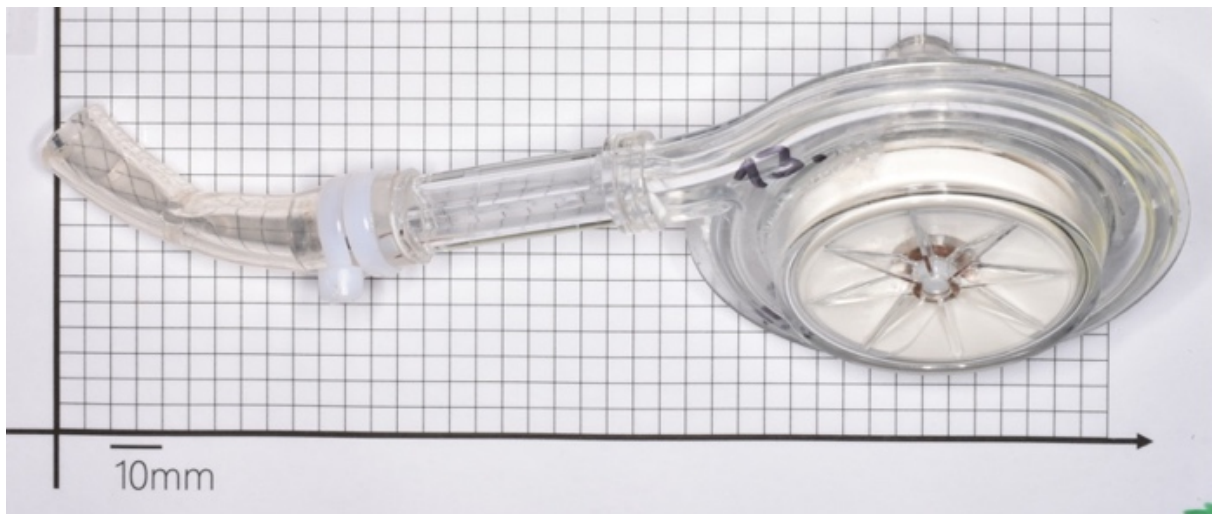


Abbildung 5: Nicht eröffnete Rotaflow Pumpe des PLS-Systems. Der Knick im Schlauch wurde durch das Abklemmen nach dem Ausbau erzeugt.

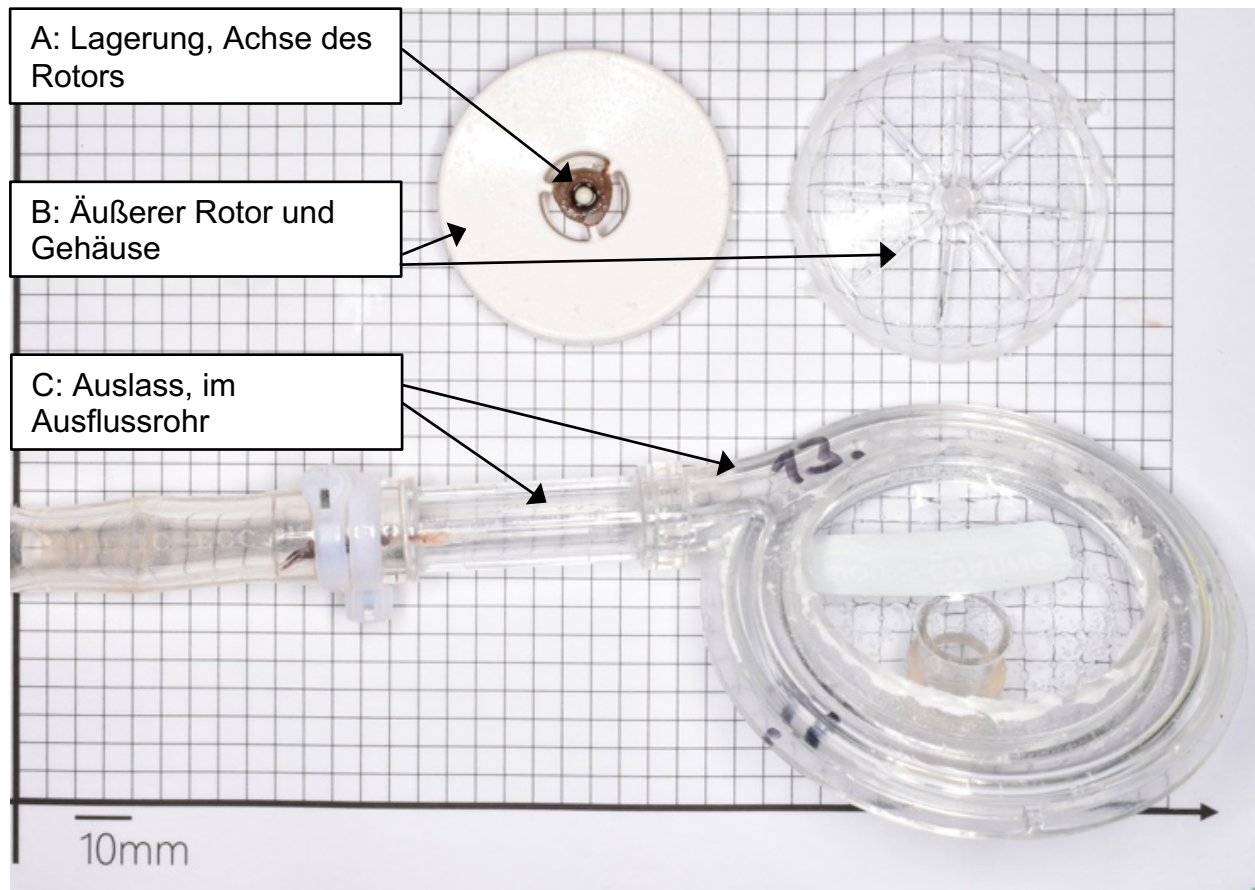


Abbildung 6: Eröffnete Pumpe mit Einteilung der Orte A, B und C, hier mit sichtbaren Thromben an den Orten A und C.

2.2 Histologie

Allen Färbungen voran wurden die Paraffinblöcke mit einem Rotationsmikrotom in 14 5µm dicke Serienschnitte geschnitten und auf Objektträger aufgezogen. Diese wurden über Nacht bei 50°C getrocknet und anschließend gefärbt. Zu jeder Färbung wurde eine Positivkontrolle hinzugefügt, um den Färberefolg und die Funktionsfähigkeit des Antikörpers im Falle eines negativen Ergebnisses in den Thromben sicherzustellen. Hierbei wurden zwei verschiedene Kombinationen von Geweben verwendet: Tonsille mit Gehirn und Colon für die Antikörper gegen Kollagen I und III sowie Tonsille mit Plazenta und Niere für die restlichen Antikörper.

Die Färbeprotokolle und Materialienlisten befinden sich im Anhang (6.1 und 6.2).

2.2.1 Reihenfolge

Die hier aufgelisteten Färbungen wurden in der folgenden Reihenfolge an den Serienschnitten gefärbt:

1. Martius Scarlet Blue (MSB)
2. Fibrinogen
3. Fibrin
4. Von Willebrand Faktor
5. Kollagen III
6. Kollagen I
7. Sirius-Resorcin-Fuchsin
8. Carstairs Method for Fibrin and Platelets
9. CD42b
10. Von Willebrand Faktor
11. CD62p
12. CD31
13. CD45
14. Hämatoxylin Eosin (HE)

2.2.2 Immunhistochemie

Bei der Immunhistochemie wurde nach der (Strept-)Avidin-Biotin-(ABC-)Methode gearbeitet. Nach dem Blocken unspezifischer Bindungen wurde der Schnitt mit einem Primärantikörper gegen das anzufärbende Antigen über Nacht inkubiert. Ein biotinylierter Sekundärantikörper gegen den ersten Antikörper wurde dazugegeben. Dieser richtet sich gegen Strukturen am Primärantikörper, welche für das Tier, in dem der Primärantikörper gezogen wurde, spezifisch sind. Es kamen sowohl in Mäusen als auch in Kaninchen gezogene Antikörper zum Einsatz. Es folgte ein Avidin-Biotin-Enzymkonjugat, welches zur Verstärkung des Signals dient. Avidin weist jeweils vier Bindungsstellen für Biotin auf. Aus sterischen Gründen können jedoch nur drei Moleküle gebunden werden. Als Enzym kam Peroxidase zum Einsatz. Als Farbstoff wurde 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) verwendet, welches durch die enzymatische Oxidation sichtbar wird. (52,53)

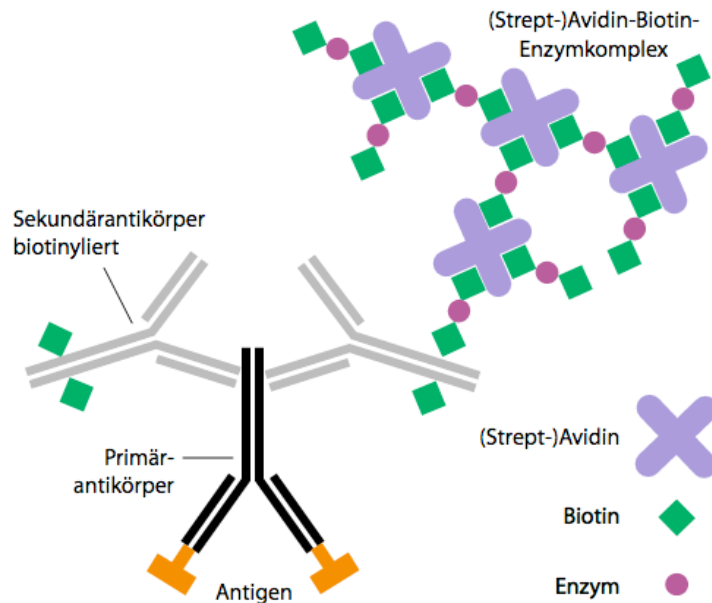


Abbildung 7: ABC-Methode (52)

2.2.3 Sirius-Resorcin-Fuchsin Kombifärbung

Zur herkömmlichen Siriusrot Färbung wurde die Resorcin-Fuchsin Färbung hinzugefügt, um elastische Fasern darzustellen. Zellkerne werden mit Hämatoxylin blau gefärbt, Muskulatur und Zytoplasma erscheinen gelb, Kollagen ist rot und elastische Fasern schwarz-violett. Unter dem Polarisationsmikroskop kann man Kollagen I von Kollagen III unterscheiden, die breiten Fasern des Kollagen I haben eine gelb-orange Doppelbrechung, die dünneren Fasern eine grüne. Die absteigende Alkoholreihe wird verkürzt, da der Farbstoff alkohollöslich ist. (52,54)

2.2.4 Martius-Scarlet-Blue

Die Martius-Scarlet-Blue Färbung stellt Fibrin rot, frisches Fibrin sowie Erythrozyten gelb und Bindegewebe bzw. altes Fibrin blau dar. Es werden die Färbelösungen Bouin (enthält Pikrinsäure), Martius (Martius Yellow), Scarlet (Ponceau 6R) und Blue (Methyl Blau) verwendet sowie Phosphorwolframsäure und Essigsäure zum Differenzieren. (55–57)

2.2.5 Carstairs Method for Fibrin and Platelets

Bei der Färbemethode nach Carstairs werden Fibrin, Thrombozyten, Erythrozyten, Kollagen und Muskelgewebe dargestellt. Es kommen dabei Eisenammoniumsulfat, Pikrinsäure-Orange G, Ponceau-Fuchsin-Lösung sowie Anilinblau zum Einsatz. Fibrin erscheint leuchtend rot, Thrombozyten blau-grau, Kollagen leuchtend blau, Muskelgewebe rot und Erythrozyten gelb. Die Färbung ist eine Modifikation der Picro-Mallory-Färbung und wurde entwickelt, um Thrombozyten von Fibrin unterscheiden zu können. (58)

2.2.6 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Bei dieser Färbung werden das positiv geladene Mayer's Hämalaun und das negativ geladene Eosin verwendet. Zellkerne stellen sich als basophile Gewebebestandteile blau dar, Zellplasma sowie Kollagen und Erythrozyten als eosinophile Bestandteile in rötlich bis rosa. Hämalaun stellt hierbei den basophilen Färbebestandteil dar und bindet an saure, negativ geladene Bestandteile, Eosin bindet an eosinophile bzw. azidophile, positiv geladene Bestandteile des Gewebes. Die Färbung arbeitet somit mit der sogenannten elektrostatischen Adsorption, also der Bindung positiv oder negativ geladener Farbstoffe an jeweils gegensätzlich geladene Gewebebestandteile. Die Eiweiße in den histologischen Schnitten liegen meist als Ampholyte vor, sind also je nach dem pH-Wert der Umgebung entweder positiv oder negativ geladen. Mayer's Hämalaun ist eine Weiterentwicklung des Hämatoxylin-Farbstoffes, ein sogenannter Hämateinlack, und wird aufgrund seiner Selektivität sehr gerne als Kernfarbstoff verwendet. (52)

2.3 Auswertung der Bilder

Es erfolgte die Digitalisierung aller Objektträger mit Hilfe eines Slide Scanners der Firma 3D Histech (Budapest, Ungarn).

2.3.1 Bildformate

Die Bilder waren nach dem Scannen als Mirax Dateien gespeichert. Dies beinhaltet mehrere Teilbilder im dat-Format und eine mrx-Datei, um die Teilbilder zusammenzusetzen. Da ImageJ und ähnliche Bildanalyse-Softwares dieses Format nicht lesen können und die Auswertung mit dem Programm CaseViewer der Firma 3D Histech nicht möglich war, mussten die Dateien zunächst in das Format TIFF (Tagged Image File Format) umgewandelt werden. Dies war mit dem CaseViewer und der dazugehörigen Export Software CNV möglich. Beim Export wurde die Auflösung um den Faktor 4 verringert, somit war das größte auszuwertende Bild knapp über 1 Gigabyte groß und konnte mit dem Importer des Bio-Formats Plugin von ImageJ/Fiji geöffnet und anschließend mit anderen Plugins dieser Software weiter analysiert werden. Der „Faktor 4“ (bzw. 1:4) wurde vom Programm so angegeben und konnte nur anhand der Ergebnisse des Exports näher untersucht werden. Es ergab sich beim Export mit der Angabe 1:1 und dem Export mit der Angabe 4:1 das folgende beispielhafte Ergebnis: 3920,62x2053,66 microns (16128x8448 Pixel) sowie 3982,85x2240,35 microns (4096x2304 Pixel). Es erfolgte also durch das Exportprogramm eine ungefähre Verringerung der Pixelzahl um den Faktor 4 entlang beider Seiten, was zu einer Speicherplatzverminderung von ursprünglich 390MB auf 27MB führte. (59)

2.3.2 Quantitative Analyse mit Case Viewer: Messung der Ringdicke

Durch ihre Lage an der Lagerung des Rotors bzw. der Rotorachse selbst, hatten alle Thromben an Ort A die gleiche, reifenförmige Struktur (s. Abb. 8, 18 und 19). Im Querschnitt präsentiert sich diese reifenförmige Struktur nun als Ring. Je nachdem wie viel Thrombus sich auf der Achse angelagert hatte, war der Ring breiter oder schmaler oder unregelmäßig breit und schmal zugleich. Daher bot sich zum Größenvergleich nicht nur die Fläche der Thromben an, in welcher auch die Fläche eventuell angelagerter Strukturen gemessen wurde, sondern auch die Messung der Dicke der Ringe an Ort A.

Für die Messung der Ringdicke wurde in zwei verschiedenen Bildern an jeweils sechs Orten die Dicke des Rings gemessen. Jeder Anschnitt ist eine zweidimensionale Repräsentation einer dreidimensionalen Struktur. Je weiter mittig im Ring der

Anschnitt lag, desto breiter war meist der Ring. Somit wurden jeweils zwei Bilder des Ringes vermessen, welche in der Reihenfolge der Serienschnitte möglichst weit auseinanderlagen, um einen möglichst breiten Bereich im Thrombus abzudecken. Es wurden also der jeweils erste und letzte Schnitt der Serie (MSB und HE) gewählt.

Zunächst wurde mit der Ellipsenannotation im Auswertungsprogramm CNV die Kreisform des Thrombus markiert. Diese Markierung diente lediglich der Hilfestellung, um besser zu erkennen, wo im Kreis die Orte „oben“, „rechts“, „unten“ und „links“ lagen (s. Abb. 8). Die Messung an diesen vier Orten war also standardisiert auf allen Bildern gleich. Anschließend wurden noch die dünnste und die dickste Stelle des Ringes nach Augenmaß bzw. nach mehrmaligen Messungen gewählt und aus allen sechs Werten der Mittelwert bestimmt. Dies wurde auf jeweils zwei Schnitten (MSB und HE) durchgeführt und wiederum der Mittelwert bestimmt.

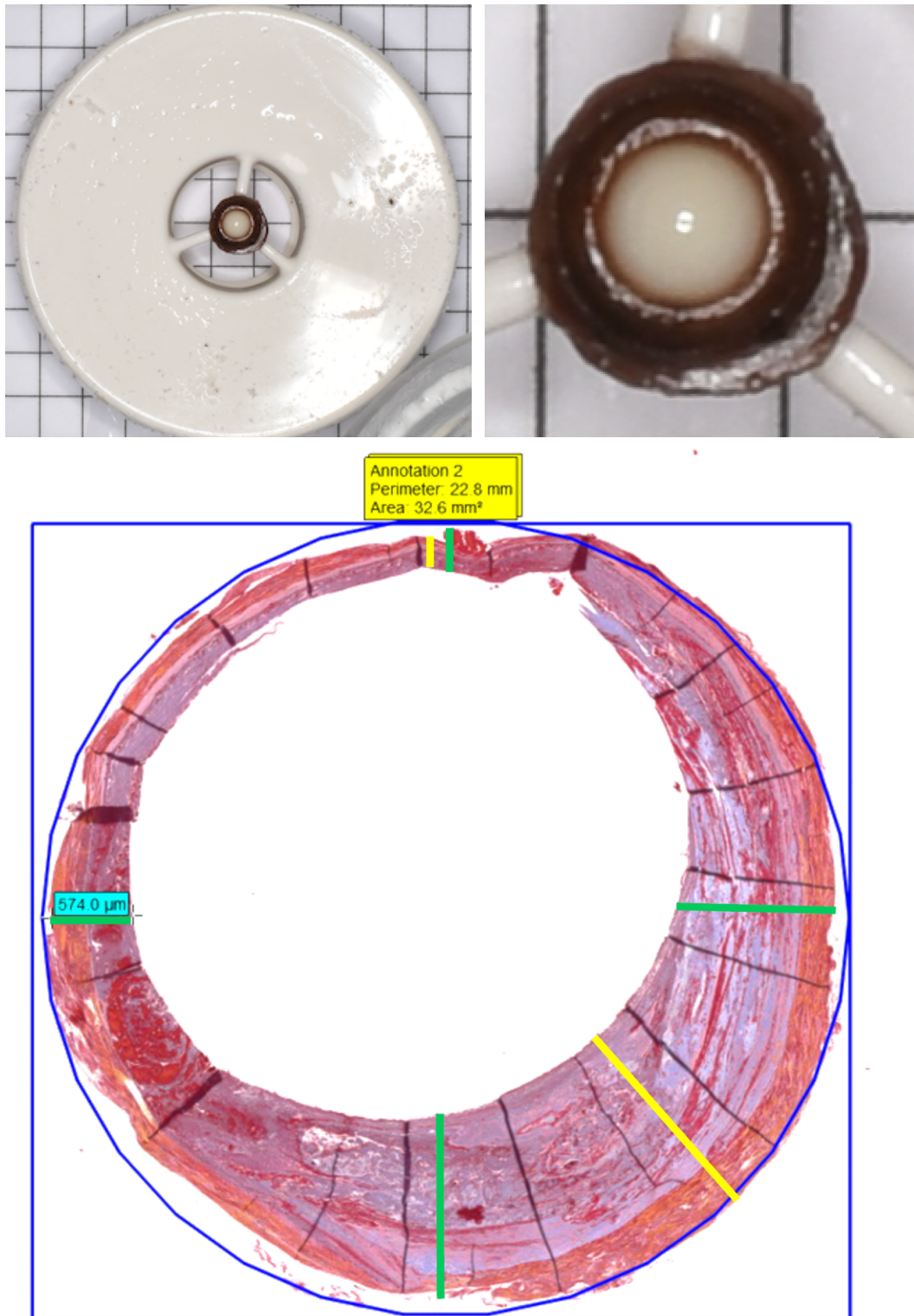


Abbildung 8: P18A, Bilder vom Ausbau und Färbung mit MSB, Orte der Messung der Ringdicke.

Die Orte der Messungen „oben“, „rechts“, „unten“ und „links“ sind grün markiert. Das Ergebnis der Messung „links“ wird im türkisenen Kästchen dargestellt und beträgt 574µm. Die gelben Striche markieren die Orte der Messungen der dünnsten und dicksten Stelle des Rings.

2.3.3 Quantitative Analyse mit ImageJ: Colour Deconvolution Plugin

Das Plugin „Color Deconvolution“ von Ruifrok und Johnston wurde entwickelt, um histologische Bilder in ihre Farbbestandteile zu zerlegen und somit diese Farbbestandteile quantifizieren zu können (60). Es gibt einige bereits eingespeicherte Färbungen und die Optionen, die 3 Farben über „Regions of interest“ auszuwählen oder benutzerdefinierte Werte einzugeben. HE und die Immunhistochemie mit DAB und Hämatoxylin sind der Software bekannt, für Carstairs und MSB mussten neue Werte festgelegt werden. Bei den Färbungen HE und der Immunhistologie werden zwei verschiedene Farben verwendet. Mit dem Plugin Color Deconvolution können drei Farben unterschieden werden. Man rechnet also am Beispiel der HE-Färbung aus, wieviel Flächenanteil rot, wieviel blau und wieviel der Komplementärfarbe grün zuzuordnen ist, um den Hintergrund herauszufiltern und weder der roten noch der blauen Farbe zuzuordnen. Die rote Farbe ist der Farbstoff Eosin, die blaue Farbe ist der Farbstoff Hämalan. Am Ende werden also aus einem Bild drei Bilder, in welchen die Bestandteile (z.B. Eosin, Hämalan und Hintergrund) aufgeteilt sind. Wenn also an einer Stelle ein blauer Zellkern sichtbar war, erscheint die Stelle auf dem Teilbild „rot“ leer bzw. weiß, auf dem blauen Teilbild erscheint jedoch der Zellkern. Am Ende kann also der Flächenanteil der roten und blauen Färbung an den gesamten auf dem Bild gefärbten Anteilen ausgerechnet werden.

2.3.3.1 Definition der Farbwerte

Im Plugin „Color Deconvolution“ gibt es die Möglichkeit, die drei Farbwerte aus einer sogenannten „Region of Interest“ zu definieren. Man verwendet also statt vorher gespeicherter Farbwerte drei benutzerdefinierte Farben aus Bereichen des Objektträgers, in welchen ausschließlich die gewünschte Farbe zu sehen ist, und der Rest des Schnittes wird einer dieser drei selbst gewählten Farben zugeordnet. So entstehen erneut drei Bilder mit je einer Farbe.

Da bei Färbungen mit mehreren Farbstoffen diese Farbstoffe miteinander interagieren können, erfolgten zunächst Vorversuche zur Definition der Farbwerte. Es wurden Kontrollschnitte angefärbt und das reguläre Färbeprotokoll verwendet, jedoch auf jedem der Schnitte immer nur einer der Farbstoffe aufgetragen. So entstanden die in Abb. 9 abgebildeten Schnitte. Es wurde jeweils ein Ausschnitt des Bildes fotografiert

und die drei Bilder (jeweils eins in gelb, eins in rot und eins in blau) in einem Einzelbild zusammengefügt (linkes Bild in Abb. 9). Anschließend wurden über das Color Deconvolution-Plugin die drei Farben als „Regions of Interest“ ausgewählt, also automatische Farbwerte erstellt. Die Farbwerte sind oben in Abb. 9 sichtbar: Es ist bei jeder der drei Farben jeweils ein Wert für rot (R), ein Wert für grün (G) und ein Wert für blau (B) aufgeführt. Nach Aufteilung in die drei so definierten Farben erhält man die drei rechts in Abb. 9 aufgeführten Bilder. Man erkennt, welche Ausschnitte des linken Bildes in welchem der drei rechten Bilder wiederzufinden sind, und dass die Bilder sehr gut den einzelnen Farben entsprechen. (61,62)

Colour deconvolution: User values

Colour_1 R:0.04002803, G:0.87060964, B:0.49034336
 Colour_2 R:0.070242755, G:0.090312116, B:0.9934333
 Colour_3 R:0.7117817, G:0.7017566, B:0.030075282

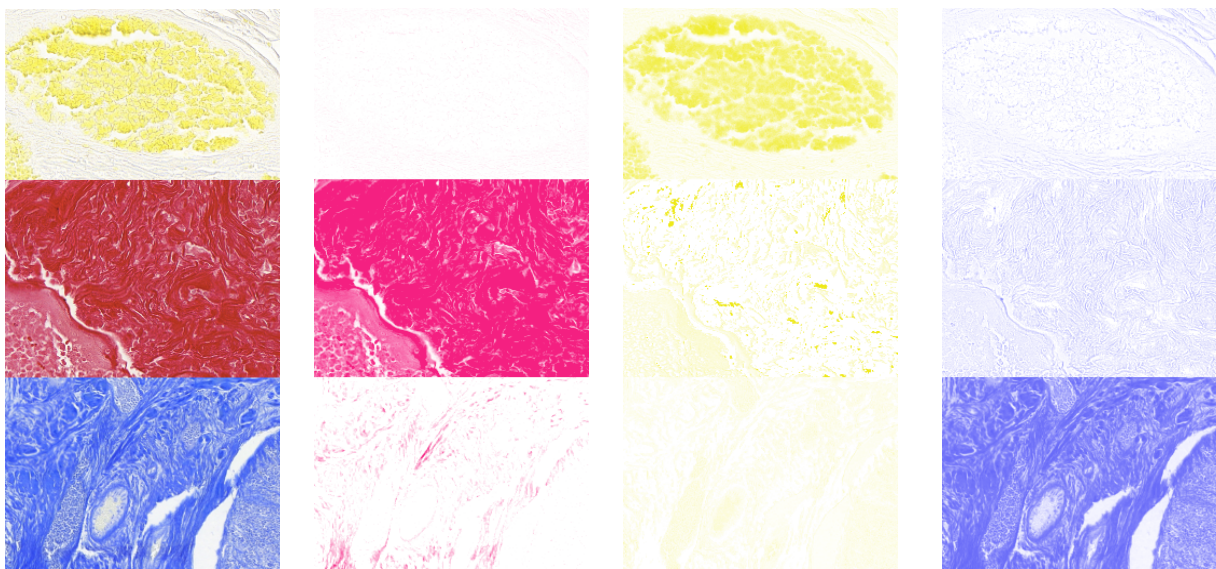


Abbildung 9: MSB, einzeln gefärbte Präparate aufgeteilt in Einzelfarben durch das Colour Deconvolution-Plugin, darüber sind die hier verwendeten, benutzerdefinierten Farbwerte zu sehen. Oben im Bild sind die sogenannten „user values“ aufgeführt, also die Farbwerte, welche zuvor über „Regions of Interest“ definiert wurden und anschließend im Rahmen dieser Vorversuche verwendet wurden. Die drei rechten Teilbilder sind die Aufspaltung des linken Bildes in die drei Farben, welche bei der MSB-Färbung zum Einsatz kommen. Diese sind Martius (gelb), Scarlet (rot) und Blue (blau).

Die in Abbildung 9 verwendeten Farbwerte stimmen für diese mit einzelnen Farbstoffen gefärbten Bilder, die einzelnen Farben werden genau aufgespalten und kaum Bereiche einer falschen Farbe zugeordnet. Bei der Quantifizierung kommt man auf plausible Werte, das Ergebnis der Quantifizierung der Gesamtfläche überschreitet

das Ergebnis der addierten Teilflächen minimal (s. Tab. 1). Auch die Verteilung der Fläche ist plausibel: rot hat den größten Flächenanteil, blau etwas weniger, gelb am wenigsten.

	Fläche in Pixel
rot	48617
gelb	17437
blau	43787
rot, gelb, blau addiert	109842
Bild alle Farben	110177

Tabelle 1: Messung der gesamten Bildfläche aus Abbildung 9, Messung der einzelnen Farben mit jeweiliger erkannter Fläche und Addition der Flächen der Einzelfarben, jeweils in Pixel. Die addierten Teilflächen der Farben „rot“, „gelb“ und „blau“ ergeben ein ähnliches Ergebnis wie die Messung der Gesamtfläche im Originalbild.

Anschließend erfolgte die Quantifizierung der tatsächlich zu untersuchenden Schnitte mit Hilfe der zuvor definierten Farbwerte. Es fiel auf, dass die neuen Farbwerte bei der Analyse der wirklichen Färbungen keine optimalen Ergebnisse erzielten, es wurde zu viel Gewebe erkannt (s. Abb. 10 und Tab. 2).

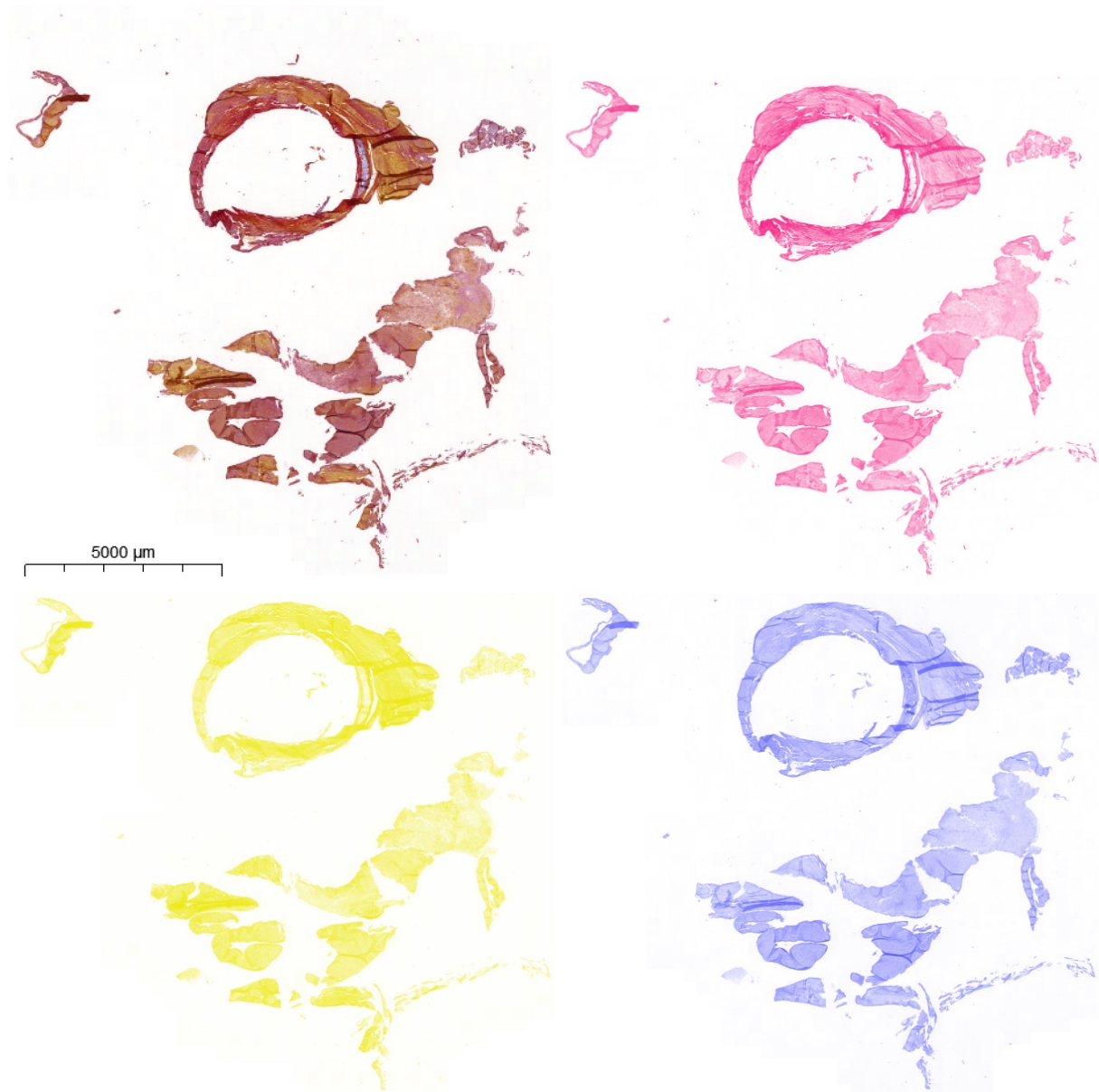


Abbildung 10: P44A, MSB, Aufspaltung in Einzelfarben mit zuvor definierten Farbwerten aus separaten Färbungen (wie in Abb. 9).

Bei der Quantifizierung der Flächen aus Abbildung 10 ergaben sich die in Tabelle 2 aufgeführten Ergebnisse. Es ist klar zu erkennen, dass nach der Zusammensetzung der Teilflächen ein zu großes Ergebnis entsteht. In jeder der 3 Einzelfarben wird fast die gesamte Thrombusfläche erkannt.

	Fläche in Pixel
rot	27961830
gelb	27302015
blau	28815723
rot, gelb, blau addiert	84079568
Bild alle Farben (Gesamter Thrombus)	28962925

Tabelle 2: Messung der einzelnen Farben mit jeweiliger erkannter Fläche und Addition der Flächen der Einzelfarben in Pixel sowie Messung der Gesamtfläche im ursprünglichen Bild. Hier ist ein deutlicher Unterschied zwischen der Thrombusfläche und der Gesamtfläche nach Addition der Teilflächen zu erkennen. Die addierten Teilflächen ergeben fast die dreifache Fläche im Vergleich zur gemessenen Gesamtfläche im Originalbild.

Wenn die Farbauswahl und Definition der Farbwerte auf dem kombiniert gefärbten Bild vorgenommen wird, erreicht man deutlich bessere Ergebnisse (s. Abb. 11 sowie Tab. 3). Die Addition der Teilflächen erreicht ein ähnliches Ergebnis wie die Messung der Gesamtfläche im ursprünglichen Bild. Auch die Plausibilität der Messung stimmt, man kann bereits vor der Aufspaltung in die Farben vermuten, dass die blaue Fläche den geringsten Anteil ausmacht.

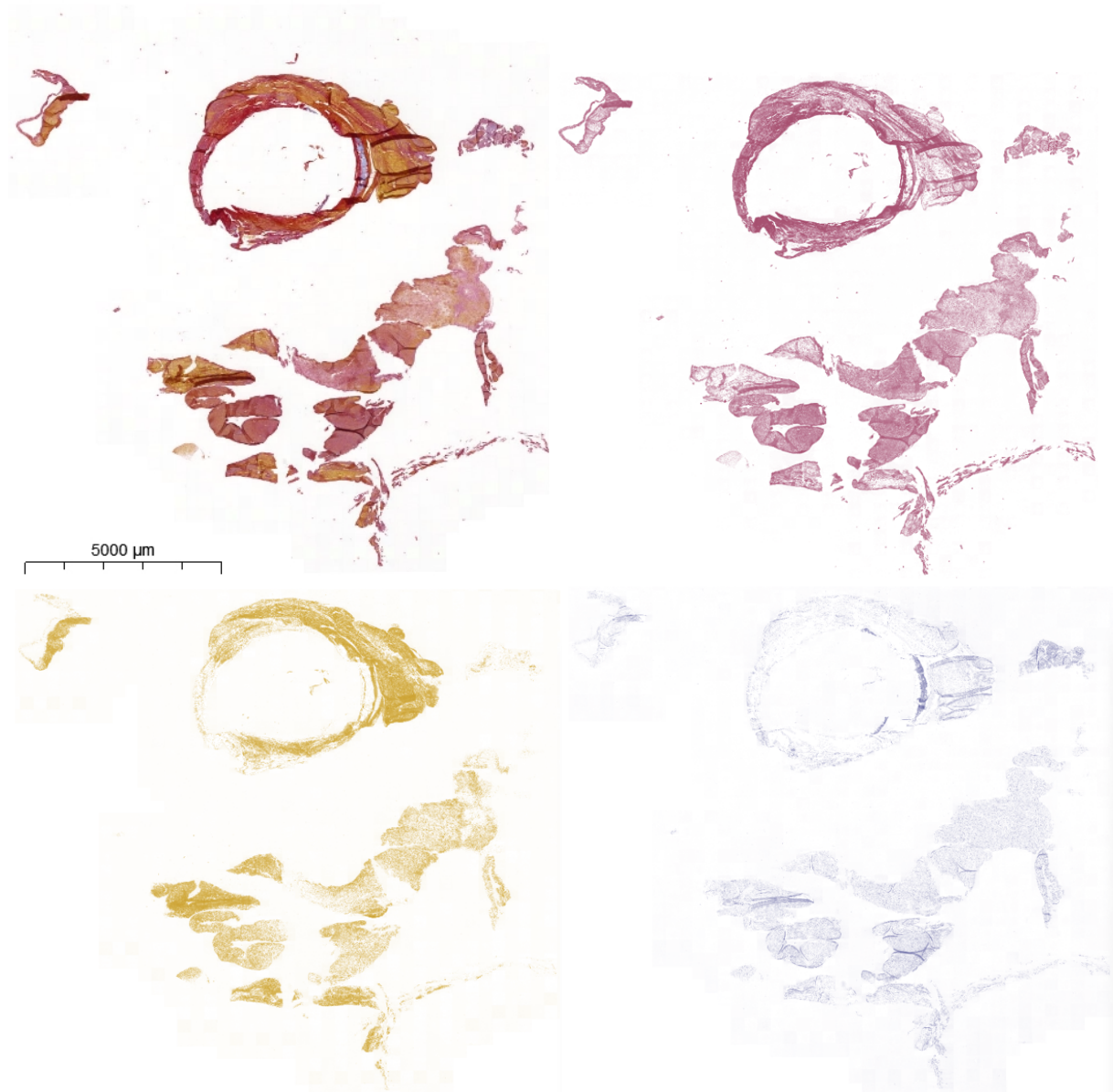


Abbildung 11: Aufspaltung in Einzelfarben mit neu definierten Farbwerten aus der kombinierten Färbung. Die Farben hier wirken etwas anders als die Farben der aufgespaltenen Teilbilder in den Abbildungen 9 und 10. Das liegt daran, dass hier neue Farbwerte verwendet wurden, welche über „Regions of Interest“ in Bildern mit kombiniertem Färbeprotokoll (also die eigentliche MSB-Färbung mit eventueller Interaktion der Farbstoffe untereinander) ausgewählt wurden. Man erkennt bei Betrachtung einzelner markanter Stellen des Thrombus eine deutlich größere Selektivität in der Erkennung und Zuordnung der Farben bei der Aufteilung in Teilbilder.

	Fläche in Pixel
rot	18565084
gelb	11101505
blau	1500224
rot, gelb, blau addiert	31166813
Bild alle Farben (Gesamter Thrombus)	28962925

Tabelle 3: Messung der gesamten Thrombusfläche, einzelne Farben mit jeweiliger erkannter Fläche und Addition der Flächen der Einzelfarben in Pixel, hier mit ähnlichen Werten der Gesamtfläche und der addierten Teilflächen.

Das minimal zu große Ergebnis der Summe aller 3 Teilbilder lässt sich u.a. durch die Falten des Schnitts erklären, welche aufgrund ihrer Farbintensität jedes Mal gemessen werden.

Sowohl bei MSB als auch bei Carstairs kommen nicht nur zwei Farben zur Anwendung, weshalb die bei HE und der Immunhistologie gewählte Taktik aus zwei Farben plus Hintergrund nicht mehr anwendbar ist. In dieser Arbeit wurden also die für die Auswertung geplanten Bestandteile und ihre zugehörigen Farbstoffe als die eine oder die zwei wichtigsten Farben sehr genau definiert und die übrigen Farbkanäle so gewählt, dass sie möglichst die anderen Bestandteile und eventuellen Hintergrund herausfiltern.

Die über „Regions of Interest“ in einem Bild definierten Farbwerte wurden nun bei anderen Bildern angewendet und bei Unstimmigkeiten eventuell angepasst. So wurden die endgültigen Farbwerte für die Auswertung festgelegt. Bei der Auswertung wurden für jedes Bild die gleichen, so ermittelten Farbwerte verwendet.

2.3.3.2 Messung von Flächen und Flächenanteilen

Nach dem Import der Bilder in ImageJ (bzw. der erweiterten Version Fiji) mit Hilfe des Bioformats-Importer-Plugins und der Aufspaltung des ursprünglichen Bildes (s. Abb. 12) in drei Farben mit Hilfe des Colour Deconvolution-Plugins (s. Abb. 11) erfolgte die

Umwandlung der farbigen RGB-Bilder¹ in 8-bit-Bilder² (Graustufen, s. Abb. 13). Nur auf den Graustufen-Bildern kann man die Helligkeitsschwellen setzen. Es erfolgte die Setzung der Helligkeitsschwellen (Set Threshold, s. Abb. 14) und Festlegung der entsprechend dunklen Bereiche als Auswahl (Create Selection, s. Abb. 15). Die Setzung der Helligkeitsschwellen kann automatisch erfolgen und muss bei manchen Bildern angepasst werden, wenn zu viel oder zu wenig Gewebe erkannt wird. Vor allem auf Bildern mit sehr wenig zu messendem Inhalt wird tendenziell vom Programm zu viel Gewebe erkannt, z.B. bei der Immunhistochemie mit vielen negativen Bereichen. Außerdem kommt es auf die Helligkeit und Kontraste der angefärbten Bereiche an, wie gut die Farben unterschieden werden können. Die Auswahl kann dann entweder in Pixeln oder bei vorher im System gespeichertem Maßstab als metrische Fläche gemessen werden. Bei der Quantifizierung der Gesamtfläche wird das Bild nicht in die einzelnen Farben aufgespalten.

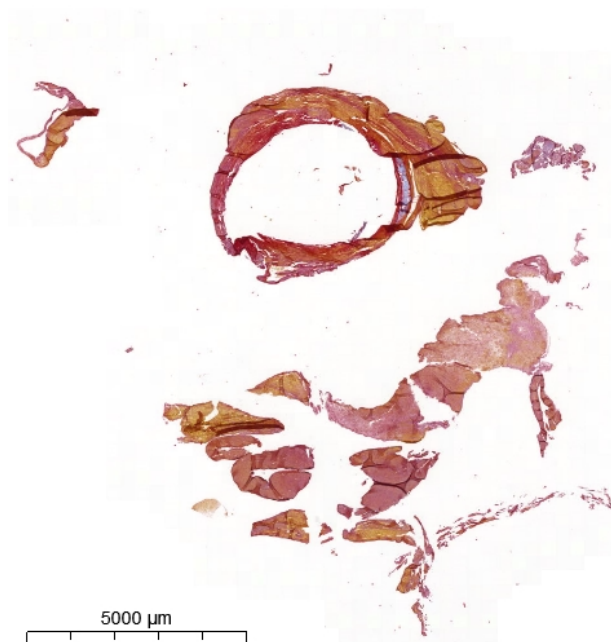


Abbildung 12: Thrombus 44A, MSB.

¹ RGB: Rot, Grün, Blau

„RGB ist ein additives Farbsystem, in dem sich alle Farben aus einem Mischungsverhältnis der drei genannten Grundfarben Rot, Grün und Blau ergeben, die der Grundfarbe Schwarz beigemischt werden. [...] Das RGB-Verfahren wird für Farbmonitore verwendet.“ (63)

² 8-bit: Farbtiefe

Maß für die Anzahl der Abstufungen eines einzelnen Farbkanals. 8-bit entspricht einer Anzahl von 256 Stufen, in diesem Fall 256 verschiedenen Grautönen. (64)



Abbildung 13: Thrombus 44A nach der Aufspaltung in die verschiedenen Farben durch das Colour Deconvolution-Plugin, links nur rote Anteile der MSB-Färbung, rechts Umwandlung in Graustufen (8-bit).



Abbildung 14: Setzen der Helligkeitsschwelle im 8-bit Bild (erkannte, also ausreichend dunkle Bereiche in rot). Werte in den Graustufen 0 bis 180 werden erkannt, alle Graustufen über 180 wurden herausgefiltert, also die Werte zwischen 181 und 255 (bei einem 8-bit Bild können 256 verschiedene Abstufungen unterschieden werden).

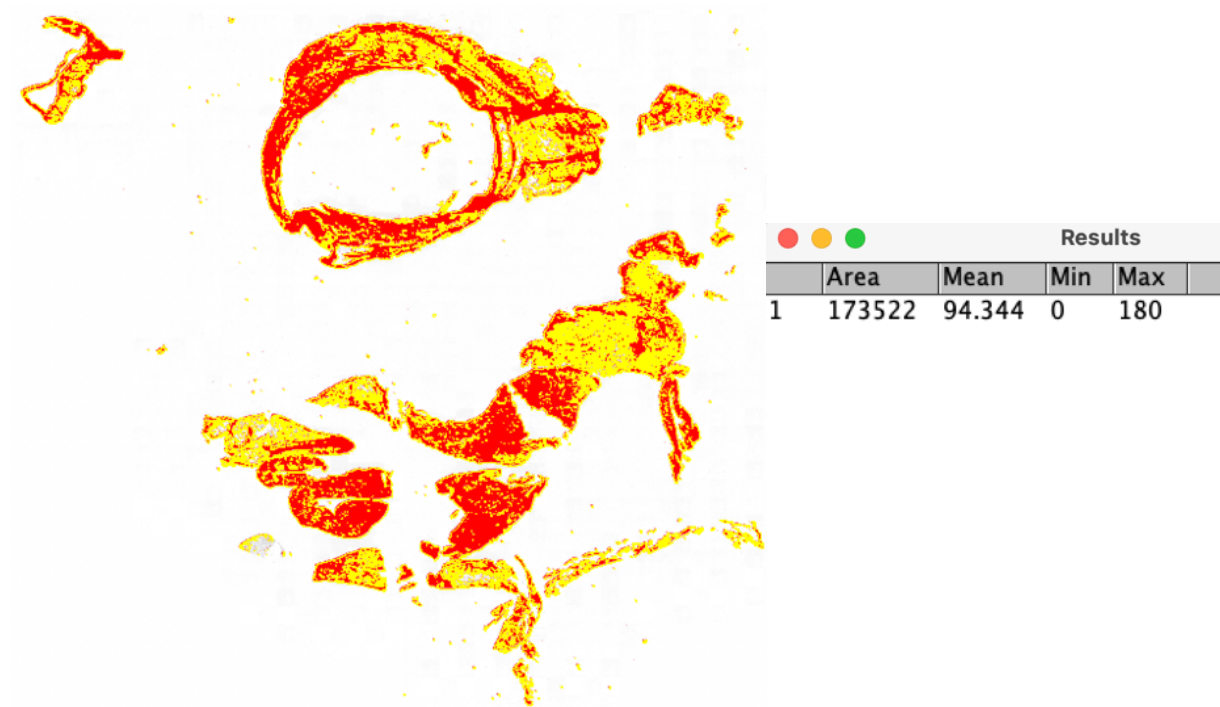


Abbildung 15: Selektion der roten Bereiche (gelb umrandet) und Ergebnisse der Quantifikation der Fläche in Pixel.

So lässt sich die Gesamtfläche des Thrombus in mm^2 und die Flächenanteile in Prozent der Gesamtfläche messen.

2.3.4 Quantifizierung der Thrombusbestandteile

Es erfolgte die immunhistologische Bestätigung der Färbeergebnisse der Übersichtsfärbungen. Zur Quantifizierung der Färbeergebnisse sind Übersichtsfärbungen nur bedingt geeignet, da die Intensität der angefärbten Strukturen nicht immer der Menge an erkanntem Material entspricht. (65) Der von Willebrand Faktor wird in keiner der Übersichtsfärbungen separat angefärbt.

Der Nachteil der Quantifikation der Immunhistologie ist die doppelte Erkennung vieler Areale, da die Strukturen in engem räumlichem Zusammenhang zueinander stehen und auf separaten Schnitten gemessen werden. Außerdem korreliert die Intensität des Färbeergebnisses nicht genau mit der Menge an Antigen, man kann aber trotzdem Aussagen über positive und negative Bereiche treffen (s. Diskussion).

Die Messung der Flächenanteile soll also nicht als absolute Maßzahl, sondern als grobe Orientierung der Mengenverhältnisse und dem Vergleich der Thromben untereinander dienen.

2.3.4.1 Carstairs Method for Fibrin and Platelets

Bei der Carstairs-Färbung fiel auf, dass sich die Unterscheidung verschiedener Blau- und Rottöne schwierig gestaltete. Im Vergleich mit der Immunhistologie fanden sich deutliche Unterschiede im erkannten Gewebe, v.a. hinsichtlich der Thrombozyten und des Fibrins.

Im folgenden Thrombus (s. Abb.16) wird eindeutig zu wenig Fibrin erkannt, welches sich eigentlich leuchtend rot darstellen sollte.

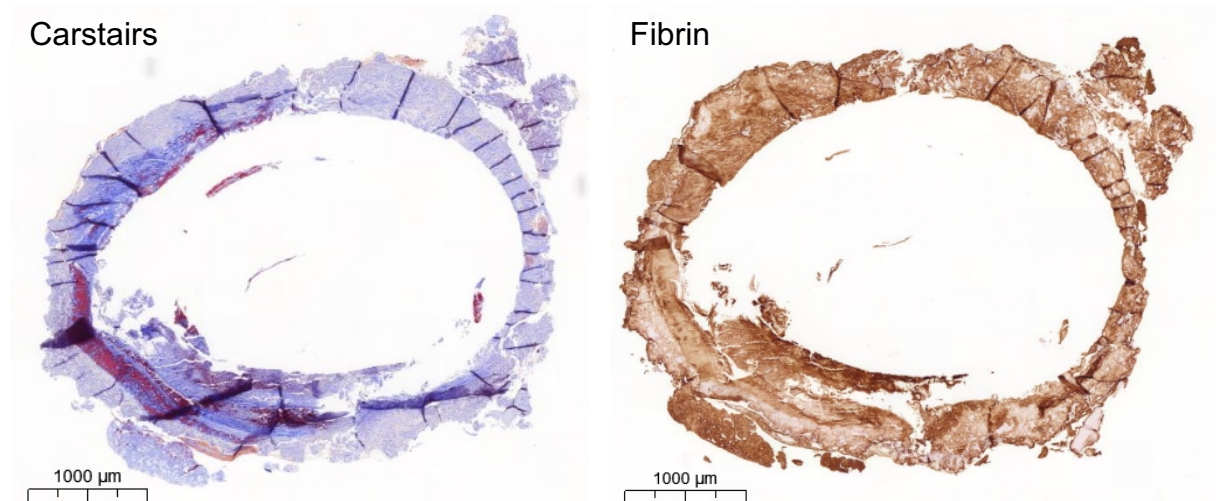


Abbildung 16: Vergleich der Carstairs-Färbung (links) mit der Immunhistologie für Fibrin, im rechten Bild in der Immunhistologie stellt sich Fibrin braun dar. In der Carstairs-Färbung des linken Bildes wurden einige Bereiche in der Mitte des Ringes unten links rot angefärbt. Diese Bereiche sind in der Immunhistochemie zwar leicht positiv, allerdings nicht so intensiv angefärbt wie andere Bereiche des Rings, welche in der herkömmlichen Histochemie blau dargestellt werden. Es liegt also ein Hinweis auf eine Darstellung des Fibrins in verschiedenen Farben vor, wahrscheinlich je nach dem Alter der Strukturen (s. Diskussion).

2.3.4.2 Martius Scarlet Blue

Bei der MSB-Färbung gibt es drei verschiedene Farben, in welchen sich Fibrinogen/Fibrin präsentieren kann, je nach Alter der Strukturen. Da auch andere Thrombusbestandteile teilweise in diesen Farben erscheinen, war es unmöglich, bei einer automatisierten Auswertung genaue Aussagen über die Flächenanteile aller Bestandteile zu treffen.

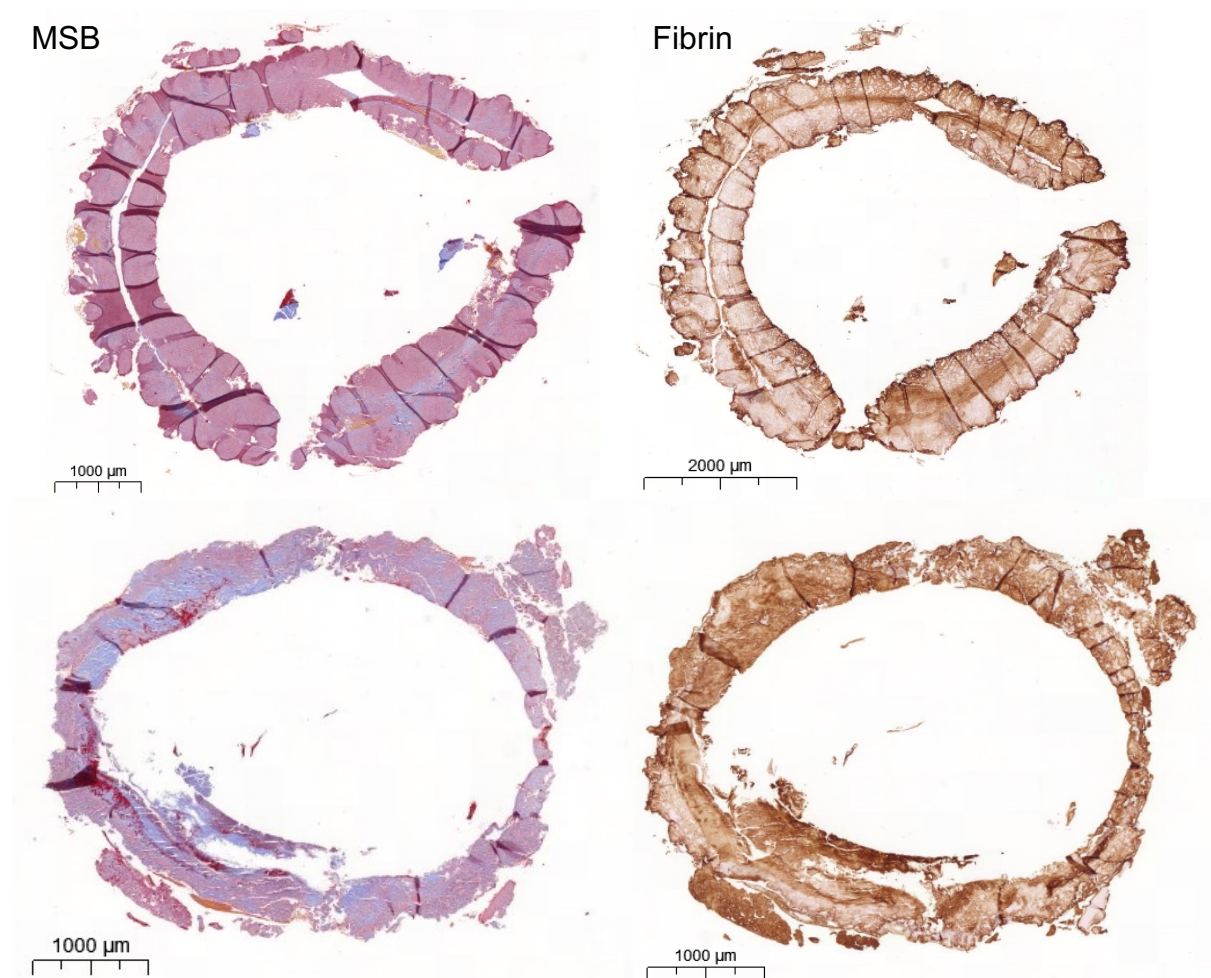


Abbildung 17: P45A (oben) und P22A (unten), Vergleich der MSB-Färbung (jeweils links) mit der Immunhistologie für Fibrin (jeweils rechts).

Das rötliche Erscheinungsbild der MSB-Färbung täuscht hier, in der Immunhistologie wird ein deutlich kleinerer Anteil des Thrombus als Fibrin erkannt (s. Abb.17). Das Fibrin stellt sich hier tatsächlich eher blau dar, was einen Hinweis auf ein höheres Alter bestimmter Fibrin-Strukturen sein kann.

2.3.4.3 Erythrozyten

Die Erkennung der Erythrozyten konnte gut durch deren charakteristische Morphologie überprüft werden und erfolgte zudem im Vergleich in den beiden Färbungen MSB und Carstairs.

2.3.4.4 Schlussfolgerung

Es ergab sich folgende Strategie für die Quantifizierung: Erythrozyten werden in Carstairs und MSB quantifiziert und daraus der Mittelwert gebildet. Thrombozyten (CD42b), Fibrinogen, Fibrin und der von Willebrand Faktor werden in der Immunhistologie quantifiziert.

2.3.5 Einteilung der Thromben in zwei Gruppen

Zum Vergleich der Thromben untereinander erfolgte die Einteilung der Thromben in die zwei farblichen Gruppen „Rot“ und „Weiß“. Die makroskopische Einteilung erfolgte anhand der Bilder vom Pumpenausbau als Blickdiagnose, je nachdem ob der Thrombus eher hell erschien (Gruppe „Weiß“) oder dunkel bis rötlich (Gruppe „Rot“). Die makroskopische Klassifizierung erfolgte ausschließlich bei den Thromben an Ort A, da hier für alle Thromben Bilder vom Pumpenausbau in ausreichend guter Qualität verfügbar waren. Die Thromben an den Orten B und C waren u.a. durch ihre Lage in der Pumpe oft nicht ausreichend gut zu sehen und wurden somit makroskopisch nicht in Gruppen eingeteilt. Wenn ein Thrombus makroskopisch nicht eindeutig einer Gruppe zuzuordnen war, wurde er als „Mix“ bezeichnet.

In der Histologie wurden die Übersichtsfärbungen Carstairs und MSB herangezogen. Wenn ein überwiegend blaues Bild in der Carstairs-Färbung sich durch wenige gelbe Erythrozyten in der MSB-Färbung bestätigen ließ, wurde der Thrombus als „Weiß“ klassifiziert, bei eher erythrozytenreichen, in der MSB-Färbung überwiegend gelben Thromben erfolgte die Zuordnung zur Gruppe „Rot“. In der histologischen Klassifizierung erfolgte die Einteilung aller Thromben von den Orten A, B und C in die beiden Gruppen. Diese Einteilung wurde auch für weitere, gruppenabhängige Analysen verwendet.

Die histologische Blickdiagnose wiederum konnte durch die Quantifizierungsergebnisse, also insbesondere die Messung der Flächenanteile der Erythrozyten und der Thrombozyten bestätigt werden (s. 3.4.2).

2.3.6 Statistische Analyse

Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit Microsoft Excel. Neben der deskriptiven Statistik mit Erstellung verschiedener Diagramme wurden zur Berechnung des P-Werts der einseitige und der beidseitige heteroskedastische Student's T-Test verwendet und die Korrelationskoeffizienten berechnet. P-Werte unter 0,05 wurden als signifikant gewertet. Korrelationskoeffizienten galten ab $\pm 0,5$ als Indikator für zwei hoch miteinander korrelierte Variablen.

3 Ergebnisse

Insgesamt wurden aus 13 Pumpen 22 Thromben gewonnen: 12 Thromben an Ort A, 6 Thromben an Ort B und 4 Thromben an Ort C (s. Tab. 4 und Abb. 6).

Lokalisation (n=22)	n (%)
A: Lagerung, Achse des Rotors	12 (54,5%)
B: Äußerer Rotor und Gehäuse	6 (27,3%)
C: Auslass, im Ausflussrohr	4 (18,2%)

Tabelle 4: Lokalisationen (A, B und C) der Thromben und dort gefundene Anzahl. Die genaue Lokalisation der Orte ist in Abbildung 6 dargestellt.

Der Thrombus P42A wurde von der Beurteilung ausgeschlossen, da sich hier nicht die typische Ringstruktur zeigte und damit sowohl Größe als auch fehlende räumliche Einordnung die Vergleichbarkeit einschränkten (s. Abb. 18 und 19).

Alle Pumpen außer eine (P24) wiesen einen Thrombus an Ort A auf (s. Tab. 5). Die Anzahl der Thromben pro Pumpe variierte zwischen einem und drei. In allen untersuchten Pumpen wurden Thromben gefunden.

3.1 Makroskopischer und mikroskopischer Überblick

Bereits in der makroskopischen Betrachtung lassen sich Aussagen über die Thromben treffen. Die Thromben an Ort A besitzen nach der Entfernung aus dem System eine charakteristische ringförmige Struktur, in deren Mitte vor dem Ausbau aus der Pumpe eine Kugel saß, welche das Verbindungsglied zwischen Rotor und Gehäuse der Pumpe bildete (s. Abb. 18 und 19). Die Thromben P17A, P23A und P44A wiesen fadenartige Ausläufer um den eigentlichen Ring herum auf. Diese von der Ringstruktur ausgehenden Strukturen wickelten sich teilweise um die Rotorstreben oder lagen locker auf (z.B. P23 und P44 in Abb. 18). Bei anderen Thromben kann man bereits mit bloßem Auge eine Schichtung des Ringes erkennen (z.B. P13 in Abb. 18). Außerdem

kann man die Thrombusgröße und Farbe makroskopisch gut einordnen. P11A und P22A können als kleinste Thromben identifiziert werden.

Pumpennummer	Anzahl der Thromben	Orte der Thromben
P11	1	A
P13	2	A, C
P17	2	A, C
P18	1	A
P21	2	A, C
P22	1	A
P23	1	A
P24	1	C
P25	2	A, B
P29	1	A
P42	2	A, B
P44	3	A, B, B
P45	3	A, B, B

Tabelle 5: Übersicht über die Anzahl und Fundorte der Thromben in den analysierten Pumpen.

In allen Pumpen außer P24 zeigte sich ein Thrombus an Ort A, fünf Pumpen zeigten ausschließlich einen Thrombus an Ort A und sieben der dreizehn untersuchten Pumpen zeigten Thromben an mehreren Orten gleichzeitig.

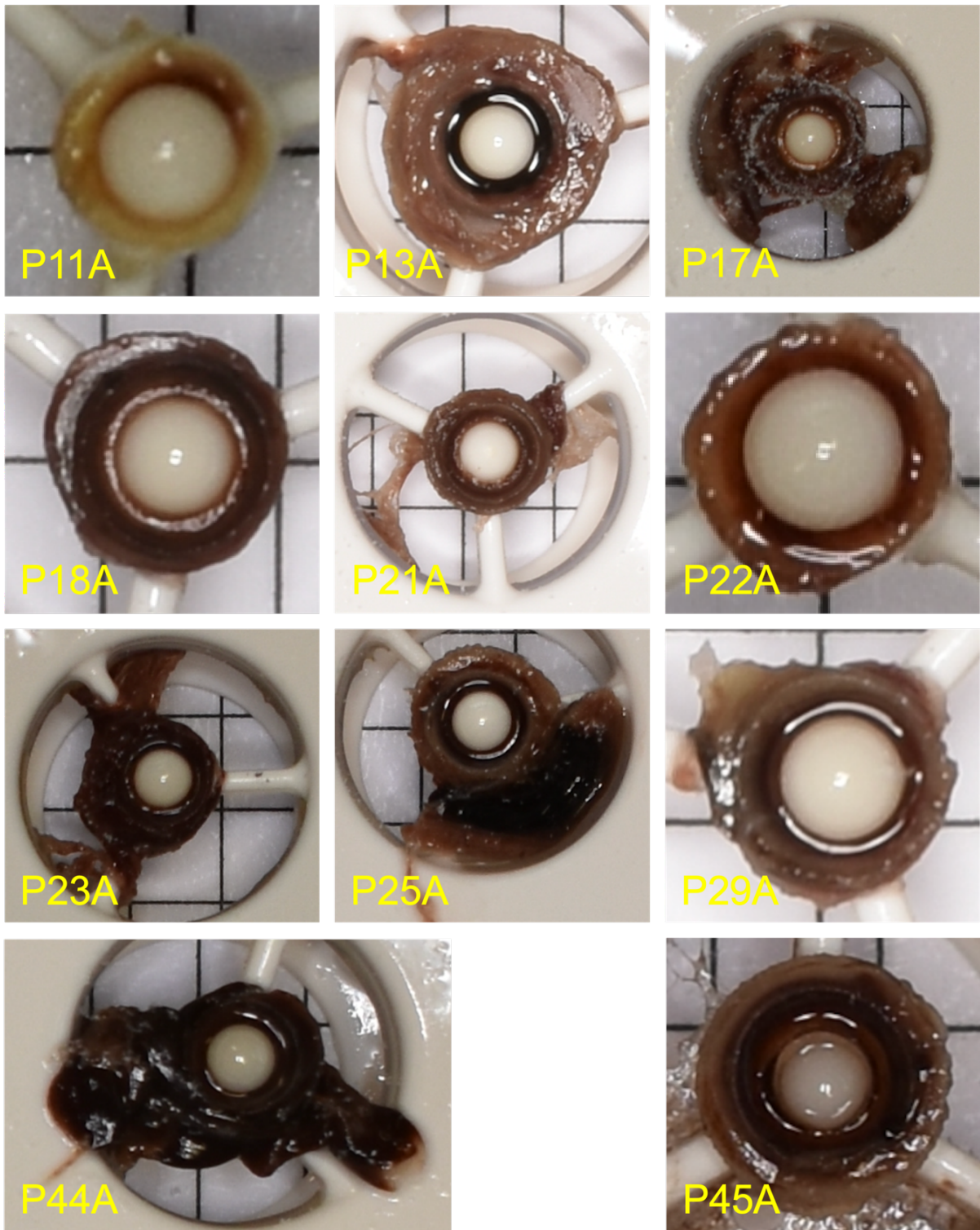
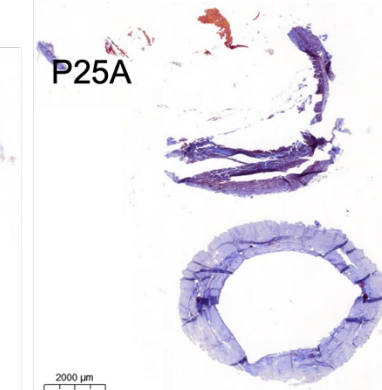
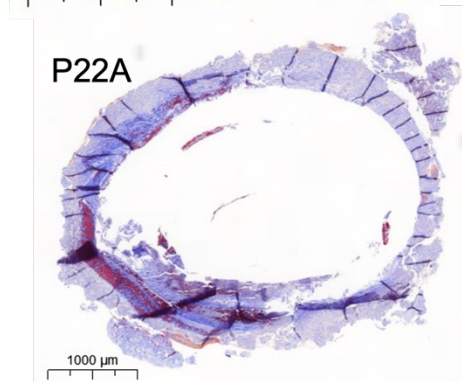
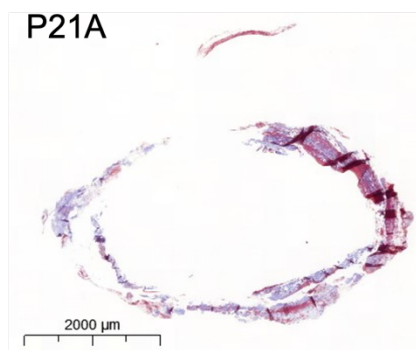
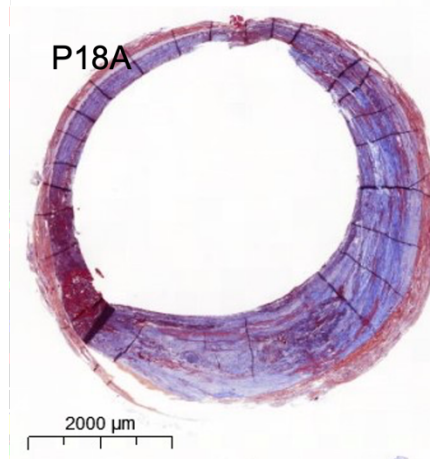
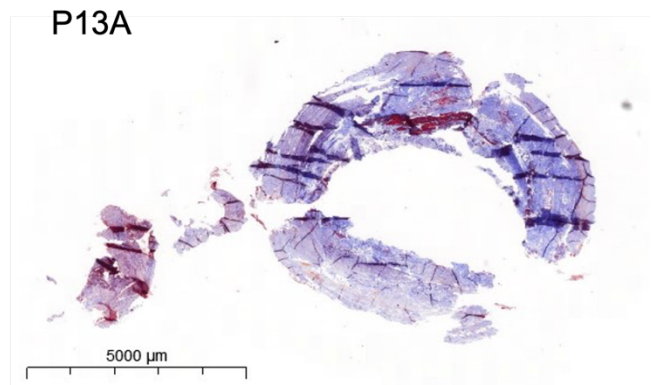
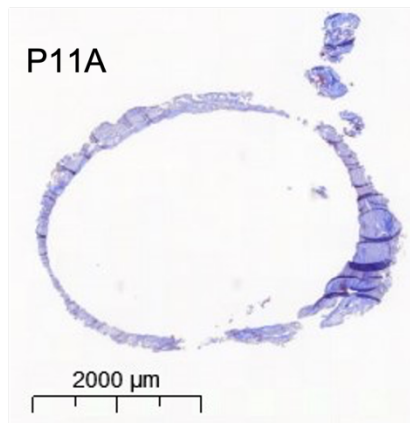


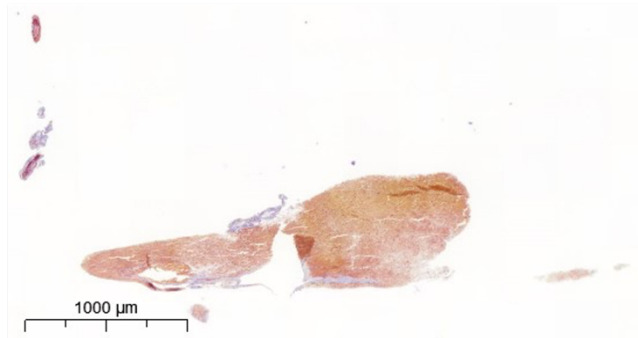
Abbildung 18: Makroskopische Betrachtung der Thromben an Ort A vor dem Ausbau. Jeweils unterschiedliche Vergrößerungen, ein Kästchen auf der Unterlage entspricht 5mm.



P29A



P42A



P44A



P45A

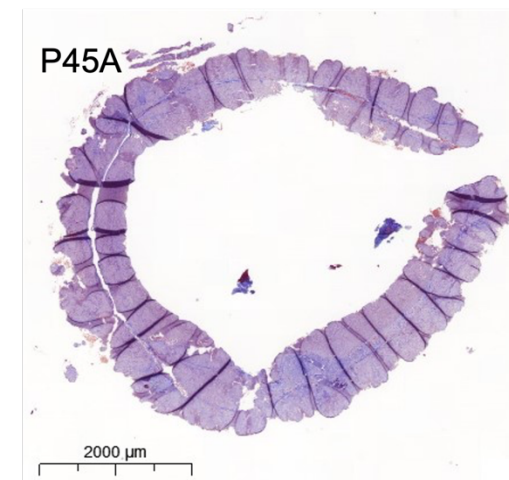


Abbildung 19: Übersicht über alle Thromben an Ort A, Carstairs.

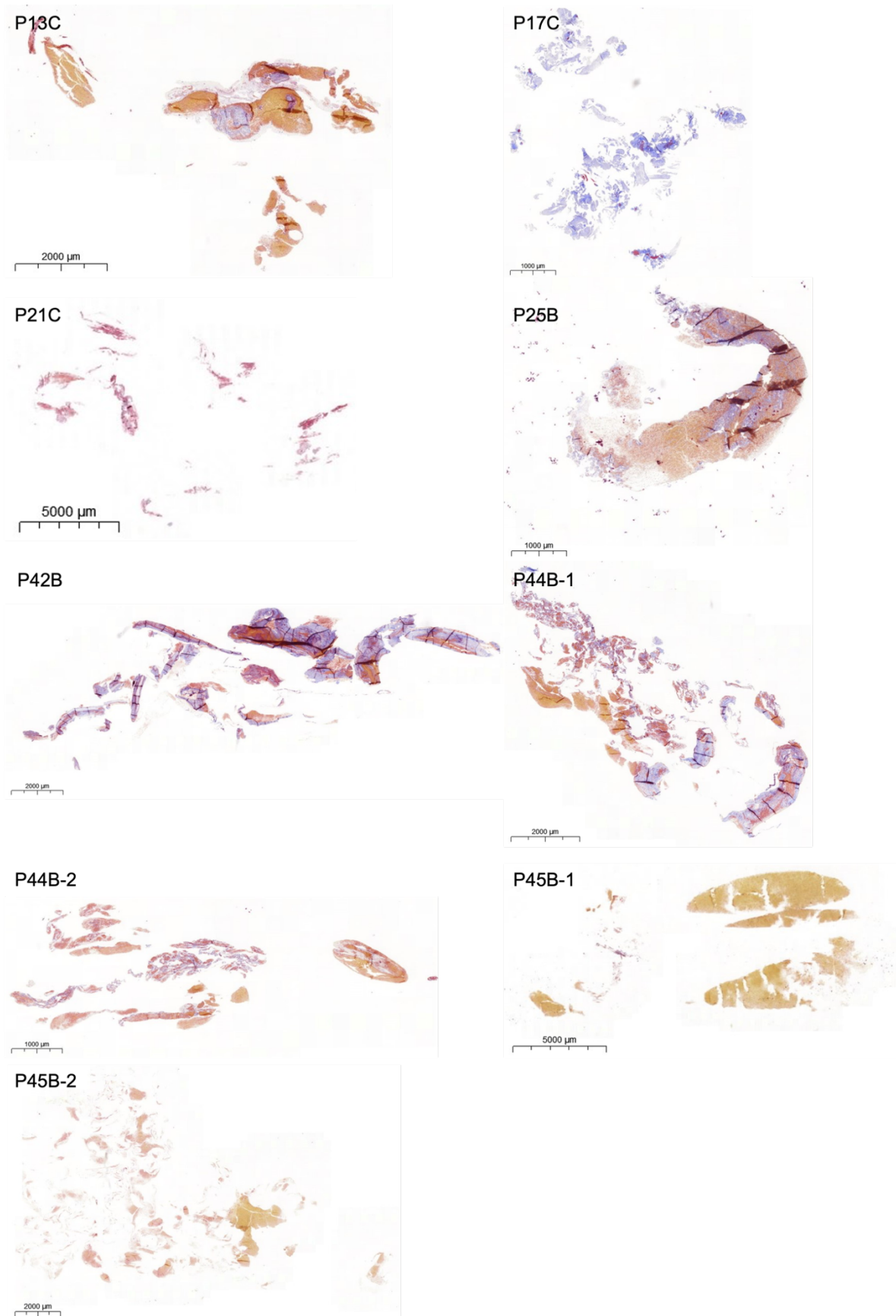


Abbildung 20: Übersicht über Thromben an den Orten B und C, Carstairs. P24C ist der Übersicht halber separat aufgeführt.

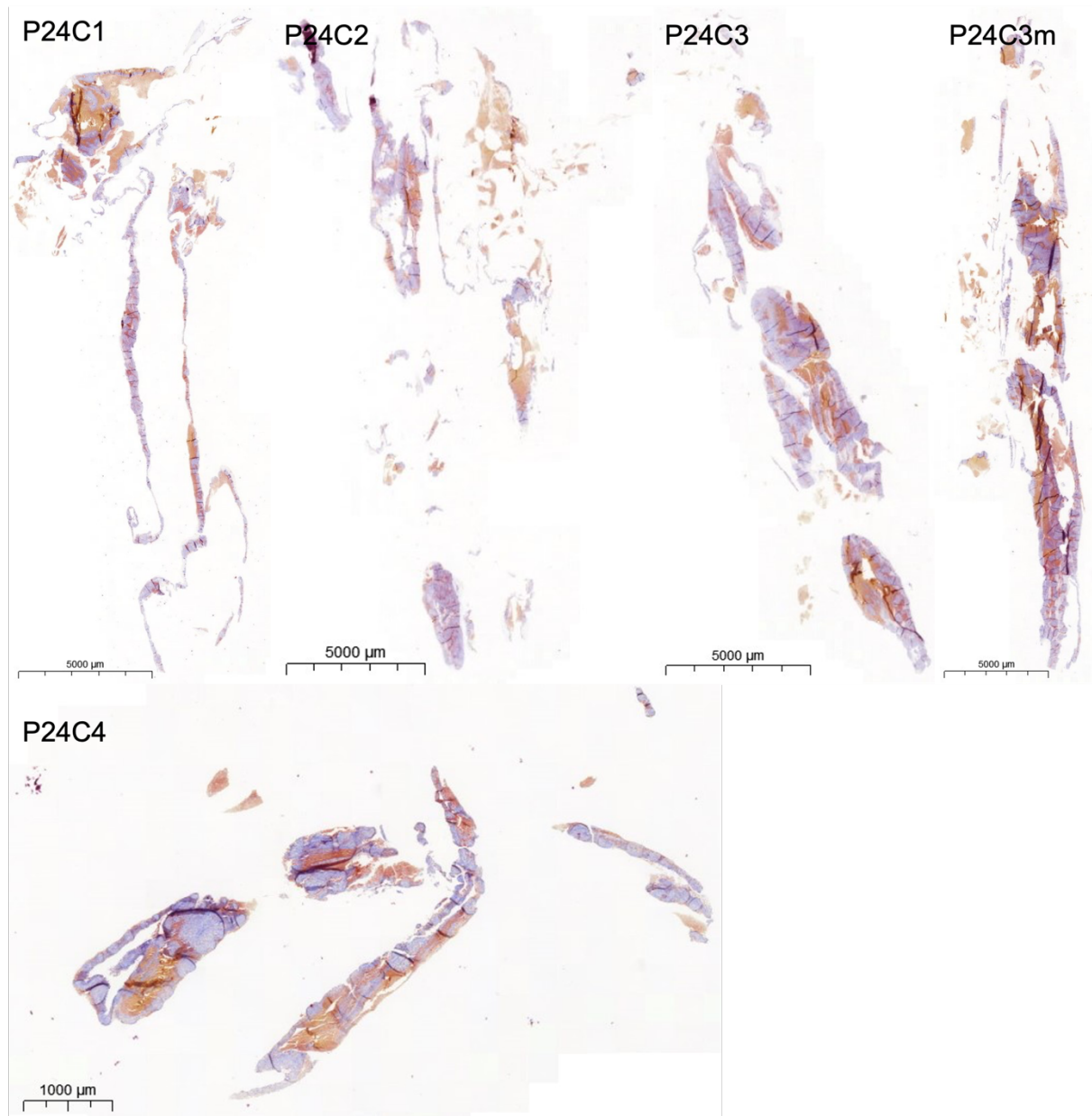


Abbildung 21: Übersicht über alle 5 Teile des Thrombus P24C, Carstairs. Der Thrombus P24C musste aufgrund seiner Größe auf 5 Paraffinblöcke verteilt werden, es handelte sich hierbei um einen langen Thrombus, welcher an Ort C stromabwärts in das Schlauchsystem ragte. P24C1 ist dabei der erste, anheftende Abschnitt und P24C4 der letzte. P24C3m befand sich medial des Abschnittes P24C3.

3.2 Beobachtungen bei der Mikroskopie

Im Folgenden wird auf die histologischen Färbungen und die allgemeinen Beobachtungen in der Mikroskopie eingegangen, welche sich unabhängig vom Fundort der Thromben in der Pumpe zeigten.

3.2.1 Beurteilung der Färbeergebnisse

Die Beurteilung der Übersichtsfärbungen beinhaltete insbesondere die Fragestellung, ob die einzelnen Thrombusbestandteile gut dargestellt und einfach voneinander zu unterscheiden waren.

3.2.1.1 Sirius-Resorcin-Fuchsin-Färbung

In der Sirius-Resorcin-Fuchsin-Färbung zeigte sich ein sehr diffuses Farbgemisch und keine eindeutige Reaktion sowohl für Kollagen als auch für elastische Fasern (s. Abb. 22). Die Färbung wurde aufgrund der unspezifischen Ergebnisse von der Beurteilung ausgeschlossen.

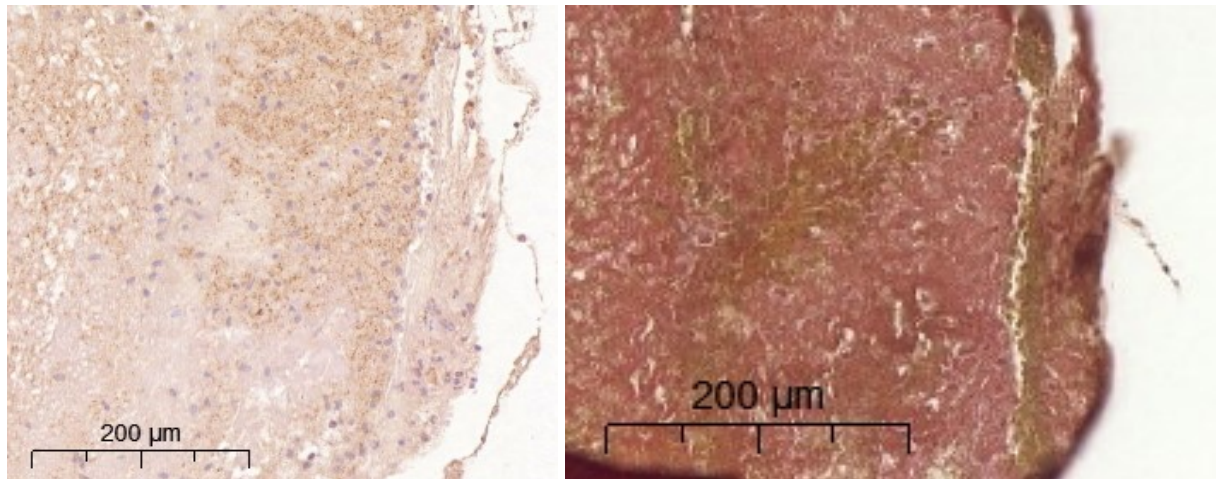


Abbildung 22: P44B-1, links Immunhistologie für Kollagen I, rechts Sirius-Resorcin-Fuchsin-Färbung. In der Histochemie (rechts) zeigen sich flächige, rötliche, diffuse Ergebnisse im Gegensatz zu den punktuellen Reaktionen in der Immunhistologie (links).

3.2.1.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die HE-Färbung lieferte eindeutige Ergebnisse bezüglich der Kernfärbung (s. Abb. 24), in den stark faserhaltigen Bereichen der Thromben entstand ein diffuses, blasslila gefärbtes Gemisch beider Farbbestandteile. Außerdem fanden sich vereinzelt stark eosinophil gefärbte Bereiche, welche in der Immunhistologie keiner anderen Färbung eindeutig zugeordnet werden konnten (s. Abb. 23).

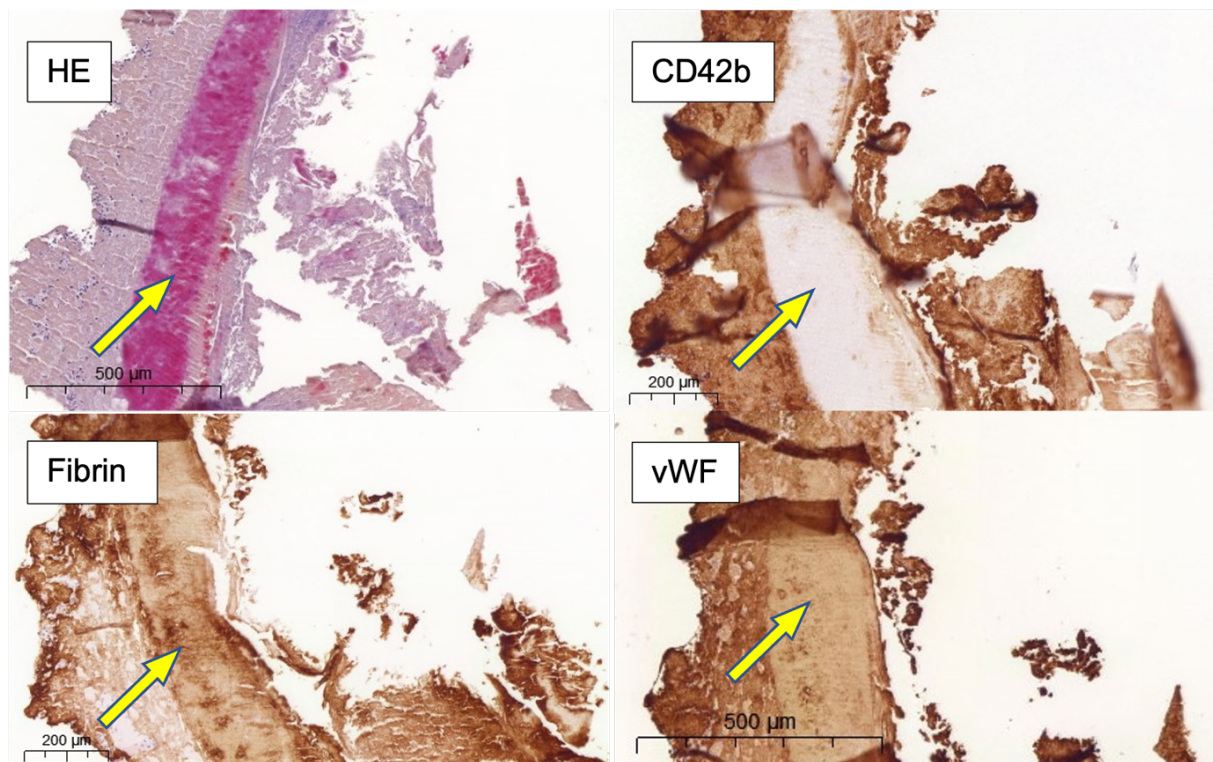


Abbildung 23: P22A; Stark eosinophile, verwaschene Bereiche in der HE-Färbung, mit diffusen Ergebnissen in der Immunhistologie an der gleichen Stelle.

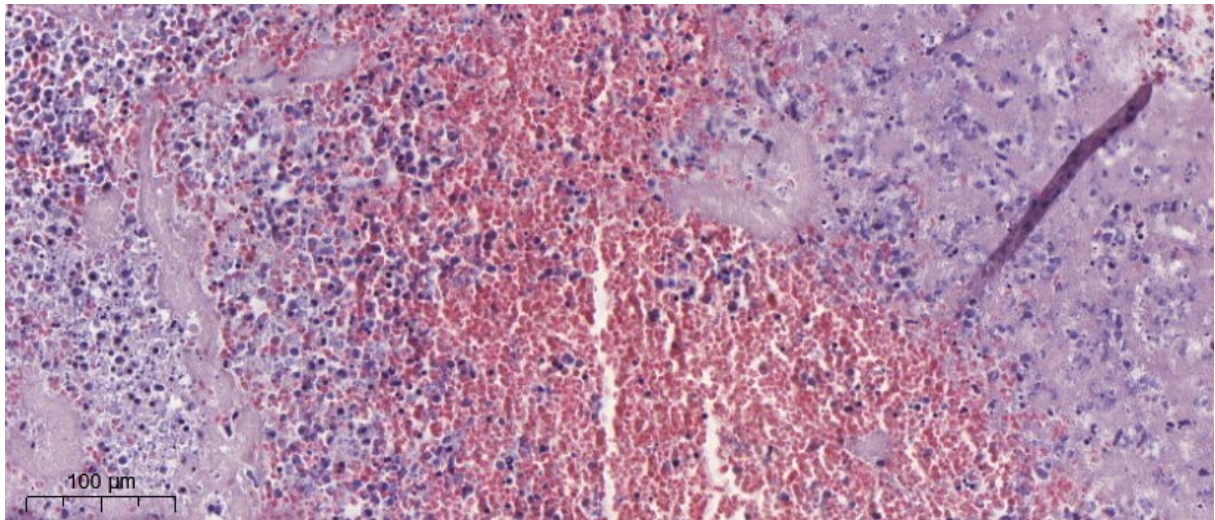


Abbildung 24: P24 (D3), Darstellung von Erythrozyten und kernhaltigen Zellen neben faserhaltigen Bereichen in blassem Lilaton. Die Zellkerne sind deutlich untereinander und gegenüber ihrer Umgebung abzugrenzen.

3.2.1.3 Carstairs und Martius-Scarlet-Blue

Carstairs und MSB boten beide ein gutes Färbeergebnis, welches durch die Immunhistologie verifiziert werden konnte. In der Carstairs-Färbung kann man gut die thrombozytenreichen Bereiche erkennen, wohingegen in der MSB-Färbung das Fibrin oft in leuchtendem Rot gut zu erkennen ist. Feine Netze bzw. Fasern und kleine Strukturen wie kleine Thrombozytenansammlungen oder feine Fibrinnetze sind in der Immunhistologie deutlich einfacher zu identifizieren als in den histochemischen Färbungen (s. Abb. 25).

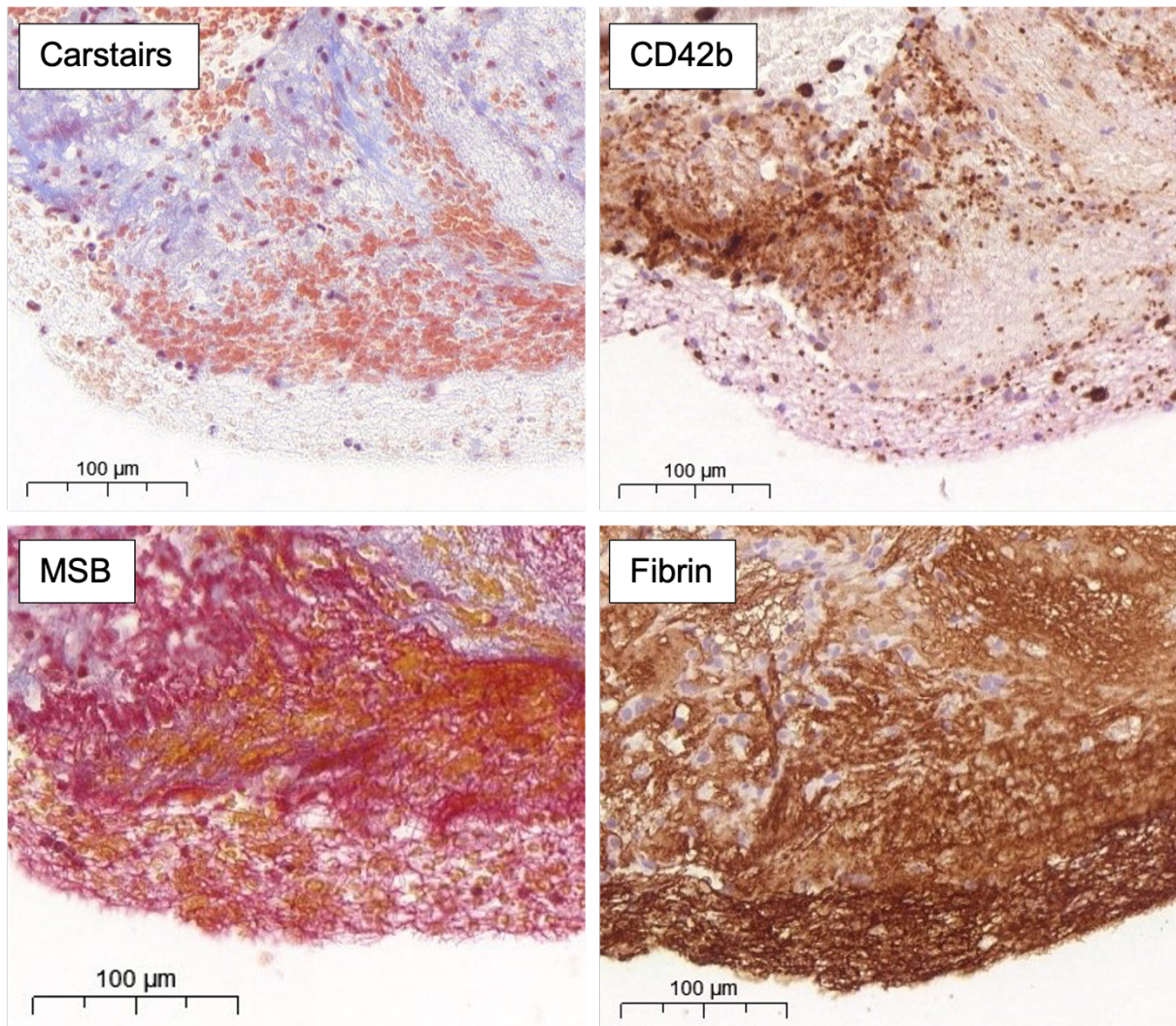


Abbildung 25: P13C, Gleiche Stelle in vier unterschiedlichen Färbungen. In den oberen zwei Bildern kann man erkennen, dass die Bereiche, welche in Carstairs hellblau angefärbt sind, in der Immunhistologie für CD42b positiv sind. Bei kleineren Thrombozytenansammlungen jedoch zeigt sich ein deutlich spezifischeres Ergebnis in der Immunhistologie und die entsprechenden Bereiche in der Carstairs-Färbung sind negativ. Fibrin erschien in der Carstairs-Färbung bei den dargestellten lockeren Netzen falsch negativ, wobei für die gleichen Bereiche in der MSB-Färbung leuchtend rote Netze dargestellt wurden, welche sich durch die Immunhistologie bestätigen ließen.

3.2.2 Kollagen

In der Carstairs-Färbung werden Thrombozyten hellblau und Kollagen leuchtend blau dargestellt. Da diese beiden Blautöne nicht immer einfach zu unterscheiden sind, erfolgte die immunhistologische Färbung mit Antikörpern gegen Kollagen I und III. In der Sirius-Resorcin-Fuchsin-Färbung zeigten sich diffuse Ergebnisse (s. Abb. 22), ein zusätzlicher Grund für die immunhistologische Kollagen-Färbung.

Kollagen I zeigte leichte, punktförmige Ergebnisse in Kolokalisation mit CD42b, CD31 und CD45 (s. Abb. 26).

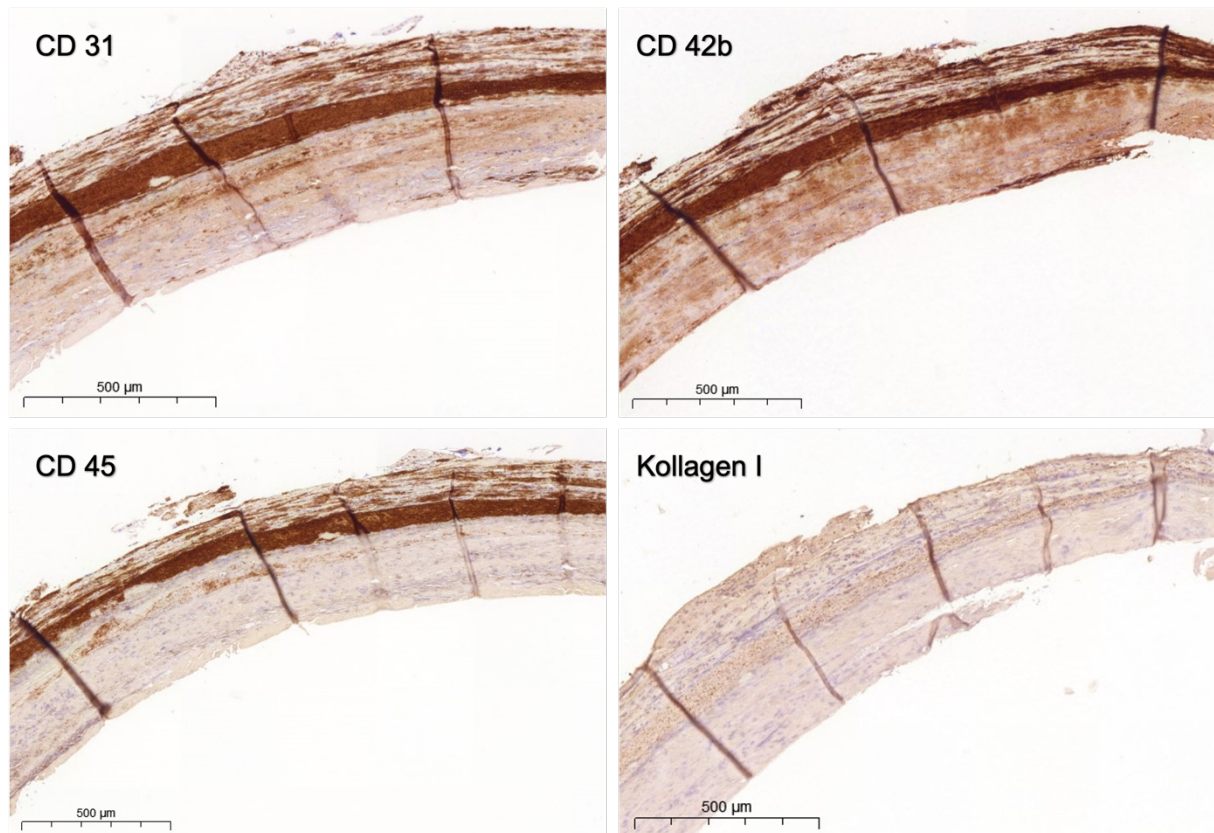


Abbildung 26: P18A, Kolokalisation von Kollagen I mit CD31, CD42b und CD45.

In zwei Pumpen (P44 und P45) zeigt sich ein anderes Verteilungsmuster der Antikörper gegen Kollagen I und III. Kollagen I ist in den anderen Thromben punktförmig verteilt und kolokalisiert mit CD31, CD42b und CD45, diese Kolokalisation lässt sich in den Pumpen 44 und 45 nicht darstellen. Kollagen III war in den anderen Pumpen nie zu sehen. In den Pumpen 44 und 45 findet sich Kollagen I und Kollagen III in mehrkernigen Riesenzellen im ganzen Thrombus verteilt (s. Abb. 27). Andere Färbungen, hier exemplarisch Fibrin, sparen diese Bereiche eindeutig aus. Nach der Entblindung stellte sich heraus, dass beide Pumpen von der gleichen Patientin stammten.

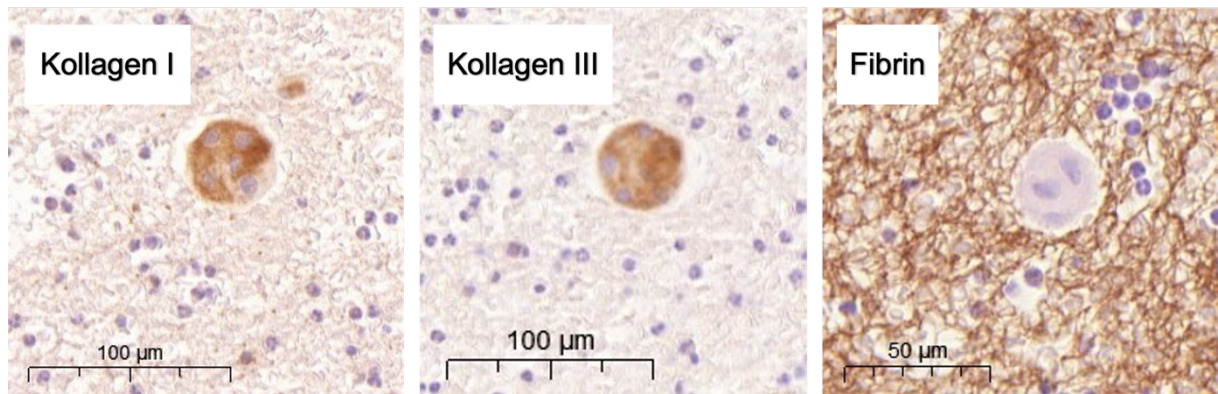


Abbildung 27: P44A, Riesenzellen in der Immunhistologie.

3.2.3 Kolokalisationen

Bei der Betrachtung der Thromben zeigten sich wiederholt die gleichen Kolokalisationen der Thrombusbestandteile in der Immunhistochemie (s. Abb. 28 und 29). Zum einen fanden sich CD31, CD42b und CD45 nebeneinander und zum anderen fanden sich Fibrinogen, Fibrin und von Willebrand Faktor zusammen. Der von Willebrand Faktor zeigte zudem häufig Kolokalisationen mit den anderen Färbungen, in vielen Schnitten war er ubiquitär zu finden.

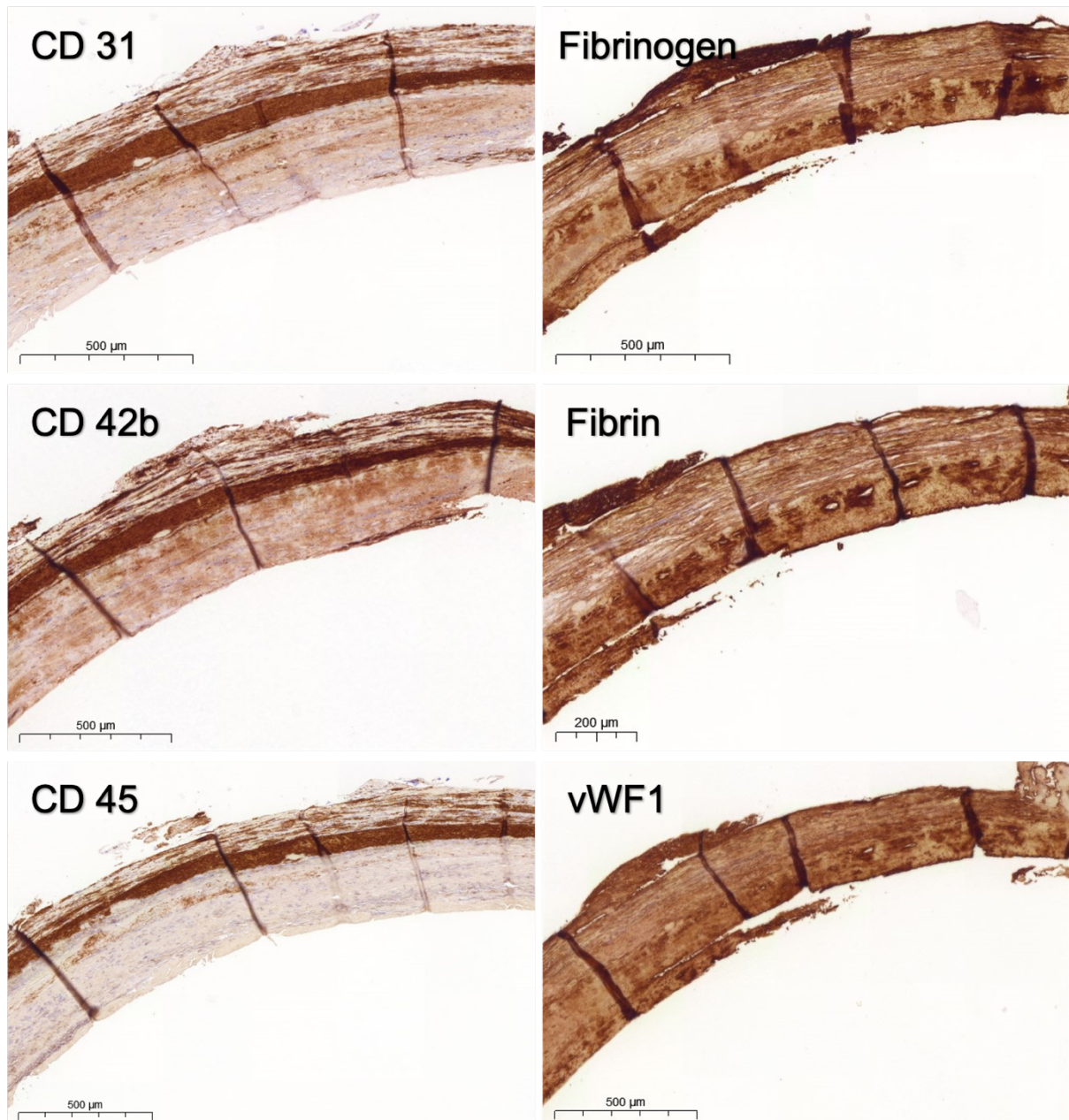


Abbildung 28: Kolokalisationen in P18A. Links erkennt man die gleiche Verteilung der Antikörper gegen CD31, CD42b und CD45. Rechts sind Fibrinogen und Fibrin ähnlich verteilt und darunter ist der von Willebrand Faktor in diesem Ausschnitt ubiquitär zu finden.

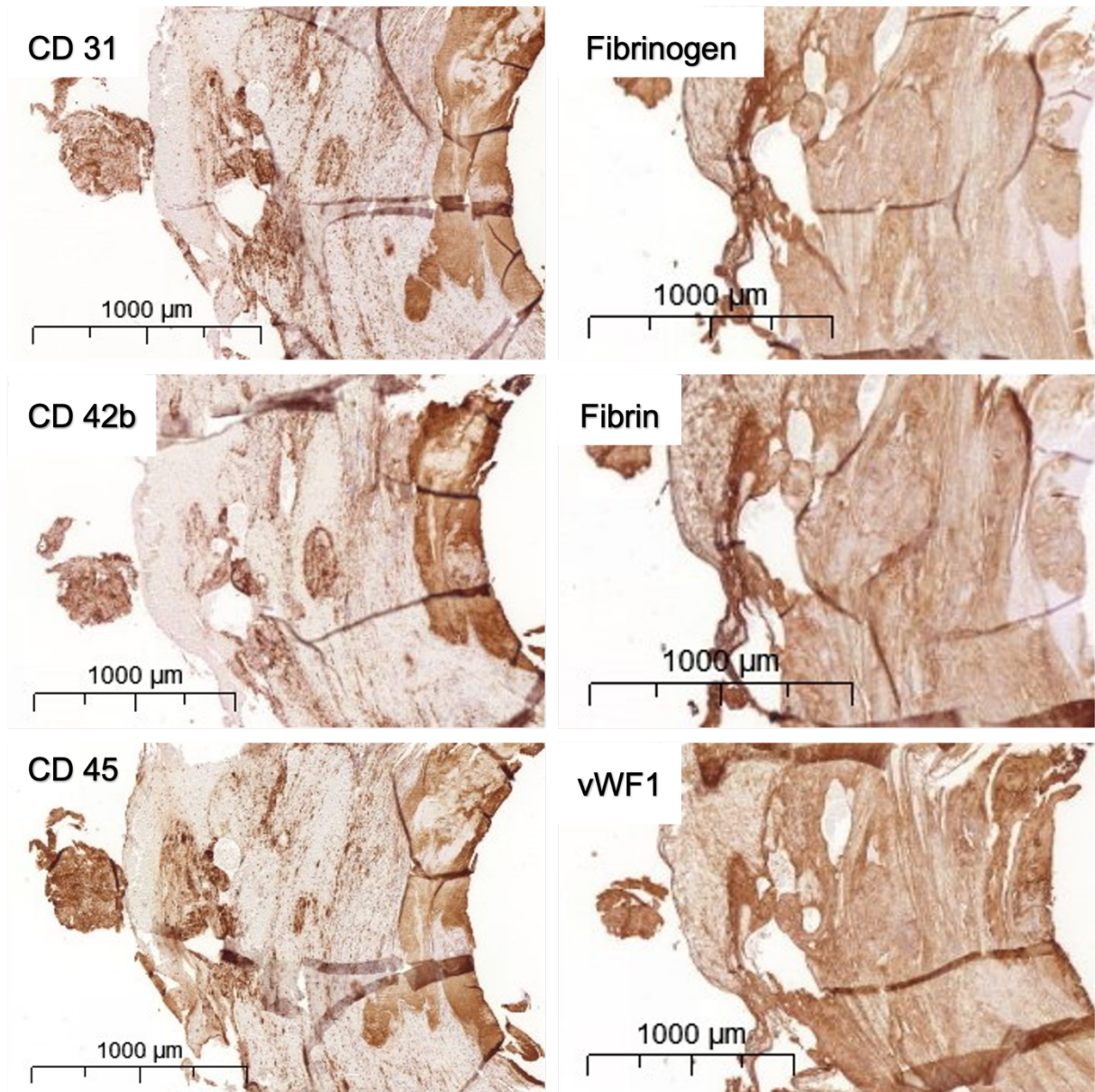


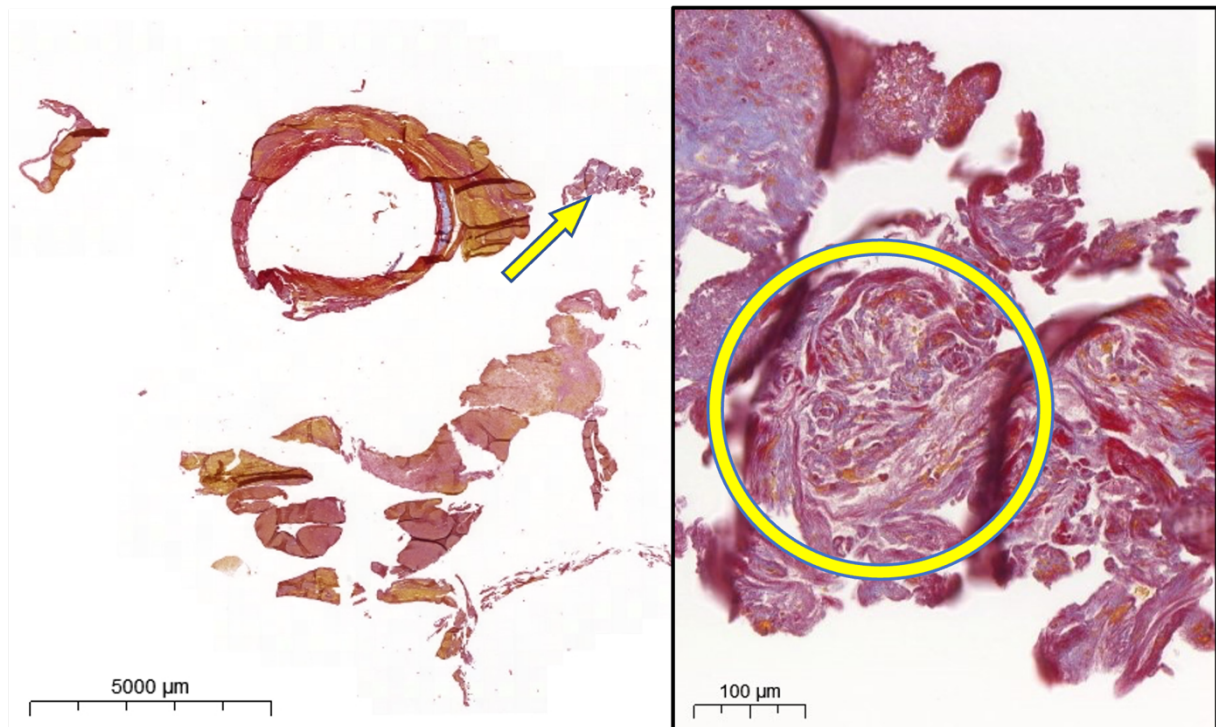
Abbildung 29: Kolokalisationen in P23A. Links sind CD31, CD42b und CD45 ähnlich verteilt, wobei minimale lokale Unterschiede in der Färbeintensität bestehen. Fibrinogen und Fibrin belegen andere Bereiche als die Färbungen gegen CD31, CD42b und CD45. Der von Willebrand Faktor ist kolokalisiert mit Fibrin und Fibrinogen und ist zusätzlich in einigen weiteren Gebieten positiv. Er ist hier jedoch nicht ubiquitär vorhanden.

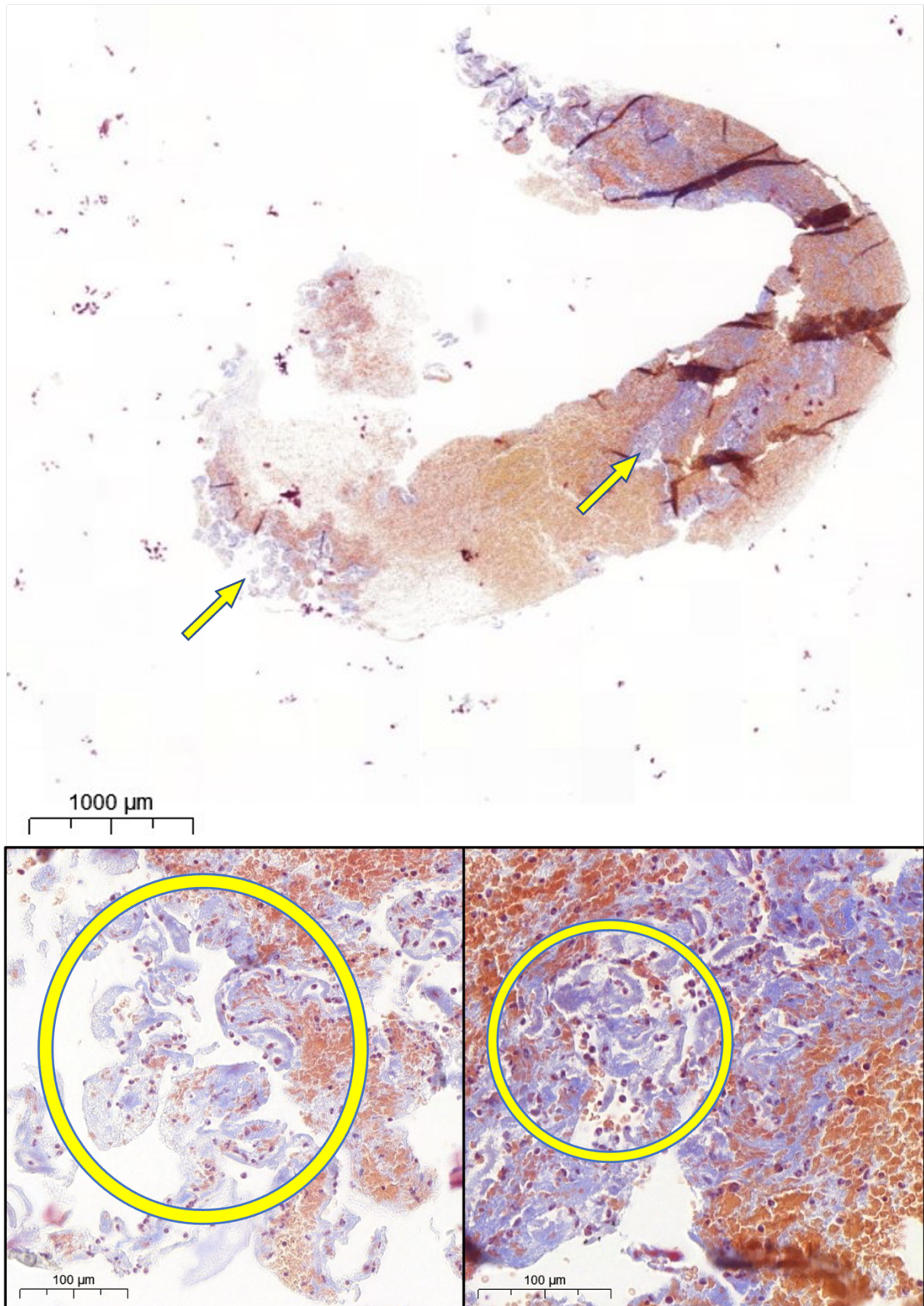
3.2.4 Besondere morphologische Strukturen

Unabhängig vom Ort fanden sich in den Thromben zwei häufig vorkommende morphologische Kriterien, welche im Folgenden beschrieben werden. Hierbei handelt es sich um verwirbelte Strukturen und die Bildung von Rissen und Lakunen innerhalb der Thromben.

3.2.4.1 Wirbel

Verwirbelte Strukturen stellten einen auffälligen Bestandteil der Thromben dar. Insbesondere bei den Thromben mit vielen flottierenden Bestandteilen an Ort A, den Randgebieten der dichten Thromben an Ort A und den Thromben an den Orten B und C war dieses morphologische Kriterium häufig zu finden. Die verwirbelten Bereiche befanden sich sowohl mittig als auch randständig und in unterschiedlicher Dichte (s. Abb. 30). Die Wirbel selbst sind erythrozytenarm, dazwischen können jedoch Erythrozyten verstreut sein.





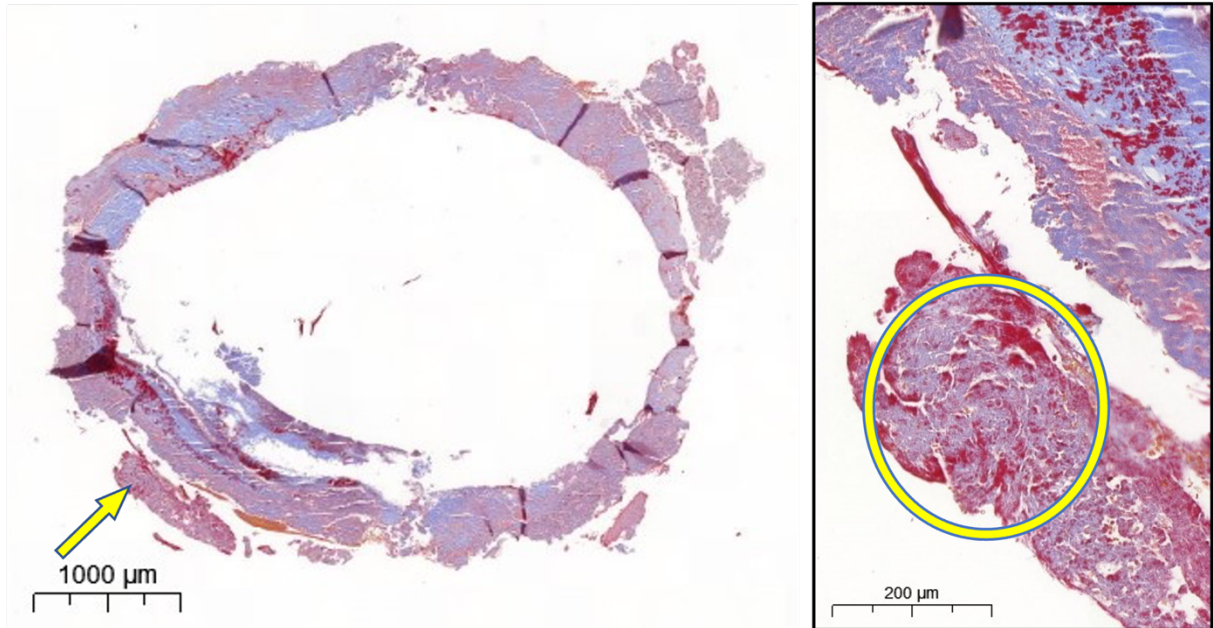


Abbildung 30: Beispielhaft mit Pfeil markierte verwirbelte Strukturen in P44A, P25B und P22A (Thromben an Ort A MSB-Färbung, P25B Carstairs). Die mit gelbem Pfeil markierten Bereiche in den Übersichtsaufnahmen sind jeweils vergrößert und dort die Wirbel mit einem gelben Kreis markiert. In den Thromben an Ort A findet man hier die verwirbelten Strukturen vornehmlich in den randständigen Bereichen und Anhängseln der Ringe. In P25B kann man verschieden dichte verwirbelte Strukturen erkennen, sowohl mittig als auch außen auf dem Thrombus.

3.2.4.2 Risse und Lakunenbildung

Viele Thromben wiesen Risse und Lakunenbildung auf (s. Abb. 31). Viele Risse waren ausgekleidet mit deutlich dichteren Strukturen als das umliegende Thrombusgewebe und enthielten Erythrozyten, welche teilweise beim Schneiden und Auftragen auf den Objektträger verloren gegangen sein können. Diese Risse oder Löcher können Sollbruchstellen der Schnitte darstellen und haben so eventuell im Rahmen des Schneidens und Färbens ihre ursprüngliche Form verloren.

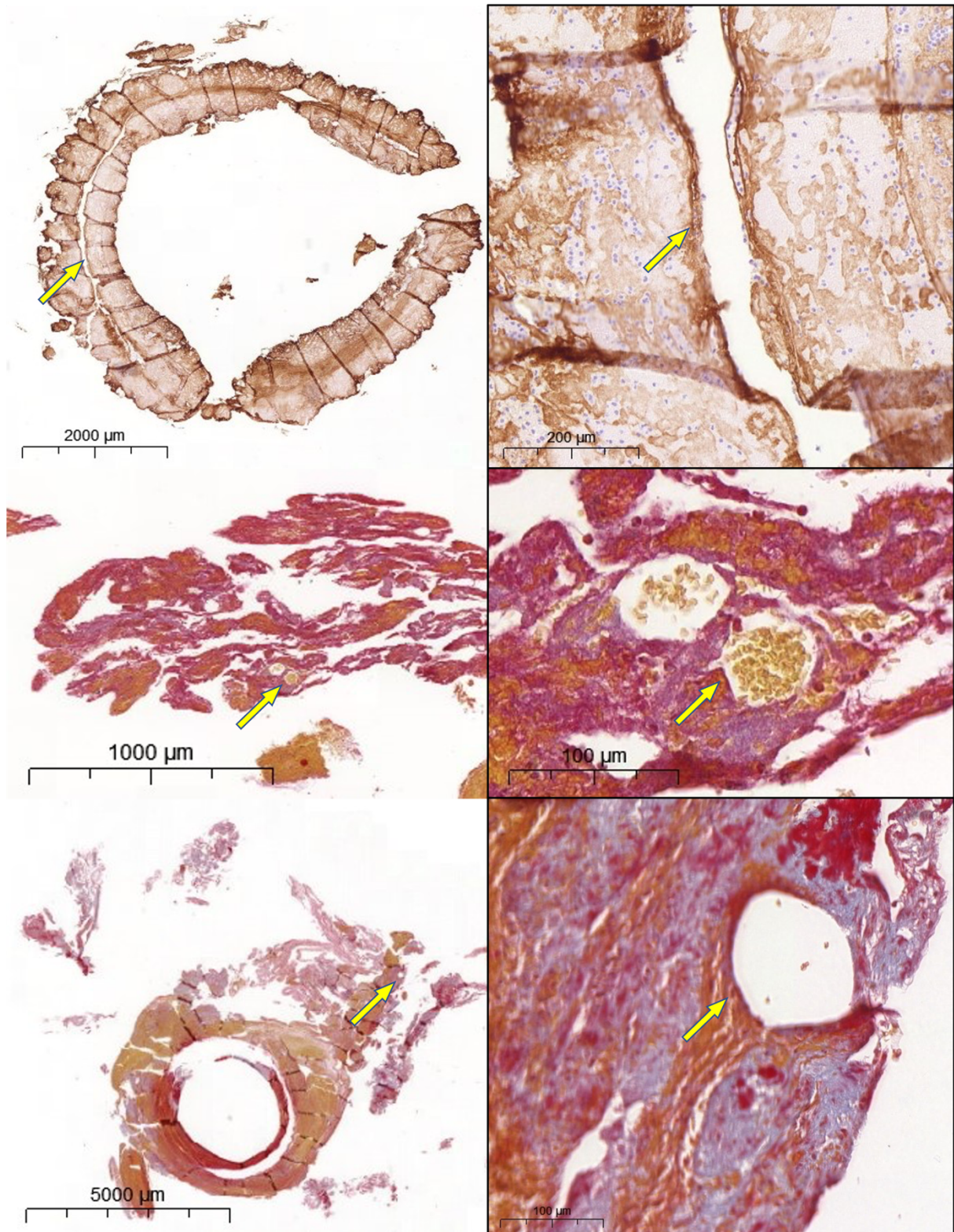


Abbildung 31: Beispiel für Risse und Lakunen in Thromben (P45A oben Fibrin-Immunhistologie, mittig P44B-2 und unten P23A, beide in MSB-Färbung). P45A zeigt einen mittig im Ring gelegenen Riss mit immunhistologisch bestätigter Auskleidung der Risskanten mit Fibrin. P44B-2 zeigt zwei runde, teils glatt berandete, mit Erythrozyten gefüllte Lakunen nebeneinander, P23A zeigt eine runde, glatt berandete, ungefüllte Lakune.

3.2.4.3 Schnittartefakte

Im Gegensatz zu den in 3.2.4.2 dargestellten Rissen (s. Abb. 31) zeigt sich bei Schnittartefakten ein deutlich abweichendes Bild (s. Abb. 32). Hier handelt es sich um gerade Linien, eventuell mit zusätzlichen, parallelen Linien an weiteren Stellen im Bild. Diese entstehen durch Scharten im Messer des Mikrotoms, welche durch das Auftreffen auf harten Strukturen im Gewebe in vorangegangenen Schnitten derselben Serie oder innerhalb des betroffenen Schnittes selbst entstanden sind und das nachfolgende Gewebe der Serie bzw. des Schnittes beschädigen. Die Wahrscheinlichkeit für Schnittartefakte steigt also vom ersten zum letzten Schnitt in einer Serie von Schnitten an. Bei Einzelschnitten ist in solch einem Fall die Wiederholung des Schnittes ratsam.

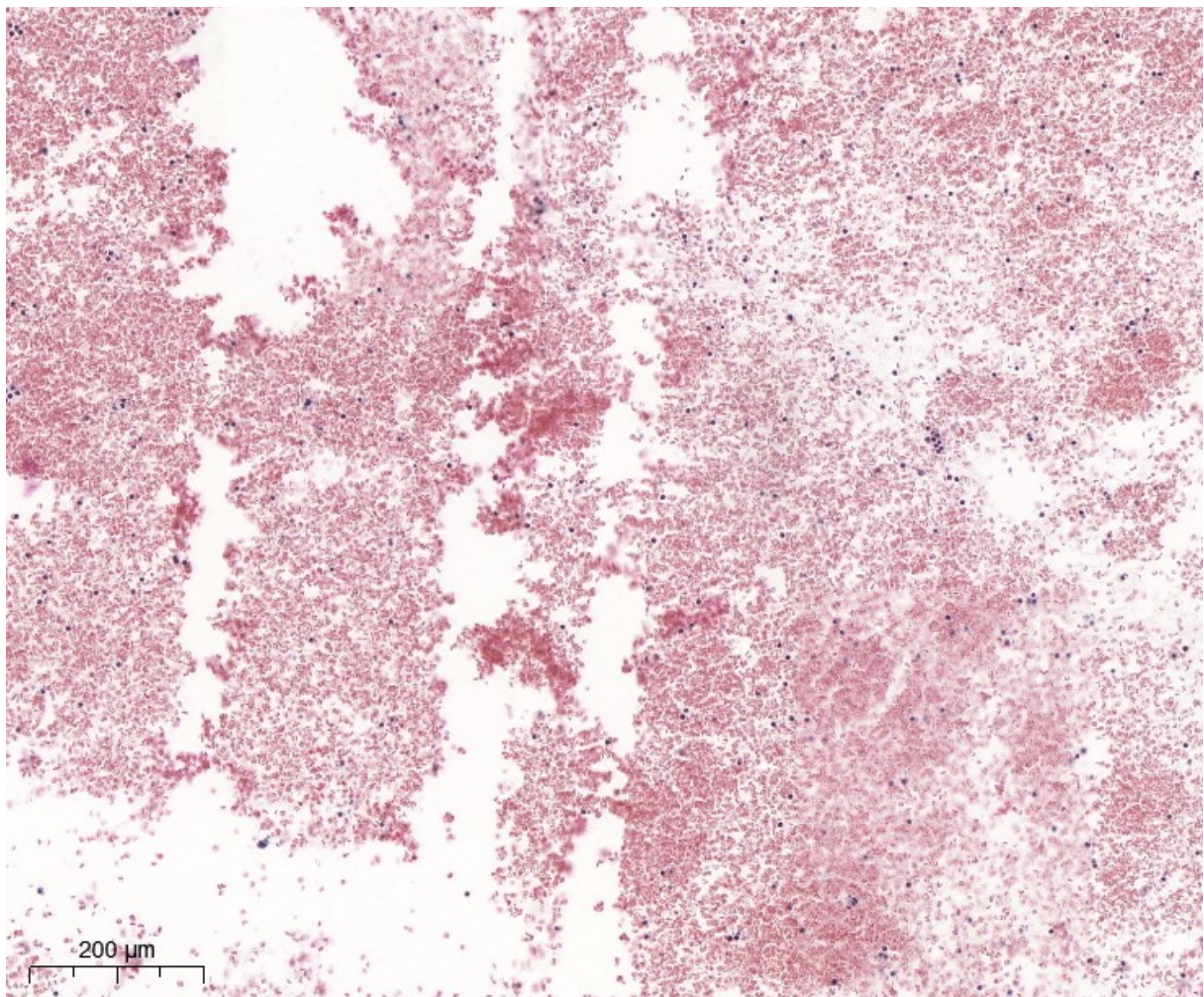


Abbildung 32: P45B-1, HE: Schnittartefakt: 3 parallele Linien dicht nebeneinander.

3.2.5 Verteilungsmuster der Thrombusbestandteile

Fibrin, Fibrinogen, vWF und Thrombozyten zeigten neben Kolokalisationen (s. 3.2.3) keine sich wiederholenden Muster in der Verteilung innerhalb des Thrombus. Erythrozyten und kernhaltige Zellen dagegen folgten mitunter bestimmten Verteilungsmustern, welche im Folgenden beschrieben werden.

3.2.5.1 Verteilungsmuster kernhaltiger Zellen

Bei genauerer Betrachtung der Verteilungsmuster der kernhaltigen Zellen fiel auf, dass die Granulozyten nicht gleichmäßig im Gewebe verteilt waren, sondern an bestimmten Stellen vermehrt auftraten. Dabei handelte es sich zum einen um die Randbereiche in verdichteten Arealen innerhalb eines Thrombus bzw. Grenzregionen zwischen unterschiedlich dichten Geweben und zum anderen um aufgelockerte Bereiche, z.B. in lockeren Netzen an den Außenseiten der Thromben oder in Lücken innerhalb des Thrombus (s. Abb. 33).

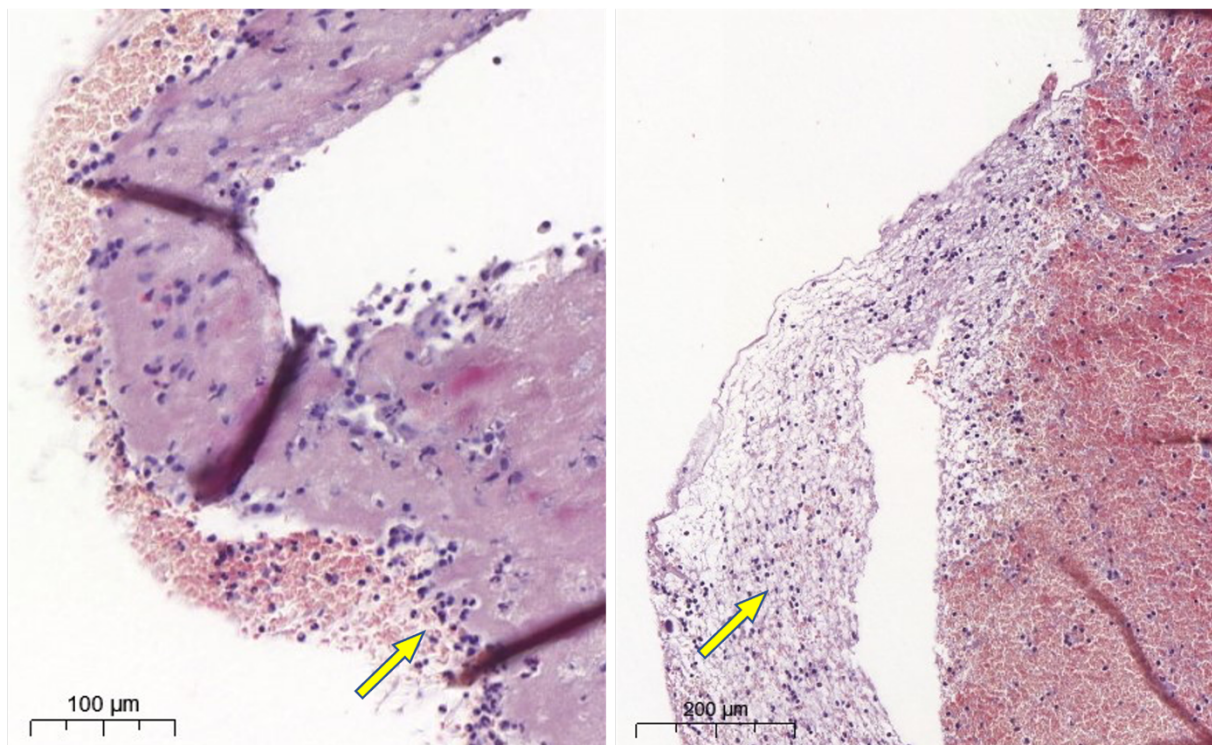


Abbildung 33: Links P24 (C4) mit zahlreichen kernhaltigen Zellen an den Außenrändern und in den Lücken der dichteren Strukturen, rechts P17A mit außen am Ring aufgelagerten lockeren Netzen mit darin gefangenen kernhaltigen Zellen (beide Bilder HE-Färbung).

3.2.5.2 Verteilungsmuster der Erythrozyten

Erythrozyten zeigten sich in dichteren Thromben häufig außen auf dem Thrombus aufgelagert in lockeren Netzen gefangen (s. Abb. 34) oder in den im Ring liegenden Rissen oder Lakunen, ähnlich wie bei den kernhaltigen Zellen beschrieben. Es gab außerdem Bereiche, z.B. in den flottierenden Anteilen, in denen sich eine sehr gleichmäßige Verteilung vieler Erythrozyten zwischen lockeren Netzen aus Fibrin und von Willebrand Faktor zeigte (s. Abb. 35).

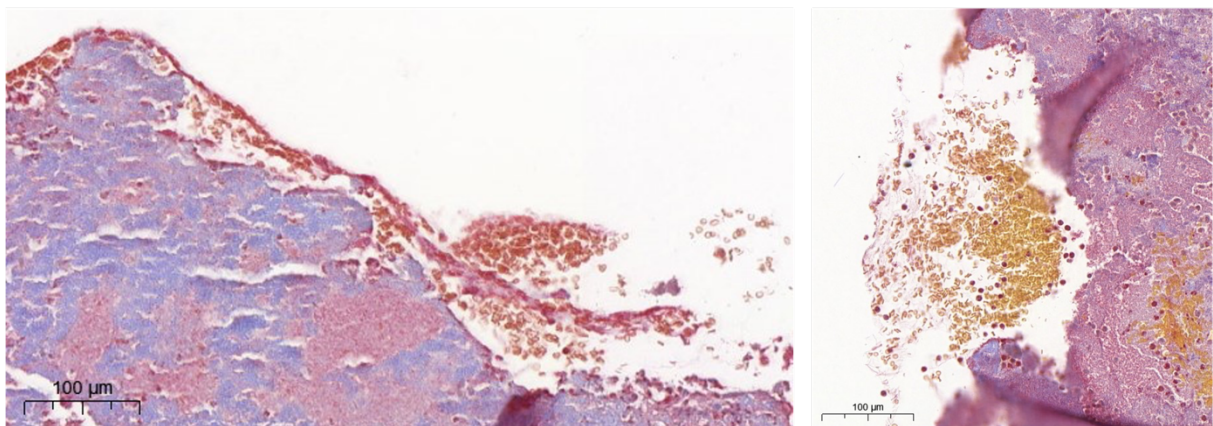


Abbildung 34: Links P22A, rechts P45A, beide MSB; an der oberen bzw. linken Seite der Struktur sind jeweils die Außenränder der Thromben zu sehen, bei beiden lassen sich locker aufgelagerte Netze mit dazwischen gelagerten Erythrozyten erkennen.

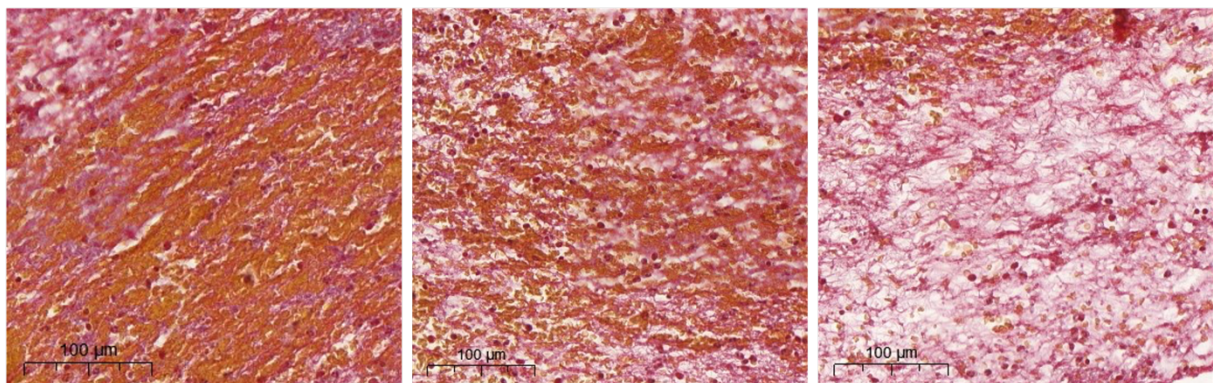


Abbildung 35: P17A, MSB: unterschiedlich dicht mit Erythrozyten (gelb) besetzte, lockere Netze aus Fibrin und vWF.

3.3 Einteilung der Thromben in zwei Gruppen

In der Literatur lassen sich Thromben in zwei Gruppen einteilen. Die eine Gruppe sind die weißen Thromben, welche bei hohen Scherkräften vornehmlich in arteriellen Gefäßen entstehen und viele Thrombozyten enthalten. Die zweite Gruppe sind die roten Thromben, welche eher in venösen Gefäßen bzw. bei Blutstase entstehen und viele Erythrozyten enthalten. Bei den hier untersuchten Thromben konnten diese zwei Gruppen ebenfalls identifiziert werden (s. Abb. 36).

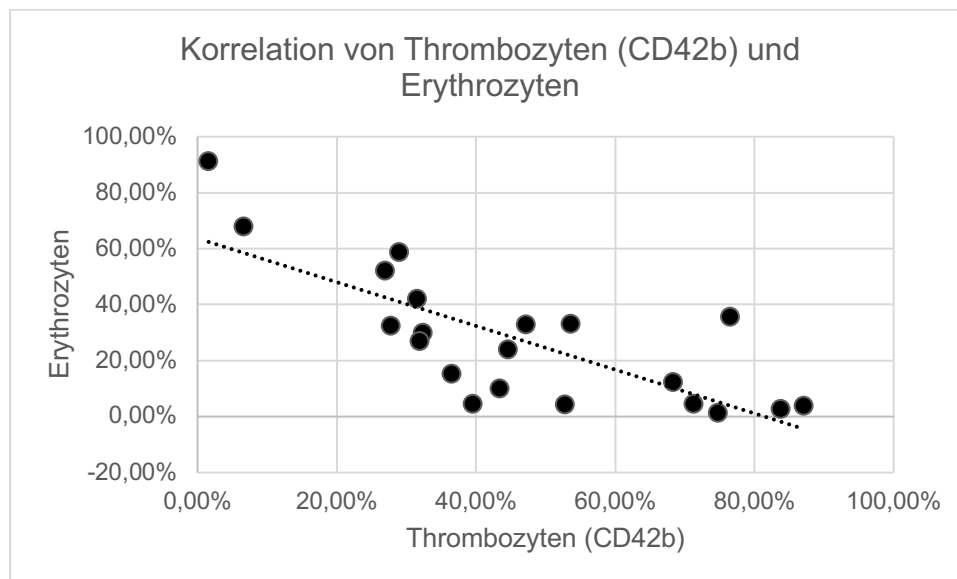


Abbildung 36: Negative Korrelation von Erythrozyten und Thrombozyten in allen Thromben unabhängig von Fundort und Gruppe. Diese Grafik unterstützt die Hypothese, dass in thrombozytenreichen Thromben weniger Erythrozyten enthalten sind und in erythrozytenreichen Thromben weniger Thrombozyten. Erstere Gruppe entspricht der Gruppe „Weiß“, zweitere der Gruppe „Rot“. Der Korrelationskoeffizient beträgt -0.767.

3.3.1 Makroskopische Gruppeneinteilung an Ort A

Makroskopisch lassen sich die Thromben ebenfalls in zwei farblich unterschiedliche Gruppen einteilen. Die Thromben 11A, 13A, 21A, 22A und 29A wurden der Gruppe „Weiß“ zugeteilt, die Thromben 17A, 23A und 44A wurden der Gruppe „Rot“ zugeteilt, wobei in den Ausläufern um den Ring herum auch weiße Anteile erkennbar waren (s. 3.1: Abb. 18). Die Thromben 18A, 25A und 45A zeigten ein uneindeutiges makroskopisches Bild und wurden makroskopisch als „Mix“ klassifiziert (s. Tab. 6).

Anschließend erfolgte die mikroskopische Einteilung in die Gruppen „Rot“ und „Weiß“ anhand der histologischen Übersichtsfärbungen (s. Abb. 19, 20 und 21 und Tab. 6).

3.3.2 Ortsunabhängige Einteilung in die Gruppen „Weiß“ und „Rot“

Nach Ausschluss des Thrombus P42A wurden 21 Thromben auf die beiden Gruppen „Weiß“ und „Rot“ verteilt. Es fanden sich unabhängig vom Ort 9 weiße und 12 rote Thromben (s. Abb. 37 und Tab. 6).

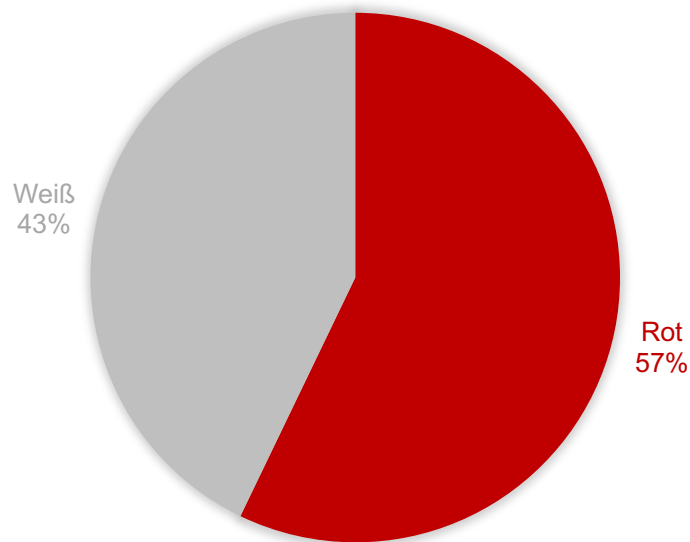


Abbildung 37: Bildung zweier Gruppen. 43% aller Thromben, unabhängig vom Fundort in der Pumpe wurden histologisch der Gruppe „Weiß“ zugeteilt, 57% der Thromben wurden der Gruppe „Rot“ zugeteilt. Dies entspricht 9 weißen und 12 roten Thromben.

Pumpennummer	Farbe makroskopisch	Farbe histologisch
P11A	Weiß	Weiß
P13A	Weiß	Weiß
P13C		Rot
P17A	Rot	Rot
P17C		Weiß
P18A	Mix	Weiß
P21A	Weiß	Weiß
P21C		Rot
P22A	Weiß	Weiß
P23A	Rot	Rot
P24C		Rot
P25A	Mix	Weiß
P25B		Rot
P29A	Weiß	Weiß
P42B		Rot
P44A	Rot	Rot
P44B-1		Rot
P44B-2		Rot
P45A	Mix	Weiß
P45B-1		Rot
P45B-2		Rot

Tabelle 6: Gruppeneinteilung der einzelnen Thromben. Die makroskopische Einteilung ergab 5 weiße Thromben, drei rote Thromben und drei uneindeutige Ergebnisse. Die histologische Einteilung konnte an Ort A die Gruppen der makroskopisch weißen und roten Thromben bestätigen, sowie die Thromben der makroskopischen Gruppe „Mix“ der Gruppe „Weiß“ zuteilen. An den Orten B und C wurden insgesamt ein weißer Thrombus und 8 rote Thromben ausschließlich histologisch eingeteilt.

In den roten Thromben fanden sich zahlreiche Erythrozyten als Leitbestandteil, in den weißen Thromben eine Mischung aus Thrombozyten, Fibrin und vWF, jedoch kaum Erythrozyten. Die Abbildungen 38 und 39 zeigen jeweils ein Beispiel der beiden Gruppen in der Übersichtsfärbung Carstairs.



Abbildung 38: P23A, Carstairs, klassifiziert als "Rot", da viele Erythrozyten (gelb) erkennbar sind.

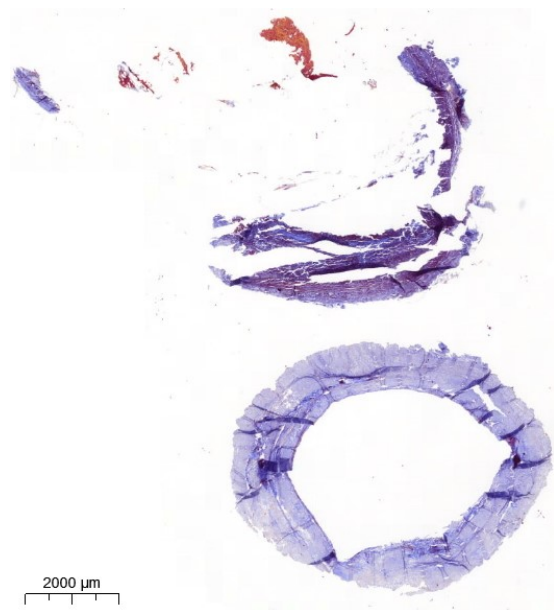


Abbildung 39: P25A, Carstairs, klassifiziert als "Weiß", da vorwiegend blaues Erscheinungsbild, ein Hinweis auf zahlreiche Thrombozyten.

3.4 Quantifizierung

Es erfolgte die Quantifizierung der Gesamtfläche sowie der Flächenanteile der Erythrozyten, Fibrinogen, Fibrin, von Willebrand Faktor und Thrombozyten (CD42b). Bei den Thromben an Ort A erfolgte außerdem die Messung der Ringdicke.

Bei den Werten handelt es sich nicht um den Maximaldurchmesser bzw. die maximale Ausdehnung der Thrombusfläche. Die genaue Beschreibung der Methodik findet sich unter 2.3.

3.4.1 Messung der Ringdicke

Der Median der Ringdicken am Ort A betrug 1053,492 μ m. Der größte Wert hierbei betrug 1735,417 μ m, der kleinste Wert lag bei 249,333 μ m (s. Abb. 40).

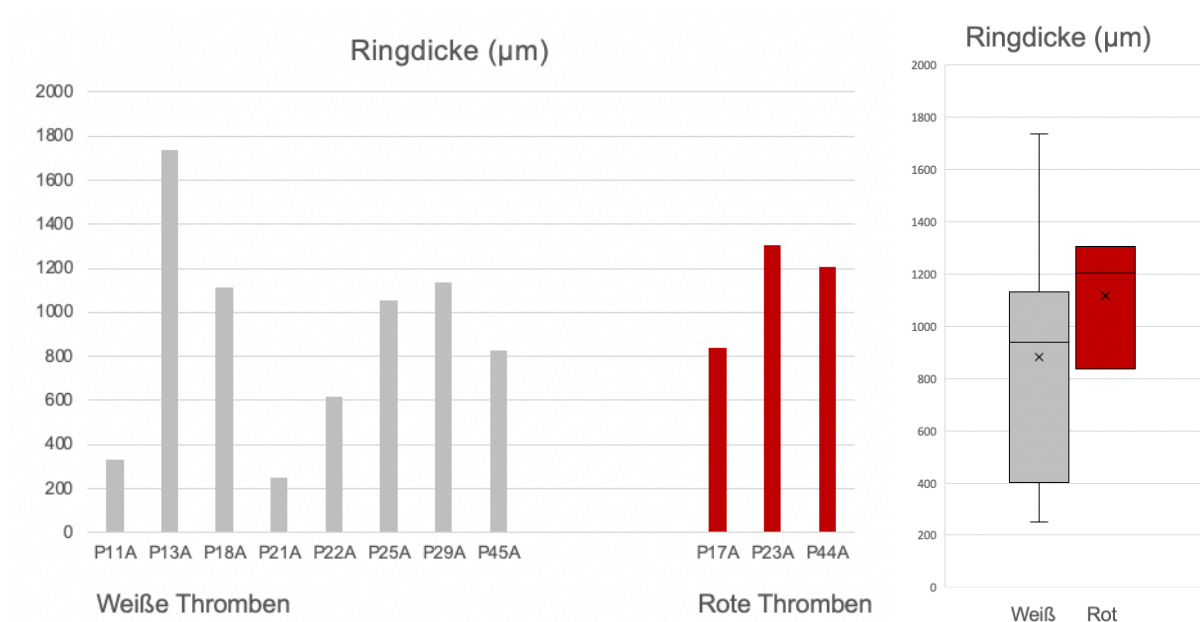


Abbildung 40: Ringdicke in μ m. Jeweils links (grau) die Werte der weißen Thromben, rechts (rot) die Werte der roten Thromben. (P-Wert=0,18)

Bei der Messung der Ringdicken ließ sich kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Rot und Weiß) erkennen. Ein Unterschied zwischen den Gruppen bei der Gesamtfläche lässt sich durch die flächenhaften Anhangsgebilde der Ringe der roten Gruppe erklären, welche bei der Ringdickenmessung nicht miterfasst wurden (s. Methodenteil 2.3.2).

3.4.2 Quantifizierung der Flächenanteile

Durch die Messung der Flächenanteile der Immunhistologie in jeweils separaten Bildern ergibt sich in der Addition aller Flächenanteile ein Wert von weit über 100%. Das liegt daran, dass die gemessenen Strukturen teils dicht nebeneinander vorkommen und so große Anteile mehrfach gemessen werden.

Bei der Analyse der Flächenanteile fällt auf, dass die Werte für Fibrinogen, Fibrin und den von Willebrand Faktor an allen Orten relativ hoch sind (s. Abb. 43 und 44). Größere Unterschiede zwischen den Orten und innerhalb der Messungen am gleichen Ort finden sich bei den Erythrozyten und Thrombozyten (s. Abb. 41 und 42).

Die einzelnen Werte der Flächenanteile sind in den Tabellen 7 und 8 aufgeführt.

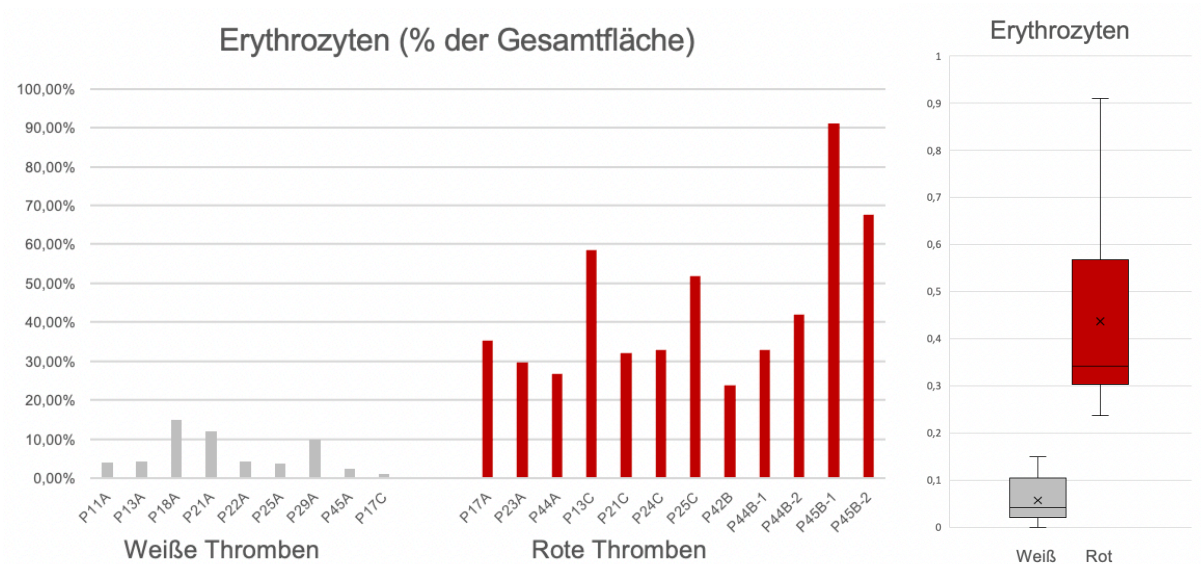


Abbildung 41: Flächenanteile der Erythrozyten nach Gruppen sortiert an allen Orten. Jeweils links (grau) die erythrozytenarmen weißen Thromben, rechts (rot) die erythrozytenreichen roten Thromben und die entsprechenden Flächenanteile in % der Gesamtfläche. Der P-Wert liegt bei $1,733 \times 10^{-5}$ (einseitiger heteroskedastischer Student's T-Test).

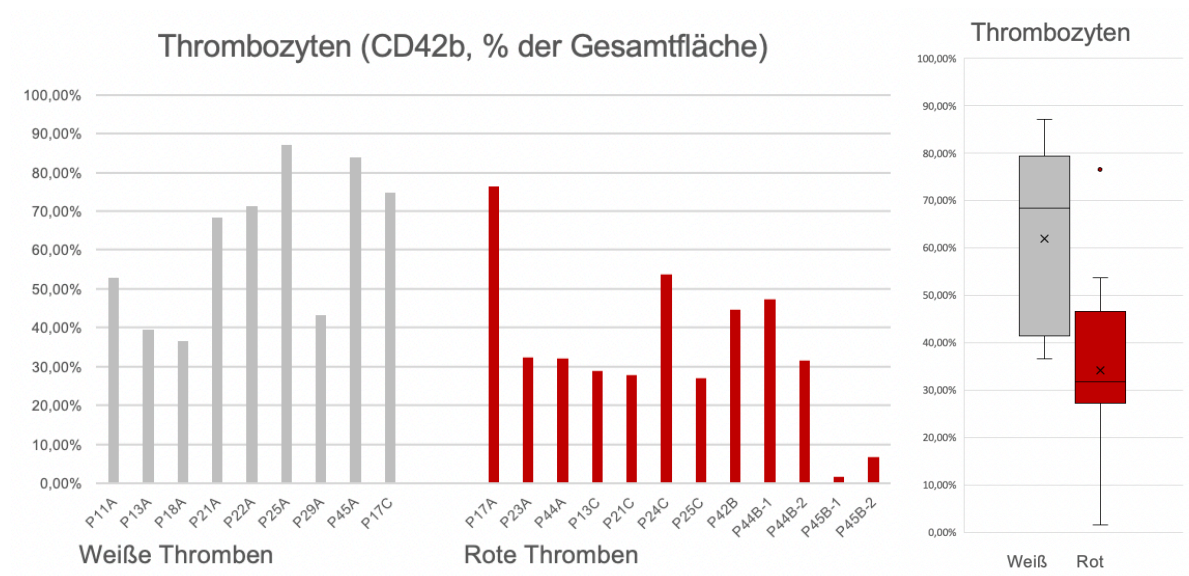


Abbildung 42: Flächenanteile der Thrombozyten (CD42b) nach Gruppen sortiert an allen Orten. Jeweils links (grau) die thrombozytenreichen weißen Thromben, rechts (rot) die roten Thromben mit den entsprechenden Flächenanteilen von CD42b in % der Gesamtfläche. Der P-Wert liegt bei 0.002 (einseitiger heteroskedastischer Student's T-Test).

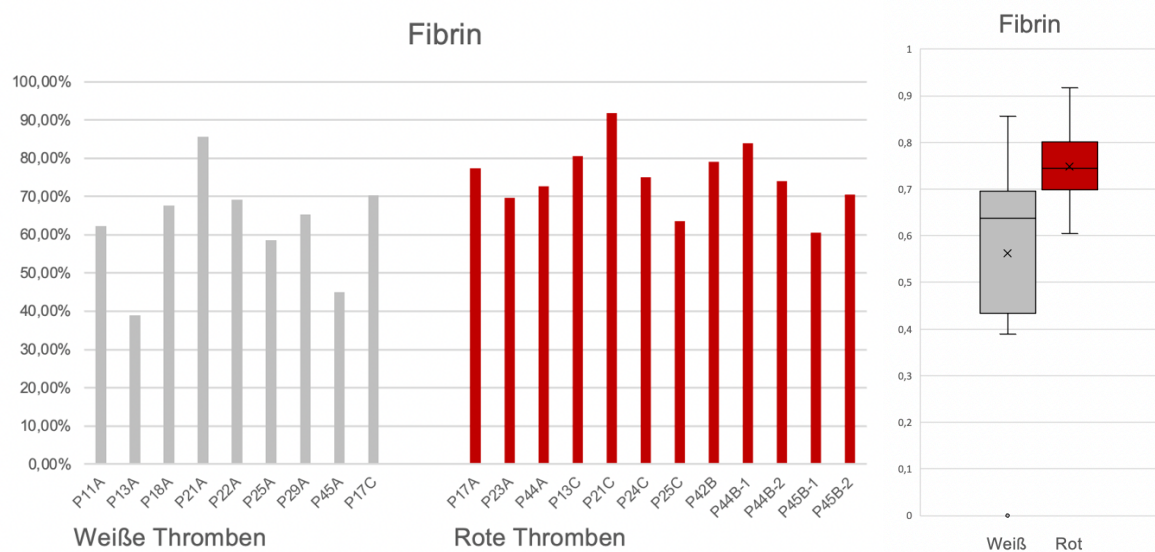


Abbildung 43: Flächenanteile von Fibrin nach Gruppen sortiert an allen Orten. Bei den Thromben der Gruppe „Rot“ konnten höhere Werte für die Flächenanteile von Fibrin an der Gesamtfläche der Thromben gefunden werden. Der P-Wert liegt bei 0.018 (einseitiger heteroskedastischer Student's T-Test).

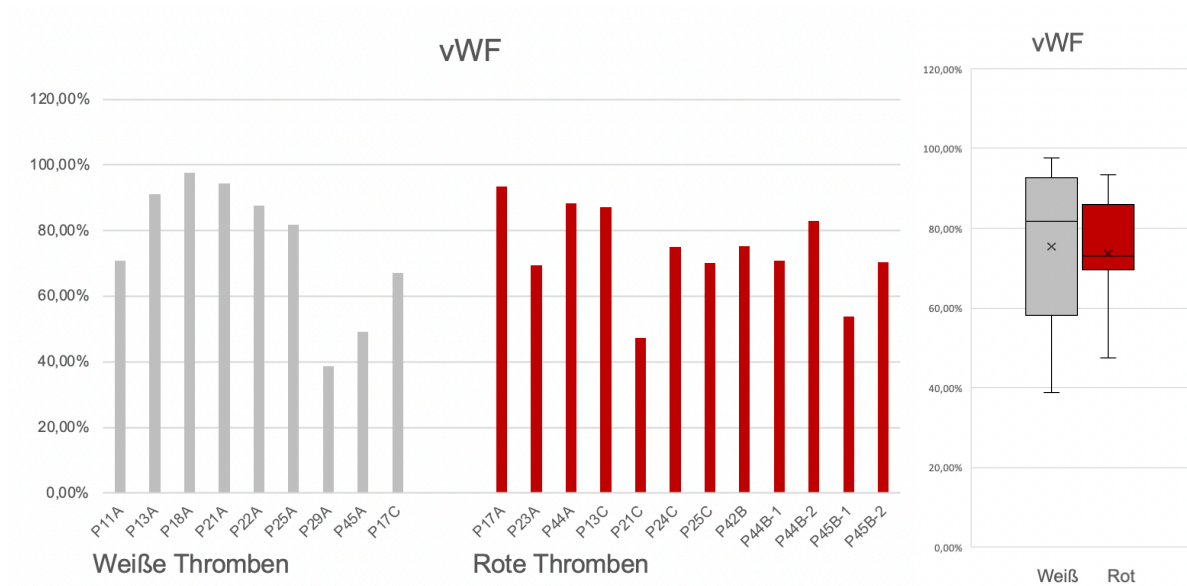


Abbildung 44: Flächenanteile von vWF nach Gruppen sortiert an allen Orten. Hier lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen darstellen. Der P-Wert liegt bei 0.416 (einseitiger heteroskedastischer Student's T-Test).

3.4.3 Quantifizierung der Gesamtfläche

Die Quantifikation der Flächenanteile erfolgte wie in 2.3 beschrieben. Der Vergleich der Ergebnisse der manuellen und automatischen Schwellensetzung wies nur minimale Unterschiede der erkannten Flächen auf (s. Abb. 45).

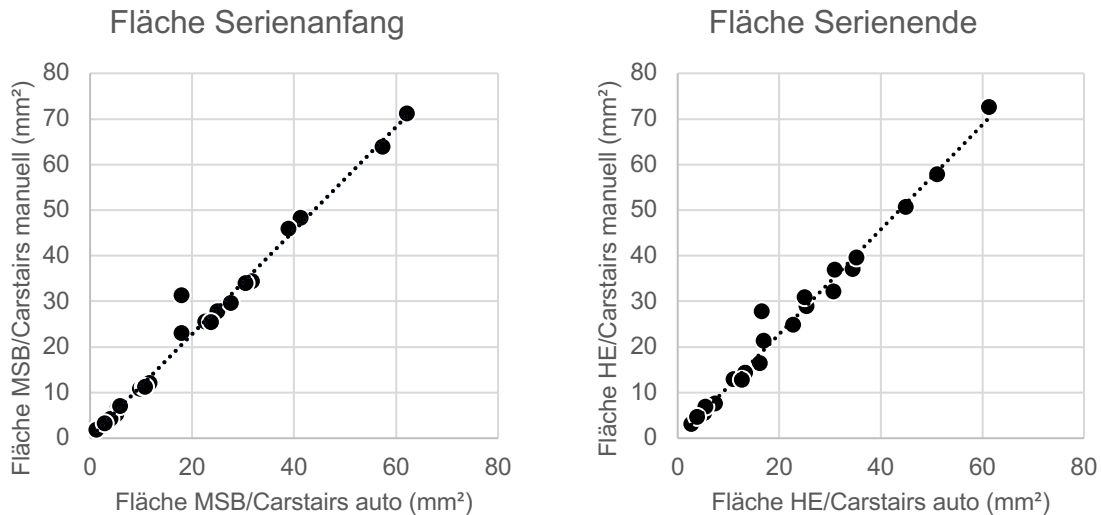


Abbildung 45: Minimale Unterschiede der manuellen und der automatischen Erkennung der Gesamtfläche. In der linken Grafik handelt es sich um die Messungen des ersten Schnitts der Serie (MSB) mit einem Korrelationskoeffizienten von 0.992 von automatischer und manueller Quantifizierung. Rechts wurde der letzte Schnitt der Serie (HE) gemessen, mit einem Korrelationskoeffizienten der zwei Messmethoden von 0.993. Carstairs wurde bei beiden Messungen als Alternative bei nicht messbaren Schnitten in der jeweils anderen untersuchten Färbung verwendet.

Die einzelnen Werte der Quantifizierung der Gesamtfläche sind in Abb. 46 dargestellt und finden sich in den Tabellen 7 und 8. Die Gesamtfläche des kleinsten Thrombus betrug 2,223 mm², die des größten Thrombus betrug 159,383 mm². Der Median lag bei 12,391 mm².

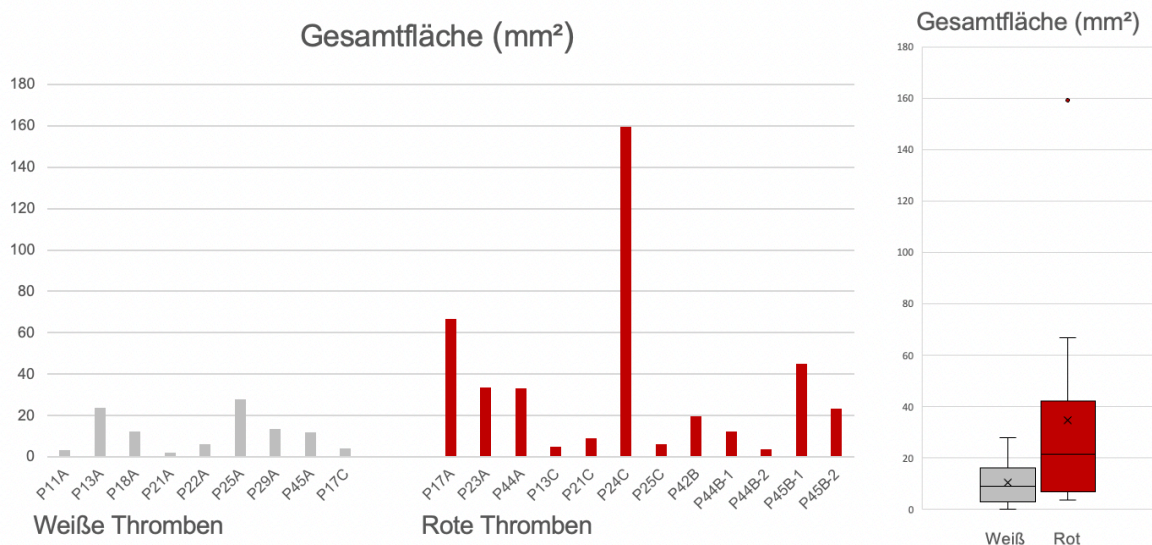


Abbildung 46: Quantifizierung der Gesamtfläche. Die Ergebnisse sind nach den Gruppen „Weiß“ (links) und „Rot“ (rechts) aufgeteilt.

3.4.4 Quantitative Analyse an Ort A

Von insgesamt 11 Thromben am Ort A konnten 8 als weiße und 3 als rote Thromben identifiziert werden.

Pumpen-nummer	Farbe histologisch	Anteil Erythrozyten	Anteil CD42b	Anteil Fibrin	Anteil vWF	Gesamtfläche (mm ²)
P11A	Weiß	4,09%	52,85%	62,32%	70,93%	3,30
P13A	Weiß	4,24%	39,55%	38,89%	91,14%	23,94
P17A	Rot	35,34%	76,52%	77,37%	93,47%	66,82
P18A	Weiß	14,98%	36,51%	67,56%	97,71%	12,37
P21A	Weiß	12,05%	68,36%	85,63%	94,39%	2,22
P22A	Weiß	4,30%	71,26%	69,21%	87,70%	6,32
P23A	Rot	29,75%	32,44%	69,69%	69,51%	33,49
P25A	Weiß	3,63%	87,09%	58,48%	81,85%	27,99
P29A	Weiß	9,88%	43,39%	65,24%	38,67%	13,34
P44A	Rot	26,84%	31,97%	72,72%	88,33%	33,06
P45A	Weiß	2,39%	83,81%	44,93%	49,06%	11,88

Tabelle 7: Unterscheidung von roten und weißen Thromben mit jeweiligen Quantifizierungsergebnissen in % der Gesamtfläche und die Gesamtfläche in mm².

Im Gegensatz zu den Thromben an den Orten B und C zeigte sich bei den Thromben an Ort A ein deutlicher Unterschied der Gesamtfläche zwischen den roten und den weißen Thromben (s. Abb. 47 und 48).

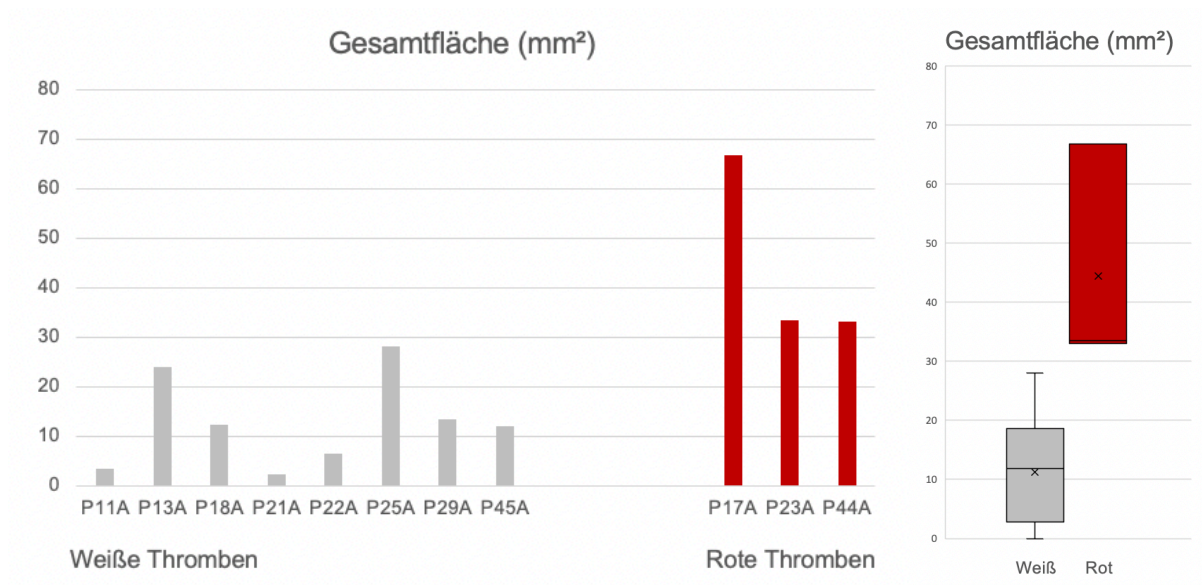


Abbildung 47: Vergleich der gemessenen Gesamtflächen in mm² an Ort A zwischen roten und weißen Thromben. Die Thromben der Gruppe „Weiß“ wiesen in der Quantifikation der Gesamtfläche niedrigere Ergebnisse auf als die der Thromben der Gruppe „Rot“ (P-Wert =0,047 im einseitigen heteroskedastischen Student's T-Test).

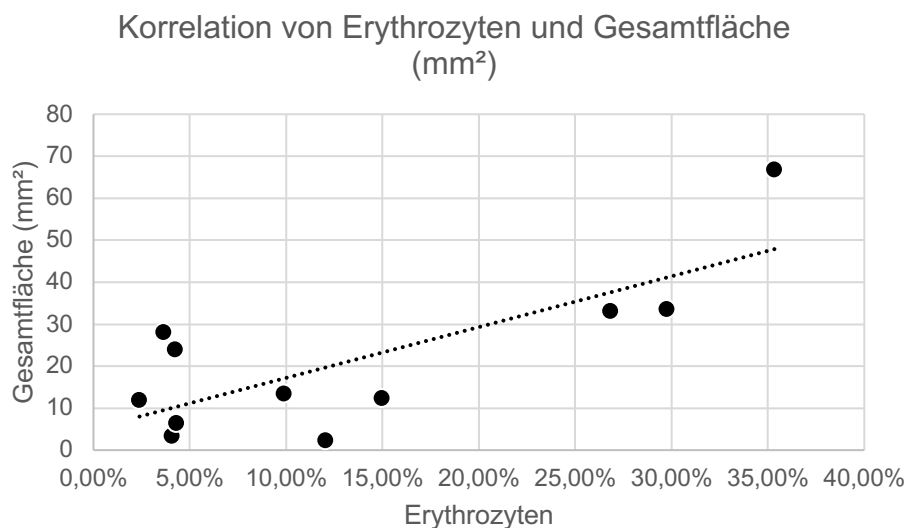


Abbildung 48: Korrelation des Erythrozyten-Flächenanteils und der Gesamtfläche an Ort A. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0.764. An den anderen Orten besteht diese Korrelation nicht (Korrelationskoeffizient für die Orte B und C = 0.035).

3.4.5 Quantitative Analyse an den Orten B und C

Die Thromben an den Orten B und C waren nicht immer auf den Bildern des Pumpenausbaus darstellbar. Dementsprechend erfolgte hier keine makroskopische

Einteilung in die beiden Gruppen „Rot“ und „Weiß“. In nachfolgender Tabelle (Tab. 8) sind die Gruppenzuordnungen sowie die dazugehörigen Flächenanteile und Gesamtflächenangaben dargestellt.

Pumpen- nummer	Farbe histo- logisch	Anteil Erythro- zyten	Anteil CD42b	Anteil Fibrin	Anteil vWF	Gesamt- fläche (mm ²)	Dazu- gehöriger Thrombus an Ort A
P13C	Rot	58,42%	29%	80,45%	87,03%	4,786	Weiß
P17C	Weiß	1,10%	74,80%	70,27%	67,21%	4,080	Rot
P21C	Rot	32,17%	27,78%	91,75%	47,38%	9,021	Weiß
P24C	Rot	32,85%	53,65%	75,03%	75,12%	159,383	
P25B	Rot	51,78%	27,02%	63,62%	70,23%	6,331	Weiß
P42B	Rot	23,71%	44,62%	78,97%	75,29%	19,784	
P44B-1	Rot	32,76%	47,21%	83,88%	70,73%	12,391	Rot
P44B-2	Rot	41,85%	31,54%	73,92%	83,04%	3,653	Rot
P45B-1	Rot	90,98%	1,60%	60,52%	53,88%	45,125	Weiß
P45B-2	Rot	67,63%	6,62%	70,48%	70,35%	23,429	Weiß

Tabelle 8: Einteilung der Thromben an den Orten B und C in die Gruppen "Weiß" und "Rot" mit histologischen Daten der Quantifikation und Vergleich zu den jeweils zugehörigen Thromben an Ort A. Es wurden insgesamt 9 Thromben der Gruppe „Rot“ zugeordnet und ein Thrombus (P17C) der Gruppe „Weiß“.

3.4.6 Unterschiede der zwei Gruppen in der Quantifizierung

In den Tabellen 7 und 8 kann man gut erkennen, dass an den Orten B und C die roten Thromben überwiegen, wobei an Ort A die weißen Thromben überwiegen. Auch die Erythrozyten-Flächenanteile übersteigen an den Orten B und C die der Thromben an Ort A (Ort A bis max. 35,34%, Orte B und C bis max. 90,98%). Außerdem sind nicht alle aus einer Pumpe stammenden Thromben gleich aufgebaut, es finden sich bei weißen Thromben an Ort A ausschließlich rote Thromben an den Orten B und C, sowie der einzige weiße Thrombus der Orte B und C bei einem roten Thrombus an Ort A. In zwei Pumpen finden sich an mehreren Orten ausschließlich rote Thromben.

Die Erythrozytenanteile aller Thromben der Gruppe „Rot“ überschreiten die der Gruppe „Weiß“ (s. Abb. 41). Bei der Betrachtung der Gesamtflächen zeigt sich bei den Thromben der Gruppe B und C ein eher heterogenes Bild, es lässt sich an den Orten B und C im Gegensatz zu Ort A keine Korrelation erkennen zwischen Erythrozytengehalt und Fläche der Thromben.

3.5 Ortsabhängige allgemeine Beobachtungen

Abgesehen von der Einteilung der Thromben in die beiden oben genannten Gruppen kann man nach wie vor die Einteilung in die verschiedenen Orte in der Pumpe vornehmen. Es zeigten sich bei der ortsabhängigen Analyse einige morphologische Besonderheiten.

3.5.1 Zusammensetzung der Thromben an den Orten B und C

Die Morphologie an den Orten B und C ist ähnlich. Sie ist meist von aufgelockerter, verwirbelter Qualität mit vielen kleinen und manchmal fadenartigen, aneinander angehefteten Bestandteilen.

Im Folgenden (s. Abb. 49 und 50) sind zwei auf den ersten Blick morphologisch ähnliche Thromben dargestellt. Es zeigt sich aber in der histologischen Analyse ein stark abweichendes Bild. Der erste Thrombus ist thrombozytenreich, fibrinreich und erythrozytenarm. Der zweite Thrombus ist erythrozytenreich und thrombozytenarm.

Dies ist ein gutes Beispiel, um zu demonstrieren, dass man nicht sicher vom makroskopischen Erscheinungsbild der Thromben auf die mikroskopische Zusammensetzung schließen kann. In der Quantifizierung dieser beiden Thromben kamen die Erythrozyten beim ersten Thrombus auf 1,1%, beim zweiten Thrombus auf 67,63%. Der Thrombozytenanteil lag bei 74,80% bzw. bei 6,62%. Im Gegensatz dazu kann man an Ort A eher von der Morphologie der Thromben auf die Zusammensetzung schließen (s. Abb. 52).

Der Thrombus P17C (s. Abb. 49) kann der Gruppe „Weiß“ zugeordnet werden, als einziger Thrombus an den Orten B und C. Der Thrombus P45B-2 (s. Abb. 50) kann der Gruppe „Rot“ zugeordnet werden. Die aus der gleichen Pumpe gewonnenen Thromben am Ort A gehören der jeweils anderen Gruppe an.

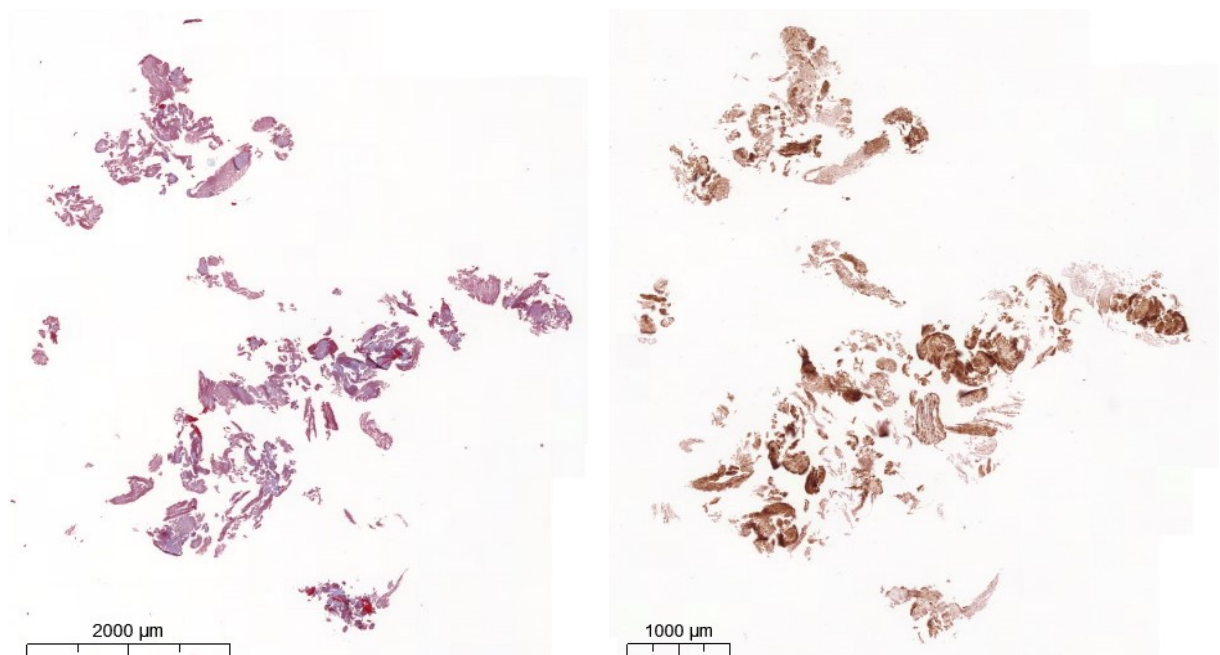


Abbildung 49: P17C, links MSB, rechts CD42b-Immunhistologie; kaum Erythrozyten (gelb), dagegen viele Thrombozyten (CD42b, braun). Der Thrombus wurde der Gruppe „Weiß“ zugeordnet.

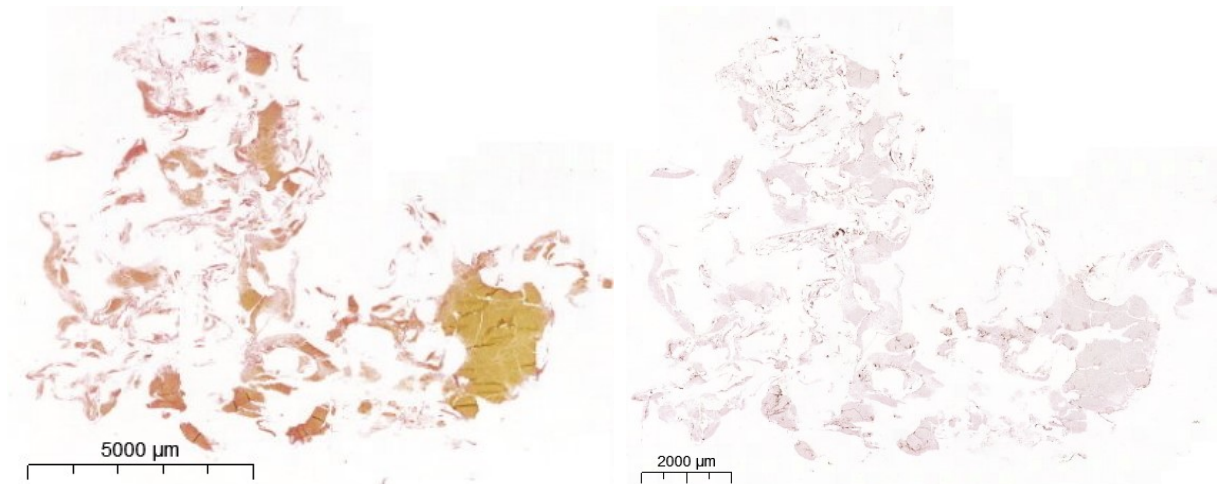


Abbildung 50: P45B-2, links MSB, rechts CD42b-Immunhistologie; hoher Anteil an Erythrozyten (gelb), kaum Thrombozyten (CD42b, braun). Der Thrombus wurde der Gruppe „Rot“ zugeordnet.

3.5.2 Spezifische Beobachtungen bei der Mikroskopie an Ort A

Die nachfolgenden Beobachtungen beziehen sich aufgrund der besonderen ringförmigen Struktur mit bekannter Orientierung in der Pumpe auf die Thromben an Ort A.

3.5.2.1 Schichtung

Eine Schichtung ist auf unterschiedliche Art und Weise bei allen Thromben an Ort A zu erkennen. Nicht alle Thromben sind gleich aufgebaut aber ein zirkulärer Verlauf der Strukturen und minimaler bis sehr ausgeprägter Wechsel der Schichtzusammensetzung ist erkennbar. Die Zusammensetzung und Reihenfolge der Schichten sind von Ring zu Ring unterschiedlich, mit Ausnahme der aufgelagerten Netze mit eingelagerten Erythrozyten (s. 3.2.5.3: Abb. 34). In Abb. 51 wird die Heterogenität der Schichtzusammensetzungen deutlich.

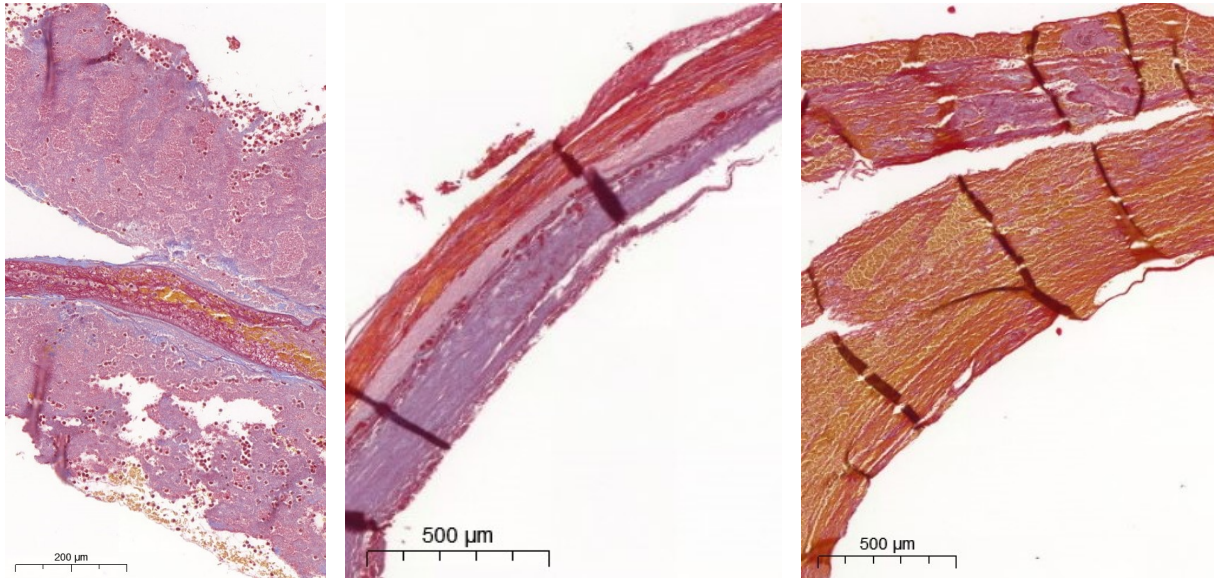


Abbildung 51: Schichtung in Ausschnitten der ringförmigen Thromben P45A, P18A und P17A (von links nach rechts, alle Bilder MSB-Färbung). Der linke Thrombus (P45A) weist innen und außen eine ähnliche Zusammensetzung auf, welche jedoch durch eine Schicht mit dichtem Fibrin und dazwischen gelagerten Erythrozyten durchbrochen werden. Bei P18A handelt es sich um eine sehr dichte, dreigeschichtete Ringstruktur, dessen innere und äußere Schicht aus einem Gemisch von Fibrin, vWF und Thrombozyten bestehen, wobei die äußere Schicht eine lockerere Struktur aufweist als die innere Schicht und auch einige Erythrozytenansammlungen. Dazwischen befindet sich eine dicht mit Thrombozyten besetzte Schicht. Der Thrombus rechts in der Abbildung (P17A) zeigt eine etwas lockerere Struktur als die anderen beiden, die Schichten setzen sich aus Fibrin- und vWF-Fasern in zirkulärer Anordnung mit dazwischen gelagerten Erythrozyten in unterschiedlicher Dichte zusammen.

3.5.2.2 Fetzen

Drei der 11 untersuchten Thromben an Ort A wiesen ausgeprägte, an der Ringstruktur hängenden Strukturen auf, hier bezeichnet als „Fetzen“. Diese Strukturen waren mit dem Ring verbunden und flottierten frei in der durch die Pumpe strömenden Flüssigkeit oder wickelten sich wie in Abb.18 erkennbar um die Rotorstreben in der Pumpe. Insgesamt zeigten sich diese Thromben, insbesondere in den flottierenden Strukturen, erythrozytenreich und von einer aufgelockerten Struktur. Die drei Thromben mit Fetzen sind identisch mit den drei Thromben, welche der Gruppe „Rot“ zugeteilt wurden (s. 3.3.2). Hier sind exemplarisch ein roter Thrombus mit Fetzen und ein weißer Thrombus ohne Fetzen dargestellt (Abb. 52 und 53).

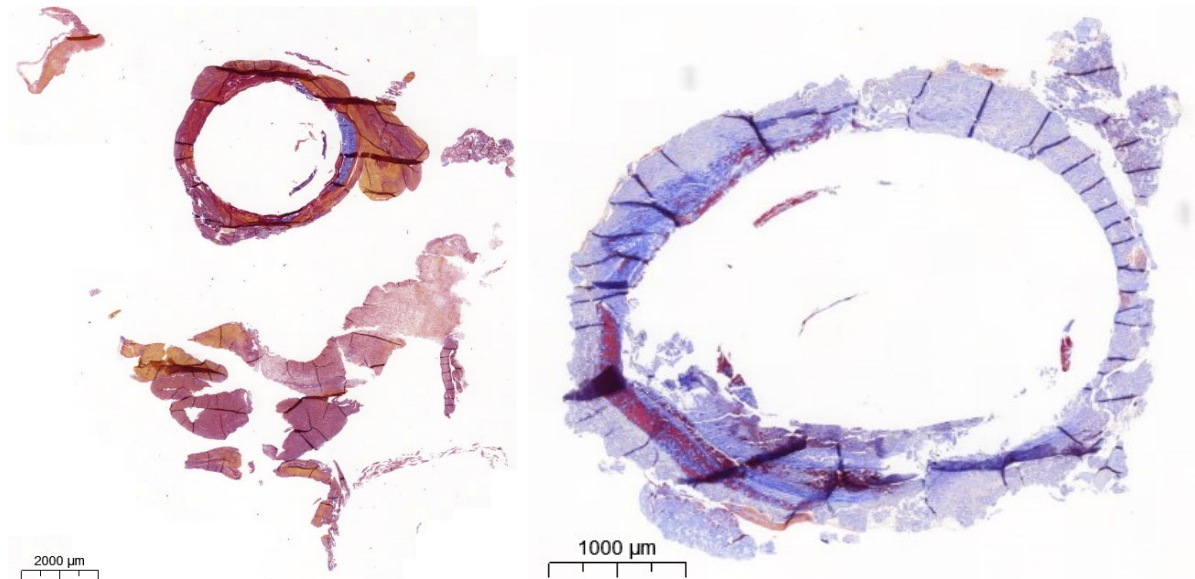


Abbildung 52: Links P44A als Beispiel für Thromben mit Fetzen, rechts P22A als Beispiel für Thromben ohne Fetzen (beide Bilder Carstairs). Der linke Thrombus weist neben dem Ring weitere Strukturen auf, welche mit der Ringstruktur verbunden sind (Verbindung in diesem Schnitt nicht angeschnitten). Der rechte Thrombus weist keine flottierenden Fetzen auf, sondern lediglich knotig wirkende Bestandteile, welche am ehesten die äußere Schicht des Ringes darstellen, welche noch nicht oder nicht mehr in Gänze angeschnitten wurde.



Abbildung 53: Makroskopisches Pendant zu den Thromben P44A (links, rot) und P22A (rechts, weiß). Die Fetzen des linken Thrombus wickeln sich um die Streben des Rotors und flottieren teilweise frei in der Pumpe. Der rechte Thrombus dagegen weist eine glatt begrenzte Ringstruktur ohne bewegliche Komponenten auf.

3.6 Analyse der Patientendaten

Nach der Entblindung der Proben erfolgte die Zuordnung der Pumpennummern zu Informationen über die jeweiligen Patientinnen und Patienten. Bei der Entblindung zeigte sich, dass die Pumpe 29 nicht als VV-ECMO sondern als VA-ECMO betrieben wurde. Es erfolgte nach kardiochirurgischem Eingriff die zentrale Kanülierung in rechtem Atrium und Aorta ascendens und im Verlauf die Umkanülierung des Ausflussschenkels in die A. subclavia. Des Weiteren zeigte sich, dass die Pumpen 44 und 45 von der gleichen Patientin stammten, wobei die Pumpe 44 das zweite von drei verwendeten Systemen war und die Pumpe 45 das letzte bei dieser Patientin verwendete System. Die häufigsten Indikationen stellten virale (n=5) und bakterielle (n=5) Pneumonien dar. Des Weiteren fanden sich eine respiratorische Krise bei Asthma bronchiale, ein postoperatives ARDS sowie bei P29 (VA-ECMO) der Zustand nach Koronararterienbypass als Indikationen.

Die Antikoagulation erfolgte in 6 Fällen ausschließlich mit Heparin, in 4 Fällen ausschließlich mit Argatroban, in zwei Fällen wurde von Heparin auf Argatroban umgestellt und in einem Fall von Argatroban auf niedermolekulare Heparine.

Weitere patientenbezogene Daten finden sich nach Gruppen geordnet in Tabelle 9, die einzelnen Werte finden sich in den Tabellen 10 und 11 im Anhang.

3.6.1 Gruppenunabhängige Analyse

Im Vergleich der Parameter Thrombozytenzahl, Leukozytenzahl, D-Dimere, Fibrinogen, freiem Hämoglobin und der Laufzeit der Pumpe in Tagen mit der gesamten Thrombuslast der Pumpe (Gesamtfläche aller Thromben einer Pumpe) oder den einzelnen Quantifikationsergebnissen an Ort A bzw. B und C ergaben sich keine Korrelationen über 0,5 bzw. unter -0,5. In den Abbildungen 54 und 55 sind exemplarisch die Werte für Leukozyten und Laufzeit aufgeführt.

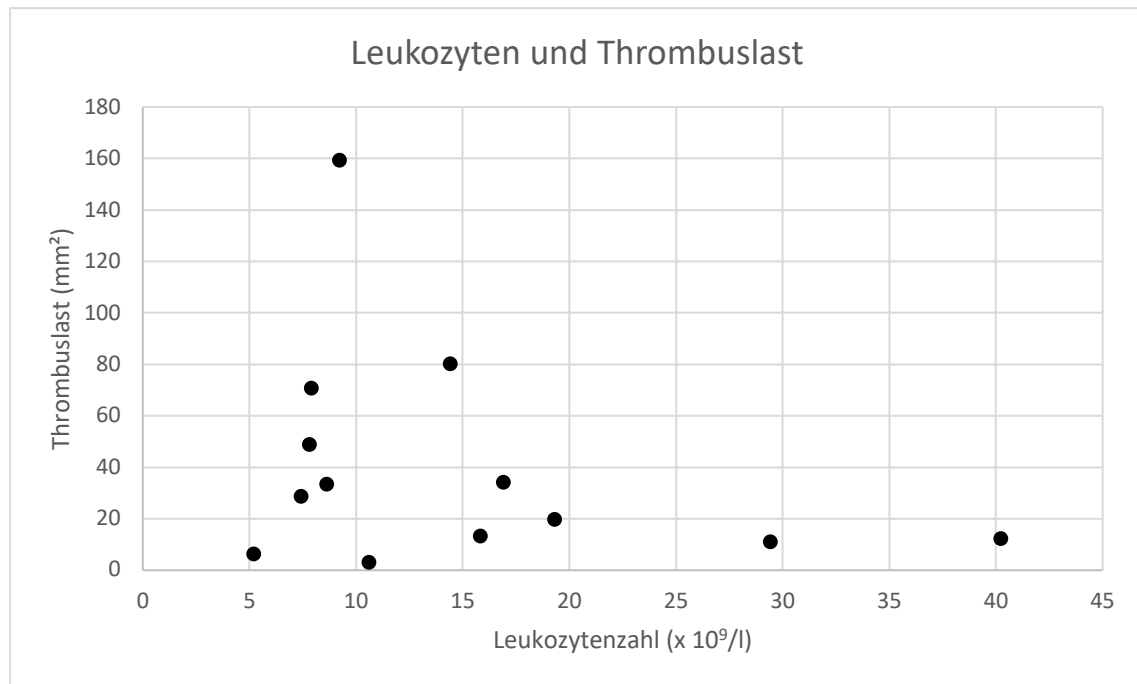


Abbildung 54: Keine Korrelation von Leukozyten ($\times 10^9/l$) und Gesamtfläche aller Thromben des jeweiligen Systems. Der Korrelationskoeffizient beträgt -0,309 ($n=13$). Der Korrelationskoeffizient bei Vergleich mit der Thrombusfläche an Ort A ergab -0,324 ($n=11$).

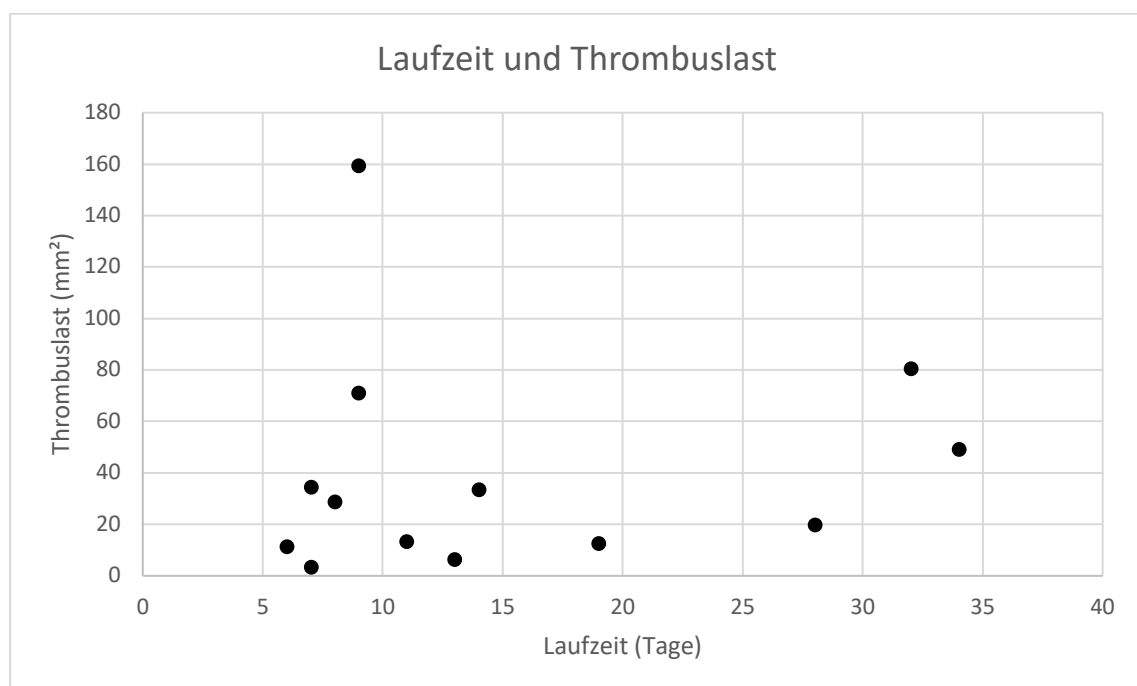


Abbildung 55: Keine Korrelation von Laufzeit (Tage) der Pumpe und gesamter Thrombuslast pro Pumpe. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,086. Bei ausschließlicher Vergleich von Laufzeit und Thrombuslast an Ort A ergab sich ebenfalls keine Korrelation (Korrelationskoeffizient 0,026).

3.6.2 Gruppenabhängige Analyse

Tabelle 9 vergleicht spezielle Parameter anhand der Gruppenzugehörigkeit zu „Weiß“ oder „Rot“ (Thrombus-Typ an Position A). Die Werte der Laborparameter und technischen Parameter stammen jeweils vom letzten Tag des Systems also bei Weaning vom letzten Therapietag und bei Wechsel vom Wechseltag. Sollte dieser Wert nicht dokumentiert worden sein, wurde der letzte zuvor aufgezeichnete Wert verwendet.

	Weißer Thromben	Rote Thromben	P-Werte
N	8	3	
Geschlecht (m/w)	4 / 4 (50%/50%)	2 / 1 (67%/33%)	
Alter (Jahre)	55 ± 19	60 ± 1	0,433
BMI (kg/m ²)	27,4 ± 4,9	26,4 ± 3,0	0,680
Weaning/ Wechsel, n (%)	5 / 3 (63%/37%)	1 / 2 (33%/66%)	
PTT (s)	59 ± 12	48 ± 18	0,413
LDH (U/L)	443 ± 108	421 ± 156	0,832
Freies Hämoglobin (mg/L)	48 ± 23	38 ± 13	0,414
Thrombozytenzahl (x1000/ μ l)	126 ± 55	168 ± 61	0,369
D-Dimere (mg/L)	28 ± 11	25 ± 15	0,791
Fibrinogen (mg/dl)	334 ± 216	175 ± 72	0,099
CRP (mg/L)	116 ± 132	30 ± 14	0,055
Leukozytenzahl (x10 ⁹ /L)	18 ± 12	8 ± 0,4	0,029
Interleukin-6 (pg/ml)	305 ± 452	26 ± 17	0,062
Blutfluss (L/min)	1,6 ± 0,6	2,5 ± 1,2	0,343
Pumpengeschwindigkeit (RPM)	1704 ± 522	2257 ± 710	0,310
Gasfluss (L/min)	2,9 ± 1,8	7 ± 2,5	0,072
Laufzeit der Pumpe (Tage)	12,9 ± 8,8	19,0 ± 13,2	0,517
Zeit an ECMO gesamt (Tage)	19,0 ± 13,2	34,0 ± 34,2	0,547
Verstorben am System, n (%)	1 (12,5%)	1 (33%)	
Verstorben nach Weaning, n (%)	1 (12,5%)	0	

Tabelle 9: Vergleich von patientenbezogenen Daten nach Thromben an Position A. Die Daten entsprechen dem Mittelwert mit Standardabweichung oder der Anzahl bzw. den Prozentwerten und stellen die Situation vor dem Ausbau des Systems dar. Wenn vom Tag des Ausbaus keine Werte vorhanden waren, wurde der letzte verfügbare Messwert verwendet. Die Gruppenzuordnung erfolgte anhand der Thrombusfarbe an Ort A (ohne P24 und P42). Statistik: heteroskedastischer zweiseitiger Student's T-Test (außer: Leukozytenzahl, CRP, IL-6: einseitiger heteroskedastischer Student's T-Test).

Bei der Entnahme der Pumpen zeichnete sich ein Unterschied der inflammatorischen Parameter ab. Dagegen waren Hämolyse- und Gerinnungsparameter vergleichbar. Pumpengeschwindigkeit, Blutfluss und Gasfluss zeigten in der weißen Gruppe niedrigere Werte, jedoch ohne statistische Signifikanz. Zu berücksichtigen ist hierbei der höhere Anteil an Weaning-Systemen in der weißen Gruppe (weiß 63%, rot 33%). Im Prozess des Weanings werden diese Parameter situationsbedingt verringert.

3.6.3 Gruppenabhängige Verlaufsanalyse

Im Folgenden (Abb. 56-60) ist der Verlauf spezifischer Laborwerte über die letzten 6 Tage vor Entnahme der Pumpen dargestellt. Bei Pumpen mit Endpunkt Weaning handelt es sich um die letzten 6 Tage mit ECMO-Therapie und bei den Pumpen mit Endpunkt Wechsel um die jeweils letzten 6 Tage der entsprechenden Pumpe, welche nicht mit den letzten 6 Therapietagen übereinstimmen.

Bei den D-Dimeren (Abb. 56) ist bei den weißen Thromben eine leicht steigende Tendenz zu erkennen, welche sich bei den Pumpen mit roten Thromben an Ort A nicht zeigt. Fibrinogen (Abb. 57) zeigt in beiden Gruppen eine fallende Tendenz. Die Thrombozytenzahl (Abb. 58) zeigt sich konstant, ebenso wie das freie Hämoglobin (Abb. 59) und die Leukozytenzahl (Abb. 60). Vergleicht man die Höhe der Parameter der letzten 6 Tage zwischen den beiden Gruppen, zeigen sich bei den drei Parametern Fibrinogen, Thrombozytenzahl und Leukozytenzahl signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (P-Werte siehe Legenden). Die Gruppe „Weiß“ zeigte höhere Leukozytenzahlen und Fibrinogenwerte sowie niedrigere Thrombozytenzahlen als die Gruppe „Rot“. Bei freiem Hämoglobin und den D-Dimeren lässt sich kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen bezüglich der Höhe feststellen.

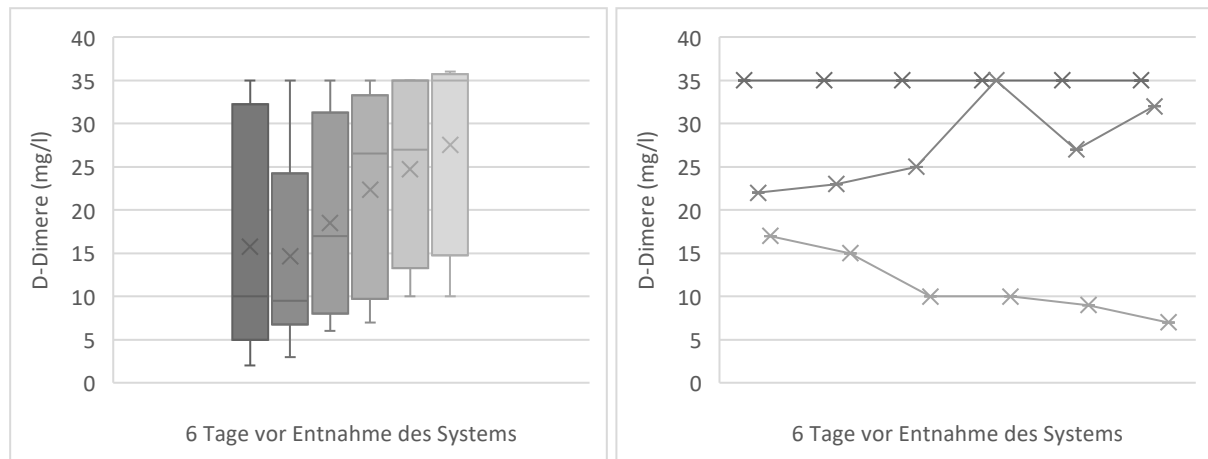


Abbildung 56: Verlauf der D-Dimere (mg/l) über die letzten 6 Tage der Systeme vor Entnahme. Während die D-Dimere in der weißen Gruppe (links) ansteigen, zeigten sich die Werte der roten Gruppe (rechts) unverändert.

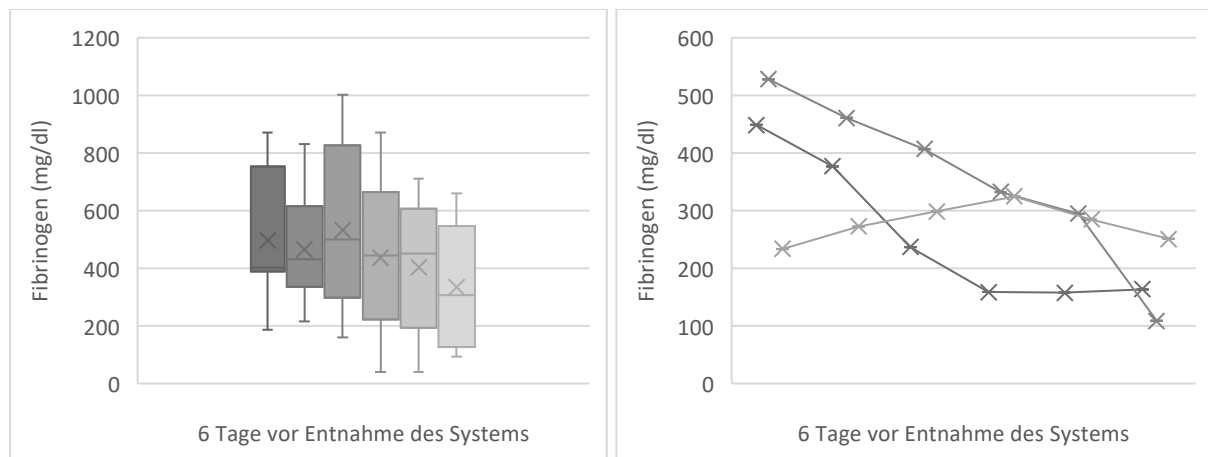


Abbildung 57: Verlauf von Fibrinogen (mg/dl) über die letzten 6 Tage der Systeme vor Entnahme. Es lässt sich in beiden Abbildungen (links Gruppe „Weiß“, rechts Gruppe „Rot“) eine fallende Tendenz erkennen. Es ist außerdem ein signifikanter Unterschied der Höhe der Parameter zwischen den beiden Gruppen erkennbar (P -Wert = 0,001).

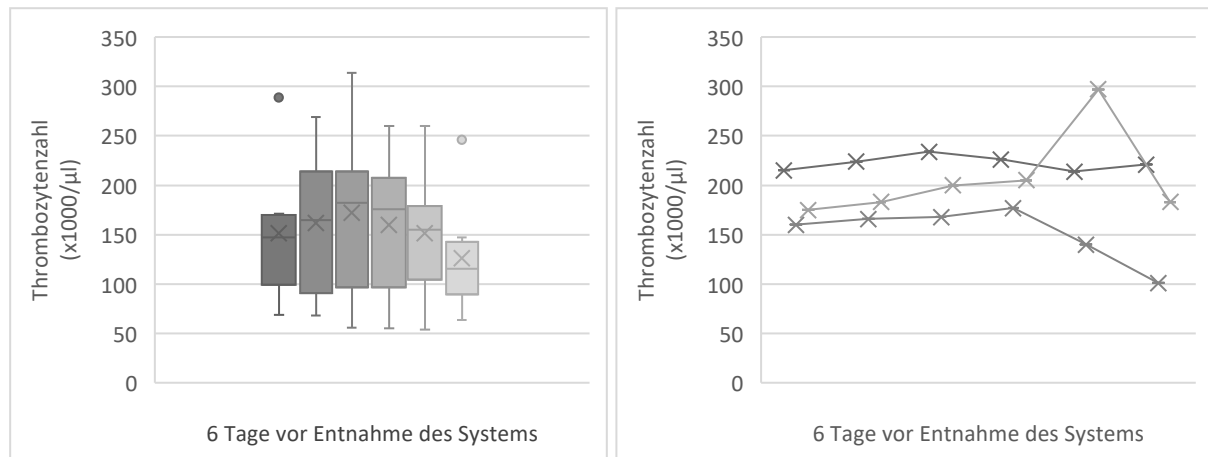


Abbildung 58: Verlauf der Thrombozytenzahl (x1000/ μ l) über die letzten 6 Tage der Systeme vor Entnahme. Es lässt sich weder bei der Gruppe „Weiß“ (links) noch bei der Gruppe „Rot“ (rechts) eine Änderung im Verlauf der Thrombozytenzahl über die letzten 6 Betriebstage der Systeme erkennen. Zwischen den beiden Gruppen lässt sich ein signifikanter Unterschied der Höhe der Parameter beobachten (P-Wert =0,006).

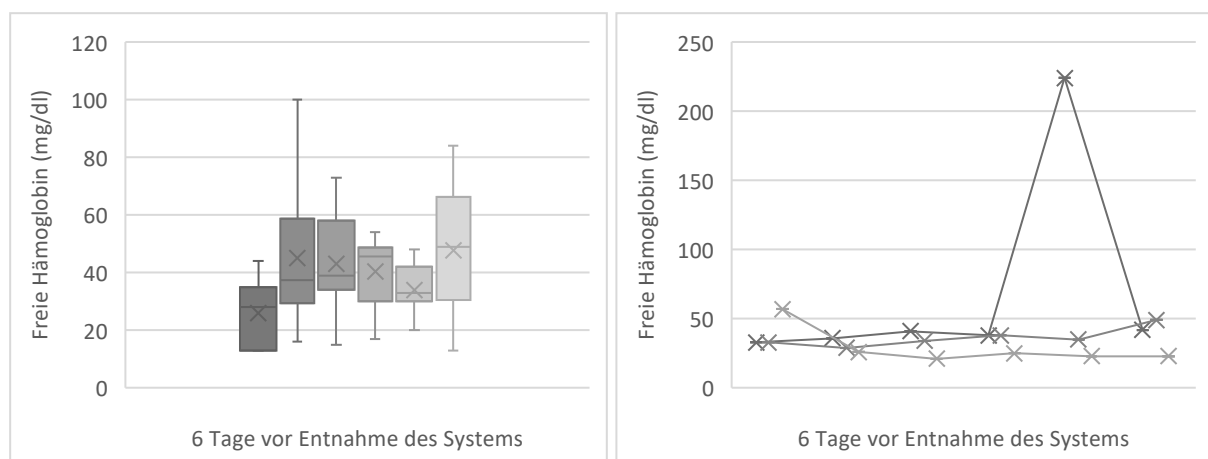


Abbildung 59: Verlauf von freiem Hämoglobin über die letzten 6 Tage der Systeme vor Entnahme. Es zeigen sich bei beiden Gruppen („Weiß“ links, „Rot“ rechts) Schwankungen, es ist jedoch keine klare Tendenz ersichtlich.

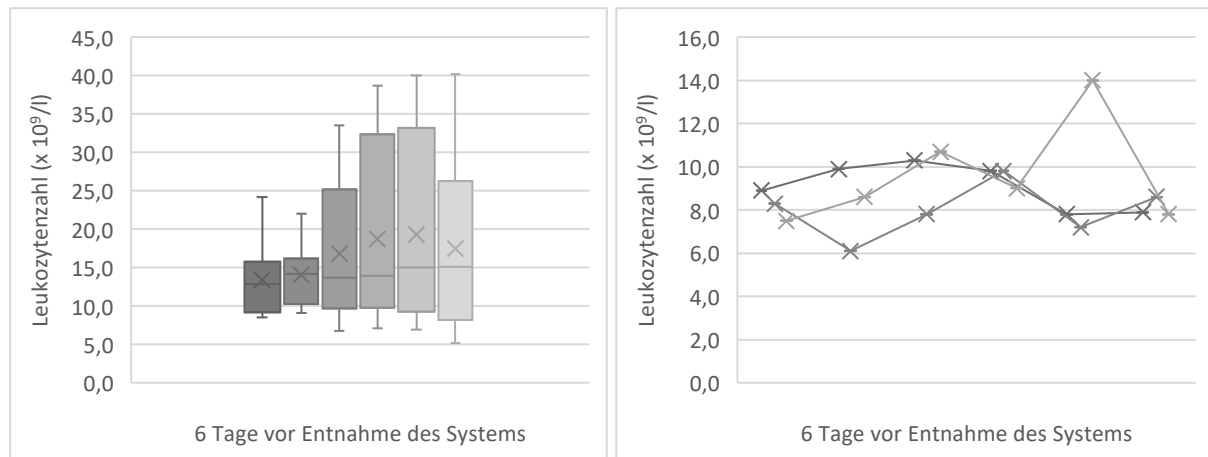


Abbildung 60: Verlauf der Leukozytenzahl ($\times 10^9/l$) über die letzten 6 Tage der Systeme vor Entnahme. Bei der Leukozytenzahl sind bei beiden Gruppen („Weiß“ links, „Rot“ rechts) keine Änderungen ersichtlich. Es besteht zwischen beiden Gruppen ein signifikanter Unterschied bei der Höhe der Parameter ($P\text{-Wert} = 1,6 \times 10^{-6}$).

3.6.4 Vergleich mit den Quantifizierungsdaten

Im Vergleich der Patientendaten mit den Ergebnissen der Quantifizierung der Thrombusbestandteile schien insbesondere der Vergleich von Fibrinogen mit den Flächenanteilen von Fibrin und der Vergleich der Thrombozytenzahl mit den Flächenanteilen von CD42b sinnvoll. Die Korrelationen sind in den Abbildungen 61 und 62 dargestellt. In beiden Fällen war keine signifikante Korrelation erkennbar.

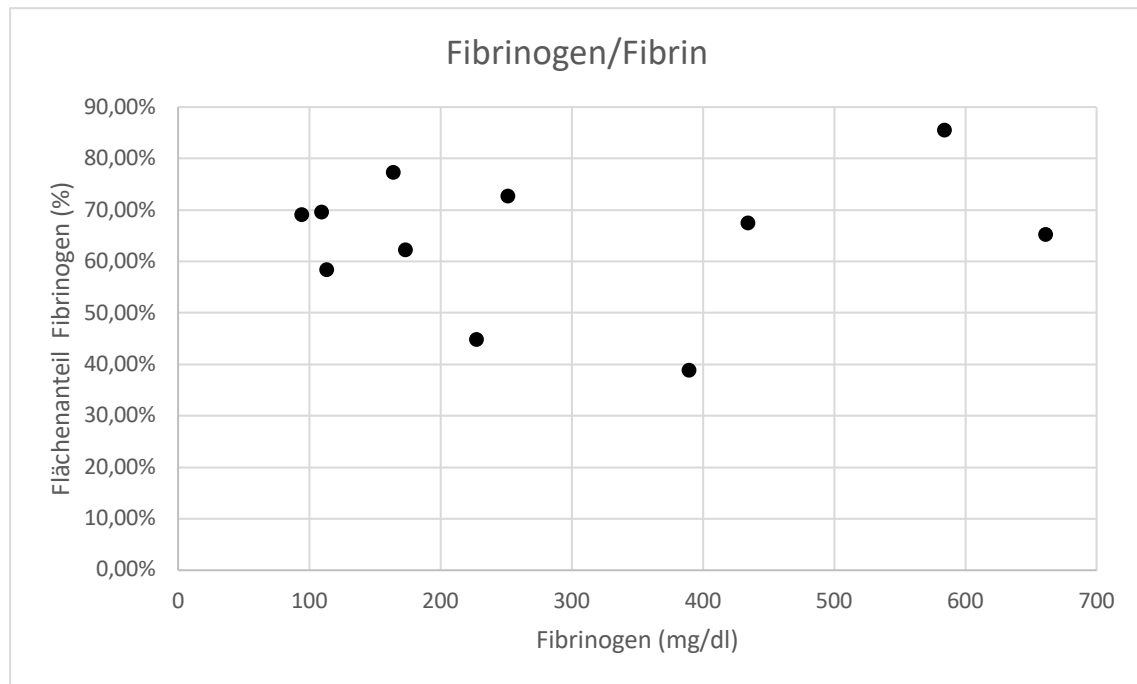


Abbildung 61: Keine Korrelation Fibrinogen am Therapieende und Flächenanteil Fibrin (Korrelationskoeffizient =0,118). Der Korrelationskoeffizient von Fibrinogen zu Beginn der Therapie und dem Flächenanteil des Fibrins liegt bei 0,198.

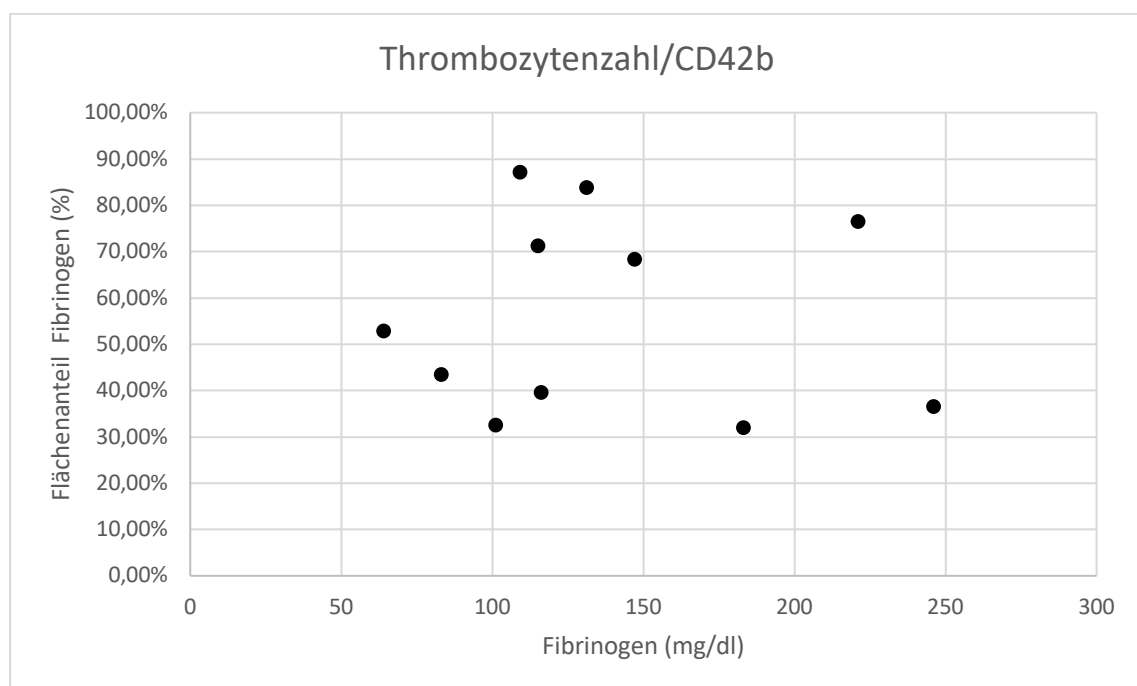


Abbildung 62: Keine Korrelation von Thrombozytenzahl am Therapieende und Flächenanteil der Thrombozyten (Korrelationskoeffizient =-0,054). Der Korrelationskoeffizient von Thrombozytenzahl zu Beginn der Therapie und dem Flächenanteil der Thrombozyten liegt bei -0,241.

3.6.5 Sonderfall der Pumpen 44 und 45

Die Pumpen 44 mit rotem Thrombus an Ort A und 45 mit weißem Thrombus an Ort A stammten von derselben Patientin. Bei der Pumpe 44 handelte es sich um das zweite von 3 verwendeten Systemen und bei der Pumpe 45 um das dritte und letzte verwendete System. Die Wechselgründe der insgesamt zwei Systemwechsel wurden als Thromben im Pumpenkopf sowie Thromben an der Anströmseite des Oxygenators mit eingeschränktem Gastransfer dokumentiert. Mit 34 und 32 Tagen war die Laufzeit der beiden untersuchten Systeme vergleichbar.

Es zeigten sich insbesondere bei den D-Dimeren und CRP größere Schwankungen im Verlauf (s. Abb. 65 und 67), bei den technischen Parametern zeigte sich erwartungsgemäß ein Rückgang von Flow, Gasflow und Pumpengeschwindigkeit zum Ende der Therapie (s. Abb. 63 und 64). Die Fibrinogenwerte zeigen sich bei beiden Pumpen im Verlauf fallend (s. Abb. 69). Die Leukozyten wiesen mit einem P-Wert von $1,168 \times 10^{-12}$ die deutlichsten Unterschiede zwischen den beiden Pumpen auf (s. Abb. 68). Die D-Dimere zeigten ebenfalls signifikante Unterschiede mit einem P-Wert von 0,027, CRP zeigte sich bei einem P-Wert von 0,050 grenzwertig. Bei den Verläufen der Thrombozytenzahlen (s. Abb. 66) konnte kein Unterschied zwischen den beiden Pumpen festgestellt werden. Es kam jeweils der zweiseitige heteroskedastische Student's T-Test zum Einsatz. Die P-Werte für Flow und Pumpengeschwindigkeit belegten ebenfalls einen signifikanten Unterschied, welcher allerdings bei den verschiedenen Endpunkten (Wechsel und Weaning) zu erwarten war.

Zum Zeitpunkt des ersten Wechsels (Tag 7) zeigten sich größere Schwankungen einiger Laborwerte, insbesondere ein Anstieg des freien Hämoglobins. Da das erste System jedoch nicht untersucht wurde, wird diese Schwankung hier vernachlässigt.

In den folgenden Graphen 63-69 sind jeweils die letzten 30 Tage der Systeme P44 und P45 dargestellt. In rot ist jeweils das zweite System (P44), in welchem sich ein roter Thrombus an Ort A gebildet hat, dargestellt, in Weiß das letzte System (P45) mit weißem Thrombus an Ort A.

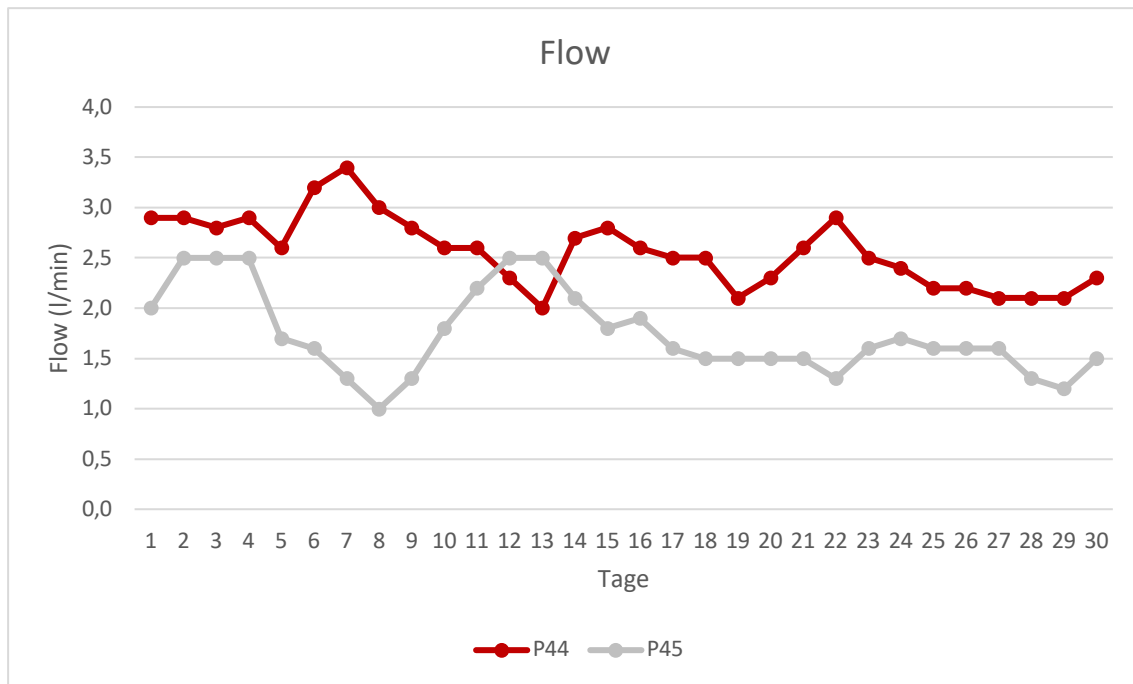


Abbildung 63: Blutfluss durch die Pumpe in l/min, Verlauf von P44 und P45 der letzten 30 Tage vor Entnahme. Wie zu erwarten ist der Blutfluss bei P45 geringer als bei P44, da es sich hier um das letzte System der Patientin handelt. P44 dagegen hat den Systemwechsel als Endpunkt und weist daher insbesondere gegen Ende höhere Flussraten auf als P45.

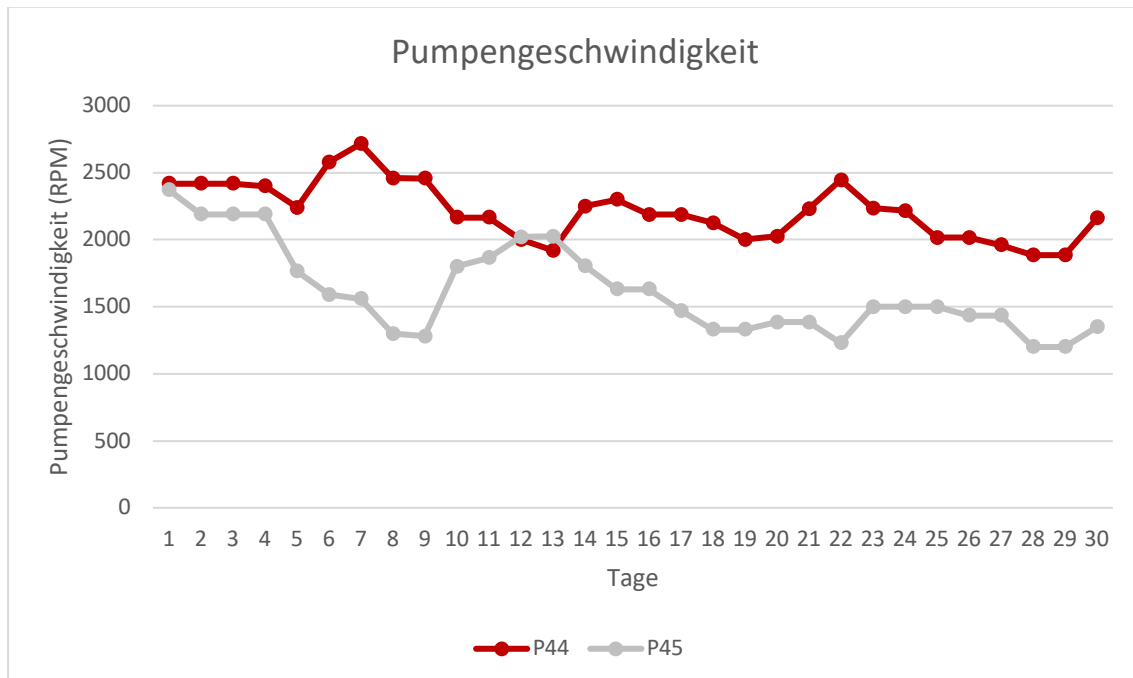


Abbildung 64: Pumpengeschwindigkeit in Umdrehungen pro Minute, Verlauf von P44 und P45 der letzten 30 Tage vor Entnahme. Hier gilt das gleiche Prinzip wie bei Abb. 59, erwartungsgemäß weist P45 gegen Ende niedrigere Werte auf.

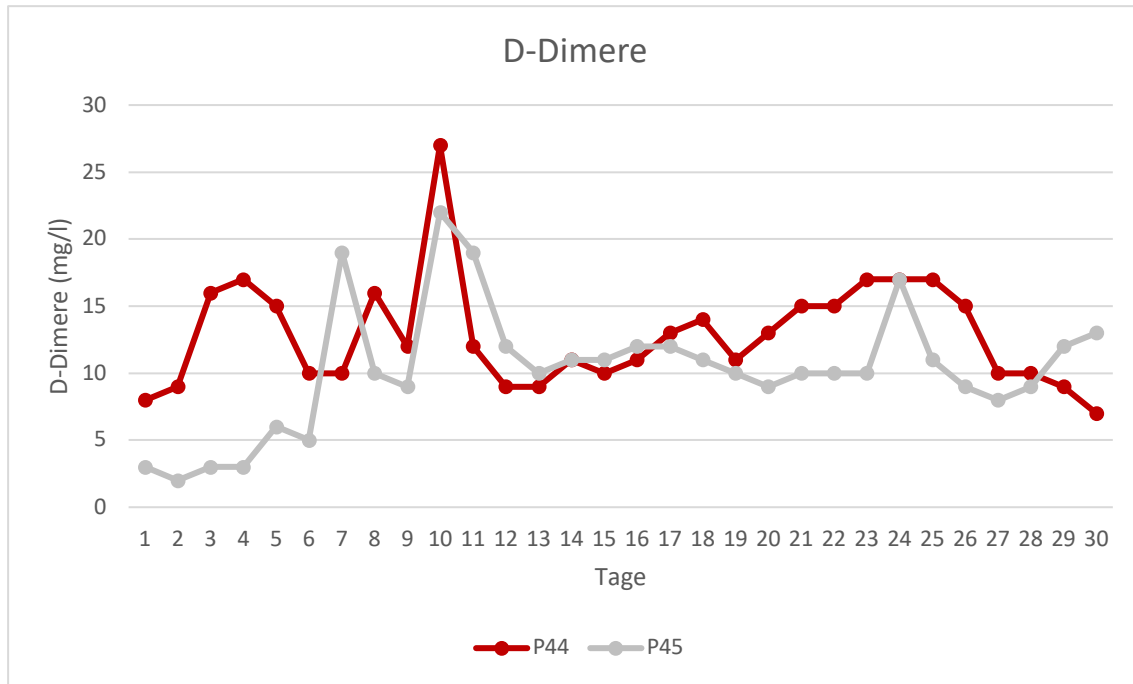


Abbildung 65: D-Dimere in mg/l, Verlauf von P44 und P45 der letzten 30 Tage vor Entnahme. Hier lassen sich viele Schwankungen bei beiden Systemen im Laufe der Therapie erkennen. Dennoch liegen insgesamt die Werte bei P44 höher als bei P45 (P-Wert =0,027).

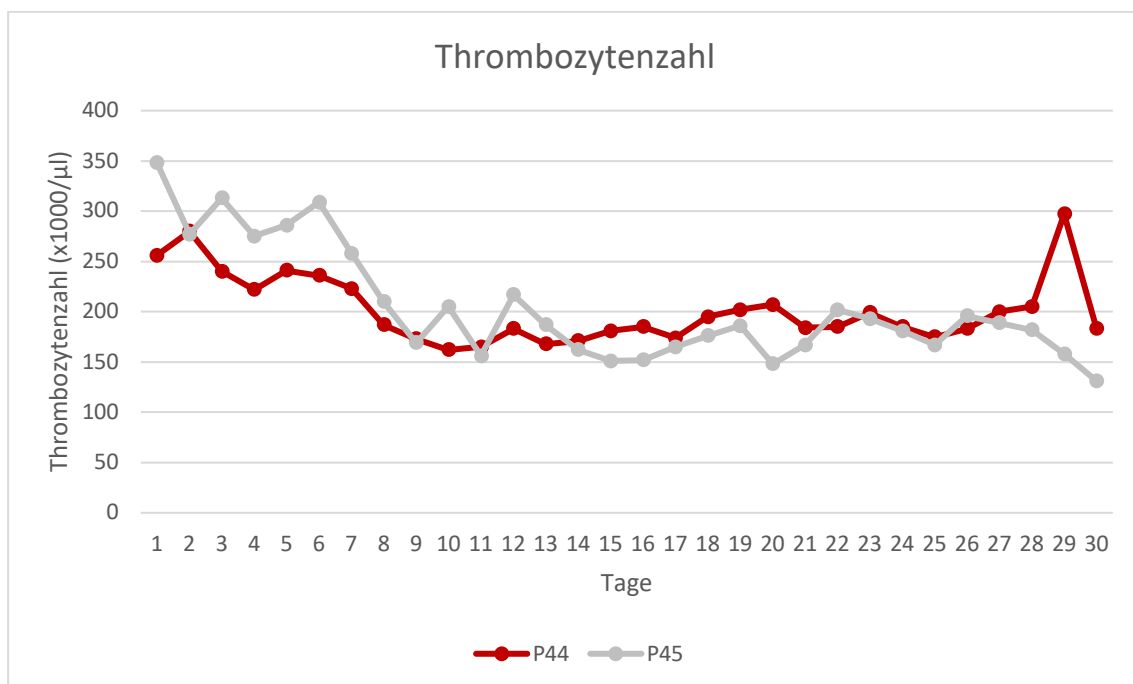


Abbildung 66: Thrombozytenzahl in x1000/μl, Verlauf von P44 und P45 der letzten 30 Tage vor Entnahme. Hier zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Systemen (P-Wert =0,849).

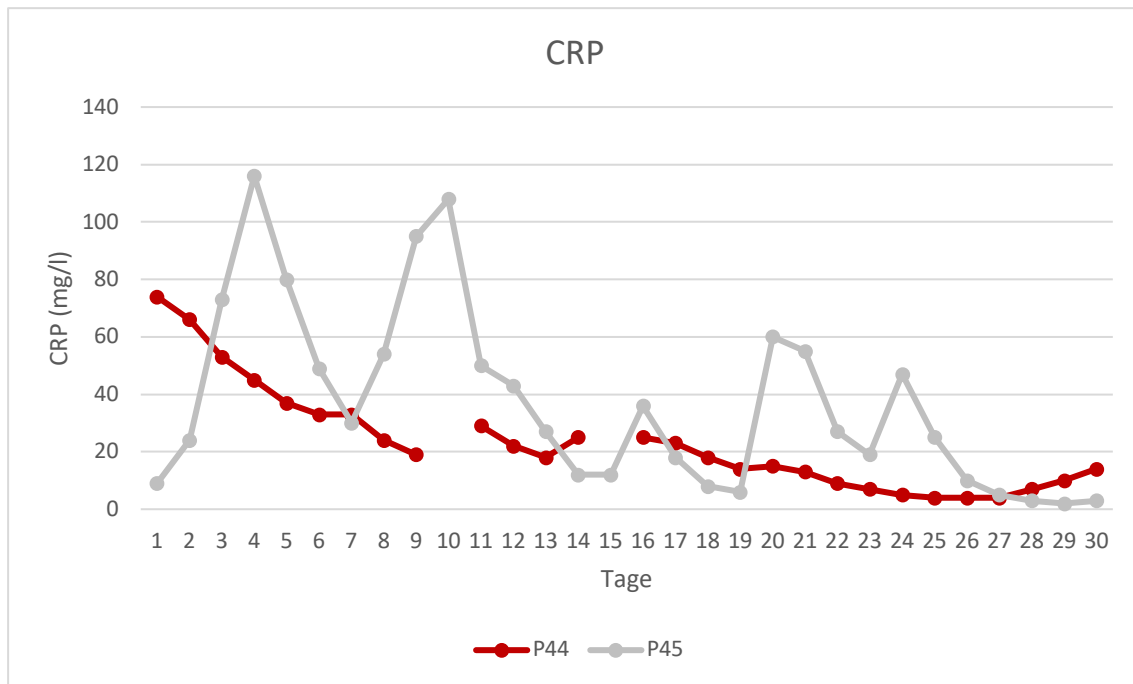


Abbildung 67: CRP in mg/l, Verlauf von P44 und P45 der letzten 30 Tage vor Entnahme. Hier zeigt sich ein eindeutig unterschiedliches Bild bei beiden Systemen, P45 weist weitaus höhere Werte und deutlichere Schwankungen auf. Der P-Wert beträgt hier 0,050.

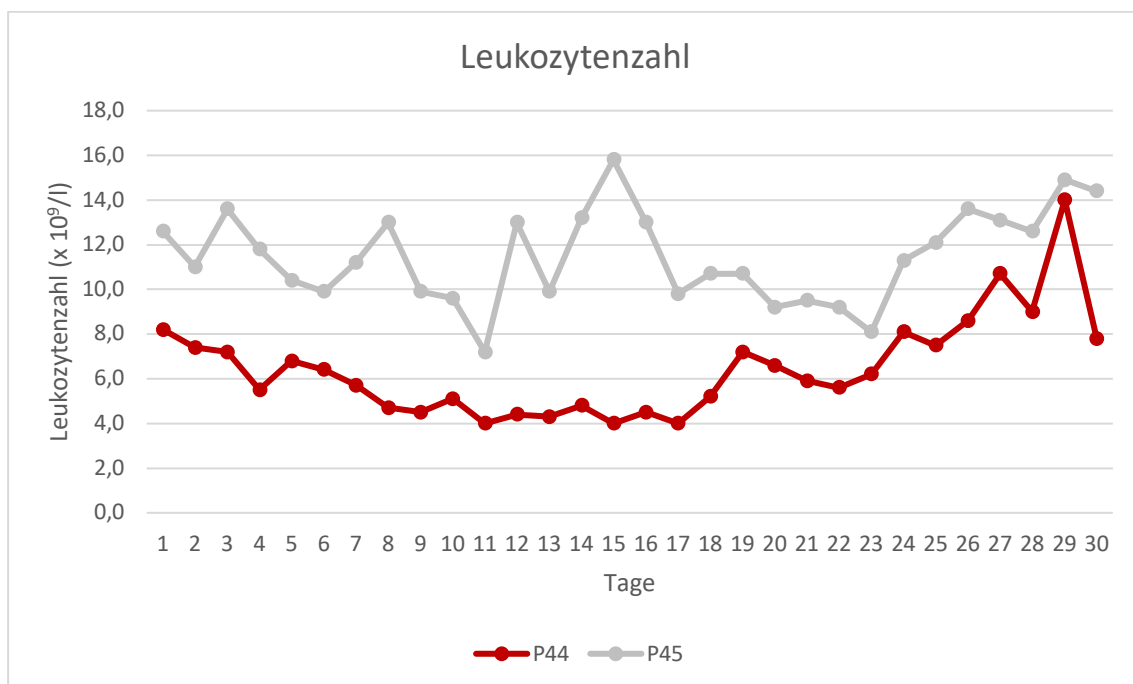


Abbildung 68: Leukozytenzahl (x 10⁹/l), Verlauf von P44 und P45 der letzten 30 Tage vor Entnahme. Hier zeigt sich der deutlichste Unterschied zwischen den Werten der beiden Pumpen mit einem P-Wert von $1,168 \times 10^{-12}$.

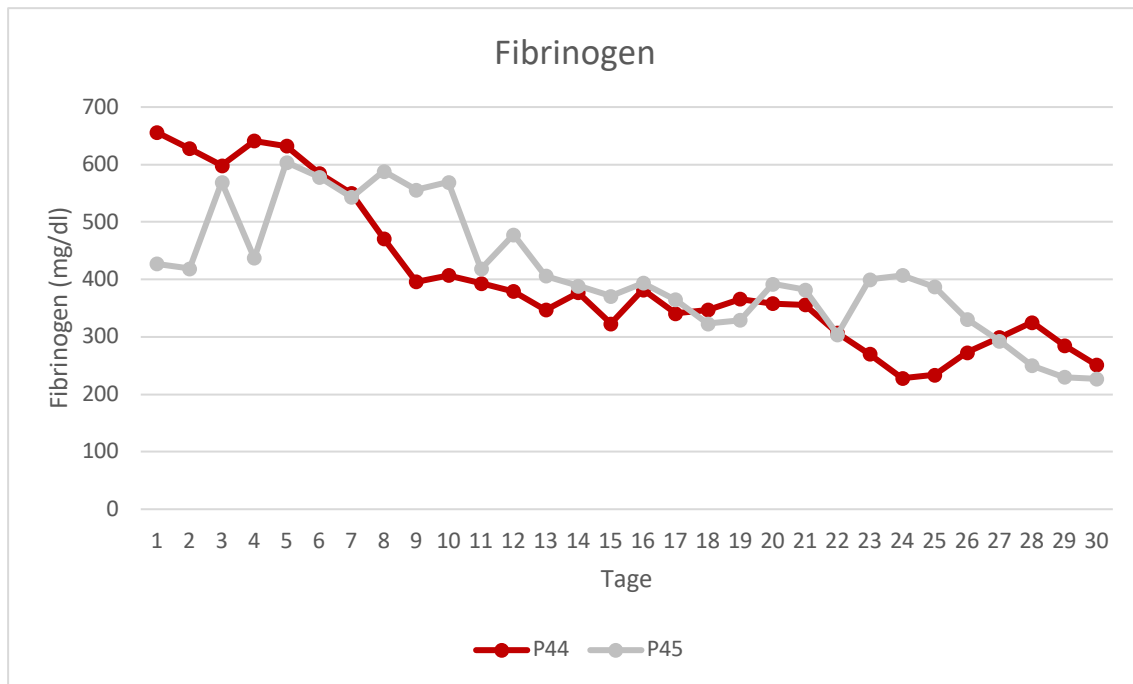


Abbildung 69: Fibrinogen (mg/dl), Verlauf von P44 und P45 der letzten 30 Tage vor Entnahme.
 Hier zeigt sich eine fallende Tendenz mit ähnlich hohen Werten ($P = 0,7$).

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnten in jedem der 13 gebrauchten Rotaflow-Pumpenköpfe Thromben mit heterogener Zusammensetzung nachgewiesen werden. Während an der Lagerung der Achse (Position A) in 92% der Pumpen immer ringförmige und geschichtete Thromben (73% weiße Thromben) gefunden wurden, wurden zusätzliche Thromben am Rotor/Gehäuse (Position B, 100% rote Thromben) und am Ausflusstutzen der Pumpe bzw. im proximalen stromabwärts gelegenen Schlauchsystem (Position C, 75% rote Thromben) identifiziert. In 46% der Pumpen lagen ausschließlich Gerinnsel am Ort A vor, in weiteren 46% lagen Thromben an mehreren Orten vor und in 8% (eine Pumpe) ein Thrombus an Ort C ohne Thrombus an Ort A. Die Thromben zeigten ein sehr heterogenes Bild. Mittels immunhistochemischer Färbungen konnte eine Kolo-kalisierung von Fibrinogen, Fibrin und vWF-Strukturen sowie von CD31-, CD42b- und CD45-positiven Strukturen gezeigt werden. Fibrin und vWF konnten nahezu ubiquitär dargestellt werden. Es zeigten sich mehrere, sich häufig wiederholende morphologische Auffälligkeiten, wie Netze und fadenartige, teils verwirbelte Strukturen. Leukozyten und Erythrozyten waren gehäuft in lockeren Netzen eingelagert an den Rändern der Thromben nachweisbar. Rote Thromben zeichneten sich überwiegend durch eine größere Gesamtfläche an Position A und einen signifikant höheren Flächenanteilen an Erythrozyten aus. Nach Entblindung der Proben fiel für die Gruppe der weißen, stärker thrombozytenhaltigen Thromben an Ort A ein signifikant höheres inflammatorisches Milieu auf.

4.1 Methodendiskussion

Bei der Erstellung der Studie ergaben sich einige methodische Einschränkungen. So waren für die Analyse nur fest anhaftende Thromben in den Pumpenköpfen zugänglich. Kleine, lose flottierende Thromben gingen wahrscheinlich beim Spülen des Systems verloren. Vor dem Spülvorgang, beim blutgefüllten System, war es nicht möglich alle Thromben zu sehen und zu dokumentieren. Es können sich in den Systemen auch zwischen Ausbau und Spülvorgang zusätzliche Thromben bilden, vor allem durch die Stase des Blutes durch eine Reduzierung der Flussrate vor der Entnahme des Pumpenkopfes. Darauf wiesen z.B. die netzartigen, sehr feinen

Thrombuswaben auf den Rotoren hin. Es ist nicht auszuschließen, dass beim Ausbau Luftblasen entstanden sind und an den entsprechenden Stellen Netze auf den Rotorblättern hinterlassen haben. Für zukünftige Untersuchungen wäre es hilfreich, das explantierte System zügig und luftblasenfrei zu spülen. Weiterhin darf nicht außer Acht gelassen werden, dass die fest anhaftenden Thromben auch nach dem Fixieren nur schwer ablösbar waren, sodass unter Umständen nur unvollständige Proben in Paraffin eingebettet werden konnten.

Ein großes Problem bei histologischen Arbeiten war und ist die Quantifizierung der Strukturen. In der Literatur gelten histologische Analysen fast immer als semiquantitativ. (65,66) Es gibt Ansätze, um die Quantifizierung von immunhistochemischen Färbungen reproduzierbarer zu machen (67,68).

In der nachfolgenden Aufzählung werden Einschränkungen der histochemischen und immunhistochemischen Methodik aufgeführt.

1. Die Schwellensetzung der Helligkeitsschwelle erfolgte manuell. Dadurch ergibt sich die Menge des erkannten Gewebes. Dies war aufgrund der unterschiedlichen Helligkeiten der vom Slidescanner eingescannten Objektträger nicht durch automatische oder standardisierte Schwellensetzung möglich.
2. Insbesondere bei den histochemischen Färbungen ist nicht immer das stärkere Färbeergebnis mit einem höheren Vorliegen des Antigens verknüpft. Die Färbeintensität ist aber die einzige Möglichkeit der Quantifizierung, da die Auswahl des zu messenden Gewebes über Helligkeitsschwellen erfolgt.
3. Bei der Aufspaltung der Übersichtsfärbungen ergaben sich teilweise abweichende Resultate im Vergleich zur Immunhistologie. Dies konnte vor allem durch das Vorliegen von Serienschnitten überprüft werden. Es sollten eigentlich in der Immunhistologie und in der Übersichtsfärbung (MSB, Carstairs) die gleichen Bestandteile identifiziert werden. In der Carstairs-Färbung werden allerdings verschiedene Blautöne verwendet, welche vom Colour Deconvolution Programm nicht immer akkurat getrennt werden konnten. In der MSB-Färbung scheiterte die Verifizierung unter anderem daran, dass das Colour Deconvolution Programm nicht drei verschiedene Farben einem

Material (Fibrin) zuordnen und zusätzlich andere Bestandteile mit ähnlichen Farben davon separieren kann.

4. Die Farbwerte mussten manuell definiert und für jedes Bild erneut überprüft werden. Wahrscheinlich können die Menge des Materials auf den Objektträgern, die Zusammensetzung der jeweiligen Thromben, die Helligkeit der Slides sowie die Zeit seit dem Ausbau eine Rolle spielen. Zudem führt Faltenbildung in den Schnitten zur Mehrfacherkennung von Gewebe, wodurch Artefakte entstehen.
5. Es existiert bis dato keine Färbung, welche alle Bestandteile eines Thrombus in unterschiedlichen Farben nebeneinander darstellt. Es ist also schwierig, absolute Aussagen über die genauen Verhältnisse der Bestandteile zueinander zu treffen. Serienschnitte und standardisierte Färbemethodik in gemeinsamen Färb-Chargen tragen zur besseren Vergleichbarkeit der Schnitte innerhalb einer Arbeitsgruppe bei.
6. Ein weiteres methodisches Problem war die lange Lagerung der Thromben in Formalin-Lösung, die einen Einfluss auf das Färbeergergebnis haben kann. Eine zeitnahe Einbettung der fixierten Proben in Paraffin sowie die unmittelbare Färbung und Digitalisierung der Proben wären eine Option. Insbesondere Trichromfärbungen scheinen sich durch Fixierung des Gewebes in Formalin beeinflussen zu lassen. (69) Wie ausgeprägt dieser Effekt wirklich ist, lässt sich ohne direkten Vergleich der Methoden und Materialien dieser Arbeit mit und ohne Fixation und Lagerung jedoch nur mutmaßen.
7. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Analytik ermöglichte eine Berechnung von Größenverhältnissen (Ringdicke, Gesamtfläche). Durch einen einzelnen Anschnitt des Thrombus können jedoch nur beschränkt Rückschlüsse über die jeweilige Größe, also den größten möglichen Anschnitt des Thrombus gezogen werden. Außerdem ist ein histologischer Schnitt ein zweidimensionales Bild eines dreidimensionalen Gebildes. Diese Einschränkung gilt auch für die Messung der Ringdicke. Hier kann außerdem verlorenes Gewebe durch Ausbau und Verarbeitung des Materials einen Unterschied machen.

Trotz der Einschränkungen der klassischen histologischen Färbungen können qualitative Aussagen getroffen werden. Aufgrund ihrer Spezifität gilt jedoch die

Immunhistologie bei der Identifizierung der Strukturen, aus welchen der Thrombus zusammengesetzt ist, als das Mittel der Wahl. Hier kann man zwischen den einzelnen Faserbestandteilen unterscheiden und auch feine Netze und einzelne Thrombozyten identifizieren, welche in den Übersichtsfärbungen leicht beim Differenzierungsschritt herausgewaschen werden oder aufgrund der geringen Größe nicht sichtbar und nicht messbar sind.

Carstairs und MSB sind gute histochemische Optionen, um einen allgemeinen Überblick über den Thrombus zu bekommen (s. Abb. 19, 20 und 21). Auch die Erythrozyten lassen sich in diesen beiden Färbungen gut darstellen (s. Abb. 34 und 35). Es gilt allerdings bei der Quantifizierung zu beachten, dass bei beiden Färbungen die Erythrozyten und das Fibrin manchmal nicht streng voneinander getrennt werden können, da die Farben teilweise sehr ähnlich erscheinen.

Zudem erscheint Fibrin in der Carstairs-Färbung rot, lila oder blau, was einen Hinweis auf das Alter der Thromben gibt. Dies wäre ein interessanter Ansatzpunkt, auch für die Thromben im Pumpenkopf. Diese sogenannte Metachromasie wurde von Khismatullin et al. an der Picro-Mallory Trichromfärbung untersucht, aus welcher die Carstairs Färbung entstanden ist. (70) Bisher war das Alter der Thromben z.B. für die Einschätzung des Lysezeitfensters bei venöser Thrombose im Fokus wissenschaftlicher Studien. (71) Bei Thromben in ECMO-Systemen wäre vor allem von Interesse, zu sehen, über welchen Zeitraum hinweg die Thromben entstehen und wachsen, um die Dynamik des Prozesses einschätzen zu können und Rückschlüsse auf die Ursachen zu ziehen. Es war zu erwarten, dass in diesen Thromben ein Nebeneinander von verschiedenen Altersstufen gefunden werden kann, dieser Verdacht konnte durch das Nebeneinander der verschiedenen Farben des Fibrins in dieser Arbeit bestärkt werden. Jedoch waren quantitative Aussagen nicht möglich.

Auch die HE-Färbung lieferte keine vollständige Klassifizierung aller Thrombusbestandteile. Allerdings ist sie sehr einfach durchzuführen, preisgünstig in der Anwendung und liefert gute Kontraste bei der Identifizierung kernhaltiger Zellen. Sie ist somit auch in Zukunft eine gute Ergänzung des Färberegimes bei der Analyse von Thromben.

Vergleichbare Arbeiten, die sich mit der Analyse der Thromben in extrakorporalen Systemen beschäftigten, verwendeten eine ähnliche Methodik, gaben jedoch keine genauen Zahlen bei der Quantifizierung der Thrombusbestandteile an (45,46,49). Andere Arbeiten publizierten genaue Zahlen zu den Flächenanteilen der Thrombusbestandteile. Hastings et al. verwendete 2017 die Carstairs-Färbung und Adobe Photoshop zur Quantifizierung, es wurden fibrin- und erythrozytenreiche sowie thrombozytenarme Thromben beschrieben (47). Staessens et al. arbeitete mit HE, MSB und Immunhistochemie mit Antikörpern gegen Thrombozyten (GPIIb/IIIa), vWF und citrulliniertes Histon H3, die Auswertung erfolgte wie in dieser Arbeit mit ImageJ (48). Die Quantifizierung wird hier ebenfalls sowohl in histochemischen als auch immunhistologischen Färbungen vorgenommen.

4.2 Charakterisierung der Thromben

Bei der räumlichen Anordnung im Pumpenkopf stand zunächst die markante Position A im Vordergrund, an welcher bei 92% der Pumpen ringförmige und geschichtete Thromben (73% weiße Thromben) gefunden wurden. Ansonsten wurden zusätzliche Thromben am äußeren Rotor/Gehäuse (Position B, 100% rote Thromben) bzw. am Auslass in das folgende Schlauchsystem (Position C, 75% rote Thromben) identifiziert. Die ringförmigen Thromben (Ort A) wurden bereits von Staessens et al. (2022) in Pumpenköpfen von VA-ECMO Systemen beschrieben, jedoch mit einer niedrigeren Häufigkeit (9 von 23, 39%) (48).

Bei der histologischen Untersuchung der Thromben zeigte sich eine große Heterogenität, sowohl der Zusammensetzung als auch der Größe und Morphologie, es konnten jedoch einige sich wiederholende Kriterien ausfindig gemacht werden.

In der immunhistologischen Untersuchung zeigten alle untersuchten Thromben einen hohen Anteil an Fibrin/Fibrinogen (39-92%) und vWF (39-98%). Rote Thromben wiesen mehr Fibrin auf ($74,8 \pm 9\%$) als weiße Thromben ($62,5 \pm 14\%$, $p=0.018$), während der Anteil an vWF unverändert blieb. Beim Vergleich der unterschiedlichen Positionen (A gegen B und C) war kein Unterschied erkennbar. Der hohe Anteil an vWF und Fibrin in den untersuchten Thromben könnte ein Abbild hoher Scherkräfte in den Rotaflow-Pumpen sein, wozu es allerdings keine entsprechenden Daten gibt. Im Gegensatz dazu war der Anteil an Fibrin bzw. vWF in den Thromben aus den

Pumpenköpfen von Staessens et al. deutlich niedriger (36.6% bzw. 30%), stellten jedoch ebenso die beiden am häufigsten nachgewiesenen Bestandteile dar. Die Unterschiede könnten auf den verwendeten ECMO-Modus zurückzuführen sein (Staessens et al.: VA-ECMO; hier: überwiegend VV-ECMO). (48) Bei vielen Präparaten konnten faden- und netzartige Fibrin- bzw. vWF-Strukturen mit eingelagerten Thrombozyten, kernhaltigen Zellen und Erythrozyten beobachtet werden.

Auffallend war weiterhin die Kollokalisierung von CD31, CD42b und CD45. Es handelte sich dabei größtenteils um großflächige positive Gebiete mit allen Markern, teilweise mit punktförmig anmutendem Verteilungsmuster. Bei weniger dichten Strukturen wurde diese Kollokalisierung auch auf kleineren Arealen und auf zellulärer Ebene beobachtet. Die Kollokalisierung von CD42b (Thrombozytenmarker, Rezeptor für vWF) und CD45 (Leukozytenmarker) könnte auf die Anwesenheit von thrombogenen PLAs (platelet-leukocyte-aggregates) hinweisen (72). Diese entstehen in Situationen des erhöhten Scherstress, in Thrombosen, Immunreaktionen, Gefäßverletzungen oder durch anderweitige Aktivierung von Thrombozyten oder Leukozyten (72). In diesem Zusammenhang stellte beispielsweise Hu et al. die Verbindung von Scherstress und der Bildung von PLAs her. Er zeigte eine erhöhte Expression von P-Selektin auf den Thrombozyten, eine erhöhte Expression von CD11b auf den Leukozyten und eine vermehrte Bildung von PLAs. Bei den Leukozyten handelte es sich um Granulozyten und Monozyten, Lymphozyten waren nicht beteiligt. (73) In der vorliegenden Arbeit konnte die Expression von P-Selektin jedoch nicht beobachtet werden. Eine weitere Spezifizierung der Leukozyten (z. B. über CD11b) wurde nicht durchgeführt. Allerdings gibt es Hinweise auf PLAs bei ECMO-Betrieb (74,75). So wurden im Blut von Patientinnen und Patienten unter ECMO-Therapie PLAs nachgewiesen, jedoch lagen die Spiegel etwa auf gleichem Niveau wie bei der gesunden Kontrollgruppe (76). Des Weiteren wurden auf den Gasfasern von Oxygenatoren in vorangegangenen Arbeiten ebenfalls PLAs nachgewiesen (77). Der Endothelzellmarker CD31 sollte eine mögliche Neovaskularisierung der Thromben aufzeigen, die jedoch in keinem Fall detektiert wurde. Die Kollokalisierung mit CD42b spricht dafür, dass hier die Expression von CD31 auf Thrombozyten sichtbar gemacht wurde.

Der hohe Anteil an CD45-positiven Bereichen bzw. Zellen in den Thromben könnte für die Beteiligung inflammatorischer Reaktionen in der Thrombenbildung sprechen (78,79). Die in der HE-Färbung identifizierten Zellkerne stimmten nicht immer mit den CD45-positiven Bereichen in der Immunhistologie überein. Kernhaltige Zellen wurden häufig randständig gefunden, was bedeuten könnte, dass Inflammation und Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion eine Rolle beim Wachstum der Thromben spielen (80). Es wurden jedoch nicht nur randständig kernhaltige Zellen gefunden, sondern immer wieder Infiltrate und verstreut im gesamten Thrombus. In der Immunhistologie konnte eindeutig ein räumlicher Zusammenhang zwischen Leukozyten und Thrombozyten hergestellt werden.

Auch die sogenannten NETs (neutrophil extracellular traps) könnten eine Rolle bei der Thrombenbildung spielen (81). NETs sind ein Abwehrmechanismus der neutrophilen Granulozyten, welcher z.B. durch Pathogene oder Cytokine ausgelöst werden kann. Es handelt sich um eine Sonderform der Apoptose mit der Freisetzung von modifiziertem Chromatin und bakteriziden Proteinen. (82) Diese Strukturen sind thrombogen und können sowohl in arteriellen als auch venösen Thromben nachgewiesen werden (83). In der vorliegenden Arbeit war der einzige Hinweis auf NETs die hin und wieder darstellbaren kaputten Zellstrukturen, welche allerdings auch durch mechanische Zerstörung der Zellen oder durch den Alterungsprozess der Thromben entstanden sein könnten. (39) Inwieweit NETs bei der Thrombenbildung unter ECMO-Therapie eine Rolle spielen, ist unklar. Zhang et al. konnte nach ECMO-Therapie angestiegene NET-Marker im Blut nachweisen (citrulliniertes Histon H3 und dsDNA), im Tiermodell zeigten hier die Systeme mit VA-Modus signifikant höhere Anstiege (84). Der Anteil des citrullinierten Histon H3 lag bei Staessens et al. (2022) in Thromben aus Pumpenköpfen bei 4,2% und war damit höher, als bei Thromben aus dem Schlauchsystem (1,8%) (48). Auch die Beteiligung von Thrombozyten wird in diesem Zusammenhang diskutiert. So konnte in einer ECMO-Simulation bei fehlenden Thrombozyten zwar eine verminderte Bildung von NETs nachgewiesen werden, allerdings hatte dies keine Auswirkung auf die Thrombuslast, sondern führte lediglich zu einer geringeren Stabilität der Thromben (85).

Die Gerüste der NETs können als Ausgangspunkt für Thrombozytenaktivierung und -aggregation dienen (86). Dieser Prozess der Histon-Thrombozyten-Interaktion wird jedoch durch Heparin unterdrückt (87,88), was eine Erklärung dafür sein kann, warum

NETs im Fall der ECMO-Thromben bis jetzt nicht als häufige Strukturen identifiziert wurden. Heparin kann NETs durch die Entfernung von Histonen aus dem Gerüst destabilisieren (81,89).

Erythrozyten tauchten in den Thromben der vorliegenden Arbeit in unterschiedlichen Größenordnungen auf. In 57% aller untersuchten Thromben dominierten Erythrozyten, was zur Klassifizierung als „rote Thromben“ führte. Der Erythrozytengehalt bei den roten im Vergleich zu den weißen Thromben lag bei $44 \pm 20\%$ vs. $6 \pm 5\%$ ($p < 0.001$). Von den ringförmigen Thromben waren 27% rot mit einem Erythrozytengehalt von $31 \pm 4\%$ (gegenüber $7 \pm 5\%$, $p < 0.001$).

Die genaue Rolle der Erythrozyten in der Thrombenentstehung ist noch nicht vollständig untersucht. Die Theorie, dass Erythrozyten keine aktive Rolle in den Vorgängen der Hämostase spielen, gilt mittlerweile immer mehr als obsolet. Neben dem Einfluss auf die Blutviskosität spielen auch Interaktionen mit Thrombozyten und Endothelzellen, sowie die Aggregatbildung und Anheftung an die Gefäßwand in vivo eine Rolle. (90,91) Zudem wird die Beteiligung von Häm, welches bei der Hämolyse von Erythrozyten freigesetzt wird, an der Thrombenbildung diskutiert (92). Dazu passt auch die Beobachtung, dass ein massiver Anstieg von freiem Hämoglobin bei einer ECMO-Therapie fast immer mit einer Pumpenkopfthrombose verbunden ist (93,94). Bei der histologischen Untersuchung verschiedener Thromben spielten auch in anderen Publikationen die Erythrozyten eine große Rolle. Nicht nur die Menge an Erythrozyten ist relevant, auch aus der Morphologie können Rückschlüsse gezogen werden. Bei allen Arten von Thromben (venös, arteriell, Emboli) können sogenannte Polyhedrozyten oder anderweitig verformte Erythrozyten nachgewiesen werden, welche im Prozess der Kontraktion des Thrombus ihre charakteristische bikonkave Form verloren haben. (95) Die genaue Morphologie der Erythrozyten konnte im Gegensatz zur elektronenmikroskopischen Analyse in der herkömmlichen Lichtmikroskopie nicht analysiert werden. Der direkte Einfluss der Expression von Phosphatidylserin auf der Erythrozytenoberfläche auf die Bildung von Thrombin ist ein weiterer Mechanismus des Mitwirkens der Erythrozyten bei der Thrombenbildung (96).

Kollagen spielt bei den arteriellen Thromben eine wichtige Rolle (97). Freiliegendes Kollagen (vom verletzten Gefäß) dient als Ansatzpunkt für Thrombozyten und einer sich daraus entwickelnden Thrombenbildung (44). Im Großteil der Thromben aus den

Pumpenköpfen wurde Kollagen I meist in punktförmigen Arealen in Kolokalisation mit CD42b, CD31 und CD45 nachgewiesen. Kollagen III war lediglich in zwei Pumpen nachweisbar in Form von Kollagen I- und III-positiven Riesenzellen. Da im ECMO-System kein subendotheliales Gewebe vorhanden ist, muss das Kollagen anderweitig in die Pumpe gelangt sein. Einerseits durch Embolisation z.B. aus der Gefäßwand bei der Kanülierung oder als Neubildung vor Ort durch die Einschwemmung von Fibroblasten mit dem Blut. Für bzw. gegen diese Theorien sprechen drei verschiedene Argumente.

Der erste Faktor ist das Verteilungsmuster des Kollagens. Die punktuelle Verteilung an unterschiedlichen Stellen im Thrombus kann nicht jeweils eine kleine Embolie gewesen sein, sondern muss wahrscheinlich mit dem Wachstum des Thrombus entstanden sein. Dagegen spricht die Kolokalisation mit CD42b. Dies legt den Verdacht nahe, dass zuerst das Kollagen existierte und die Thrombozyten dieses als Bindungspartner nutzten. Der zweite Hinweis auf die Entstehung vor Ort ist der allgemeine Lebenszyklus eines Thrombus. Es handelt sich hierbei um den physiologischen Prozess der Organisation des Thrombus, wobei Fibroblasten einwandern und Neovaskularisierungen gebildet werden (98). Gegen diese Theorie spricht das Fehlen von Neovaskularisierungen (siehe oben) und der ortsständige Charakter der Fibroblasten. Bei den großen, kollagenhaltigen Zellen könnte es sich um Fibroblasten oder phagozytierende Zellen handeln. Die Phagozytose müsste allerdings an einem anderen Ort erfolgt sein, da in diesen zwei Thromben sonst kein Kollagen zu sehen war. Diese Zellen können dann nach der Phagozytose des Kollagens im Körper mit dem Blut in die ECMO-Pumpe gespült worden sein. Dafür spricht auch das runde Erscheinungsbild der Zellen und dass einige Zellen mehrere Zellkerne besitzen.

Im Allgemeinen lässt sich allerdings vorbringen, dass es sich auch um ein Artefakt handeln könnte. Es ist eher unwahrscheinlich, dass in allen Thromben nur isoliert Kollagen I vorliegt und dass das Kollagen III außer bei den Riesenzellen in den Pumpen 44 und 45 fehlt. Außerdem ist das Erscheinungsbild eher untypisch, bei Kollagen würde man eher Fibrillen oder organisierte Strukturen vermuten und nicht viele kleine Punkte im ganzen Thrombus verteilt. Fibroblasten treten sehr selten im peripheren Blut auf.

Die Zusammensetzung der oben beschriebenen Thromben, insbesondere in der weißen Gruppe, ähnelt der von arteriellen Thromben, welche im Gegensatz zu den venösen Thromben eher in einer Umgebung mit höherem Scherstress entstehen (95). Es ließen sich arterielle Thromben aus Thrombektomien bei Apoplex jedoch ebenfalls in erythrozytenreiche und thrombozytenreiche Areale unterteilen. Auch die Morphologie wird ähnlich beschrieben mit lockeren Fibrinnetzen um die Erythrozyten herum und komplexeren, dichteren Bereichen in den thrombozytenreichen Thromben. (99) Des Weiteren konnten in arteriellen Thromben ebenfalls hohe Mengen an Fibrin in unterschiedlichen Formen nachgewiesen werden. Es fanden sich wie in den ECMO-Thromben neben den lockeren Netzen mit dazwischen gelagerten Erythrozyten auch festere Bündel von aneinandergelagerten Fibrinfasern. (95) Im Gegensatz zu arteriellen Thromben in menschlichen Gefäßen z.B. Carotiden, Koronargefäßen oder im Gehirn war in extrakorporalen Systemen keine Plaque-Ruptur als Ursache der Thromben zu erwarten und daher wurden dafür relevante Bestandteile der Thromben wie Lipide und Monozyten hier nicht explizit untersucht. (100)

4.3 Aus der Charakterisierung abgeleitete Mechanismen

Die Bildung von Thromben ist seit langer Zeit Gegenstand der medizinischen Forschung. Rudolf Virchow formulierte 1856 eine Trias der Ursachen der Thrombusformation. (101) Virchows drei Faktoren sind Blutzusammensetzung, Veränderungen der Gefäße und verminderte Strömungsgeschwindigkeit. Heute werden die drei Faktoren konkretisiert und erweitert, z.B. um erhöhte Scherkräfte und Inflammation (79,102). Für Myokardinfarkte und Schlaganfälle ist der Zusammenhang zwischen Inflammation und Thrombose seit längerem Gegenstand der Forschung (103). In letzter Zeit kamen dabei immer mehr Details, wie der Einfluss des von Willebrand-Faktors in diesem Zusammenhang zu Tage. Die genauen Abläufe der Thrombuschronologie sind jedoch weiterhin Gegenstand der aktuellen Forschung, insbesondere in extrakorporalen Systemen. (79,104,105)

Beim Kontakt von Blut mit Fremdoberflächen während einer ECMO-Therapie spielen sich verschiedene Reaktionen ab, die sich von den Abläufen im Gefäßsystem unterscheiden (106). Der Vorgang beinhaltet Protein-Adsorption auf den

Fremdoberflächen, Adhäsion von Thrombozyten, Leukozyten und Erythrozyten, Thrombinbildung und Komplementaktivierung. Bei diesem Prozess spricht man auch vom sogenannten „Biofouling“. Für die Adhäsion von Thrombozyten ist Fibrinogen der häufigste Bindungspartner. An zweiter Stelle der Thrombozytenbindungspartner stehen Fibronectin und von Willebrand Faktor. (107,108) Die histologische Untersuchung lässt keinen Rückschluss auf diese Vorgänge zu. Aufgrund der starken Adhärenz der Thromben im Pumpenkopf fehlt häufig die innerste Schicht des Thrombus, wodurch man nicht endgültig rekonstruieren kann, welche Zellen oder Proteine sich als Erste an der Oberfläche der ECMO-Pumpe angeheftet haben. Im Gegensatz dazu konnte Figueroa Villalba et al. für Thromben im Schlauchsystem einen möglichen chronologischen Ablauf rekonstruieren: die Initiation der Thrombusbildung durch Anheftung von Fibrin auf Fremdoberflächen, woraufhin sich Thrombozyten, von Willebrand Faktor sowie Erythrozyten und Leukozyten ablagerten (49). Auch bei Hastings et al. wird die Ablagerung von Proteinen auf Systemoberflächen und dortige Bindung von Fibrin als wahrscheinliche Initialsituation diskutiert. (46)

Weitere mögliche Mechanismen der Thrombusbildung in den Pumpenköpfen könnten die Thrombozytenaktivierung durch den von hohen Scherkräften entfalteten von Willebrand Faktor (104) und die Thrombusbildung durch Blutstase, welche zur Bildung sogenannter roter bzw. venöser Thromben führt (109) sein. Die beschriebene Thrombenzusammensetzung mit einem ubiquitär hohen Anteil an vWF im Thrombus mit einer zum Teil faden- bzw. netzartigen Struktur könnte ein Beleg für diesen Mechanismus darstellen. Die durch die Elongation des vWFs freiwerdenden Bindungsstellen für Thrombozyten und Leukozyten spiegelt sich in der Kolo-kalisation der Netzstrukturen mit CD42b und kernhaltigen Zellen (HE-Färbung) wider.

Die Thromben sind häufig innen von dichter Struktur als außen. An der Oberfläche finden sich häufig lockere Netze mit Zellen in den Zwischenräumen. Dies legt nahe, dass das Wachstum der Thromben über diese lockeren Strukturen erfolgt und lässt vermuten, dass sich die lockeren Strukturen mit der Zeit verdichten. Dafür sprechen auch die Bereiche in den Thromben, welche kaputte Zellen aufweisen. Solche Zellreste, v.a. bei den Erythrozyten konnten auch in Staessens et al. identifiziert werden (48). Kaputte Erythrozyten können auch durch Hämolyse entstanden sein,

kaputte Granulozyten können ein Hinweis auf NETose sein. Ein weiterer Hinweis auf zerstörte Erythrozyten sind die stark eosinophilen Bereiche in der HE-Färbung, welche keinem der Antikörper der Immunhistologie eindeutig zugeordnet werden konnten (s. Abschnitt 3.2.1.2 Abb. 23). Die Schichtung der Thromben an Ort A deutet darauf hin, dass die Thromben über einen längeren Zeitraum entstanden sein müssen. Es ließ sich in der MSB-Färbung blaues, altes Fibrin nachweisen, außerdem fand sich in manchen Schichten der Thromben zerstörtes und verdichtetes Material eher innen und außen lockere Netze und zelluläre Komponenten. Die Thromben mit erythrozytenreichen Fetzen, welche insgesamt eine größere Grundfläche aufwiesen, können eine Vorstufe eines ausgedehnteren Thrombosierungsprozesses darstellen, hier zeigt sich mehr Fläche mit wahrscheinlich neuem Thrombusgewebe mit lockeren, roten Fibrinnetzen und somit auch eine insgesamt schnellere Größenzunahme, welche nicht mehr nur auf die Achse des Rotors begrenzt ist, sondern sich frei flottierend auf andere Orte in der Pumpe ausbreitet. Es ist außerdem denkbar, dass sich diese flottierenden Anteile lösen und in den Oxygenator und das Schlauchsystem embolisieren und hier zur weiteren Thrombusbildung oder Ablagerungen mit gestörtem Gasaustausch führen.

Abgegrenzte Bestandteile mancher Thromben an Ort A, welche sich nicht in die restliche Ringstruktur einfügen, können ein Hinweis auf embolische Prozesse in der Pumpe sein. Sie können zu Beginn der Pumpenlaufzeit an einem anderen Ort im System entstanden sein und sich an der Achse abgelagert haben, um wiederum dort die Formation weiteren thrombotischen Materials auszulösen. Außerdem kann sich embolisches Material auf wachsenden Thromben angelagert haben. Dies kann nur vermutet und durch histologische Analyse nicht nachgewiesen werden.

Ein weiteres sich wiederholendes Spezifikum stellen die Lakunen dar. Die Füllung mit Erythrozyten legt den Prozess der Neovaskularisierung im Prozess der Organisation der Thromben nahe. Dies konnte jedoch u.a. in den Vorversuchen durch das Fehlen von Tissue Factor und das Fehlen von Kollagen an den potenziellen Gefäßwänden ausgeschlossen werden. Eine weitere Möglichkeit sind durch Thrombusgewebe umschlossene Lufteinschlüsse von zuvor im System vorhandenen Luftblasen. Außerdem kann es sich um die in 4.4 diskutierten „Microchannels“ handeln.

4.4 Gruppeneinteilung in weiße und rote Thromben

Die Gruppenbildung in rote und weiße Thromben erfolgte nach dem Vorbild arterieller und venöser Thromben. Trotz unphysiologischer Flussverhältnisse in ECMO-Systemen können auch hier diese zwei Gruppen beobachtet werden. Weiße Thromben entstehen in vivo meist nach Plaqueruptur und es sammeln sich an der entsprechenden Stelle viele Thrombozyten, was dem Thrombus ein helles Aussehen verleiht. Rote Thromben finden sich eher in der Gruppe der venösen Thromboembolien, welche Endotheldysfunktionen und Stase des Blutes zur Ursache haben können und durch ihren hohen Anteil an Erythrozyten rot imponieren. (91)

In einer Arbeit von Kim und Ku wurden in einem künstlichen Gefäß mit kollagenbeschichteten Wänden und hohem Scherstress die dort gebildeten Thromben untersucht. Darin fanden sich wiederkehrende morphologische Auffälligkeiten. Es zeigten sich, ähnlich der in den Pumpen dieser Arbeit gefundenen Thromben, dünne, thrombozytenreiche, vWF-reiche Fäden, welche in das Lumen hereinreichten und zur Anhaftung weiterer Thrombusbestandteile führten. Des Weiteren fanden sich dichtere Bestandteile des Thrombus, mit sog. „Microchannels“. (110) Diese sind möglicherweise ähnlich den in dieser Arbeit gefundenen Rissen und Lakunen. Unter dem Begriff Microchannels versteht man die Poren oder auch „Täler“ in nicht vollkommen dichten Thromben. Diese Begriffe werden nicht immer einheitlich in der Literatur verwendet, außerdem werden immer wieder verschiedene Begriffe gewählt. Neben der Porosität spielt die Dichte der Faseraggregate bei der Durchlässigkeit der Thromben eine Rolle. Die Porosität bzw. Durchlässigkeit der Thromben ist unter anderem Untersuchungsgegenstand im Hinblick auf Lysetherapien, da je nach der Durchlässigkeit der Thromben lokal wirkende Medikamente mehr oder weniger Effektivität zeigen. (111,112) In weiteren Untersuchungen weißer Thromben ergab sich auch eine porösere Struktur als bei roten Thromben, die Stabilität der weißen Thromben jedoch überschritt die der weniger porösen roten Thromben. Dies gewährleistet in vivo einen zumindest teilweise erhaltenen weiteren Blutstrom. (113)

Es fanden sich überwiegend gemischte Bilder in den Systemen, aus welchen mehrere Thromben gewonnen wurden. So kann man vermuten, dass nicht ausschließlich patienteneigene Faktoren für die Bildung roter oder weißer Thromben verantwortlich

sind, sondern höchstwahrscheinlich zusätzlich die unterschiedlichen Scherkräfte an verschiedenen Orten im System. Des Weiteren stimmten Fundort und farbliche Gruppenzuordnung nicht immer überein. Es konnten jedoch an den Orten B und C mehr rote als weiße Thromben und an Ort A mehr weiße als rote Thromben gefunden werden. Um die Theorie der Scherkräfte als Ursache dieses Unterschiedes zu unterstützen, sollte ergänzend zu dieser Arbeit eine Berechnung der Scherkräfte an diesen Orten in der Pumpe erfolgen.

Ein weiterer interessanter Fund ist die unterschiedliche Zusammensetzung des Thrombus an Ort A der beiden Pumpen 44 und 45. Hier fand sich ein weißer und ein roter Thrombus an der gleichen Stelle im System bei der gleichen Patientin in zwei aufeinanderfolgenden Systemen. In beiden Pumpen fanden sich weitere Thromben im System, die Reihenfolge der Entstehung dieser Thromben ist unbekannt. Es kann sein, dass die Thromben an Ort B die Strömungs- und Druckverhältnisse an Ort A bei einer Pumpe verändert haben oder dass die zunehmende Aktivierung der Gerinnung zu einer eher Thrombozyten-basierten Hämostase an Ort A in der dritten Pumpe der Patientin geführt hat (s. 4.5).

4.5 Einfluss von Patientencharakteristika auf die Zusammensetzung der Thromben

Man unterscheidet bei der Gerinnungsdiathese einen prothrombotischen und einen antithrombotischen Zustand. Patientinnen und Patienten in einem prothrombotischen Zustand können diverse Ursachen hierfür aufweisen z.B. Endothelschäden, zurückliegende Ischämien, Inflammation, Atherosklerose, Diabetes mellitus und arterielle Hypertonie. (114) Diese Grunderkrankungen können unter Umständen die Thrombusbildung in ECMO-Systemen begünstigen. Zusätzlich zu den erworbenen prothrombotischen Zuständen spielen die primären, angeborenen Thrombophilien eine Rolle. (115) So zeigte sich bei Figueroa Villalba et al. ein erhöhtes Auftreten von Thromben auf Oxygenatormembranen bei Patientinnen und Patienten mit thromboembolischer Vorgeschichte oder bakterieller Infektion (49). In der vorliegenden Arbeit traten keine Auffälligkeiten hinsichtlich primärer Indikation und der Schwere der Erkrankung (z.B. SOFA-Score) auf. Zudem war das Ausmaß der

Thrombuslast in den Pumpenköpfen nicht von der Laufzeit des Systems abhängig. Es konnte keine Korrelation zwischen den untersuchten Laborparametern und der Thrombuslast der Pumpen hergestellt werden.

Auffallend war jedoch, dass beim Vergleich der Gruppen „Rot“ und „Weiß“ signifikante Unterschiede im Bereich der Inflamationsparameter gefunden wurden. Insbesondere im Vergleich der Pumpen 44 und 45 miteinander zeigten sich deutliche Unterschiede. In der Pumpe 45 bzw. der Gruppe der weißen Thromben wurden insgesamt höhere inflammatorische Marker gemessen. Dies legt den Verdacht nahe, dass die weißen Thromben an Ort A bevorzugt bei inflammatorischen Umgebungen gebildet wurden. Die Bildung der sogenannten Immunthrombose weist unter anderem im Bereich der kardiovaskulären Erkrankungen zukunftssträchtige therapeutische Strategien auf, welche für die Verhinderung der Thrombenbildung in ECMO-Systemen ebenso relevant zu sein scheinen (79). Auch Staessens et al. konnte erhöhte Leukozytenzahlen und erhöhte Werte der Lactatdehydrogenase im Blut an den ersten 6 Therapietagen mit den Thromben mit niedrigem Erythrozytengehalt und hohen Fibrin-Flächenanteilen assoziieren (48). Bei pädiatrischer ECMO-Therapie konnten eine erhöhte Mortalität sowie schlechtere Ergebnisse in neurologischer Bildgebung bei erhöhten inflammatorischen Parametern nachgewiesen werden (116). Im Rahmen der Covid-19-Pandemie konnte die Immunthrombose als einer der zentralen Pathogenitätsmechanismen beschrieben werden (117). Da respiratorische Infekte auch vor und wahrscheinlich ebenfalls nach der Pandemie eine der häufigsten Indikationen für venovenöse ECMO-Therapie darstellen (118), empfiehlt es sich, diesen Mechanismus der Thrombusbildung weiter zu ergründen.

4.6 Limitationen der Studie

Die vorliegende Arbeit unterliegt einigen Limitationen, u.a. durch die Datenerhebung aus lediglich einer Klinik und eines Pumpenmodells, sowie dem Ausschluss der VA-ECMO-Systeme. Bei Figueroa Villalba et al. zeigte sich, dass VA-ECMO Systeme eine 5,4-fach höhere Wahrscheinlichkeit der Thrombosierung zeigten (49). Außerdem wurden hier nur die Pumpenköpfe untersucht und nicht der Oxygenator oder das Schlauchsystem. Es sollte ergänzend zu dieser Arbeit die Untersuchung von

vollständigen ECMO-Systemen in größerer Anzahl sowie die Analyse der VA-Systeme erfolgen. Höhere analysierte Stückzahlen würden auch einen besseren Vergleich der Patientendaten zulassen. Außerdem wäre es wichtig, tatsächliche Pumpenkopfthrombosen zu analysieren und sie mit der hier erarbeiteten Methodik einem Ort und einer farblichen Gruppe zuzuordnen. Durch die fehlende Analyse der Strömungsdynamik und der Scherkräfte in den analysierten Pumpenköpfen konnten keine Aussagen über eine derartige Kausalität getroffen werden.

4.7 Ausblick

Das bessere Verständnis der Thrombenbildung in ECMO-Systemen ist ein wichtiger Ansatzpunkt, um dem Ziel einer komplikationsarmen Lungenersatztherapie näher zu kommen. Anpassungsmöglichkeiten bestehen in den Pumpenköpfen, um Areale mit Blutstase und zu hohen Scherkräften zu vermindern und bei der Verbesserung der Oberflächenbeschichtung und Biokompatibilität der Fremdoberflächen. Die Zusammensetzung der Thromben kann Hinweise für eine Anpassung des antikoagulatorischen Therapieregimes geben, auch kann man Rückschlüsse ziehen auf medikamentöse Ansatzpunkte wie Thrombozytenaggregationshemmer und medikamentöse Fibrinolyse, wie es schon bei Thromben in Myokardinfarkten und Schlaganfällen untersucht wurde (119,120). So könnte man perspektivisch auch bei Thrombosen in ECMO-Systemen mit medikamentöser Lysetherapie oder Thrombozytenaggregationshemmern arbeiten, statt einen Systemwechsel anzustreben. Außerdem wäre ein ergänzendes antiinflammatorisches Therapieregime denkbar (79,121). Hierbei ist allerdings zu bedenken, dass den Komplikationen des Systemwechsels die jeweiligen Risiken einer Lysetherapie bzw. anderer therapeutischer Interventionen gegenüberstehen.

5 Zusammenfassung

Die Bildung von Thromben in ECMO-Pumpenköpfen bleibt ein nicht vollkommen verstandenes Phänomen. Die histologische Analyse der Thromben bietet einige wichtige Hinweise in Bezug auf die Ergründung der Ursachen und Abläufe.

Durch die histologischen Übersichtsfärbungen und immunhistologische Charakterisierung der Thromben konnte ein besserer Überblick über die Bestandteile der Thromben gewonnen werden. Es wurde eine Methodik etabliert, mit welcher halbautomatisch eine größere Anzahl an Thromben untersucht werden kann, sowie die Vorteile und Nachteile der einzelnen Färbungen und Relevanz verschiedener Antikörper festgestellt. Bei der Untersuchung der Thromben zeigte sich eine große Heterogenität sowohl der Zusammensetzung als auch der Größe und Morphologie, es konnten jedoch einige sich wiederholende Kriterien ausfindig gemacht werden.

Makroskopisch waren die Thromben gut in rote, weiße und gemischte Thromben einzuteilen, diese Einteilung konnte mikroskopisch bestätigt werden und die makroskopisch uneindeutigen Thromben einer Gruppe zugeordnet werden. Somit erwies sich die mikroskopische Einteilung anhand der Erythrozyten in den Übersichtsfärbungen als die beste Methode für die Zuordnung zur roten oder weißen Gruppe. Morphologisch fanden sich an Ort A eine Schichtung unterschiedlicher Bestandteile und ortsunabhängig Verwirbelungen, Risse, Lakunen, bestimmte Verteilungsmuster der kernhaltigen Zellen in Aggregaten z.B. an den Rändern dichter Bereiche innerhalb der Thromben sowie Erythrozyten in lockeren Netzen am Thrombusrand aufgelagert. Die Kolokalisation von CD45 und CD42b kann ein Hinweis auf immunologische Einflüsse bei der Thrombenbildung in ECMO-Pumpenköpfen sein. In der Quantifikation der Thrombusbestandteile zeigte sich bei den Thromben an Ort A eine signifikant höhere Thrombusfläche der roten Thromben im Vergleich zu den weißen Thromben, an den Orten B und C bestand dieser Zusammenhang nicht. In den erythrozytenreichen Thromben der Gruppe „Rot“ fanden sich weniger Thrombozyten und umgekehrt viele Thrombozyten in der erythrozytenarmen Gruppe „Weiß“. Fibrin und von Willebrand Faktor stellten den größten Flächenanteil in den Thromben beider Gruppen dar.

Die Patientendaten zeigten sich sehr heterogen, es konnten jedoch in der Gruppe „Weiß“ signifikant höhere Leukozytenzahlen und Fibrinogenwerte sowie niedrigere Thrombozytenzahlen als in der Gruppe „Rot“ bei der Analyse der letzten 6 Tage vor Explantation der Systeme gemessen werden.

6 Anhang

6.1 Färbeprotokolle

6.1.1 Immunhistochemie

Arbeitsschritt	Zeitablauf	Materialien
Absteigende Alkoholreihe zum Entparaffinieren	3x5-10min	Xylol
	2x2-3min	100% Ethanol
	2x2-3min	96% Ethanol
	2x2-3min	70% Ethanol
Waschen		VE
Endogene Peroxidase blocken	10min	3% H ₂ O ₂ in VE-Wasser
Waschen		VE
Optional je nach Antikörper: Gewebeaufschluss	20min bei 97°C im Wasserbad kochen	Citratpuffer (pH6) oder EDTA-Puffer (pH9)
Optional: Abkühlen	20min bei Raumtemperatur	
Optional: Waschen		VE
In Coverplates und Shandon-Wannen einklemmen		PBST
Waschen	2x	PBST

Blocken unspezifischer Bindungen	30min bei Raumtemperatur	10% NGS (Normal Goat Serum) in PBS
Waschen		PBST
1. Antikörper	Über Nacht bei 4°C	Mouse/Rabbit anti Human in verschiedenen Konzentrationen (s.u.) in PBS
Waschen	3x	PBST
2. Antikörper	1h bei Raumtemperatur	z.B. biotinylierter Goat anti Rabbit/Mouse 1:300 in PBS
Waschen	1x	PBST
Waschen	2x	PBS
3. Antikörper	1h	Avidin-Biotin-Complex (ABC): 10µl A in 1000µl PBS schütteln, 10µl B dazu, vortexen, 30min ruhen lassen
Waschen	1x	PBST
Waschen	2x	PBS
Färben	5min im Dunkeln	DAB: 1 Tropfen DAB pro ml Substratpuffer
Waschen		PBS
Aus Wannen nehmen		PBS
Waschen		VE
Gegenfärbung	Ca. 1 min	Mayer's Häkalaun
Waschen		
Differenzieren	Kurz dippen	HCl Alkohol
Waschen		VE

Bläuen	5 min	Leitungswasser
Aufsteigende Alkoholreihe	1-2min	70%
	3x1-2min	96%
	2x1-2min	100%
		Xylol
Eindeckeln		Entellan

6.1.2 Sirius-Resorcin-Fuchsin-Färbung

Arbeitsschritt	Zeitablauf	Materialien
Absteigende Alkoholreihe zum Entparaffinieren	3x5-10min	Xylol
	2x2-3min	100% Ethanol
	2x2-3min	96% Ethanol
	2x2-3min	70% Ethanol
Waschen		VE
Färben der elastischen Fasern	15min bei 60°C im Wasserbad	Resorcin-Fuchsin-Lösung
Abkühlen	5min bei Raumtemperatur	
Differenzieren	mindestens 3x eintauchen bis elastische Fasern hervortreten und Hintergrund entfärbt ist	96% Ethanol

Kernfärbung	15 min bei Raumtemperatur	Weigert's Hämatoxylin: A und B 1:1
	Kurz eintauchen	VE
Bläuen	10 min	Leitungswasser
Waschen		VE
Färben	45 min	Picro-Sirius: 0,5g Direct Red 500ml gesättigte wässrige Pikrinsäure
Waschen	2x	Gesäuertes H ₂ O: 5ml Eisessig 1000ml destilliertes Wasser
Schnelle aufsteigende Alkoholreihe	3x dippen	100%
	2x	Xylol
Eindeckeln		Entellan

6.1.3 Martius Scarlet Blue

Arbeitsschritt	Zeitablauf	Materialien
Absteigende Alkoholreihe zum Entparaffinieren	3x5-10min	Xylol
	2x2-3min	100% Ethanol
	2x2-3min	96% Ethanol
	2x2-3min	70% Ethanol
Waschen		VE

Fixierung	Über Nacht bei Raumtemperatur oder 1h bei 60°C im Wasserbad	Bouin: 150ml gesättigte wässrige Pikrinsäure 50ml 40% Formol 10ml Eisessig
		70% Ethanol
		96% Ethanol
		70%Ethanol
Kernfärbung	15 min	Weigert's Hämatoxylin: A und B 1:1
	Kurz eintauchen	VE
Bläuen	10 min	Leitungswasser
		70% Ethanol
		96% Ethanol
Färben	2 min	Martius: 0,5g Martius Yellow 2g Phosphorwolframsäure 100ml Ethanol 95%
Waschen	3x	VE
Färben	5 min	Scarlet: 1g Ponceau 6R 2,5 ml Eisessig 97,5 ml destilliertes Wasser
Differenzieren, bis Fibrin rot und Kollagen klar erscheint	Ca. 5 bis 10 min	1% Phosphorwolframsäure, mehrmals wechseln bis Säure klar
Färben	10 min	Blue: 0,5g Methylblau 1ml Eisessig 98ml destilliertes Wasser

Waschen		1% Essigsäure, bis Essig klar ist wechseln
Schnelle aufsteigende Alkoholreihe	Kurz dippen	70%
	Mehrmals kurz dippen	96%
	Ca. 1 bis 2 min	100%
		Xylol
Eindeckeln		Entellan

6.1.4 Carstairs Method for Fibrin and Platelets

Arbeitsschritt	Zeitablauf	Materialien
Absteigende Alkoholreihe zum Entparaffinieren	3x5-10min	Xylol
	2x2-3min	100% Ethanol
	2x2-3min	96% Ethanol
	2x2-3min	70% Ethanol
Waschen		VE
Ätzen	5 min	5% Eisenammoniumsulfat
Waschen		VE
Kernfärbung	5 min	Mayer's Hämatoxylin
Waschen		VE
Färben	1h	Pikrinsäure-Orange G: 20ml gesättigte wässrige Pikrinsäure

		80ml gesättigte Pikrinsäure in Isopropanol 0,2g Orange G
Waschen		VE
Färben	5 min	Ponceau-Fuchsin: 0,5g Säurefuchsin 0,5g Ponceau 2R 1ml Essigsäure 99ml destilliertes Wasser
Differenzieren		1% Phosphorwolframsäure
Waschen		VE
Färben	10 min	Anilinblau: 1g Anilinblau 100ml 1% Essigsäure
Waschen		VE
Aufsteigende Alkoholreihe	1-2min	70%
	3x1-2min	96%
	2x1-2min	100%
		Xylol
Eindeckeln		Entellan

6.1.5 Hämatoxylin Eosin

Arbeitsschritt	Zeitablauf	Materialien
Absteigende Alkoholreihe zum Entparaffinieren	3x5-10min	Xylol

	2x2-3min	100% Ethanol
	2x2-3min	96% Ethanol
	2x2-3min	70% Ethanol
Waschen		VE
Kernfärbung	5 min	Mayer's Hämalan
Waschen		VE
Differenzieren		0,1% HCl-Alkohol: 3ml konzentriertes HCl 1l Ethanol 70%
Waschen	3-5x	VE
Bläuen	2-3min	Leitungswasser
Waschen		VE
Aufsteigende Alkoholreihe	2min	70% Ethanol
	2min	96% Ethanol
Färben	10min	Eosin: 1% in Ethanol 96%
Differenzieren	Mehrmals bis Ethanol klar	96% Ethanol
Aufsteigende Alkoholreihe	2x3min	100%
	2x10min	Xylol
Eindeckeln		Entellan

6.2 Materialien

6.2.1 Geräte

Paraffin-Mikrotom Mikrom HM340E	Thermo Scientific	Walldorf, D
Wasserbad des Mikrotoms	Kunz Instruments	Stockholm, SWE
Trockenschrank	Memmert	Schwabach, D
Vortex-Gerät	Heidolph	Schwabach, D
Alkoholbäder	Medite	Burgdorf, D
Kühlschrank, Liebherr Comfort	Liebherr	Ochsenhausen, D
Multipette Plus (Stepper)	Eppendorf	Wesseling-Berzdorf, D
Eppendorf Reference 0,5-10µl	Eppendorf	Wesseling-Berzdorf, D
Eppendorf Research (2-20-100-1000µl)	Eppendorf	Wesseling-Berzdorf, D
Abzug	Waldner	Wangen, D
Magnetrührer, Ika Vibramax-VXR	Ika	Staufen, D
Pipetboy	Integra Bioscience	Fernwald, D
Milli Q-Anlage (Dest)	Millipore	Schwalbach, D
Autoklav, Varioklav	H+P Labortechnik	Oberschleißheim, D
Computer	Dell	Frankfurt a.M., D
Pinsel Rotmarder f. Paraffin	Elco	Bechhofen, D
Halterung für Objektträger	Medite	Burgdorf, D
Slide Scanner	3DHISTECH Kft.	Budapest, HUN

6.2.2 Verbrauchsmaterial

Objektkträger Superfrost (Menzel Gläser)	Thermo Scientific	Waltham, USA
Shandon OT-System Racks	Thermo Fisher	Hennigsdorf, D
Shandon OT-System Coverplates	Thermo Fisher	Hennigsdorf, D
1,5+2ml-Reagenzgefäße	Eppendorf	Wesseling-Berzdorf, D
Combitips (2,5-5-10 µl)	Eppendorf	Wesseling-Berzdorf, D
Spitzen (20-100-1000µl)	Eppendorf	Wesseling-Berzdorf, D
Deckgläser	VWR	Ismaning, D
Mikrotomklingen	Feather	Osaka, Japan
Rasierklingen	Astra	St. Petersburg, RUS
Skalpelle Feather No 11 + No 22	PFM	Köln, D

6.2.3 Chemikalien

Xylol	VWR	Radnor, USA
Ethanol (rein)	Roth	Karlsruhe, D
Ethanol (vergällt, für Alkoholreihe)	Chemikalienausgabe Universität Regensburg	Regensburg, D
HIER Citrate Buffer pH 6,0 (10 X)	Zytomed Systems	Berlin, D
HIER T-EDTA Buffer pH 9,0 (10 X)	Zytomed Systems	Berlin, D
Tween 20	Sigma-Aldrich	Saint-Louis, USA
H ₂ O ₂	Merck	Darmstadt, D

PBST 0,005%	Im Labor hergestellt	Regensburg, D
PBS	Im Labor hergestellt	Regensburg, D
NaCl	Roth	Karlsruhe, D
Na ₂ HPO ₄	Roth	Karlsruhe, D
KCl	Roth	Karlsruhe, D
KH ₂ PO ₄	Roth	Karlsruhe, D
Triton	Roth	Karlsruhe, D
Aqua bidest	Roth	Karlsruhe, D
NGS (Normal Goat Serum)	Sigma-Aldrich Inc.	Saint-Louis, USA
Methanol	Roth	Karlsruhe, D
Biotinylierter goat anti rabbit/mouse Antikörper	Vector	Burlingame, USA
Vectastain Elite Standard Kit (PK6100)	Vector	Burlingame, USA
Liquid DAB+ Substrate Chromogen System	Dako	Glostrup, DEN
Mayers Hämalalunlösung	Merck	Darmstadt, D
HCl-Lösung	Merck	Darmstadt, D
Entellan	Merck	Darmstadt, D
Pikrinsäure	Sigma	München, D
Ponceau 6R	Santa Cruz Biotechnology Inc.	Dallas, USA
Ponceausäurefuchsin	EMS	Domat/Ems, CH
Phosphorwolframsäure	Honeywell Fluka (Fisher Scientific)	Schwerte, D
Direct Red 80	Sigma	München, D
Resorcin-Fuchsin-Lösung	Roth	Karlsruhe, D

Weigerts Hämatoxylin A und B	Roth	Karlsruhe, D
Eisessig/Essigsäure	Merck	Darmstadt, D
Martius Yellow	Roth	Karlsruhe, D
Paraformaldehyd	Sigma	München, D
Methylblau	Merck	Darmstadt, D
Eisenammoniumsulfat	EMS	Domat/Ems, CH
Isopropanol	Riedel-de Haen	Seelze, D
Orange G	Sigma	München, D
Anilinblau	Roth	Karlsruhe, D
Eosin	Merck	Darmstadt, D
Direct Red	Sigma	München, D
Resorcin-Fuchsin-Lösung	Roth	Karlsruhe, D

6.2.4 Software

Fiji (Fiji is just ImageJ)	Open source	
Microsoft Excel	Microsoft Corporation	Redmond, USA
Case Viewer	3DHISTECH Kft.	Budapest, HUN

6.2.5 Antikörper

Name	Hersteller	Ort	Verdünnung
Monoklonal Mouse Anti-Human CD31, Clone JC70A	Dako	Glostrup, DEN	1:30

CD42b/GPIb alpha Antibody (MM2/174) NBP1-28457	Novus Biologicals	Abingdon, GBR	1:300
Anti-CD45RA- Antikörper, Klon MEM 56	Merck	Darmstadt, D	1:100
Monoklonal P- Selectin (CTB201): sc-84	Santa Cruz Biotechnology Inc.	Dallas, USA	1:150
Collagen I alpha 1 Antibody (COL-1) NB600-450	Novus Biologicals	Abingdon, GBR	1:300
Collagen III alpha 1/COL3A1 Antibody (1E7-D7/Col3) - BSA Free NBP1-05119	Novus Biologicals	Abingdon, GBR	1:100
Mouse Monoclonal Antibody Anti-Fibrin Antibody, clone 59D8	Biotrend	Köln, D	1:300
Mouse Monoclonal Antibody Fibrinogen β (D-4): sc-271035	Santa Cruz Biotechnology Inc.	Dallas, USA	1:300
Polyclonal Rabbit Anti-Human Von Willebrand Factor Code-Nr. A 0082	Dako	Glostrup, DEN	1:300

6.3 Patientendaten

Pumpen-nummer	Thrombus-farbe an Ort A	Geschlecht (m/w)	Alter (Jahre)	BMI (kg/m ²)	Indikation	Laufzeit des Systems (Tage)	Zeit an ECMO insgesamt (Tage)	Anzahl verwendeter Systeme	Art/ Endpunkt des Systems	Outcome	Antikoagulation
P11	Weiß	w	29	23,9	Post-operatives ARDS	7	7	1	Weaning	OK	Heparin
P13	Weiß	m	54	27,7	Bakterielle Pneumonie	8	14	2	Weaning	OK	Argatroban
P17	Rot	m	61	26,3	Virale Pneumonie	9	9	1	Weaning	OK	Argatroban, Wechsel auf niedermolekulare Heparine
P18	Weiß	w	61	27,7	Bakterielle Pneumonie	19	19	1	Weaning	OK	Argatroban
P21	Weiß	m	68	34,6	Bakterielle Pneumonie	6	6	1	Weaning	OK	Heparin
P22	Weiß	m	71	32,9	Virale Pneumonie	13	16	3	Wechsel (1.System)	Verstorben am System (cerebrale Blutung)	Heparin
P23	Rot	m	61	23,4	Bakterielle Pneumonie	14	20	2	Wechsel (1.System)	Verstorben am System (resp. In-suffizienz)	Heparin

P24		m	68	27,7	Bakterielle Pneumonie	9	9	1	Weaning	OK	Argatroban
P25	Weiß	w	23	20,7	Respiratori- sche Krise bei Asthma bronchiale	7	7	1	Weaning	OK	Heparin
P29	Weiß	m	73	22,5	Zustand nach Koronar- arterien- bypass	11	13	2	Weaning (2.System)	Verstorben 1 Tag nach Explanta- tion (Multi- organ- versagen)	Heparin
P42		m	57	34	Virale Pneumonie	28	49	2	Wechsel (1.System)	Verstorben 7 Tage nach Explanta- tion (cerebrale Blutung)	Argatroban
P44	Rot	w	59	29,4	Virale Pneumonie	34	73	3	Wechsel (2.System)	OK	Heparin, Wechsel auf Argatroban
P45	Weiß	w	59	29,4	Virale Pneumonie	32	73	3	Weaning (3. System)	OK	Heparin, Wechsel auf Argatroban

Tabelle 10: Allgemeine Daten.

Pumpen-nummer	PTT (s)	LDH (U/l)	Freies Hämoglobin (mg/l)	D-Dimere (mg/l)	Fibrinogen (mg/dl)	Thrombozyten (x1000/ μ l)	CRP (mg/l)	Leukozyten (x 10 ⁹ /l)	IL-6 (pg/ml)	Flow (l/min)	Gasflow (l/min)	Pumpen-geschwindigkeit (RPM)
P11	71	245	84	10	173	64	11	10,6	310	1,5	1	1465
P13	78	393	52	36	389	116	68	7,4	86	1,5	5	1565
P17	65	485	42	35	164	221	36	7,9	33	1,4	5	1600
P18	42	490	13	20	434	246	80	40,2	172	1,1	1	1345
P21	50	563	52	35	584	147	137	29,4	130	1,8	2	1730
P22	61	673	29	35	94	115	308	5,2	331	3,5	6	3035
P23	25	515	49	32	109	101	6	8,6	4	3,8	5	6000
P24	55	481	50	35	227	146	126	9,2	57	1,5	4	1850
P25	59	590	35	36	113	109	26	16,9	24	1,4	3	1400
P29	57	422	71	35	661	83	206	15,8	1384	1,3	3	1865
P42	49	304	32	12	269	126	77	19,3	98	1,5	1	1730
P44	51	243	23	7	251	183	14	7,8	39	2,3	10	2160
P45	50	421	46	13	227	131	3	14,4	4	1,5	2	1350

Tabelle 11: Gerinnung, Entzündung, Hämolyse und technische Parameter. Die jeweils letzten aufgezeichneten Werte der Systeme bei Wechsel oder Ausbau. Die Pumpen 22, 23, 42 und 44 waren jeweils Wechsel-Systeme, alle anderen Systeme waren entweder das einzige oder das letzte System vor dem Weaning. Referenzbereiche: PTT: 20-38 s; LDH: Frauen: 135 bis 215 U/l. Männer: 135 bis 225 U/l; Freies Hämoglobin: 20 mg/l; Thrombozyten: 150-400 x1000/ μ l; D-Dimere <0,5 mg/l; Fibrinogen: 200-400 mg/dl; CRP: <5 mg/l; Leukozyten: 4–10 x 10⁹/l; IL-6: <150 pg/ml (Werte <5 pg/ml: keine akute Inflammation, Werte zwischen 5 und 150 pg/ml: lokalisierte Inflammation, >150 pg/ml: systemische Inflammation/Sepsis).

6.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines VV-ECMO Kreislaufs (4).....	8
Abbildung 2: Rollerpumpe (12).	10
Abbildung 3: Zentrifugalpumpe (12).....	10
Abbildung 4: Linkes Bild: HLS Set Advanced (Cardiohelp) (50), rechtes Bild PLS-System (51) von Maquet/Getinge, beide mit Rotaflow-Zentrifugalpumpe.	17
Abbildung 5: Nicht eröffnete Rotaflow Pumpe des PLS-Systems.	18
Abbildung 6: Eröffnete Pumpe mit Einteilung der Orte A, B und C, hier mit sichtbaren Thromben an den Orten A und C.	19
Abbildung 7: ABC-Methode (52)	21
Abbildung 8: P18A, Bilder vom Ausbau und Färbung mit MSB, Orte der Messung der Ringdicke.	25
Abbildung 9: MSB, einzeln gefärbte Präparate aufgeteilt in Einzelfarben durch das Colour Deconvolution-Plugin, darüber sind die hier verwendeten, benutzerdefinierten Farbwerte zu sehen.....	27
Abbildung 10: P44A, MSB, Aufspaltung in Einzelfarben mit zuvor definierten Farbwerten aus separaten Färbungen (wie in Abb. 9).	29
Abbildung 11: Aufspaltung in Einzelfarben mit neu definierten Farbwerten aus der kombinierten Färbung.	31
Abbildung 12: Thrombus 44A, MSB.....	33
Abbildung 13: Thrombus 44A nach der Aufspaltung in die verschiedenen Farben durch das Colour Deconvolution-Plugin, links nur rote Anteile der MSB-Färbung, rechts Umwandlung in schwarz-weiß (8-bit).	34
Abbildung 14: Setzen der Helligkeitsschwelle im 8-bit Bild (erkannte, also ausreichend dunkle Bereiche in rot).....	34
Abbildung 15: Selektion der roten Bereiche (gelb umrandet) und Ergebnisse der Quantifikation der Fläche in Pixel.....	35

Abbildung 16: Vergleich der Carstairs-Färbung (links) mit der Immunhistologie für Fibrin, im rechten Bild in der Immunhistologie stellt sich Fibrin braun dar.	36
Abbildung 17: P45A (oben) und P22A (unten), Vergleich der MSB-Färbung (jeweils links) mit der Immunhistologie für Fibrin (jeweils rechts).	37
Abbildung 18: Makroskopische Betrachtung der Thromben an Ort A vor dem Ausbau.	42
Abbildung 19: Übersicht über alle Thromben an Ort A, Carstairs.	44
Abbildung 20: Übersicht über Thromben an den Orten B und C, Carstairs.	45
Abbildung 21: Übersicht über alle 5 Teile des Thrombus P24C, Carstairs.	46
Abbildung 22: P44B-1, links Immunhistologie für Kollagen I, rechts Sirius-Resorcin-Fuchsin-Färbung.	47
Abbildung 23: P22A; Stark eosinophile, verwaschene Bereiche in der HE-Färbung, mit diffusen Ergebnissen in der Immunhistologie an der gleichen Stelle.	48
Abbildung 24: P24 (D3), Darstellung von Erythrozyten und kernhaltigen Zellen neben faserhaltigen Bereichen in blassem Lilaton.	49
Abbildung 25: P13C, Gleiche Stelle in vier unterschiedlichen Färbungen.	50
Abbildung 26: P18A, Kolokalisation von Kollagen I mit CD31, CD42b und CD45.	51
Abbildung 27: P44A, Riesenzellen in der Immunhistologie.	52
Abbildung 28: Kolokalisationen in P18A.	53
Abbildung 29: Kolokalisationen in P23A.	54
Abbildung 30: Beispielhaft mit Pfeil markierte verwirbelte Strukturen in P44A, P25B und P22A (Thromben an Ort A MSB-Färbung, P25B Carstairs).	57
Abbildung 31: Beispiel für Risse und Lakunen in Thromben (P45A oben Fibrin-Immunhistologie, mittig P44B-2 und unten P23A, beide in MSB-Färbung).	58
Abbildung 32: P45B-1, HE: Schnittartefakt: 3 parallele Linien dicht nebeneinander.	59

Abbildung 33: Links P24 (C4) mit zahlreichen kernhaltigen Zellen an den Außenrändern und in den Lücken der dichteren Strukturen, rechts P17A mit außen am Ring aufgelagerten lockeren Netzen mit darin gefangenen kernhaltigen Zellen (beide Bilder HE-Färbung).	60
Abbildung 34: Links P22A, rechts P45A, beide MSB; an der oberen bzw. linken Seite der Struktur sind jeweils die Außenränder der Thromben zu sehen, bei beiden lassen sich locker aufgelagerte Netze mit dazwischen gelagerten Erythrozyten erkennen.	61
Abbildung 35: P17A, MSB: unterschiedlich dicht mit Erythrozyten (gelb) besetzte, lockere Netze aus Fibrin und vWF.	61
Abbildung 36: Negative Korrelation von Erythrozyten und Thrombozyten in allen Thromben unabhängig von Fundort und Gruppe.	62
Abbildung 37: Bildung zweier Gruppen.	63
Abbildung 38: P23A, Carstairs, klassifiziert als "Rot", da viele Erythrozyten (gelb) erkennbar sind.	65
Abbildung 39: P25A, Carstairs, klassifiziert als "Weiß", da vorwiegend blaues Erscheinungsbild, ein Hinweis auf zahlreiche Thrombozyten.	65
Abbildung 40: Ringdicke in μm .	66
Abbildung 41: Flächenanteile der Erythrozyten nach Gruppen sortiert an allen Orten.	67
Abbildung 42: Flächenanteile der Thrombozyten (CD42b) nach Gruppen sortiert an allen Orten.	68
Abbildung 43: Flächenanteile von Fibrin nach Gruppen sortiert an allen Orten.	68
Abbildung 44: Flächenanteile von vWF nach Gruppen sortiert an allen Orten.	69
Abbildung 45: Minimale Unterschiede der manuellen und der automatischen Erkennung der Gesamtfläche.	70
Abbildung 46: Quantifizierung der Gesamtfläche.	70
Abbildung 47: Vergleich der gemessenen Gesamtflächen in mm^2 an Ort A zwischen roten und weißen Thromben.	72

Abbildung 48: Korrelation des Erythrozyten-Flächenanteils und der Gesamtfläche an Ort A.	72
Abbildung 49: P17C, links MSB, rechts CD42b-Immunhistologie; kaum Erythrozyten (gelb), dagegen viele Thrombozyten (CD42b, braun).	75
Abbildung 50: P45B-2, links MSB, rechts CD42b-Immunhistologie; hoher Anteil an Erythrozyten (gelb), kaum Thrombozyten (CD42b, braun).	76
Abbildung 51: Schichtung in Ausschnitten der ringförmigen Thromben P45A, P18A und P17A (von links nach rechts, alle Bilder MSB-Färbung).	77
Abbildung 52: Links P44A als Beispiel für Thromben mit Fetzen, rechts P22A als Beispiel für Thromben ohne Fetzen (beide Bilder Carstairs).	78
Abbildung 53: Makroskopisches Pendant zu den Thromben P44A (links, rot) und P22A (rechts, weiß).	78
Abbildung 54: Keine Korrelation von Leukozyten ($\times 10^9/l$) und Gesamtfläche aller Thromben des jeweiligen Systems.	80
Abbildung 55: Keine Korrelation von Laufzeit (Tage) der Pumpe und gesamter Thrombuslast pro Pumpe.	80
Abbildung 56: Verlauf der D-Dimere (mg/l) über die letzten 6 Tage der Systeme vor Entnahme.	83
Abbildung 57: Verlauf von Fibrinogen (mg/dl) über die letzten 6 Tage der Systeme vor Entnahme.	83
Abbildung 58: Verlauf der Thrombozytenzahl ($\times 1000/\mu l$) über die letzten 6 Tage der Systeme vor Entnahme.	84
Abbildung 59: Verlauf von freiem Hämoglobin über die letzten 6 Tage der Systeme vor Entnahme.	84
Abbildung 60: Verlauf der Leukozytenzahl ($\times 10^9/l$) über die letzten 6 Tage der Systeme vor Entnahme.	85
Abbildung 61: Keine Korrelation Fibrinogen am Therapieende und Flächenanteil Fibrin (Korrelationskoeffizient =0,118).	86
Abbildung 62: Keine Korrelation von Thrombozytenzahl am Therapieende und Flächenanteil der Thrombozyten (Korrelationskoeffizient =-0,054).....	86

Abbildung 63: Blutfluss durch die Pumpe in l/min, Verlauf von P44 und P45 der letzten 30 Tage vor Entnahme.	88
Abbildung 64: Pumpengeschwindigkeit in Umdrehungen pro Minute, Verlauf von P44 und P45 der letzten 30 Tage vor Entnahme.	88
Abbildung 65: D-Dimere in mg/l, Verlauf von P44 und P45 der letzten 30 Tage vor Entnahme.	89
Abbildung 66: Thrombozytenzahl in x1000/ μ l, Verlauf von P44 und P45 der letzten 30 Tage vor Entnahme.	89
Abbildung 67: CRP in mg/l, Verlauf von P44 und P45 der letzten 30 Tage vor Entnahme.	90
Abbildung 68: Leukozytenzahl (x 10 ⁹ /l), Verlauf von P44 und P45 der letzten 30 Tage vor Entnahme.	90
Abbildung 69: Fibrinogen (mg/dl), Verlauf von P44 und P45 der letzten 30 Tage vor Entnahme.	91

6.5 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Messung der gesamten Bildfläche aus Abbildung 9, Messung der einzelnen Farben mit jeweiliger erkannter Fläche und Addition der Flächen der Einzelfarben, jeweils in Pixel.....	28
Tabelle 2: Messung der einzelnen Farben mit jeweiliger erkannter Fläche und Addition der Flächen der Einzelfarben in Pixel sowie Messung der Gesamtfläche im ursprünglichen Bild.....	30
Tabelle 3: Messung der gesamten Thrombusfläche, einzelne Farben mit jeweiliger erkannter Fläche und Addition der Flächen der Einzelfarben in Pixel, hier mit ähnlichen Werten der Gesamtfläche und der addierten Teilflächen. ..	32
Tabelle 4: Lokalisationen (A, B und C) der Thromben und dort gefundene Anzahl...	40
Tabelle 5: Übersicht über die Anzahl und Fundorte der Thromben in den analysierten Pumpen.....	41
Tabelle 6: Gruppeneinteilung der einzelnen Thromben.....	64
Tabelle 7: Unterscheidung von roten und weißen Thromben mit jeweiligen Quantifizierungsergebnissen in % der Gesamtfläche und die Gesamtfläche in mm ²	71
Tabelle 8: Einteilung der Thromben an den Orten B und C in die Gruppen "Weiß" und "Rot" mit histologischen Daten der Quantifikation und Vergleich zu den jeweils zugehörigen Thromben an Ort A.....	73
Tabelle 9: Vergleich von patientenbezogenen Daten nach Thromben an Position A.	81
Tabelle 10: Allgemeine Daten.....	124
Tabelle 11: Gerinnung, Entzündung, Hämolyse und technische Parameter.	125

7 Literaturverzeichnis

1. Hill JD, O'Brien TG, Murray JJ, Dontigny L, Bramson ML, Osborn JJ, et al. Prolonged Extracorporeal Oxygenation for Acute Post-Traumatic Respiratory Failure (Shock-Lung Syndrome). *New England Journal of Medicine*. 1972 Mar 23;286(12):629–34.
2. Toomasian J, Schreiner R, Meyer D, Schmidt M, Hagan S, Griffith G, et al. A Polymethylpentene Fiber Gas Exchanger for Long-Term Extracorporeal Life Support. *ASAIO journal (American Society for Artificial Internal Organs : 1992)*. 2005 Jul 1;51:390–7.
3. ECMO / ECLS [Internet]. Deutsche Gesellschaft für Kardiotechnik e.V. [cited 2023 Jan 7]. Available from: <https://dgfkt.de/technik/ecmo-ecls/>
4. Consult QD [Internet]. 2019 [cited 2023 Jan 12]. Venovenous Extracorporeal Membrane Oxygenation for Lung Failure. Available from: <https://consultqd.clevelandclinic.org/venovenous-extracorporeal-membrane-oxygenation-for-lung-failure/>
5. 011-021I_S3_Einsatz-der-extrakorporalen-Zirkulation-ECLS-ECMO-bei-Herz-Kreislaufversagen_2021-02.pdf [Internet]. [cited 2023 Jan 7]. Available from: https://register.awmf.org/assets/guidelines/011-021I_S3_Einsatz-der-extrakorporalen-Zirkulation-ECLS-ECMO-bei-Herz-Kreislaufversagen_2021-02.pdf
6. Michels G, Wengenmayer T, Hagl C, Dohmen C, Böttiger BW, Bauersachs J, et al. Empfehlungen zur extrakorporalen kardiopulmonalen Reanimation (eCPR): Konsensuspapier der DGIIN, DGK, DGTHG, DGfK, DGNI, DGAI, DIVI und GRC. *Anaesthesist*. 2018 Aug;67(8):607–16.
7. COVID-19 Registry Dashboard | ECMO | ECLS [Internet]. [cited 2023 Aug 2]. Available from: <https://www.else.org/registry/fullcovid-19registrydashboard.aspx>
8. Alhazzani W, Møller MH, Arabi YM, Loeb M, Gong MN, Fan E, et al. Surviving Sepsis Campaign: guidelines on the management of critically ill adults with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Intensive Care Med*. 2020 May;46(5):854–87.

9. World Health Organization. Clinical management of COVID-19: interim guidance, 27 May 2020 [Internet]. World Health Organization; 2020 [cited 2023 May 6]. Report No.: WHO/2019-nCoV/clinical/2020.5. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/332196>
10. Lehle K, Philipp A, Foltan M, Schettler F, Ritzka M, Müller T, et al. Coagulation abnormalities in patients with COVID-19 on venovenous ECLS increased risk for technical complications and support times but had no impact on survival. *Artificial Organs*. 2022 Aug;46(8):1669–81.
11. Ündar A, Kunselman AR, Barbaro RP, Alexander P, Patel K, Thomas NJ. Centrifugal or Roller Blood Pumps for Neonatal Venovenous Extracorporeal Membrane Oxygenation: Extracorporeal Life Support Organization Database Comparison of Mortality and Morbidity. *Pediatr Crit Care Med*. 2023 Aug 1;24(8):662–9.
12. Gajkowski EF, Herrera G, Hatton L, Velia Antonini M, Vercaemst L, Cooley E. ELSO Guidelines for Adult and Pediatric Extracorporeal Membrane Oxygenation Circuits. *ASAIO Journal*. 2022 Feb;68(2):133–52.
13. ELSO Guidelines General All ECLS Version 1_4.pdf [Internet]. [cited 2023 Jan 9]. Available from: https://www.else.org/Portals/0/ELSO%20Guidelines%20General%20All%20ECLS%20Version%201_4.pdf
14. Sun W, Wang S, Chen Z, Zhang J, Li T, Arias K, et al. Impact of high mechanical shear stress and oxygenator membrane surface on blood damage relevant to thrombosis and bleeding in a pediatric ECMO circuit. *Artif Organs*. 2020 Jul;44(7):717–26.
15. Olson SR, Murphree CR, Zonies D, Meyer AD, Mccarty OJT, Deloughery TG, et al. Thrombosis and Bleeding in Extracorporeal Membrane Oxygenation (ECMO) Without Anticoagulation: A Systematic Review. *ASAIO Journal*. 2021 Mar;67(3):290–6.
16. Furie B, Furie BC. Mechanisms of Thrombus Formation. *New England Journal of Medicine*. 2008 Aug 28;359(9):938–49.
17. Furie BC, Furie B. Tissue factor pathway vs. collagen pathway for in vivo platelet

- activation. *Blood Cells Mol Dis*. 2006;36(2):135–8.
18. Goto S, Ikeda Y, Saldívar E, Ruggeri ZM. Distinct mechanisms of platelet aggregation as a consequence of different shearing flow conditions. *J Clin Invest*. 1998 Jan 15;101(2):479–86.
 19. Boyer MH, Shainoff JR, Ratnoff OD. Acceleration of Fibrin Polymerization by Calcium Ions. *Blood*. 1972 Mar 1;39(3):382–7.
 20. Cilia La Corte AL, Philippou H, Ariëns RAS. Role of fibrin structure in thrombosis and vascular disease. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2011;83:75–127.
 21. Laurens N, Koolwijk P, de Maat MPM. Fibrin structure and wound healing. *J Thromb Haemost*. 2006 May;4(5):932–9.
 22. Hui K, Haber E, Matsueda G. Monoclonal antibodies to a synthetic fibrin-like peptide bind to human fibrin but not fibrinogen. *Science*. 1983 Dec 9;222(4628):1129–32.
 23. Nogami K, Shima M, Nishiya K, Hosokawa K, Saenko EL, Sakurai Y, et al. A novel mechanism of factor VIII protection by von Willebrand factor from activated protein C–catalyzed inactivation. *Blood*. 2002 Jun 1;99(11):3993–8.
 24. Mendolicchio GL, Ruggeri ZM. New perspectives on von Willebrand factor functions in hemostasis and thrombosis. *Seminars in Hematology*. 2005 Jan 1;42(1):5–14.
 25. Arya M, Anvari B, Romo GM, Cruz MA, Dong JF, McIntire LV, et al. Ultralarge multimers of von Willebrand factor form spontaneous high-strength bonds with the platelet glycoprotein Ib-IX complex: studies using optical tweezers. *Blood*. 2002 Jun 1;99(11):3971–7.
 26. Romijn RAP, Bouma B, Wuyster W, Gros P, Kroon J, Sixma JJ, et al. Identification of the Collagen-binding Site of the von Willebrand Factor A3-domain. *Journal of Biological Chemistry*. 2001 Mar;276(13):9985–91.
 27. De Marco L, Girolami A, Zimmerman TS, Ruggeri ZM. von Willebrand factor interaction with the glycoprotein IIb/IIIa complex. Its role in platelet function as demonstrated in patients with congenital afibrinogenemia. *J Clin Invest*. 1986 Apr;77(4):1272–7.

28. Ruggeri ZM. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2003;1(7):1335–42.
29. Lewis JC, Hantgan RR, Stevenson SC, Thornburg T, Kieffer N, Guichard J, et al. Fibrinogen and glycoprotein IIb/IIIa localization during platelet adhesion. Localization to the granulomere and at sites of platelet interaction. *Am J Pathol*. 1990 Jan;136(1):239–52.
30. Okhota S, Melnikov I, Avtaeva Y, Kozlov S, Gabbasov Z. Shear Stress-Induced Activation of von Willebrand Factor and Cardiovascular Pathology. *Int J Mol Sci*. 2020 Oct 21;21(20):7804.
31. Tsai HM. Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion. *Blood*. 1996 May 15;87(10):4235–44.
32. Furlan M, Robles R, Lämmle B. Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis. *Blood*. 1996 May 15;87(10):4223–34.
33. Tsai HM. Shear Stress and von Willebrand Factor in Health and Disease. *Semin Thromb Hemost*. 2003;29(5):479–88.
34. Schlagenhaut A, Kalbhenn J, Geisen U, Beyersdorf F, Zieger B. Acquired von Willebrand Syndrome and Platelet Function Defects during Extracorporeal Life Support (Mechanical Circulatory Support). *Hamostaseologie*. 2020 May;40(02):221–5.
35. Kaski S, Kekomäki R, Partanen J. Systematic screening for genetic polymorphism in human platelet glycoprotein Iba α . *Immunogenetics*. 1996;44(3):170–6.
36. Lukito P, Wong A, Jing J, Arthur JF, Marasco SF, Murphy DA, et al. Mechanical circulatory support is associated with loss of platelet receptors glycoprotein Iba α and glycoprotein VI. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2016;14(11):2253–60.
37. Dole VS, Bergmeier W, Mitchell HA, Eichenberger SC, Wagner DD. Activated platelets induce Weibel-Palade-body secretion and leukocyte rolling in vivo: role of P-selectin. *Blood*. 2005 Oct 1;106(7):2334–9.

38. Gremmel T, Koppensteiner R, Kaider A, Eichelberger B, Mannhalter C, Panzer S. Impact of variables of the P-selectin – P-selectin glycoprotein ligand-1 axis on leukocyte-platelet interactions in cardiovascular disease. *Thromb Haemost.* 2015 Jul;113(04):806–12.
39. Swystun LL, Liaw PC. The role of leukocytes in thrombosis. *Blood.* 2016 Aug 11;128(6):753–62.
40. Cao G, O'Brien CD, Zhou Z, Sanders SM, Greenbaum JN, Makrigiannakis A, et al. Involvement of human PECAM-1 in angiogenesis and in vitro endothelial cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002 May;282(5):C1181-1190.
41. Lertkiatmongkol P, Liao D, Mei H, Hu Y, Newman PJ. Endothelial functions of PECAM-1 (CD31). *Curr Opin Hematol.* 2016 May;23(3):253–9.
42. Saunders AE, Johnson P. Modulation of immune cell signalling by the leukocyte common tyrosine phosphatase, CD45. *Cellular Signalling.* 2010 Mar 1;22(3):339–48.
43. Pape HC, Kurtz A, Silbernagl S. *Physiologie.* 7. vollständig überarbeitete und erweiterte Edition. Stuttgart New York, NY: Thieme; 2014. 1024 p.
44. Farndale RW, Sixma JJ, Barnes MJ, De Groot PG. The role of collagen in thrombosis and hemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2004;2(4):561–73.
45. Baumann Kreuziger L, Slaughter MS, Sundareswaran K, Mast AE. Clinical Relevance of Histopathologic Analysis of HeartMate II Thrombi: *ASAIO Journal.* 2018;64(6):754–9.
46. Hastings SM, Deshpande SR, Wagoner S, Maher K, Ku DN. Thrombosis in Centrifugal Pumps: Location and Composition in Clinical and in Vitro Circuits. *Int J Artif Organs.* 2016 Apr;39(4):200–4.
47. Hastings SM, Ku DN, Wagoner S, Maher KO, Deshpande S. Sources of Circuit Thrombosis in Pediatric Extracorporeal Membrane Oxygenation: *ASAIO Journal.* 2017;63(1):86–92.
48. Staessens S, Moussa MD, Pierache A, Rauch A, Rousse N, Boulleaux E, et al. Thrombus formation during ECMO: Insights from a detailed histological analysis of thrombus composition. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2022

Sep;20(9):2058–69.

49. Figueroa Villalba CA, McMullan DM, Reed RC, Chandler WL. Thrombosis in Extracorporeal Membrane Oxygenation (ECMO) Circuits. *ASAIO J.* 2022 Aug 1;68(8):1083–92.
50. HLS Set Advanced [Internet]. [cited 2023 Feb 13]. Available from: <https://www2.getinge.com/de/produktkatalog/hls-set-advanced/>
51. PLS-System [Internet]. [cited 2023 Feb 13]. Available from: <https://www2.getinge.com/de/produktkatalog/pls-system/>
52. Aescht E. Romeis Mikroskopische Technik. 19. Auflage. Mulisch M, Welsch U, Romeis B, editors. Berlin Heidelberg: Springer Spektrum; 2015. 603 p.
53. Graham RC, Karnovsky MJ. The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J Histochem Cytochem.* 1966 Apr;14(4):291–302.
54. Rittié L. Method for Picrosirius Red-Polarization Detection of Collagen Fibers in Tissue Sections. In: Rittié L, editor. *Fibrosis: Methods and Protocols* [Internet]. New York, NY: Springer; 2017 [cited 2023 Feb 14]. p. 395–407. (Methods in Molecular Biology). Available from: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7113-8_26
55. Gajda M, Jaształ A, Banasik T, Jasek-Gajda E, Chlopicki S. Combined orcein and martius scarlet blue (OMSB) staining for qualitative and quantitative analyses of atherosclerotic plaques in brachiocephalic arteries in apoE/LDLR-/- mice. *Histochem Cell Biol.* 2017 Jun;147(6):671–81.
56. Lendrum AC, Fraser DS, Slidders W, Henderson R. Studies on the character and staining of fibrin. *Journal of Clinical Pathology.* 1962 Sep 1;15(5):401–13.
57. Buk SJ. Simultaneous demonstration of connective tissue elastica and fibrin by a combined Verhoeff's elastic-Martius-scarlet-blue trichrome stain. *Stain Technol.* 1984 Jan;59(1):1–5.
58. Carstairs KC. The identification of platelets and platelet antigens in histological sections. *The Journal of Pathology and Bacteriology.* 1965 Jul 1;90(1):225–31.

59. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012 Jun 28;9(7):676–82.
60. Ruifrok AC, Johnston DA. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol*. 2001 Aug;23(4):291–9.
61. Colour Deconvolution – Novel context-based segmentation algorithms for intelligent microscopy [Internet]. [cited 2019 Oct 25]. Available from: <https://blog.bham.ac.uk/intellimic/g-landini-software/colour-deconvolution/>
62. Landini G, Martinelli G, Piccinini F. Colour deconvolution: stain unmixing in histological imaging. Xu J, editor. *Bioinformatics*. 2021 Jun 16;37(10):1485–7.
63. RGB [Das Lexikon der Filmbegriffe] [Internet]. [cited 2023 Feb 28]. Available from: <https://filmlexikon.uni-kiel.de/doku.php/r:rgb-4293>
64. Farbinformationen [Internet]. [cited 2023 Aug 4]. Available from: <https://lehre.idh.uni-koeln.de/lehveranstaltungen/sosem21/basissysteme-der-informationsverarbeitung-2-bsi-4/bilder-und-bildverarbeitung/farbinformationen/>
65. Taylor CR, Levenson RM. Quantification of immunohistochemistry—issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II. *Histopathology*. 2006;49(4):411–24.
66. Becker RL. Standardization and quality control of quantitative microscopy in pathology. *J Cell Biochem Suppl*. 1993;17G:199–204.
67. Walker RA. Quantification of immunohistochemistry--issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment I. *Histopathology*. 2006 Oct;49(4):406–10.
68. Decaestecker C, Lopez XM, D’Haene N, Roland I, Guendouz S, Duponchelle C, et al. Requirements for the valid quantification of immunostains on tissue microarray materials using image analysis. *Proteomics*. 2009 Oct;9(19):4478–94.
69. Likhithaswamy HR, Madhushankari GS, Selvamani M, Kokila G, Kumar KPM, Chethana K. Comparison of staining adequacy between tissues stored in formalin and paraffin embedded blocks for prolonged duration. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*. 2020;24(3).

70. Khismatullin RR, Shakirova AZ, Weisel JW, Litvinov RI. Age-Dependent Differential Staining of Fibrin in Blood Clots and Thrombi. *BioNanoSci.* 2020 Mar;10(1):370–4.
71. Hendley SA, Dimov A, Bhargava A, Snoddy E, Mansour D, Afifi RO, et al. Assessment of histological characteristics, imaging markers, and rt-PA susceptibility of ex vivo venous thrombi. *Sci Rep.* 2021 Nov 23;11(1):22805.
72. Pluta K, Porębska K, Urbanowicz T, Gąsecka A, Olasińska-Wiśniewska A, Targoński R, et al. Platelet–Leucocyte Aggregates as Novel Biomarkers in Cardiovascular Diseases. *Biology.* 2022 Feb;11(2):224.
73. Hu H, Varon D, Hjemdahl P, Savion N, Schulman S, Li N. Platelet-leukocyte aggregation under shear stress: differential involvement of selectins and integrins. *Thromb Haemost.* 2003 Oct;90(4):679–87.
74. Granja T, Schad J, Schüssel P, Fischer C, Häberle H, Rosenberger P, et al. Using six-colour flow cytometry to analyse the activation and interaction of platelets and leukocytes – A new assay suitable for bench and bedside conditions. *Thrombosis Research.* 2015 Oct 1;136(4):786–96.
75. Mansour A, Roussel M, Gaussem P, Nédelec-Gac F, Pontis A, Flécher E, et al. 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 Jul 23;9(8):2361.
76. Siegel PM, Chalupsky J, Olivier CB, Bojti I, Pooth JS, Trummer G, et al. Early platelet dysfunction in patients receiving extracorporeal membrane oxygenation is associated with mortality. *J Thromb Thrombolysis.* 2022 Apr;53(3):712–21.
77. Steiger T, Foltan M, Philipp A, Mueller T, Gruber M, Bredthauer A, et al. Accumulations of von Willebrand factor within ECMO oxygenators: Potential indicator of coagulation abnormalities in critically ill patients? *Artificial Organs.* 2019;43(11):1065–76.
78. Engelmann B, Massberg S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2013 Jan;13(1):34–45.
79. Stark K, Massberg S. Interplay between inflammation and thrombosis in cardiovascular pathology. *Nat Rev Cardiol.* 2021 Sep;18(9):666–82.

80. Iba T, Levy JH. Inflammation and thrombosis: roles of neutrophils, platelets and endothelial cells and their interactions in thrombus formation during sepsis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2018 Feb 1;16(2):231–41.
81. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010 Sep 7;107(36):15880–5.
82. Vorobjeva NV, Chernyak BV. NETosis: Molecular Mechanisms, Role in Physiology and Pathology. *Biochemistry (Mosc)*. 2020;85(10):1178–90.
83. Laridan E, Martinod K, De Meyer S. Neutrophil Extracellular Traps in Arterial and Venous Thrombosis. *Semin Thromb Hemost*. 2019 Feb;45(01):086–93.
84. Zhang Y, Peng R, Pei S, Gao S, Sun Y, Cheng G, et al. Neutrophil extracellular traps are increased after extracorporeal membrane oxygenation support initiation and present in thrombus: A preclinical study using sheep as an animal model. *Thromb Res*. 2023 Jan;221:173–82.
85. Winnersbach P, Rossaint J, Buhl EM, Singh S, Lölsberg J, Wessling M, et al. Platelet count reduction during *in vitro* membrane oxygenation affects platelet activation, neutrophil extracellular trap formation and clot stability, but does not prevent clotting. *Perfusion*. 2022 Mar;37(2):134–43.
86. Zucoloto AZ, Jenne CN. Platelet-Neutrophil Interplay: Insights Into Neutrophil Extracellular Trap (NET)-Driven Coagulation in Infection. *Front Cardiovasc Med*. 2019 Jun 20;6:85.
87. Martinod K, Wagner DD. Thrombosis: tangled up in NETs. *Blood*. 2014 May 1;123(18):2768–76.
88. Fuchs TA, Bhandari AA, Wagner DD. Histones induce rapid and profound thrombocytopenia in mice. *Blood*. 2011 Sep 29;118(13):3708–14.
89. Perdomo J, Leung HHL, Ahmadi Z, Yan F, Chong JJH, Passam FH, et al. Neutrophil activation and NETosis are the major drivers of thrombosis in heparin-induced thrombocytopenia. *Nat Commun*. 2019 Mar 21;10(1):1322.
90. Litvinov RI, Weisel JW. Role of red blood cells in haemostasis and thrombosis. *ISBT Sci Ser*. 2017 Feb;12(1):176–83.

91. Byrnes JR, Wolberg AS. Red blood cells in thrombosis. *Blood*. 2017 Oct 19;130(16):1795–9.
92. Dimitrov JD, Roumenina LT, Perrella G, Rayes J. Basic Mechanisms of Hemolysis-Associated Thrombo-Inflammation and Immune Dysregulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2023 Aug;43(8):1349–61.
93. Lubnow M, Philipp A, Foltan M, Enger TB, Lunz D, Bein T, et al. Technical Complications during Veno-Venous Extracorporeal Membrane Oxygenation and Their Relevance Predicting a System-Exchange – Retrospective Analysis of 265 Cases. *PLOS ONE*. 2014 Dec 2;9(12):e112316.
94. Appelt H, Philipp A, Mueller T, Foltan M, Lubnow M, Lunz D, et al. Factors associated with hemolysis during extracorporeal membrane oxygenation (ECMO)-Comparison of VA- versus VV ECMO. *PLoS One*. 2020;15(1):e0227793.
95. Chernysh IN, Nagaswami C, Kosolapova S, Peshkova AD, Cuker A, Cines DB, et al. The distinctive structure and composition of arterial and venous thrombi and pulmonary emboli. *Sci Rep*. 2020 Mar 20;10(1):5112.
96. Whelihan MF, Mann KG. The role of the red cell membrane in thrombin generation. *Thromb Res*. 2013 May;131(5):377–82.
97. Barnes MJ, Farndale RW. Collagens and atherosclerosis. *Exp Gerontol*. 1999 Jul;34(4):513–25.
98. Modarai B, Guiver Burnand K, Humphries J, Waltham M, Smith A. The role of neovascularisation in the resolution of venous thrombus. *Thromb Haemost*. 2005;93(05):801–9.
99. Staessens S, Denorme F, Francois O, Desender L, Dewaele T, Vanacker P, et al. Structural analysis of ischemic stroke thrombi: histological indications for therapy resistance. *Haematologica*. 2020 Feb 1;105(2):498–507.
100. Davies MJ. Pathology of arterial thrombosis. *Br Med Bull*. 1994 Oct;50(4):789–802.
101. Linnemann B, Lindhoff-Last E. Virchow-Trias. In: Haas S, editor. *Prävention von Thrombosen und Embolien in der Inneren Medizin: Möglichkeiten und Vorzüge von niedermolekularen Heparinen [Internet]*. Berlin, Heidelberg:

- Springer; 2005 [cited 2023 May 2]. p. 40–4. Available from:
https://doi.org/10.1007/3-540-27118-X_7
102. Casa LDC, Deaton DH, Ku DN. Role of high shear rate in thrombosis. *J Vasc Surg.* 2015 Apr;61(4):1068–80.
 103. Nagareddy P, Smyth SS. Inflammation and thrombosis in cardiovascular disease. *Curr Opin Hematol.* 2013 Sep;20(5):457–63.
 104. Hathcock JJ. Flow Effects on Coagulation and Thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2006 Aug;26(8):1729–37.
 105. Drakeford C, Aguila S, Roche F, Hokamp K, Fazavana J, Cervantes MP, et al. von Willebrand factor links primary hemostasis to innate immunity. *Nat Commun.* 2022 Nov 3;13(1):6320.
 106. Gorbet M, Sperling C, Maitz MF, Siedlecki CA, Werner C, Sefton MV. The blood compatibility challenge. Part 3: Material associated activation of blood cascades and cells. *Acta Biomater.* 2019 Aug;94:25–32.
 107. Hanna Hartmann. Fremdkörper-Reaktionen auf Biomaterialien und Strategien zum Funktionserhalt von Implantaten. *BioNanoMaterials.* 2010 Nov 1;11(1):15–23.
 108. Jaffer IH, Fredenburgh JC, Hirsh J, Weitz JI. Medical device-induced thrombosis: what causes it and how can we prevent it? *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2015;13(S1):S72–81.
 109. Smeets MWJ, Mourik MJ, Niessen HWM, Hordijk PL. Stasis Promotes Erythrocyte Adhesion to von Willebrand Factor. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2017 Sep;37(9):1618–27.
 110. Kim DA, Ku DN. Structure of shear-induced platelet aggregated clot formed in an in vitro arterial thrombosis model. *Blood Advances.* 2022 May 6;6(9):2872–83.
 111. Diamond SL. Engineering design of optimal strategies for blood clot dissolution. *Annu Rev Biomed Eng.* 1999;1:427–62.
 112. Du J, Kim D, Alhawael G, Ku DN, Fogelson AL. Clot Permeability, Agonist Transport, and Platelet Binding Kinetics in Arterial Thrombosis. *Biophys J.*

2020 Nov 17;119(10):2102–15.

113. White Clot is More Permeable and Stronger than the Red Clot [Internet]. ISTH Congress Abstracts. [cited 2023 Apr 27]. Available from: <https://abstracts.isth.org/abstract/white-clot-is-more-permeable-and-stronger-than-the-red-clot/>
114. Becker BF, Heindl B, Kupatt C, Zahler S. Endothelial function and hemostasis. *Z Kardiol*. 2000 Mar;89(3):160–7.
115. Schafer AI. The hypercoagulable states. *Ann Intern Med*. 1985 Jun;102(6):814–28.
116. Caprarola SD, Ng DK, Carroll MK, Tekes A, Felling RJ, Salorio CF, et al. Pediatric ECMO: unfavorable outcomes are associated with inflammation and endothelial activation. *Pediatr Res*. 2022 Aug;92(2):549–56.
117. Bonaventura A, Vecchié A, Dagna L, Martinod K, Dixon DL, Van Tassell BW, et al. Endothelial dysfunction and immunothrombosis as key pathogenic mechanisms in COVID-19. *Nat Rev Immunol*. 2021 May;21(5):319–29.
118. Combes A, Hajage D, Capellier G, Demoule A, Lavoué S, Guervilly C, et al. Extracorporeal Membrane Oxygenation for Severe Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med*. 2018 May 24;378(21):1965–75.
119. Brouwer PA, Brinjikji W, De Meyer SF. Clot Pathophysiology: Why Is It Clinically Important? *Neuroimaging Clin N Am*. 2018 Nov;28(4):611–23.
120. Alkarithi G, Duval C, Shi Y, Macrae FL, Ariëns RAS. Thrombus Structural Composition in Cardiovascular Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2021 Sep;41(9):2370–83.
121. Aksu K, Donmez A, Keser G. Inflammation-induced thrombosis: mechanisms, disease associations and management. *Curr Pharm Des*. 2012;18(11):1478–93.

Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Christof Schmid als Leiter des Instituts für Herz-, Thorax- und herznaher Gefäßchirurgie und seinem Team. Alois Philipp gewährte mir einzigartige Einblicke in seinen Alltag, ohne seine unermüdliche Datenerhebung wäre dieses Projekt so nicht möglich gewesen. Ich danke Maik Foltan und seinem Team für die Fortführung des Projekts und die Zusammenarbeit. Ich danke außerdem dem gesamten Laborteam für das Sammeln der Pumpen und die Unterstützung bei den Färbungen und deren Auswertung.

Das Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Regensburg unterstützte mich bei der Einbettung der Proben und stellte mir großzügigerweise den Slidescanner zur Verfügung.

Großer Dank gilt Prof. Dr. Lars Krenkel und seinem Team an der OTH Regensburg für die zuverlässige Zusammenarbeit. Clemens Birkenmaier unterstützte tatkräftig beim Verarbeiten der Pumpen.

Mein größter Dank gilt meiner Doktormutter Prof. Dr. Karla Lehle für das Ermöglichen der Doktorarbeit, die vielen guten Ideen, die konstruktive Kritik, die interessanten Diskussionen und die zuverlässige Betreuung der Arbeit.

Selbstständigkeitserklärung

Ich, Leonie Köster, geboren am 05.01.1996 in München, erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ort, Datum

Unterschrift