

NETose während extrakorporaler Membranoxygenation



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Biomedizinischen Wissenschaften
(Dr. rer. physiol.)

der
Fakultät für Medizin
aus der Klinik und Poliklinik für
Herz-, Thorax- und herznahe Gefäßchirurgie
(Direktor: Prof. Dr. Christof Schmid)

der Universität Regensburg

vorgelegt von
Maik Foltan
aus
Seesen

im Jahr
2025

NETose während extrakorporaler Membranoxygenation



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Biomedizinischen Wissenschaften
(Dr. rer. physiol.)

der
Fakultät für Medizin
aus der Klinik und Poliklinik für
Herz-, Thorax- und herznahe Gefäßchirurgie
(Direktor: Prof. Dr. Christof Schmid)

der Universität Regensburg

vorgelegt von
Maik Foltan
aus
Seesen

im Jahr
2025

Dekan:	Prof. Dr. Dirk Hellwig
Gutachter/in	Prof. Dr. Karla Lehle Prof. Dr. Christian Keller
Mentor/in:	Prof. Dr. Christof Schmid Prof. Dr. Karla Lehle Prof. Dr.-Ing. Lars Krenkel PD Dr. Christina Hart

Tag der mündlichen Prüfung: 16. April 2026

Inhaltsverzeichnis	1
Abbildungsverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis	7
Abstrakt	8
Abstract	9
1. Einleitung	10
1.1 Klinische Bedeutung einer ECMO	10
1.2 Thrombenbildung im ECMO-System	11
1.3 Bedeutung von PMNs und NETs im Rahmen der Immunabwehr	13
2. Material und Methoden	17
2.1 Testmaterial	17
2.2 ECMO-Membranoxygenatoren	18
2.3 Beschichtungen der ECMO-Gasfasern	20
2.3.1 Bioline-Beschichtung	21
2.3.2 Balance-Beschichtung	21
2.3.3 X.ELLENCE-Beschichtung	21
2.3.4 Phosphorylcholin-Beschichtung	22
2.4 Gewinnung der Proben aus den Oxygenatormembranen	22

2.5	Vorbereitung des Testmaterials für die statischen Versuche	23
2.6	Beschichtung der Objektträger der statischen Versuche.....	24
2.7	Optimierung der Versuchsdurchführung.....	24
2.8	Isolation von polymorphkernigen Granulozyten	26
2.9	PMN-Adhäsion auf Gasfasern innerhalb der statischen Versuche.....	28
2.9.1	Kategorisierung von netotischen PMNs	29
2.9.2	PMNs im Fluorescence-activated cell sorting System.....	30
2.9.3	Analyse der adhärenen DAPI-gefärbten Kernmorphologien	32
2.10	PMN-Adhäsion auf Gasfasern innerhalb der dynamischen Versuche.....	36
2.10.1	Messaufbau des ex vivo Perfusionsmodells	36
2.10.2	Einbringen der ECMO-Gasfasern in den Kanal-Objektträger.....	39
2.10.3	Numerische Strömungsberechnung einer Gasfaser	40
2.10.4	Durchführung der dynamischen Versuche	42
2.10.5	Messtechnische Verbesserungen im ex vivo Perfusionsmodells	44
2.10.6	Auswertestrategie dynamische Versuche	46
2.11	Statistische Auswertung	49
3.	Ergebnisse	50
3.1	Ergebnisse der statischen Versuche	50
3.1.1	Material-induzierte Zelladhäsion und NET-Induktion.....	51
3.1.2	Materialinduzierte Zellaktivierung.....	58

3.2. Ergebnisse der dynamischen NETose-Versuche	63
4. Diskussion.....	81
5. Zusammenfassung.....	88
6. Anhang.....	90
6.1 Funktionsweise des Cell Counter and Analyser Systems	90
6.2 Funktionsweise des Fluorescence-activated cell sorting.....	91
6.3 Zusätzliche Ergebnisse zu den statischen Versuchen	92
6.4 Verbrauchsmaterialien	95
6.4.1 Hepes-Tyrodde Puffer für statischen Versuche.....	95
6.4.2 HTP-BSA 0,5%	96
6.4.3 Probenvorbereitung Oxydativer-Burst.....	97
7. Literaturverzeichnis	99
8. Danksagung	
9. Selbstständigkeitserklärung	

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht über die verwendeten handelsüblichen Oxygenatoren.	19
Abbildung 2: Anordnung der Gasfasern.	20
Abbildung 3: Gewinnung des Testmaterials aus handelsüblichen Oxygenatoren. ...	22
Abbildung 4: Membranprobe im Edelstahleinsatz in Petrischale.	23
Abbildung 5: Optimierung der Versuchsdurchführung.	25
Abbildung 6: Übersichtung zur Granulozytenisolierung.	27
Abbildung 7: Morphologische Veränderungen durch Chromatin-Schwellung.	30
Abbildung 8: Zeitlicher Ablauf der automatischen Zellzählfunktion ImageJ.	34
Abbildung 9: Beispiel für die Validierung der automatischen Zellzählfunktion. .	35
Abbildung 10: Messaufbau des ex vivo Perfusionsmodells.	37
Abbildung 11: Schematische Darstellung des ex vivo Perfusionsmodells.	38
Abbildung 12: Das Strömungsprofil der Kanal-Objektträger ohne Gasfaser.	40
Abbildung 13: Konturdiagramme Geschwindigkeitsamplitude und Dehnrage	41
Abbildung 14: Die Probeneinbringung über den Injektionsport.	45
Abbildung 15: Auswertungsbereiche der Filamentflächen.	47
Abbildung 16: NETosis Detection by BFM-Analysesoftware.	48
Abbildung 17: Negativ- und Positivkontrollen der PMN-Versuche.	51
Abbildung 18: Adhärierende PMNs auf der Oberfläche der einzelnen GF-Typen. ...	52
Abbildung 19: Vergleich der PMNs-Adhäsion.	53

Abbildung 20: Morphologische PMN-Veränderungen auf Gasfasern.	54
Abbildung 21: PMNs auf Poly-L-Lysin-beschichteten Glasträgern	55
Abbildung 22: Verhältnis von netotisch veränderten PMNs zu allen Nuklei.....	56
Abbildung 23: DNase I Auswirkungen auf PMA-behandelte PMNs.....	57
Abbildung 24: FACS-basierter Nachweis von PMN-Interaktionen	58
Abbildung 25: Oxidativer Burst und Expression von Aktivierungsmarkern.	59
Abbildung 26: Aktivierungsmarker L-Selektin und (CD11b/CD18) im FACS.	61
Abbildung 27: NETotische Anlagerungen auf unbeschichteter Gasfaser.	63
Abbildung 28: Kumulative Anlagerungen von Gasfasern und DNA-Filamenten.	64
Abbildung 29: Anlagerungen von DNA auf Gasfasern und Filamenten.	65
Abbildung 30: Exemplarische DNA-Anlagerungen zum Messzeitpunkt T = 90.	66
Abbildung 31: Betrachtung der DNA-Anlagerungen.	67
Abbildung 32: Beginn der Anlagerungen auf Gasfasern.....	68
Abbildung 33: DNA-Filamentbildung in der Strömungskammer.....	69
Abbildung 34: Der Vergleich der Gasfaseranlagerungen und DNA-Filamente.	70
Abbildung 35: Beginn der DNA-Filamentbildung nach Experimentstart.....	71
Abbildung 36: Beginn der DNA-Anlagerungen.	72
Abbildung 37: DNA-Filamentbildung in verschiedenen Bereichen der Gasfasern....	73
Abbildung 38: Lokalisation der DNA-Filamentflächen im Strömungskanal.	76
Abbildung 39: Darstellung der DNA-Filamentbildung nach Lokalisationsbereich.	77

Abbildung 40: Die summierte Anzahl von DNA-Filamenten.	78
Abbildung 41: Anzahl der DNA-Filamente in Relation zum Anlagerungsbereich.....	79
Abbildung 42: DNA-Filamentlängen.	80
Abbildung 43: Morphologische Veränderungen auf einer Hilite-Gasfaser.	92
Abbildung 44: Morphologische Veränderungen auf einer Nautilus-Gasfaser.	93
Abbildung 45: Morphologische Veränderungen auf einer EOS-Gasfaser.....	94
Abbildung 46: Fehlerbalken der summierten Anlagerungsflächen.....	95

Abkürzungsverzeichnis

CASY	Cell Counter and Analyzer System
cfDNA	Extrazelluläre DNA
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DHR	Dihydrorhodamin
ECMO	Extrakorporale Membranoxygenation
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
HTP	Hepes-Tyrode Puffer
MPO	Myeloperoxidase
NE	Neutrophile Elastase
NET	Neutrophil Extracellular Traps
NETose	Mechanismus der NET-Freisetzung
PI	Propidiumiodid
PLA	Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate
PMA	Phorbol-12-myristate-13 acetate
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PMP	Polymethylpenten
TNF	Tumornekrosefaktor
VE	Vollentsalztes Wasser

Abstrakt

Neutrophil Extracellular Traps (NETs) wurden als potenzielle Mitverursacher thrombogener Prozesse während der extrakorporalen Membranoxygenierung (ECMO) identifiziert. Ziel dieser wissenschaftlichen Arbeit war die Untersuchung des Einflusses von Polymethylpenten (PMP)-basierten Gasfaser- und Wärmeaustauschmembranen sowie verschiedener antithrombogener Beschichtungen auf isolierte neutrophile Granulozyten gesunder Probanden unter statischen und dynamischen Bedingungen. Unter statischen Bedingungen zeigten alle getesteten Membranoberflächen eine vergleichbare Zelladhärenz, jedoch war die NET-Induktion bei unbeschichteten Gasfasern signifikant höher ($p < 0,001$) als bei beschichteten. Ein ex vivo Perfusionsmodell unter definierten Strömungsbedingungen bestätigte eine scherkraftabhängige NET-Bildung mit einer 5- bis 6-fach erhöhten DNA-Freisetzung an unbeschichteten Gasfasern. Die Ergebnisse belegen sowohl eine materialinduzierte als auch eine Scherkraft induzierte NET-Bildung und unterstreichen die hemmende Wirkung antithrombogener Beschichtungen. Beide Testsysteme eignen sich zur Bewertung neuer Oberflächen für zukünftige ECMO-Systeme und implantierbare künstliche Lungen.

Abstract

Neutrophil extracellular traps (NETs) have been identified as potential contributors to thrombogenic processes during extracorporeal membrane oxygenation (ECMO). The aim of this scientific study was to investigate the influence of polymethylpentene (PMP)-based gas fibre and heat exchange membranes as well as various antithrombogenic coatings on isolated neutrophil granulocytes from healthy subjects under static and dynamic conditions. Under static conditions, all membrane surfaces tested showed comparable cell adhesion, but NET induction was significantly higher ($p < 0.001$) on uncoated gas fibres than on coated ones. An ex vivo perfusion model under defined flow conditions confirmed shear-dependent NET formation with a 5- to 6-fold increase in DNA release on uncoated gas fibres. The results demonstrate both material-induced and shear force-induced NET formation and underscore the inhibitory effect of antithrombogenic coatings. Both test systems are suitable for evaluating new surfaces for future ECMO systems and implantable artificial lungs.

1. Einleitung

1.1 Klinische Bedeutung einer ECMO

Die extrakorporale Membranoxygenierung (ECMO) ist eine lebensrettende Behandlungsoption für Patienten mit schwerem akutem, aber potenziell reversiblen kardiopulmonalem Versagen. Aufgrund der positiven Ergebnisse in Bezug auf das Überleben der Patienten, insbesondere in ECMO-Zentren [1], ist die ECMO-Anwendung eine zunehmend verbreitete intensivmedizinische Technik. Trotz verbesserter technischer sowie klinischer Strategien ist die ECMO-Unterstützung mit einer hohen Komplikationsrate assoziiert, insbesondere mit Blutungsereignissen und thromboembolischen Komplikationen, die maßgeblich zur Mortalität der Patienten beitragen [2].

Eine besondere Herausforderung beim Einsatz der ECMO ist die beim Blutkontakt mit den künstlichen ECMO-Oberflächen potenziell mögliche Fibrinogenadsorption, die Gerinnungsaktivierung und die Thrombogenese. Thromben-Formationen im ECMO-System können zum Versagen der Antriebspumpe (Pumpenkopfthrombose) oder zur Dysfunktion des Membranoxygenators, der den extrakorporalen Gasaustausch ermöglicht, führen [3,4]. Im klinischen Kontext besteht für den Patienten ein erhöhtes Risiko für thromboembolische Komplikationen, das sich in arteriellen Gefäßverschlüssen mit nachfolgendem Organinfarkt (Myokard, Mesenterium, Niere, Leber) sowie in zerebralen Ischämien manifestieren kann. Der konsekutive obligatorische Austausch des ECMO-Systems aufgrund von Pumpenkopfthrombose oder Dysfunktion des Membranoxygenators stellt oft eine akut lebensbedrohliche Situation für den Patienten dar. Die Ursachen für thrombotische ECMO-Komplikationen sind bisher noch weitgehend unbekannt. In der Literatur wird die Inzidenz der Thrombenbildung in einem ECMO-System, die einen Systemwechsel erforderlich macht, mit 3-26% beschrieben [3-5]. Generell führen thrombotische Anlagerungen auf den Gasfasern von Membranoxygenatoren zu einer Verringerung der Gasaustauschkapazität [6,7]. Aktuelle Studien legen nahe, dass

„Neutrophil Extracellular Traps“ (NETs) wesentlich zur Thrombogenese beitragen [8]. Die Ursachen für die Entstehung von NETs auf Gasfasern in klinisch verwendeten Oxygenatoren sind unbekannt. Naheliegender wäre eine materialinduzierte oder eine strömungsinduzierte NETose. Deshalb war das Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit, sowohl die materialinduzierte NETose unter systematischen statischen Bedingungen als auch die strömungsinduzierte NETose unter systematischen dynamischen Bedingungen als potenzielle Mechanismen für die Thrombogenese im ECMO-Oxygenator zu evaluieren.

Da es offensichtlich Oxygenator-Typ-abhängige Unterschiede in der Leukozytenadhäsion [9] und damit möglicherweise auch in der NETose-Bildung gibt, sollten die Gasfasern von verschiedenen handelsüblichen verfügbaren Membranoxygenatoren auf eine NETose induzierende Wirkung untersucht werden. Die Gasfasern aller Membranoxygenatoren bestanden aus dem Basismaterial Polymethylpenten (PMP), unterschieden sich aber in der Beschaffenheit der antithrombogenen Oberflächenbeschichtung.

1.2 Thrombenbildung im ECMO-System

Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass die thrombotischen Anlagerungen auf den Gasfasern aus Fibrinsträngen mit eingelagerten Thrombozyten und Erythrozyten bestehen, die jedoch je nach Lokalisierung im Oxygenator und der verwendeten Antikoagulation eine unterschiedliche Morphologie zeigen können [10].

Der Von-Willebrand-Faktor (vWF) stellt eine zentrale Komponente der Thrombusbildung dar, insbesondere unter Bedingungen hoher Scherkräfte, wie sie in arteriellen Gefäßen vorherrschen. Seine Fähigkeit, die Adhäsion von Thrombozyten an das subendotheliale Kollagen zu vermitteln, macht ihn zu einem entscheidenden Mediator der primären Hämostase und potenziell zu einem Schlüsselfaktor bei der

scherkraftinduzierten Thrombogenese. Höhere vWF-Anlagerungen konnten in der Nähe der Kreuzungspunkte benachbarter Gasfasern in klinisch eingesetzten Membranoxygenatoren nachgewiesen werden [11].

Histologische Untersuchungen eines klinisch eingesetzten ECMO-Oxygenators ergaben, dass auch makroskopisch thrombusfreie Bereiche mit Leukozyten und Thrombozyten bedeckt waren, die sich zu Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten (PLA) formierten [12].

Weiterhin wurde in den thrombotischen Anlagerungen auf den ECMO-Gasfasern neben Thrombozyten und Erythrozyten auch anhaftende kernhaltige Leukozyten gefunden, die auf eine Beteiligung von Entzündungsreaktionen an der Thrombogenese im Oxygenator hinweisen [6,9,13,14].

Solche Entzündungsreaktionen können durch die Beteiligung von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMNs) und die Freisetzung von „Neutrophil Extracellular Traps“ (NETs) zu pathologischen Thrombosen oder „Immunothrombosen“ führen [15]. NETs sind netzartige Strukturen aus extrazellulären Fasern, die hauptsächlich aus der DNA von PMNs bestehen und mit granulären Proteinen wie beispielsweise Myeloperoxidase (MPO) und Neutrophiler Elastase (NE) assoziiert sind. Krankheitserreger und Thrombozyten können an diese extrazellulären DNA-Fasern binden, was zur Inaktivierung von Pathogenen aber auch zur Thrombusbildung führen kann [16,17]. „Neutrophil Extracellular Traps“ konnten auf biokompatiblen Materialien mit hydrophober Oberfläche [18] sowie in klinisch verwendeten Oxygenatoren [8,12] durch die Visualisierung von extrazellulärer DNA, NE und citrullinierten Histonen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse deuten auf eine potenzielle Beteiligung von „Neutrophil Extracellular Traps“ an der Thrombogenese während der extrakorporalen Membranoxygenierung hin [8].

1.3 Bedeutung von PMNs und NETs im Rahmen der Immunabwehr

Die zentrale Funktion des Immunsystems ist der Schutz vor Pathogenen wie Bakterien, Parasiten oder Viren. Funktionell kann das Immunsystem in zwei sich ergänzende Komponenten unterteilt werden: die angeborene und die adaptive Immunantwort. Beide Systeme verfügen jeweils über humorale und zelluläre Bestandteile [19]. Zu den zellulären Bestandteilen des Immunsystems gehören verschiedene Immunzellen, darunter Granulozyten, Lymphozyten, Makrophagen sowie natürliche Killerzellen (NK-Zellen) [20].

Granulozyten als Teil der angeborenen Immunabwehr zählen wie Lymphozyten und Monozyten zu den Leukozyten und lassen sich anhand der unterschiedlichen Färbeeigenschaften ihrer Granula in die drei Gruppen basophile, eosinophile und neutrophile Granulozyten differenzieren [20]. Der Zellkern morphologisch ausgereifter neutrophiler Granulozyten ist hierbei in drei bis fünf Segmente unterteilt, was histologisch eine Differenzierung gegenüber unreifen neutrophilen Granulozyten mit einem stabkernigen Zellkern ermöglicht. Weiterhin werden die neutrophilen Granulozyten aufgrund der Segmentierung des Zellkerns und der folglich vielfachen Gestalt dessen als polymorphkernige Granulozyten bezeichnet [21].

Die polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) sind nahezu ausgereifte, spezialisierte und nicht teilungsfähige Zellen mit einer durchschnittlichen Lebensdauer von etwa einem Tag im Blut, die sich im Gewebe durchschnittlich um zwei Tage verlängern kann. [21]. Der Anteil der neutrophilen Granulozyten an den ca. 5.000 - 10.000 pro μl Blut im Organismus zirkulierenden Leukozyten [22] beträgt in etwa 40 - 60% [22]. Täglich werden im Knochenmark ca. $5 \cdot 10^{10}$ - $10 \cdot 10^{10}$ neutrophile Granulozyten [23] mit einem Durchmesser von ca. 10-12 μm [21] neu gebildet.

Neben ihrer charakteristischen Zellkernmorphologie zeigen PMNs zytoplasmatische Granula als weiteres histologisches Merkmal [24]. Diese enthalten antimikrobielle

Proteine und Enzyme wie z. B. Neutrophile Elastase, Myeloperoxidase sowie weitere Proteasen und Lysozym.

Auf der Oberfläche ihrer Zellmembranen tragen PMNs Proteinstrukturen wie Pattern Recognition Receptors (PRR), Selectine und Integrine. Diese Membranproteine ermöglichen die Erkennung und Eliminierung von Pathogenen, die Einwanderung in entzündetes Gewebe sowie die Initiierung von Immunantworten. Somit sind sie essenziell für die Funktion der PMNs im Rahmen der angeborenen Immunantwort.

Das Oberflächenprotein L-Selektin (CD62L) ist bedeutend für die Migration von PMNs zu den Entzündungsherden [25]. Selektine ermöglichen den Leukozyten im Rahmen der Selektinphase ein erstes Anhaften an Zelladhäsionsmoleküle der Endothelzellen, was durch den Strom des Blutes zunächst in einer rollenden Bewegung resultiert. Zytokinvermittelt kommt es im Anschluss zu einer Aktivierung von Integrinen auf der Leukozytenoberfläche und einer dauerhaften Adhäsion (Adhäsionsphase) an die Oberfläche des Endothels. Zuletzt erfolgen die Diapedese und die interstitielle Migration der Leukozyten zum Inflammationsherd [21]. Während der Aktivierung der Neutrophilen verändert sich die Ausstattung dieser mit Oberflächenproteinen. Im Rahmen des sogenannten Sheddings kommt es zu einem proteolytischen Abbau der extrazellulären Domäne des L-Selektins CD62L und somit zu einer Begünstigung der Adhäsion über Integrine. Folglich ist die Reduktion der L-Selektin-Expression auf der Oberfläche neutrophiler Granulozyten charakteristisch für die Aktivierung dieser Zellen [26,27].

Gelangen die neutrophilen Granulozyten zum Ort der Entzündung, können sie ihre bakterizide Wirkung entweder durch Vesikelentleerung extrazellulär oder nach Phagozytose intrazellulär entfalten [21]. Die Phagozytosefähigkeit der Neutrophilen wird dabei durch Opsonierung verstärkt. Hierbei werden Pathogene mit Komplementfaktoren oder Antikörpern auf ihrer Oberfläche markiert und somit leichter durch die Phagozyten mittels entsprechender Rezeptoren erkannt [22]. Ein derartiger Rezeptor auf neutrophilen Granulozyten, welcher mit Komplementfaktor C3b behaftete Krankheitserreger erkennt, ist der Komplementrezeptor CR3, wobei

dieser aus den Integrinuntereinheiten CD11b und CD18 besteht [27]. Das CR3-Heterodimer (CD11b/CD18) wird auch als Mac-1 oder $\alpha_M\beta_2$ bezeichnet und erfüllt innerhalb der angeborenen Immunität wichtige Funktionen bei der Phagozytose, der Zelladhäsion [28,29] sowie bei der PMN-Migration an die Infektionsherde [30]. Die Stärke der (CD11b/CD18)-Expression auf den PMNs ist entsprechend der Funktion des Heterodimers CR3 ein Maß für die Phagozytosebereitschaft der Neutrophilen. Diese steigt beispielsweise innerhalb weniger Minuten nach Exposition gegenüber bakteriellen Lipopolysacchariden [31].

Neben dem zuvor bereits beschriebenen Granulainhalt wirken auch reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) bakterizid. Der Vorgang der Bildung einer Vielzahl von ROS und Freisetzung gegenüber den phagozytierten Pathogenen wird auch als „oxidativer burst“ bezeichnet [27]. Das für die Bildung der ROS entscheidende Enzym, die NADPH-Oxidase katalysiert die Reduktion molekularen Sauerstoffs zum Superoxidanion, wobei NADPH oxidiert wird. Weiterhin werden durch die Superoxiddismutase zunächst Wasserstoffperoxid und Sauerstoff sowie mittels Myeloperoxidase anschließend Hypochloridionen gebildet [27].

Der Kontakt von Granulozyten mit körperfremden Biomaterialien führt ebenfalls zu einer Aktivierung der PMNs, die sich in einer Abspaltung von L-Selektin, der Hochregulation von (CD11b/CD18) und einer Aktivierung des oxidativen Bursts äußert [32]. Erhöhte (CD11b/CD18)-Spiegel werden auch in Zusammenhang mit der Hämodialyse [33] oder der kardiopulmonalen Bypassoperation [34] beschrieben.

Eine Heparinbeschichtung polymerer Materialien scheint einen inhibierenden Einfluss auf die Adhäsion von Granulozyten zu bewirken [35]. Inwieweit dieser Effekt selektin- oder integrinvermittelt ist, ist bislang nicht geklärt. Diamond et al. gelang es eine direkte Interaktion zwischen Mac-1 und Heparansulfatglykanen nachzuweisen [36]. Eine Reduktion der Granulozytenadhäsion wurde in einer klinischen Untersuchung im Rahmen kardiopulmonaler Bypassverfahren beobachtet, bei denen eine Heparinbeschichtung des arteriellen Blutfilters eingesetzt wurde [37].

PMNs können Pathogene auch extrazellulär bekämpfen, indem sie sogenannte „Neutrophil Extracellular Traps“ (NETs) bilden und freisetzen [16]. NETs bestehen aus glatten DNA-Filamentstrukturen mit einem Durchmesser von etwa 17 nm und zeigen ein wolkenartiges Aussehen mit einer räumlichen Ausdehnung, die 10- bis 15-mal größer ist, als das Volumen des ursprünglichen PMN, aus dem sie stammen [16]. An die DNA-Strukturen sind antimikrobielle Proteine aus den Granula der Neutrophilen, wie die MPO und die NE, angeheftet [21,24].

Nach der Aktivierung der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten kommt es im Rahmen der suizidalen NETose zunächst zur Delobulierung des Zellkerns und zum Auflösen der Kernmembran. Dabei verlieren die Granulozyten ihre Polarisierung, und das Chromatin wird dekondensiert. Letztlich führt die Ruptur der Plasmamembran zur Freisetzung der sogenannten „Neutrophil Extracellular Traps“ [38].

Bei der zweiten Form der NETose, der sogenannten vitalen oder nicht-lytischen NETose, erfolgt ebenfalls eine Degranulation sowie die Freisetzung von Kernchromatin. Im Gegensatz zur suizidalen NETose bleibt jedoch ein phagozytisch aktiver Zytoplast erhalten, der weiterhin antibakterielle Funktionen ausübt [39].

Die Induktion der NETose steht in direktem Zusammenhang mit den Oberflächencharakteristika von körperfremden Biomaterialien [40]. Beispielsweise führen sandgestrahlte und säuregeätzte Titanimplantatoberflächen mit hoher Rauheit zu einer vermehrten Freisetzung von „Neutrophil Extracellular Traps“ [41]. Aktuelle Studien dokumentieren zudem erhöhte Konzentrationen zellfreier DNA (cfDNA) als Marker der NETose nach Dialysebehandlungen [42,43]. Sperling et al. zeigten in ihren Untersuchungen, dass hydrophobe Biomaterialien die NET-Bildung effektiv stimulieren. Besonders ausgeprägte NET-Ablagerungen wurden dabei auf hydrophobem Teflon AF detektiert [18].

2. Material und Methoden

Die Effekte von Oberflächenbeschichtungen verschiedener handelsüblicher ECMO-Gasfasern auf isolierte PMNs wurden in dieser wissenschaftlichen Arbeit analysiert.

2.1 Testmaterial

Das Testmaterial bestand aus Gasaustauschfasern (GF) und Wärmeaustauschfasern (WT) aus verschiedenen kommerziell erhältlichen ECMO-Oxygenatoren mit unterschiedlichen anti-thrombotischen Beschichtungen (Tabelle 1), die in bioaktive [PLS, Bioline®-Beschichtung (Getinge GmbH, Raststatt, Deutschland); Hilite 7000LT, X.ELLENCE®-Beschichtung (Fresenius Medical Care AG, Bad Homburg, Deutschland)] und biopassive [Nautilus, Balance®-Beschichtung (Medtronic GmbH, Meerbusch, Deutschland); EOS, PH.I.S.I.O®-Beschichtung (LivaNova, Mirandola, Italien)] eingeteilt werden [44]. Biopassive Beschichtungen reduzieren die Wechselwirkungen zwischen Blut und künstlicher Oberfläche durch Hemmung der Proteinadsorption, während bioaktive Beschichtungen spezifisch durch Hemmung von Gerinnungsfaktoren, Thrombozyten oder anderen Faktoren, die an der Gerinnung und Hämostase beteiligt sind, wirken [44,45].

Unbeschichtete Gasaustauschfasern, welche als Referenzmaterial dienten, wurden freundlicherweise von der Firma Getinge GmbH zur Verfügung gestellt. Unbeschichtete Gasaustauschfasern und die GFs aller verwendeten Oxygenator-Typen bestanden aus dem Basismaterial Polymethylpentene (PMP). Die untersuchten Wärmeaustauschfasern wurden je nach Oxygenator-Typ aus verschiedenen Materialien wie Polyurethan, Polyethylenterephthalat oder rostfreien Stahl hergestellt (Tabelle 1). Von jedem Oxygenator-Typ eines Herstellers wurde ein unbenutzter Oxygenator analysiert.

Oxygenator-Typ (Hersteller), Oberflächengröße	Beschichtung	Beschichtungsform	Wärmetauscher-Material und Oberflächengröße
PLS (Getinge GmbH, Rastatt) 1,8 m ²	Bioline (bioaktiv)	Kovalente Bindungen zwischen Heparinmolekülen und einer Albuminschicht.	Polyurethan (PUR) 0,4 m ²
Hilite 7000 LT (Fresenius, Medical Care AG Bad Homburg) 1,9 m ²	X.ELLENC (bioaktiv)	Heparin kovalent und ionisch an immobilisiertes Albumin in mehreren Schichten gebunden.	Polyethylenterephthalat (PET) 0,45 m ²
Nautilus (Medtronic GmbH, Meerbusch) 1,8 m ²	Balance (biopassiv)	Polyethylenoxid (PEO), Integration von Sulfat- und Sulfonatgruppen.	Polyethylenterephthalat (PET) 0,3 m ²
EOS (LivaNova, Mirandola, Italien) 1,2 m ²	PH.I.S.I.O (biopassiv)	Phosphorylcholin (PC)	Rostfreier Stahl 0,14 m ²
PMP (Getinge GmbH, Rastatt)	Unbeschichtet	-	-

Tabelle 1: Gasfaser-Oberflächenbeschichtungen und Wärmetauschermaterialien der im Handel erhältlichen ECMO-Membranoxygenatoren. Das Basismaterial aller beschichteten oder unbeschichteten GFs besteht aus Polymethylpentene (PMP) [46].

2.2 ECMO-Membranoxygenatoren

Bei einer ECMO-Unterstützung wird mit einer Zentrifugalpumpe über Gefäßkanülen kontinuierlich eine definierte Blutmenge pro Minute aus dem Körper des Patienten durch einen Membranoxygenator gepumpt und nach der Oxygenierung zum Patienten zurückgeleitet. Der Membranoxygenator unterstützt den Gasaustausch der Patientenlunge, indem er das Blut mit Sauerstoff anreichert und gleichzeitig Kohlendioxid eliminiert. Die verfügbaren ECMO-Membranoxygenatoren unterscheiden sich in der Anordnung und Oberflächengröße der Gas- und Wärmetauscherfasern [Tabelle 1]. Innerhalb der Membranoxygenatoren können die Gasfasern gewickelt (EOS-Membranoxygenator, Hilite 7000 LT) oder in

Sandwichform geschichtet (PLS- oder Nautilus-Membranoxygenator) sein (Abbildung 1).



Abbildung 1: Übersicht über die verwendeten handelsüblichen Oxygenatoren. Von links: Nautilus-, Hilite 7000 LT -, EOS-, PLS-Membranoxygenator [ECMO-Zentrum, Universitätsklinikum Regensburg].

Die Oberflächengröße der Gasfasern (Abbildung 2) der analysierten Membranoxygenatoren variiert zwischen $1,2 \text{ m}^2$ (EOS-Membranoxygenator) und $1,9 \text{ m}^2$ (Hilite 7000 LT).

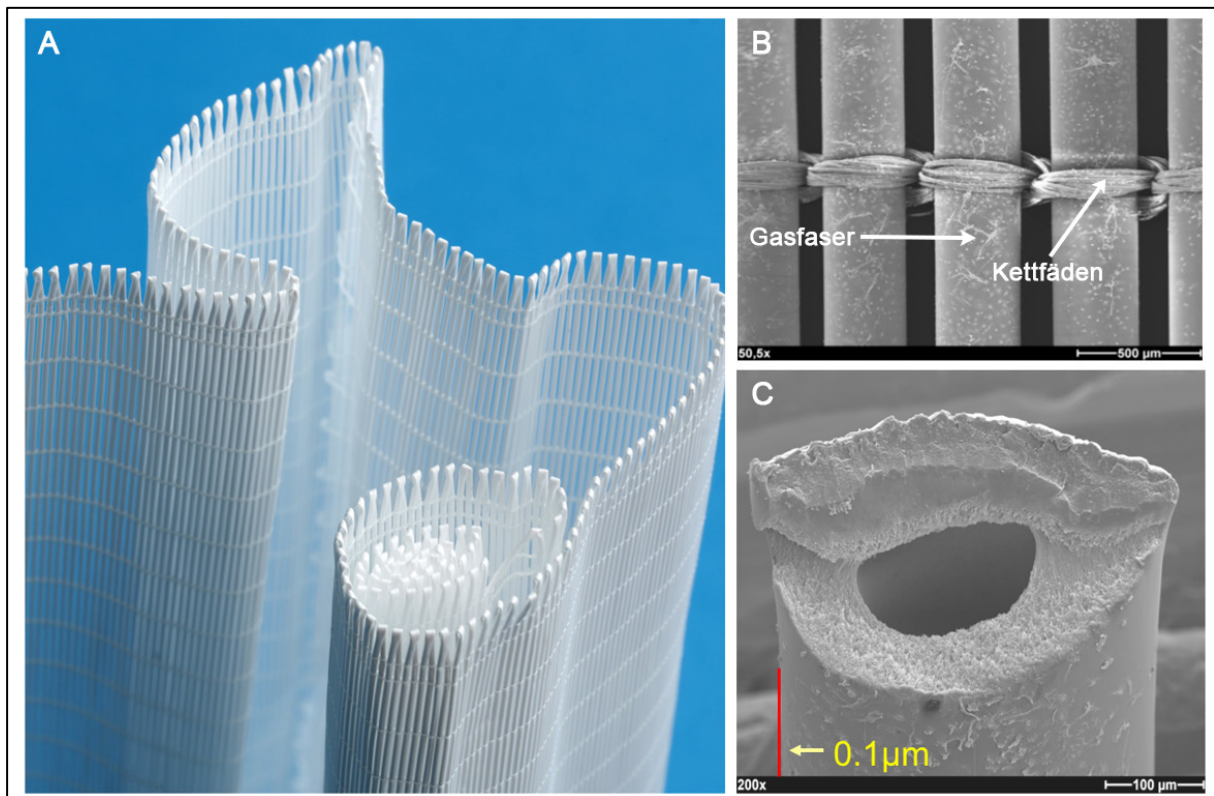


Abbildung 2: Anordnung der Gasfasern.

(A) Konventionelle Gasfasermatte. (B) Die einzelnen Gasfasern werden mit Kettfäden stabilisiert. (C) Mikroporöse Gasfaser in zweihundertfacher Vergrößerung mit einer 0,1 µm dicken Außenschicht aus Polymethylpenten [ECMO-Zentrum, Universitätsklinikum Regensburg].

2.3 Beschichtungen der ECMO-Gasfasern

In dieser wissenschaftlichen Arbeit wurden die Auswirkungen von Oberflächenbeschichtungen verschiedener handelsüblicher ECMO-Gasfasern auf isolierte PMNs analysiert. Dabei wurde die Polymeroberflächenbeschichtung des Nautilus (Medtronic GmbH, Meerbusch, Deutschland), die Bioline-Oberflächenbeschichtung des PLS (Permanent-Life-Support-System, Getinge GmbH, Rastatt, Deutschland), die X.ELLENCE-Oberflächenbeschichtung des Hilite 7000 LT (DP3-System, Fresenius Medical Care AG, Bad Homburg, Deutschland) und die Phosphorylcholin-Oberflächenbeschichtung des EOS (LivaNova, Mirandola, Italien) im Verhältnis zueinander und im Verhältnis zum

unbeschichteten Basismaterial Polymethylpenten in Hinblick auf netotische Veränderungen neutrophiler Granulozyten analysiert.

2.3.1 Bioline-Beschichtung

Die BIOLINE-Beschichtung nutzt kovalente Bindungen zwischen Heparinmolekülen und einer Albuminschicht, um eine hydrophile und homogene Oberfläche zu schaffen. Diese Form der Oberflächenbeschichtung verspricht, die Gerinnungsaktivierung und die potenzielle Thrombusbildung zu hemmen [47,48].

2.3.2 Balance-Beschichtung

Die Basis der Balance-Beschichtung besteht aus dem Polymer Polyethylenoxid (PEO). Bei dieser Polymerbeschichtung ist die Funktionsschicht über einen Primer fest mit der künstlichen ECMO-Oberfläche verbunden. Die hydrophile Funktionsschicht enthält integrierte Sulfat- und Sulfonatgruppen, welche die negative Ladung des Gefäßendothels imitieren. Forschungsergebnisse haben gezeigt, dass sulfonierte Polymere mit negativer Ladung sowohl negativ geladene Thrombozyten abstoßen [49] als auch Thrombin durch Bindung an Antithrombin ähnlich wie Heparin hemmen können [50,51]. Über die hydrophilen Polymermoleküle wird zwischen der künstlichen ECMO-Oberfläche und dem Patientenblut eine „isolierende“, wasserähnliche Struktur aufgebaut, die Proteinablagerungen und Zelladhäsionen reduzieren soll [52].

2.3.3 X.ELLENCE-Beschichtung

In der biokompatiblen und hämokompatiblen X.ELLENCE-Beschichtung ist Heparin in mehreren Schichten kovalent und ionisch an immobilisiertes Albumin gebunden. Die mehrschichtige Beschichtung wird durch eine abschließende Vernetzung stabilisiert.

2.3.4 Phosphorylcholin-Beschichtung

Oberflächenbeschichtungen auf der Basis von Phosphorylcholin (PC) sollen eine Alternative zu heparingebundenen Systemen darstellen. Insbesondere für Patienten, die an Heparin-induzierter Thrombozytopenie (HIT) leiden, ist eine Oberflächenbeschichtung mit Phosphorylcholin eine sinnvolle Option. Das Stoffwechselzwischenprodukt Phosphorylcholin ist antithrombotisch, proteinresistent und antibakteriell [53]. Die „Phosphorylcholine Inert Surface in Oxygenation“-Beschichtung (PH.I.S.I.O) des EOS-Oxygenators besteht aus physiologisch inertem Material, das das menschliche Endothel nachahmt. Die hydrophile Phospholipidoberfläche dieser Beschichtung soll die Aktivierung des Gerinnungssystems bei Kontakt mit Blut verhindern [54]. Phosphorylcholin ist die polare Kopfgruppe einiger Phospholipide, zwischen denen sich negativ geladene Phosphatmoleküle befinden, die ihrerseits an positiv geladene Cholinmoleküle gebunden sind [44].

2.4 Gewinnung der Proben aus den Oxygenatormembranen

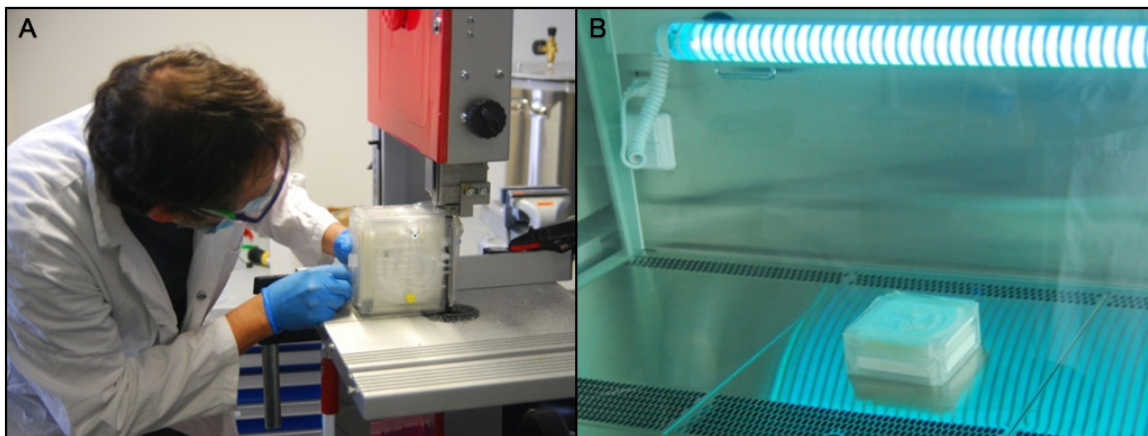


Abbildung 3: Gewinnung des Testmaterials aus handelsüblichen Oxygenatoren. (A) Aussägen des Gas- und Wärmetauscherkerns und (B) dessen Sterilisation [Eigene Aufnahme].

Zur Vorbereitung des Testmaterials wurde eine Bandsäge (TC-SB 305 U, Einhell, Landau, Deutschland) verwendet, um das Gehäuse der entsprechenden Oxygenatoren zu öffnen (Abbildung 3). Die Kerne mit Gas- und Wärmetauscherfasern wurden anschließend sterilisiert und steril verpackt. Daraufhin wurden die Gas- und Wärmetauscherfasern ohne spezifische Zuordnung getrennt zugeschnitten. Die Materialproben bestanden in den Versuchen aus Faserflächen mit einem Verhältnis von 25 mm x 5 mm (Länge x Breite), in dem sich zehn Fasern verbunden durch Kettfäden befanden. Entsprechend der Versuche mit Gas- oder Wärmetauscherfasern wurden diese in sterilisierten Edelstahlinsätzen (Durchmesser, 34 mm) fixiert und in sterile Petrischalen (Thermo Fischer, Waltham, Massachusetts, USA) mit einem Durchmesser von 35 mm positioniert (Abbildung 4).

2.5 Vorbereitung des Testmaterials für die statischen Versuche

Die Materialproben der verschiedenen Oxygenatorfasern wurden mit 3 ml HTP-Puffer + 30 % AB-Serum über 12 Stunden bei sanfter Bewegung und Raumtemperatur (RT) beschichtet, anschließend abgesaugt und über Nacht in der Sterilbank getrocknet.

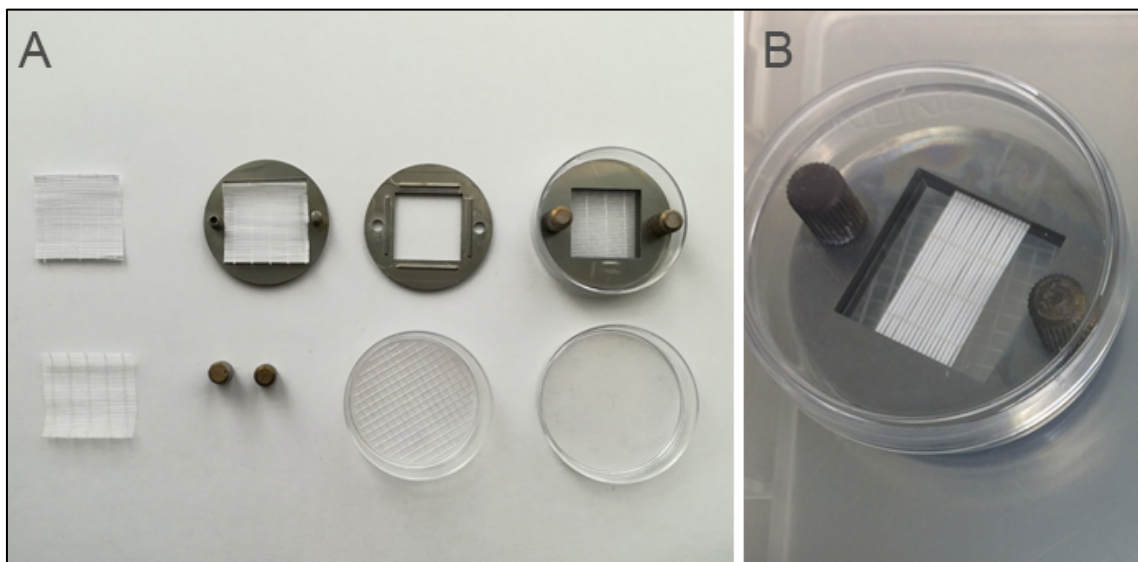


Abbildung 4: Membranprobe im Edelstahlinsatz in Petrischale. Bestandteile der Membranfixierung (A). Die Probe bestand aus einer Membran von Gas- oder Wärmetauscherfasern (B), die über Kettfäden verbunden waren [46].

Damit waren die Materialproben für die PMN-Versuche, welche innerhalb von 24 h durchgeführt wurden, vorbereitet. Die Adhäsionsversuche fanden dabei in denselben Petrischalen statt.

2.6 Beschichtung der Objektträger der statischen Versuche

Poly-L-Lysin-beschichtete (0,01 %, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) Glasobjektträger wurden verwendet, um in den Versuchen eine potenzielle Induktion von NETose aus adhärennten Granulozyten zu überprüfen. Hierfür wurden unbeschichtete Objektträger in Küvetten-Einsätze positioniert und mit 1 % HCl-EtOH (70 %)-Gemisch bei Raumtemperatur unter dem Abzug eine Stunde lang gereinigt. Vor der Beschichtung mit 0,01 % Poly-L-Lysin-Lösung wurde dreimal mit destilliertem Wasser bei RT für jeweils fünf Minuten gewaschen. Hierauf erfolgte die zwölfstündige Trocknung der beschichteten Objektträger bei Raumtemperatur unter der Sterilbank.

2.7 Optimierung der Versuchsdurchführung

Die verschiedenen Membranproben wurden zu Beginn der Untersuchungen in Edelstahleinsätze so positioniert, dass diese vollständig das offene Sichtfenster von $1,7 \cdot 1,7 \text{ cm}^2$ bedeckten (Abbildung 5). Nach der Inkubation mit PMNs auf den Gas- und Wärmetauscherfasern wurden die Edelstahleinsätze geöffnet und die Membranproben entnommen. Da die Membranproben größer waren, als die Glasobjektträger, auf denen diese für die Analysen positioniert werden sollten, mussten die Membranproben mit adhärennten PMN noch zugeschnitten werden. Im Verlauf dieser Aktion rollten sich die Membranproben zusammen (Abbildung 5 B) und mussten vorsichtig entfaltet werden.

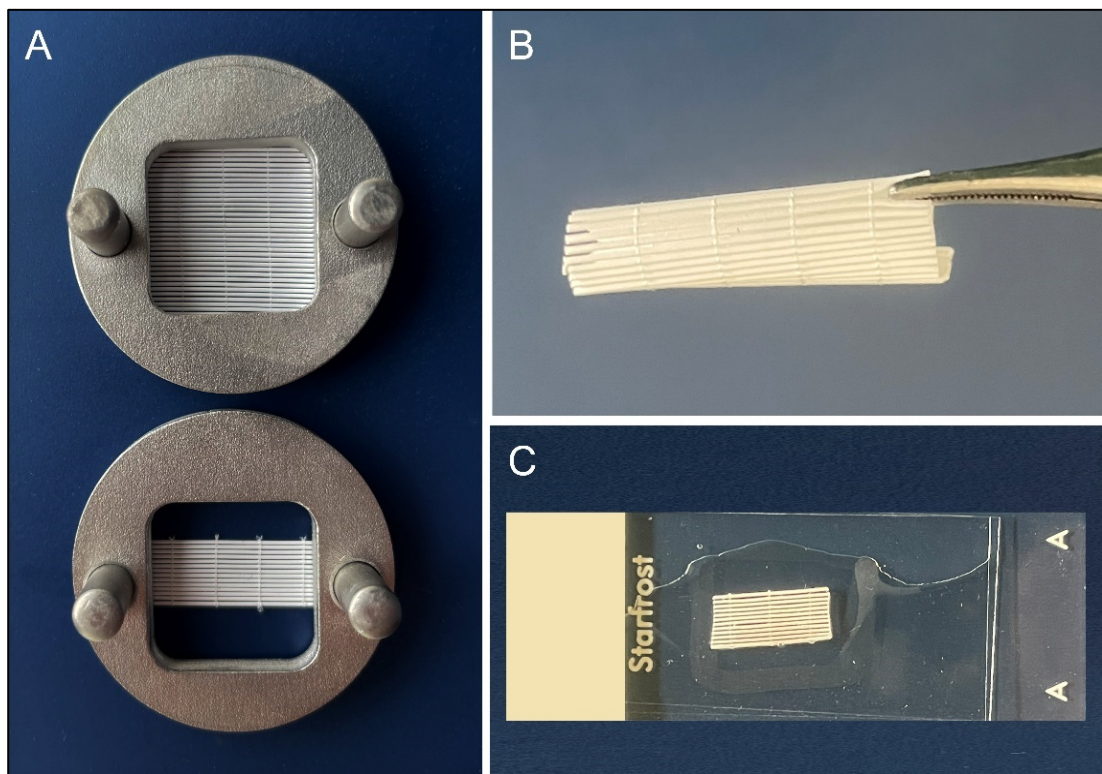


Abbildung 5: Optimierung der Versuchsdurchführung. Reduktion der eingespannten Membranfläche von der ursprünglichen Fläche von $2,9 \text{ cm}^2$ auf $0,9 \text{ cm}^2$ (A), um ein Einrollen (B) und damit eine unbeabsichtigte Manipulation der adhärten PMNs zu vermeiden. Auf dem Glasobjektträger fixierte Membran (C) [Eigene Aufnahmen].

Da durch diesen Vorgang eine unbeabsichtigte Veränderung der PMN-Anzahl nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde von diesem Vorgehen Abstand genommen. Als neue Variante wurden die Membranproben für die Fixierung auf dem Glasobjektträger bereits auf die später notwendige Größe von $1,7 \cdot 0,5 \text{ cm}^2$ zugeschnitten. Durch die minimierte Fläche der Membranproben wurde ein Einrollen der Materialproben vermieden und diese konnte problemlos auf dem Glasobjektträger positioniert werden (Abbildung 5 C). Die Versuche mit der ursprünglichen Membrangröße $1,7 \cdot 1,7 \text{ cm}^2$ wurden in den Analysen nicht berücksichtigt.

2.8 Isolation von polymorphkernigen Granulozyten

Polymorphonukleäre Granulozyten wurden aus mit Lithium-Heparin (16 IU/ml) antikoagulierten Blutproben von gesunden Freiwilligen (n = 6 bei statischen und n = 5 bei dynamischen NETose-Versuchen) mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Hierfür wurde das Probandenblut mit einer 20-G-Nadel entnommen und in drei 7,5-ml-Li-Heparin-Blut Röhrchen (S-Monovette® Plasma/Lithium-Heparin, Sarstedt AG & Co, Nürnberg) gefüllt. Das Blut ruhte dann 20 Minuten bei 10 U/min auf einem Röhrchenroller (RS-TR10 Phoenix Instrument GmbH, Karlsdorf-Neuthard, Deutschland).

Die Blutspender gaben vor der Blutentnahme ihre schriftliche Einverständniserklärung zur Teilnahme an der vorliegenden Studie ab. Das Studienprotokoll erhielt die Genehmigung durch die Ethikkommission der Universität Regensburg (Abstimmung Nr. 16-101-0322). Die Probanden erhielten eine Aufklärung über den Inhalt der Studie und ihr Recht, die Teilnahme jederzeit zu beenden. Es nahmen gesunde Probanden beider Geschlechter teil, die keine Antikoagulanzen einnahmen. Zur Isolation der PMNs wurden nacheinander 3 ml Leuko Spin Medium (pluriSelect Life Science, Leipzig, Deutschland), 3 ml Lympho Spin Medium / PBMC Spin Medium (pluriSelect Life Science, Leipzig, Deutschland) und 3 ml Lithium-heparinisiertes Blut der Probanden geschichtet (Abbildung 6 A). Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 1000x g ohne Bremse (Centrifuge 5810 R, Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland) wurden das Plasma und das Lympho Spin Medium (Abbildung 6 B) vorsichtig mit einer Glaspipette entfernt und die isolierten Granulozyten mit einer Pipette (Eppendorf Research® plus, Wesseling-Berzdorf, Deutschland) entnommen. Die isolierten Granulozyten wurden daraufhin in ein mit 5 ml Hepes-Tyrode-Puffer¹ (HTP) und 0,5% Rinderserumalbumin (BSA) gefülltes Falcon™ Zentrifugenröhrchen (Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte,

¹ Zusammensetzung siehe Kapitel 6.4 Verbrauchsmaterialien

Deutschland) pipettiert. Anschließend erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation mit 250x g bei Raumtemperatur ohne Bremse.

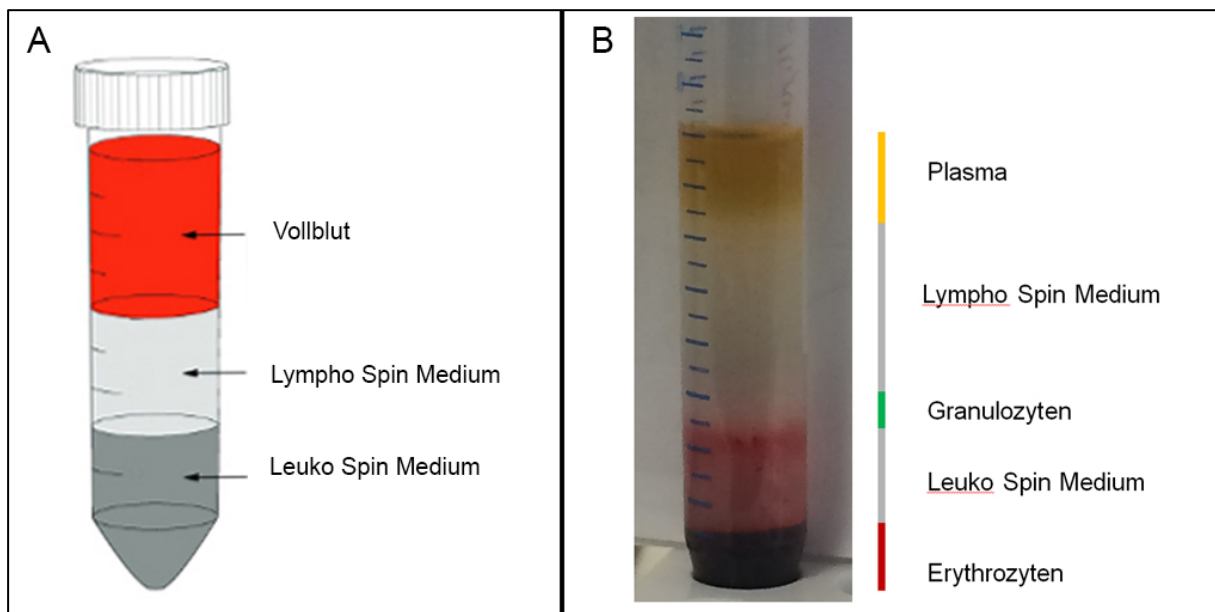


Abbildung 6: Übersichtung zur Granulozytenisolierung.

(A) Vor dem Zentrifugieren wurden Leuko Spin Medium, Lympho Spin Medium und Vollblut geschichtet. (B) Nach dem Zentrifugieren lagen Bereiche mit Erythrozyten, Granulozytenisolierung (grüner Bereich) und Plasma isoliert vor. [A: Firma pluriSelect Life Science, Leipzig, Deutschland; B: Eigene Aufnahme]

Zur Bestimmung der Zellanzahl der isolierten PMNs in der Suspension kam das „Cell Counter and Analyzer System“ (CASY System, OMNI Life Science, Bremen, Deutschland) zum Einsatz. Hierfür wurde in einer Verdünnung von 1:1001 der Zellsuspension (10 µl Zellsuspension in 10 ml Casyton) die Anzahl der PMNs automatisch gezählt und für die statischen Adhäsionsversuche in einem Resuspensionspuffer auf $2,5 \cdot 10^5$ Zellen / ml eingestellt. Innerhalb der auf die statischen Adhäsionsversuche folgenden dynamischen PMN-Versuche wurden $9 \cdot 10^6$ Zellen / ml in die ex vivo Versuchsanordnung eingesetzt.

2.9 PMN-Adhäsion auf Gasfasern innerhalb der statischen Versuche

Die isolierten PMNs eines einzelnen Probanden wurden in einer Messreihe mit allen Testmaterialien (eine Materialprobe von jedem Oxygenator-Typ) in sechs unabhängigen Experimenten inkubiert.

Um die Auswirkung der verschiedenen Oxygenatoroberflächenbeschichtungen und des Basismaterials Polymethylpenten der Gas- und Wärmetauscherfasern auf PMNs zu untersuchen, wurden die Materialproben zunächst mit 3 ml HTP - BSA 0,5 % + Ca/Mg befeuchtet. Nach dem Anfeuchten der Materialproben wurde 1 ml HTP - BSA 0,5 % + Ca/Mg unter die eingespannten Proben und 2 ml der Zellsuspension auf die Proben pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 3 Stunden bei 37 °C unter leichter Bewegung (Schüttelinkubator, Kuhner Kelvin+, Basel, Schweiz).

Die parallele Inkubation von PMNs mit HTP-BSA-Ca/Mg auf mit 100 µl 0,01% Poly-L-Lysin-Lösung beschichteten Objektträgern diente als Negativkontrolle. Für eine Positivkontrolle wurden die adhärenenten Zellen nach der 30-minütigen Adhäsionsphase für 3 Stunden mit 10µl frisch hergestellter 200 nM Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) -Lösung (P8139 Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) inkubiert. Eine Inkubation mit PMA führt zu einer morphologischen Veränderung der Zellkernstruktur und zeigt eine ausgeprägte netotische Reaktion nach einer Kernfärbung [55].

Zur Entfernung nicht-adhärenenter PMNs wurden die Membranproben vor der Fixierung mit HTP-BSA-0,5%-Puffer gewaschen. Die adhärenenten Zellen auf den Materialproben wurden anschließend in 3 ml 4% Paraformaldehyd in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) bei Raumtemperatur für jeweils 10 min, fixiert. Nach dem zweimaligen Waschen mit HTP-Puffer wurden die Materialproben mit 500 ng/ml 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) gefärbt. Hierfür wurde die DAPI-Stammlösung in Aqua destillata gelöst und diese dann im Verhältnis 1:200 in HTP-Puffer (ohne BSA) diluiert. Die anschließenden 60-minütige Inkubationen erfolgten bei Raumtemperatur in Dunkelheit. Nach dem erneuten Waschen mit 2 ml HTP-

Puffer wurden die Materialproben mit Fluoromount-GTM-Montagemedium (Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte, Deutschland) abgedeckt und ein zweites Deckglas aufgelegt. Dieser Vorgang wurde ohne die Bildung von Luftblasen durchgeführt. Die anschließende Aushärtung im Kühlschrank erfolgte über 3 Tage.

DAPI-gefärbte Zellkerne wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop (BZ-8100E Keyence GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland) mit 100-fachen und 200-fachen Vergrößerungen visualisiert. Der verwendete BZ-Filter GFP-BP (Keyence GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland) ermöglichte eine 470 nm Anregung, dichroitische Spiegelwellenlänge von 495 nm und eine 535 nm Emission.

2.9.1 Kategorisierung von netotischen PMNs

Für die Beurteilung von morphologischen Veränderungen der neutrophilen Granulozyten wurde die Klassifizierung basierend auf der Chromatin-Schwellung der Zellkerne [55] angewandt (Abbildung 7). Dabei wurden die PMNs in den verschiedenen Messreihen entsprechend den morphologischen Veränderungen durch Chromatin-Schwellung differenziert und zahlenmäßig erfasst. Bei morphologisch unveränderten Zellkernen der PMNs, mit einem Nukleus in gelappter Form bzw. ohne sichtbare Verformungen oder Ausstülpungen, erfolgte die Zuordnung zur Gruppe „Netotisch unverändert“ (Abbildung 7 Phase I). Bei einer Schwellung des Zellkerns (Abbildung 7 Phase II) ist der ursprüngliche Umriss deutlich umgeformt und Ausweitungen sowie Ausbuchtungen, über die halbe Zellkerngröße hinaus, sichtbar. Eine weitere Schwellung kann zur Ruptur der Plasmamembran und zur Freisetzung von NETs führen (Abbildung 7 Phase III).

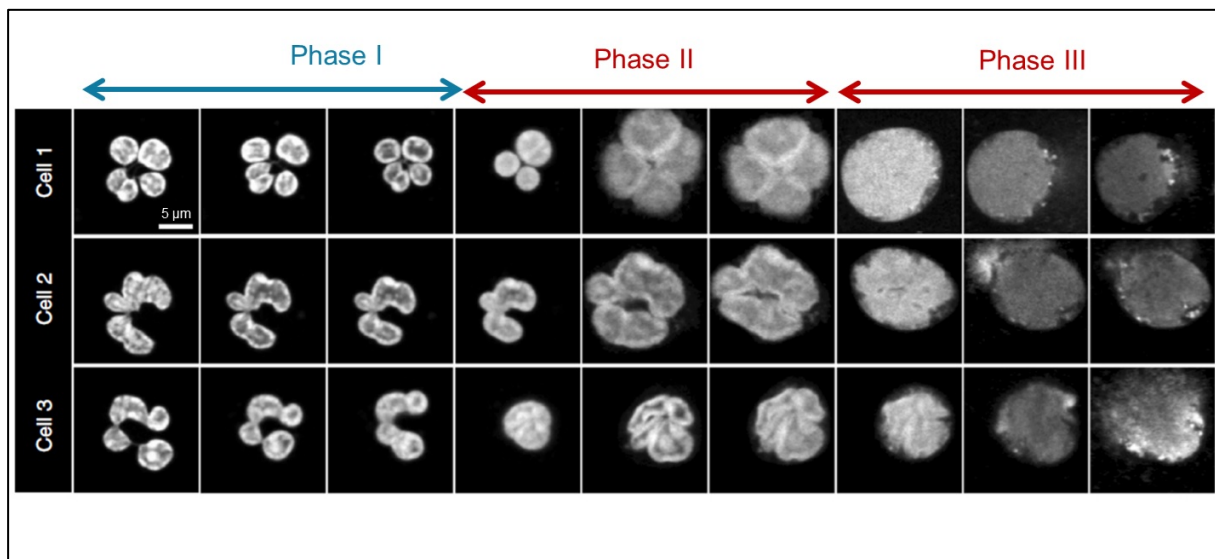


Abbildung 7: Morphologische Veränderungen durch Chromatin-Schwellung. Normale Zellkerne (Phase I), geschwollene (Phase II) und stark geschwollene sowie rupturierte Zellkerne (Phase III) [55].

Geschwollene Zellkerne und solche, die kurz vor der Ruptur der Plasmamembran standen oder bei denen sich bereits NETs zeigten, sind pathologisch veränderte PMNs und wurden entsprechend der Gruppe „Netotisch verändert“ zugeordnet.

2.9.2 PMNs im Fluorescence-activated cell sorting System

Mit Hilfe der fluoreszenzaktivierten Zellsortierung (FACS) lebender Zellen kann eine Zellpopulation anhand der Fluoreszenzmarkierung in Subpopulationen differenziert werden. In der vorliegenden Promotionsarbeit diente die FACS-Analyse dazu, zu untersuchen, ob PMNs beim Kontakt mit den beschichteten ECMO-Oberflächen vermehrt Sauerstoffradikale freisetzen (oxidativer Burst).

Für die FACS-Analysen wurden 100 µl PMN-Suspension aus dem jeweiligen Überstand nach einem dreistündigen Kontakt mit den verschiedenen

Oberflächenbeschichtungen in 2 ml HTP-Puffer + Ca/Mg in die FACS-Röhrchen 7-14 pipettiert.

In den FACS-Röhrchen 1-6 befanden sich für die Kontrollgruppen (LW) jeweils $6,6 \cdot 10^4$ Zellen. Nach einem Pufferwechsel mit 2 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation mit 250x g bei Raumtemperatur.

Hierauf erfolgte ein erneuter Pufferwechsel mit 1000 µl PBS und das Hinzufügen von 10 µl Dihydrorhodamin/SNARF-1 (DHR/CargoxySNARF-1, 1 mM; D632/C1271; Invitrogen, Kalifornien, USA) zur Erreichung einer Endkonzentration von 100 nM für die Burst-Experimente. Zur Detektion reaktiver Sauerstoffspezies kam Dihydrorhodamin (DHR) zum Einsatz, da es passiv durch Zellmembranen diffundiert. Nicht fluoreszierendes Dihydrorhodamin wird innerhalb der Zelle durch Oxidation in grün fluoreszierendes Rhodamin 123 überführt. Die Menge von Rhodamin 123 war proportional zu den erzeugten reaktiven Sauerstoffspezies.

Nach einer 10-minütigen Inkubation bei 37 °C wurde das erste Aliquot mit 10 µl PBS behandelt. Das zweite Aliquot war mit 10 µl Tumornekrosefaktor (TNF- α , Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte, Deutschland; 1 µg/ml in PBS) und 10 µl N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP, F3506, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA; 1 mM in Dimethylformamid, DMF) versetzt. Das dritte Aliquot erhielt 10 µl PMA (1 mM in DMF). Nach einer weiteren 20-minütigen Inkubation bei 37 °C wurden 10 µl Propidiumiodid (PI, P1304MP Invitrogen, 1 mg/ml) hinzugefügt.

Abgestorbene Zellen wurden anhand der erhöhten PI-Fluoreszenz (>600 nm) und des Fehlens einer Esteraseaktivität, sichtbar als ausbleibende SNARF-1-vermittelte orange Fluoreszenz, identifiziert. In vitalen Leukozyten erfolgte die Spaltung des nicht fluoreszierenden Esters SNARF1/AM durch Esterasen zu SNARF1. Nur vitale Zellen (PI-negativ) gelangten in die Auswahl, um ROS-produzierende Zellen (DHR-positiv) zu erkennen (Protokoll siehe Anhang 6.4.3). Nach PI-Zugabe musste sofort die FACS-Messung durchgeführt werden.

Es wurde ein FACS Calibur™ Durchflusszytometer (BD corporate, Franklin Lakes, NJ, USA) und CellQuest Pro Software™ (Version 5.2, BD corporate, Franklin Lakes, NJ, USA) verwendet. Die Identifikation der Granulozyten erfolgte über ihr charakteristisches Vorwärts- (FSC) und Seitenstreulichtmuster (SSC) sowie ihre Dihydrorhodamin/SNARF-1-Fluoreszenz. Der Aktivierungsstatus ließ sich anhand eines Dotplots (CD11b-PE vs. CD62L-FITC) bestimmen. Nicht stimulierte Granulozyten wurden mit einem positiven Signal für CD62L und einem moderaten Signal für CD11b identifiziert. Nach der Aktivierung mit TNF/fMLP exprimierte die Mehrheit der PMNs ein höheres Signal für CD11b und CD62L war reduziert.

Für die Expression von PMNs-Aktivierungsmarkern wurden 100 µl des Überstandes in 2 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS-Ca/Mg) verdünnt und mit 250x g 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Resuspension des Zellpellets erfolgte in 100 µl PBS-Ca/Mg mit jeweils 5 µl monoklonalen primären Antikörpern (antihuman CD62L-FITC, antihuman CD11b-PE; 304804/301306, Biolegend, San Diego, USA), gefolgt von einer 15-minütigen Inkubation bei 4 °C im Dunkeln. Nach der Zugabe von 2 ml PB-Ca/Mg und einer fünfminütigen Zentrifugation (290x g, Raumtemperatur) erfolgte die Resuspension des Zellpellets in 200 µl PBS, gefolgt von einer Behandlung mit 1 ml BD-lysis Reagent (1:10, BecktonDickenson Biosciences, Heidelberg, Deutschland) zur Fixierung (10 Minuten, Raumtemperatur, Dunkelheit).

Als Positivkontrolle wurden isolierte Granulozyten mit TNF/fMLP (wie für den oxidativen Burst beschrieben) stimuliert und mit den Antikörpern gefärbt. Die Negativkontrolle bestand aus nicht stimulierten Zellen.

2.9.3 Analyse der adhärennten DAPI-gefärbten Kernmorphologien

Die verschiedenen ECMO-Gasfaser-Testmaterialien ohne und mit ihren unterschiedlichen antithrombotischen Oberflächenbeschichtungen wurden hinsichtlich der Anzahl der adhärrierenden PMNs und der Quantität der morphologisch netotischen Veränderungen bewertet. Die Aufnahmen erfolgten mit einem Fluoreszenzmikroskop (BZ-8100E, Keyence GmbH, Neu-Isenburg,

Deutschland), ausgestattet mit 10x- und 20x-PlanApo-Objektiven (Nikon, Tokio, Japan), bei Vergrößerungen von 100-fach und 200-fach. Dabei ergab sich beispielsweise die 100-fache finale Vergrößerung aus dem 10-fachen Zoomfaktor des Objektivs, multipliziert mit dem 10-fachen Zoomfaktor des Okulars des Fluoreszenzmikroskops.

Für die Verarbeitung und Analyse der Fluoreszenzmikroskopbilder kam ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA), eine frei zugängliche wissenschaftliche Bildanalysesoftware, zum Einsatz. Dabei erfolgte nach dem Import der DAPI-gefärbten Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen in 100-facher Vergrößerung die Umwandlung der Bildinformation in eine 8-Bit-Graustufe. Anschließend wurde für alle Fluoreszenzmikroskopbilder die Nachweisgrenze sowie der Untersuchungsbereich (ROI = Region of Interest) definiert und die automatische Zellzählung durchgeführt (Abbildung 8).

Die Bestimmung der Zellanzahl adhärierter PMNs erfolgte für jede Materialprobe in einem Detektionsbereich von 0,51 mm² bei 100-facher Vergrößerung. Zur Validierung der automatisierten Zellzählung wurde eine Vorstudie durchgeführt, um zu ermitteln, ob zwischen den automatisch bestimmten Zellzahlen und den von einem erfahrenen Spezialisten manuell ermittelten Zellzahlen ein relevanter Unterschied besteht. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p = 0,919$) zwischen der manuellen und der automatischen Auszählung (Abbildung 9). Nach Bestätigung der Zuverlässigkeit der automatischen Auszählung dienten zehn zufällig ausgewählte Fluoreszenzmikroskopbilder jeder Gasfasermaterialprobe ohne stabilisierende Haltefäden (Kett-Fäden) zur Auswertung der auf den Gasfaserproben adhärierenden PMNs. Die Analyse wurde auf alle sechs Probanden ausgeweitet, wodurch für jede der fünf unterschiedlichen Oberflächenbeschichtungen jeweils 60 Bilder entstanden. Insgesamt wurden somit 300 mikroskopische Aufnahmen für die Evaluierung der adhärierenden PMNs untersucht.

Zur exakten Beurteilung der morphologischen Veränderungen der PMNs (NET-Analyse) kamen weitere 180 mikroskopische Bilder bei 200-facher anstelle von

100-facher Vergrößerung zur Auswertung. Von jeder Materialprobe der sechs Probanden wurden fünf nicht überlappende Fluoreszenzmikroskopaufnahmen ohne Kettfäden in die Auswertung einbezogen. Dies galt sowohl für die vier antithrombotischen Beschichtungen als auch für die unbeschichtete PMP Oberfläche. Zur Bestimmung des Verhältnisses der netotisch veränderten Zellkerne zu allen Kernen erfolgte die manuelle Zählung der PMN-Zellkerne in einem Analysebereich (ROI) von 0,13 mm² bei 200-facher Vergrößerung.

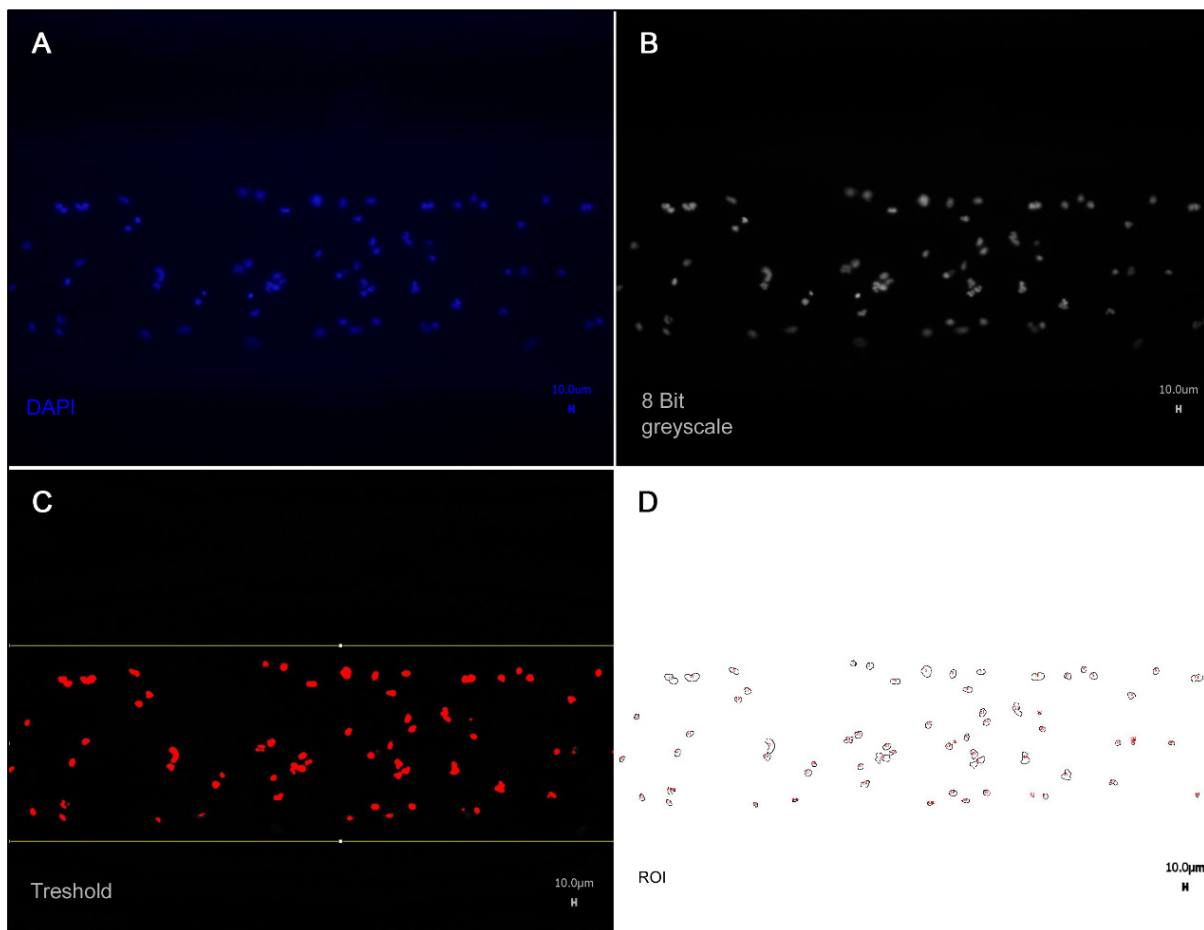


Abbildung 8: Zeitlicher Ablauf der automatischen Zellzählfunktion ImageJ. Import des DAPI-gefärbten Originalbildes in 100-facher Vergrößerung (A) und Umwandlung der Bildinformation in eine 8-Bit-Graustufe (B). Nach der Definition der Nachweisgrenze (C) und der Region of Interest wurde die automatische Zellzählung (D) durchgeführt [46].

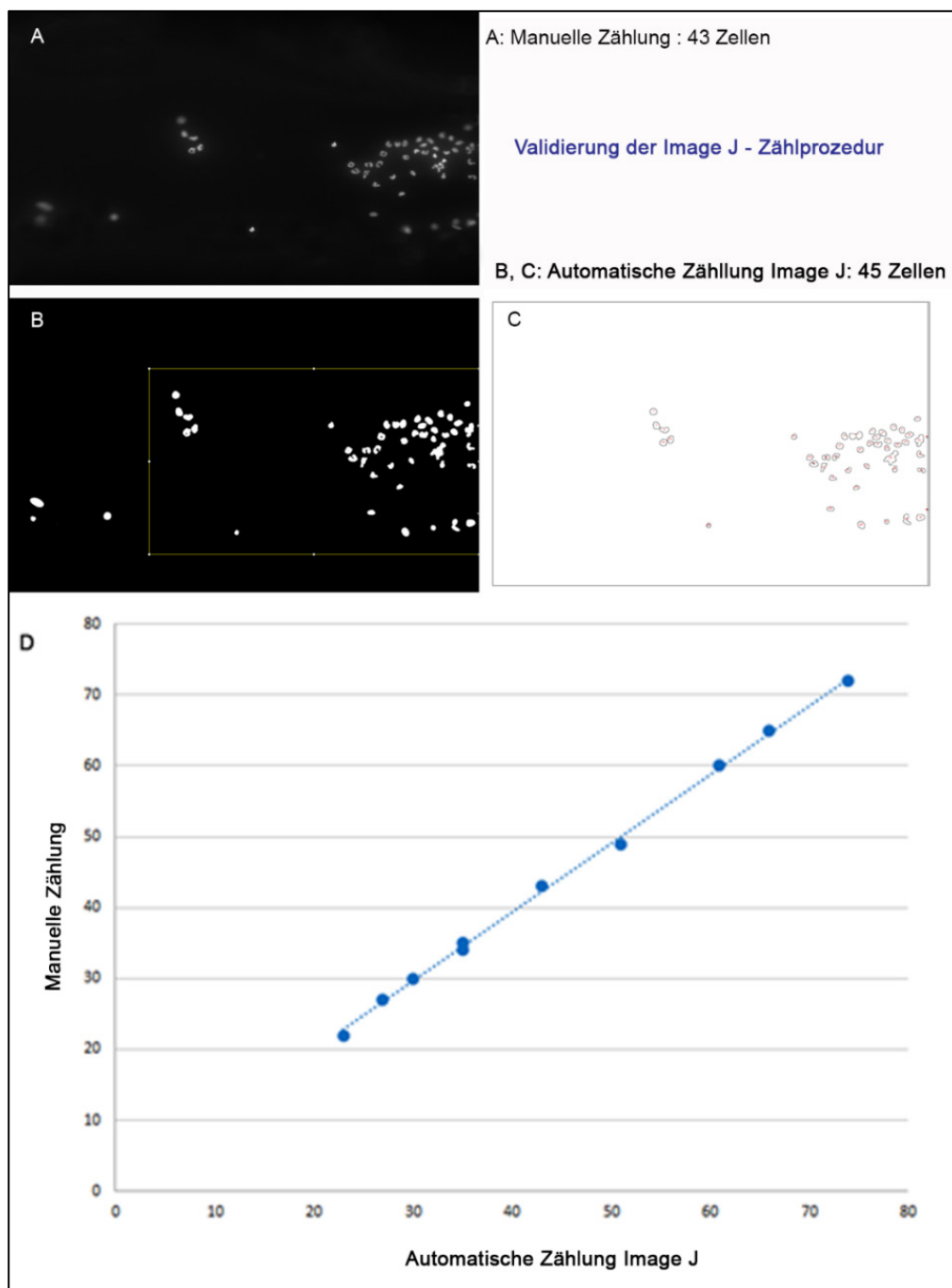


Abbildung 9: Beispiel für die Validierung der automatischen Zellzählungsfunktion. Zu Validierungszwecken wurde eine Vorstudie durchgeführt, um festzustellen, ob ein signifikanter Unterschied zwischen den automatisch ermittelten Zellzahlen (B, C) und den von einem erfahrenen Spezialisten analysierten (A) besteht. Es wurde kein signifikanter Unterschied ($p = 0,919$) zwischen der manuellen und der automatischen Zählung festgestellt. (B) zeigt die durch den gelben Kasten dargestellte Region of interest in ImageJ und die daraus resultierende Erkennung und Zählung der PMNs. Korrelation zwischen manuell gezählten und automatisch ermittelten Zellkernen (D) [46].

2.10 PMN-Adhäsion auf Gasfasern innerhalb der dynamischen Versuche

Nach der statischen Untersuchung der Auswirkungen des Basismaterials PMP sowie der verschiedenen antithrombotischen Beschichtungen auf PMNs von gesunden Probanden erfolgte im nächsten Schritt die Evaluation der Scherkräfte auf PMNs unter definierten dynamischen Bedingungen im Perfusionsmodell. Deshalb kam ein ex vivo Perfusionsmodell mit integrierter ECMO-Gasfaser zum Einsatz, das eigens hierfür konzipiert war.

2.10.1 Messaufbau des ex vivo Perfusionsmodells

Zur Visualisierung von potenziellen Auswirkungen einer Scherbelastung der PMNs in klinischen Membranoxygentoren wurde ein miniaturisiertes ECMO-Perfusionsmodell (Abbildung 10 A) konzipiert, das die Echtzeitbeobachtung (Live cell imaging) von neutrophilen Granulozyten beim Kontakt mit ECMO-Gasfasern in Kanal-Objektträgern ermöglichte. Die Analyse beschränkte sich ausschließlich auf ECMO-Gasfasern. Die verwendeten Strömungskammer-Objektträger (80178 Sicky-Slide I 0.4 Luer, ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland) verfügten über eine effektive Kammerhöhe von 400 µm, sodass Wärmetauscherfasern (z. B. 3M Membrana HEXPET™, Capillary, 3M GmbH, Wuppertal, Deutschland im Hilite 7000 LT) mit einem Außendurchmesser von 790 µm nicht integriert werden konnten. Als Antrieb diente ein pneumatisches Pumpensystem (10902, ibidi Pump System, ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland), welches softwaregesteuert einen nahezu kontinuierlichen Volumenfluss realisierte. Das pneumatische Pumpensystem (Fluidic Unit, 10903, ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland) mit den zwei dazugehörigen 10 ml Reservoirs wurde in einem Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ (Thermo Scientific™ Midi 40 Inkubator, Thermo Fischer, Darmstadt, Deutschland) positioniert und mit kurzen Verbindungsleitungen mit einem Innendurchmesser von 1,6 mm (10964, ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland) mit dem Strömungskammer-Objektträger verbunden. Die Strömungskammern bestanden aus zwei Bestandteilen: dem bodenlosen Kanalobjektträger (Kanalabmessungen: 0,4 mm x 50 mm x 5 mm) und einem Polymer-Deckglas (10812, ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland). Vor dem Verkleben der beiden sterilen Komponenten wurde in den bodenlosen

Kanalobjektträger eine einzelne PMP-Oxygenator-Gasfaser mit dem Durchmesser von 380 μm senkrecht zur Strömungsrichtung fixiert (Abbildung 10 C). Anschließend erfolgte die Befestigung des Strömungskammer-Objektträgers mit integrierter Oxygenator-Gasfaserprobe im Keyence-Fluoreszenzmikroskop.

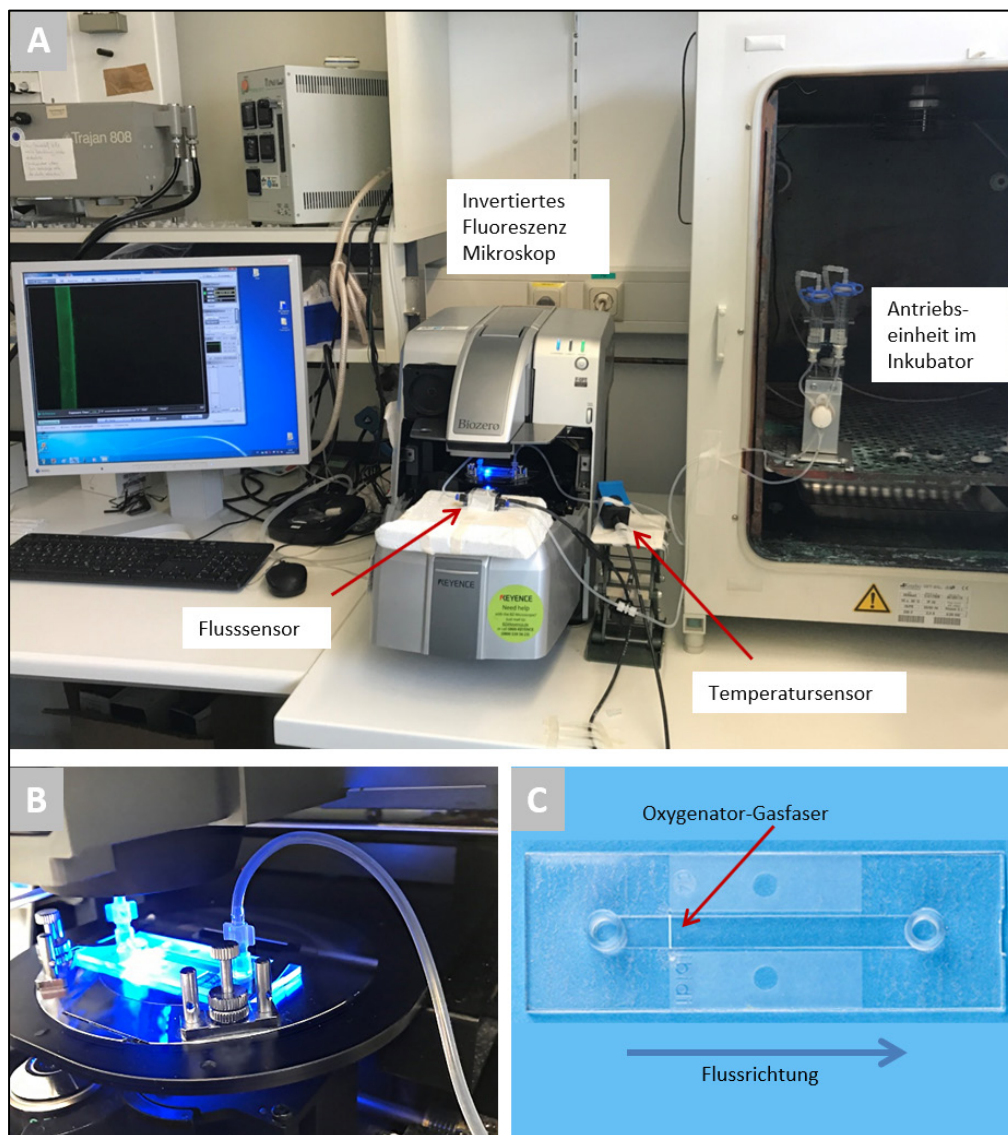


Abbildung 10: Messaufbau des ex vivo Perfusionsmodells. (A) Versuchsaufbau mit Antriebseinheit, Temperatursensor, Durchflusssensor und invertierenden Mikroskop. (B) Strömungskammer-Objektträger im inversen Mikroskop. (C) Membranoxygenator-Gasfaser im Strömungskammer-Objektträger [Eigene Aufnahmen].

Die Temperatur des Schlauchsystems außerhalb des Inkubators und des inversen Fluoreszenzmikroskops wurde mittels eines im Schlauchsystem integrierten Temperatursensors (CO₂-1 SMA PreSens Precision Sensing GmbH, Regensburg, Deutschland) überwacht und während der Versuche im Bereich von 37 °C gehalten. Zur Aufrechterhaltung dieser Temperatur diente ein Heizlüfter, der in variablem Abstand auf die Messapparatur gerichtet war (Abbildung 11).

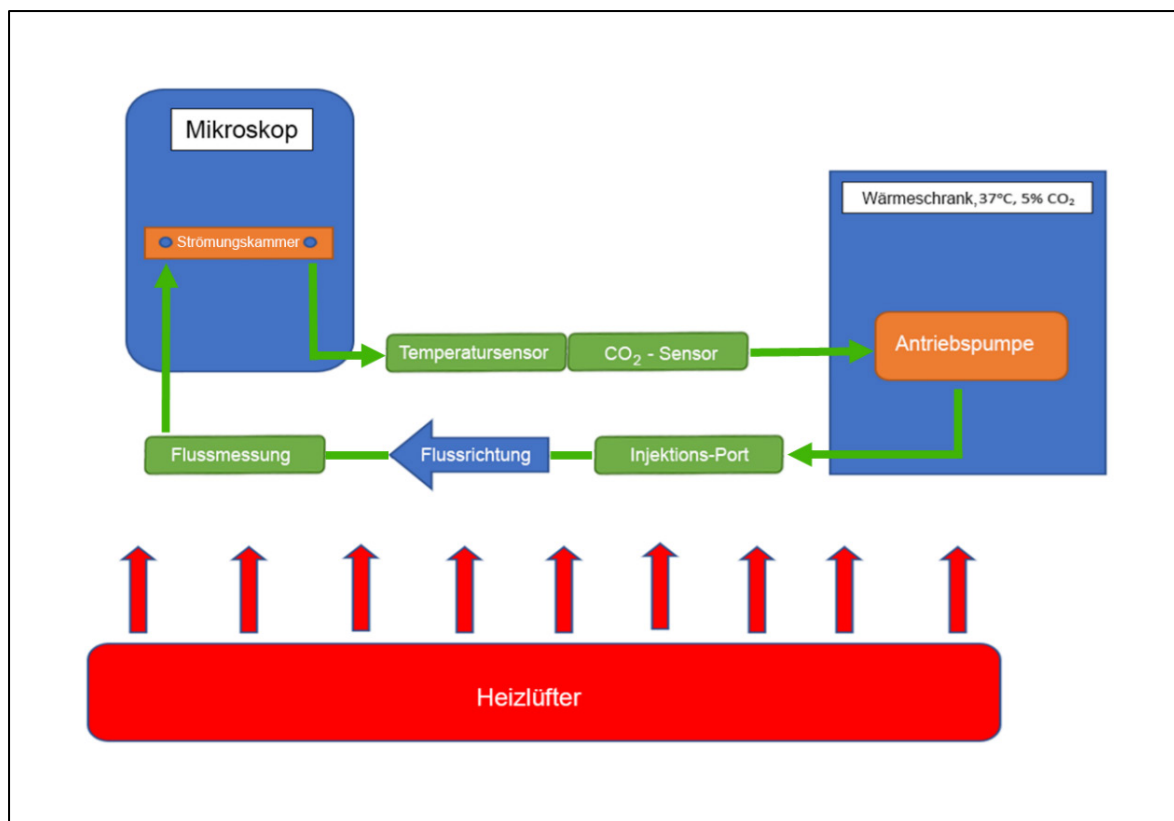


Abbildung 11: Schematische Darstellung des ex vivo Perfusionsmodells.

Die PMNs, die in der initialen Phase der Experimente über das Injektionsport injiziert wurden, strömten angetrieben von der Antriebspumpe im Wärmeschrank zunächst über den Fluss-Sensor zur Strömungsmesskammer im Fluoreszenzmikroskop. Von dort gelangten sie weiter zum Temperatur- und CO₂-Sensor und anschließend zurück zur Antriebspumpe. Um messtechnische Einflüsse zu reduzieren, wurde der Injektionsport aus dem Perfusionsmodell entfernt. Fortan erfolgte die Zugabe der isolierten PMNs über das linke Reservoir der Ibidi-Antriebspumpe. Nur diese Versuche gingen in die finale Auswertung ein. Die Distanz des Heizlüfters zur Messapparatur wurde zur Aufrechterhaltung einer konstanten Temperatur variiert.

Zur Kontrolle der Messparameter „Kohlenstoffdioxid-Gehalt“ und „Strömungsgeschwindigkeit“ in den Schläuchen der Versuchsanordnung außerhalb des Inkubators wurden ein CO₂-Messsensor (CO₂-1 SMA, PreSens, Precision Sensing GmbH, Regensburg, Deutschland) und ein Durchflusssensor (SLS-1500 Liquid Flow Meter, Sensirion, Stäfa, Schweiz) in die Verbindungsleitungen integriert. Eine optische Polymerfaser übertrug das Messsignal zum CO₂-Sensor und leitete die Antwort zurück zum Messgerät.

2.10.2 Einbringen der ECMO-Gasfasern in den Kanal-Objektträger

Für die Durchführung eines einzelnen Versuches wurden zwischen einem Strömungskammer-Objektträger und einem Glasträger (10813, Coverslips for sticky-slides, ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland) jeweils eine Gasfaser in einer Länge von 5,5 mm quer zur Strömungsrichtung im Kanal-Objektträger fixiert (Abbildung 10 C). Die Kanalhöhe der Kanal-Objektträger betrug 0,4 mm. Nach einer Pressung mit einer Hightech-Hebelzange (KliKlamp KLI, BESSEY Tool GmbH & Co. KG, Bietigheim-Bissingen, Deutschland) und einer Trocknungszeit von 12 Stunden bei 37 °C im Wärmeschrank waren die Kanal-Objektträger mit den Versuchsgasfasern druckstabil, so dass es auch bei einem maximalen Volumenstrom von 40 ml/min in der Versuchsanordnung zu keinen Leckagen vor allem im Fluoreszenzmikroskop kam.

Der gefüllte Kanal-Objektträger ohne Gasfaser zeigt entsprechend der Herstellerangaben beim Durchströmen mit einem Zellkulturmedium ein laminares parabelförmiges Strömungsprofil. Aufgrund der Reibung an den Wänden und zwischen den Schichten der Flüssigkeit ist die Strömungsgeschwindigkeit in der Mitte des Kanals am höchsten. Aus der räumlichen Veränderung der Strömungsgeschwindigkeiten ergibt sich die Scherrate, die beschreibt, wie sich benachbarte Schichten einer Flüssigkeit relativ zueinander bewegen (Abbildung 12).

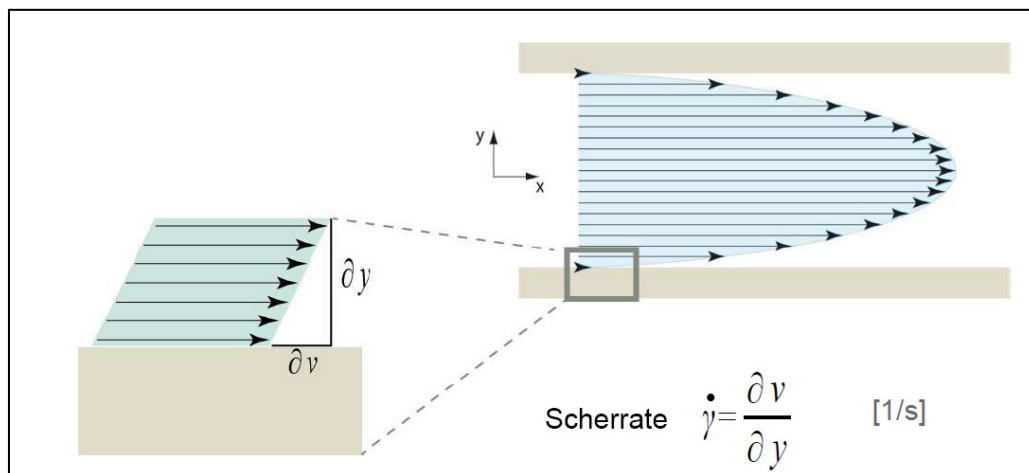


Abbildung 12: Das Strömungsprofil der Kanal-Objektträger ohne Gasfaser. Die Scherrate charakterisiert die relative Verschiebung benachbarter Flüssigkeitsschichten infolge eines Geschwindigkeitsgefälles innerhalb der Strömung. [Mit freundlicher Genehmigung der ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland].

2.10.3 Numerische Strömungsberechnung einer Gasfaser

Die vom Labor für Biofluidmechanik der Ostbayerischen Technischen Hochschule Regensburg realisierten hochauflösenden numerischen Strömungsberechnungen lieferten detaillierte Informationen zum Strömungsfeld (Abbildung 13) im Umfeld der eingebrachten Gasfasern im Kanal-Objektträger. Diese ermöglicht die Korrelation der herrschenden Geschwindigkeitsamplituden und der Dehnraten mit den experimentellen Ergebnissen. Abbildung 13 zeigt die Geschwindigkeitsamplituden und Dehnungsraten in zehn Ebenen über die Breite des Kanal-Objektträgers (Strömungskammer).

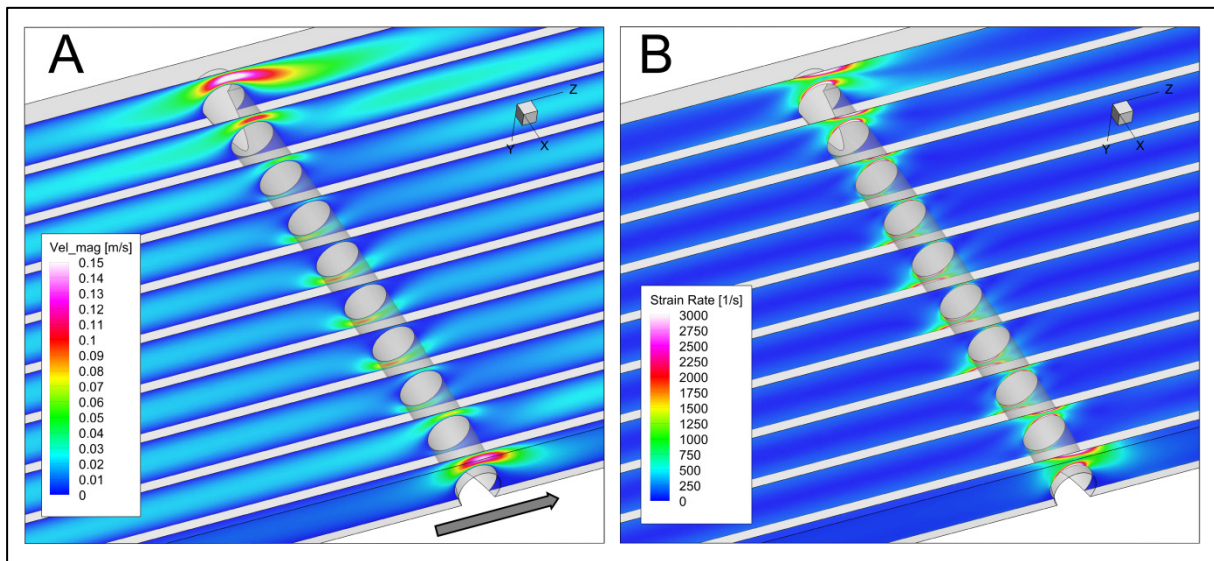


Abbildung 13: Konturdiagramme Geschwindigkeitsamplitude (A) und Dehnrate (B) im Kanal-Objektträger mit Gasfaser. Die höchsten Geschwindigkeitsamplituden und Dehnraten (Strain Rate) finden sich oberhalb der eingebrachten Gasfaser im Bereich der Seitenwände des Kanal-Objektträgers [Mit freundlicher Genehmigung des Labors für Biofluidmechanik der Ostbayerischen Technischen Hochschule Regensburg].

In den oberen und unteren Ecken nahe den Seitenwänden der Strömungskammer finden sich mit 0,15 m/s die maximal erfassten Geschwindigkeitsamplituden. Die höchsten Dehnraten liegen bei 3000 1/s in einem kleinen Bereich nahe der Seitenwand des Kanal-Objektträgers oberhalb der eingebrachten Gasfaser. Im mittleren Abschnitt der Gasfaser sind die Geschwindigkeitsamplituden und Dehnraten geringer. In einfachen Strömungen wie z.B. der Couette-Strömung, also der laminaren Bewegung eines Fluids zwischen zwei parallel verschobenen Platten sind Dehnrate und Scherrate direkt vergleichbar, da die Scherraten (Shear rate) direkt eine Komponente des Dehnraten Tensors, der sich auf die Scherverzerrung eines Materials bezieht, ist. Für Geräte wie Blutpumpen oder künstliche Herzklappen liegen die Scherraten im Bereich von $\dot{\gamma} = 1800$ bis 110.000 1/s (bei 400 ms) [56].

2.10.4 Durchführung der dynamischen Versuche

In ein Perfusionsset (10964, Perfusionsset Yellow-and-Green, ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland) mit einer Schlauchlänge von 50 cm und einem inneren Schlauchdurchmesser von 1,6 mm wurden die CO₂-, Fluss- und Temperatursensoren integriert. Zur gründlichen Reinigung und Benetzung des Systems erfolgte ein fünfmaliges Spülen mit vollentsalztem Wasser (VE). Anschließend wurde ein vorbereiteter Strömungskammer-Objektträger mit einer quer zur Flussrichtung integrierten Gasfaser in das Perfusionsmodell implementiert. Nach der Positionierung des Strömungskammer-Objektträgers im Fluoreszenzmikroskop fand eine erneute Spülung mit vollentsalztem Wasser zur Entfernung von Luftblasen statt. Anschließend wurde zur Kontrolle der Dichtigkeit des selbsthergestellten Strömungskammer-Objektträgers eine Perfusion mit einem Volumenstrom von 40 ml/min im Perfusionsmodell durchgeführt. Dabei befand sich in den beiden 10 ml Perfusionsreservoirs jeweils 3 ml VE-Wasser. Insgesamt betrug das zirkulierende Volumen ohne Granulozytensuspension im Perfusionsmodell 19,6 ml. Nach dem 10-minütigen Perfundieren mit VE-Wasser erfolgte der Mediumwechsel auf gefiltertes RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute Medium, Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte, Deutschland). Das RPMI 1640 Medium beinhaltet das Reduktionsmittel Glutathion, eine hohe Konzentration der Vitamine Biotin, Vitamin B₈, Vitamin B₁₂ sowie Choline und Paraaminobenzoessäure (PABA). Durch den mit 2,0 g/l im RPMI 1640 Medium verwendeten Natriumbikarbonat-Puffer ist eine CO₂ Umgebungsgehalt von 5 % zur Aufrechterhaltung des physiologischen pH-Wertes notwendig.

Das Perfusionsmodell wurde durch den Einsatz eines Heizlüfters auf eine Temperatur von 37 °C innerhalb und außerhalb des Wärmeschrankes kalibriert. Parallel erfolgte zur Erhaltung eines unidirektionalen Flusses von 5 ml / min die Justierung der beiden Ventile des Antriebes auf eine Umschaltdauer von 5 s.

Bei konstanten Versuchsbedingungen erfolgte zur Visualisierung von zellfreier DNA oder von Zellkernen der beschädigten PMNs das Einbringen des grün

fluoreszierenden Kernfarbstoff Sytox™ Green (Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte, Deutschland) in einer Konzentration von 0,01 µM in das rechte Reservoir der Fluidic Unit. Sytox™ Green färbt zellfreie DNA und nach der Passage, der für tote Zellen charakteristischen beschädigten Membranen, auch DNA in Zellkernen. Zur Realisierung einer gleichmäßigen Verteilung des Kernfarbstoffes Sytox™ Green wurde im ex vivo Perfusionsmodell 10 Minuten mit 5 ml/min perfundiert.

Die Zugabe der 9 Millionen isolierten PMNs in die Messvorrichtung erfolgte erst nach vollständigem Durchmischen des Kernfarbstoffes Sytox™ Green. Zur Reduktion möglicher messtechnischer Störeinflüsse wurde der zu Beginn genutzte Injektionsport aus dem Perfusionsmodell eliminiert. Die Zugabe der isolierten PMNs erfolgte anschließend über das linke Reservoir der ibidi-Antriebspumpe. In die abschließende Auswertung wurden ausschließlich Versuche ohne Injektionsport einbezogen.

Mit einer Fluoreszenzmikroskop-Kamera (Biozero BZ8100E, Keyence GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland), einem 4x PlanApo-Objektiv (Nikon, Tokio, Japan), einer 120-W-Quecksilberdampflampe als Lichtquelle sowie der BZ-Beobachtungssoftware (Keyence GmbH, Neu-Isenburg Deutschland) wurden nach dem Einsetzen der PMNs alle 9 Sekunden ein Fluoreszenzbild während der gesamten Versuchsdauer von 105 min aufgenommen. Die Belichtungszeit betrug 1/1,1 s. Der eingesetzte BZ-Filter GFP-BP (Keyence GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland) gewährleistete eine 470 nm Anregung, eine dichroitische Spiegelwellenlänge von 495 nm und eine 525 nm Emission.

Für alle 25 dynamischen Versuche, bestehend aus jeweils fünf Messungen pro antithrombotischer Oberflächenbeschichtung von fünf Probanden, kam jeweils ein neues Perfusionssystem mit Strömungskammer-Objektträger zum Einsatz. Nach jedem Experiment wurden die Messsensoren mit einer 1:1-Lösung aus CASY Clean (OMNI Life Science, Bremen, Deutschland) und VE-Wasser gründlich gereinigt.

2.10.5 Messtechnische Verbesserungen im ex vivo Perfusionsmodells

Nachdem eine Vielzahl von Versuchen aufgrund von Luftblasen im Perfusionsmodell abgebrochen werden mussten, konnte als Ursache der im Perfusionsmodell integrierte Injektionsport (In-line Luer Injection Port, 10820, ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland) identifiziert werden. Denn trotz größter Sorgfalt bei der Entlüftung der mit 9 Millionen isolierten PMNs gefüllten Mikroliterspritze (Hamilton™, Hamiltonspritze 1750, Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) traten beim Injizieren wiederholt Lufteinschlüsse auf (Abbildung 14). Diese minimalen Luftblasen verfrachten sich anfänglich in der Messapparatur und gelangten im Verlauf des Versuchs zufällig in die Versuchsanordnung. Als Konsequenz zeigten sich Luftblasen in der Strömungskammer. Da eine Aktivierung der PMNs durch den Luftkontakt nicht auszuschließen war, wurden die entsprechenden Versuche zeitnah abgebrochen und nicht gewertet. Neben einer potenziellen Aktivierung der PMNs musste auch von einer veränderten Strömung in der Strömungskammer durch eine eingeschlossene Luftblase ausgegangen werden.

Zur Reduktion dieser messtechnischen Störeinflüsse wurde der Injektionsport aus dem Perfusionsmodell entfernt. Die Applikation der isolierten PMNs erfolgte anschließend über das linke Reservoir der Ibidi-Antriebspumpe, die einen präzisen und gleichmäßigen Zelltransfer gewährleistete. In die finale Auswertung wurden ausschließlich diese Experimente einbezogen.

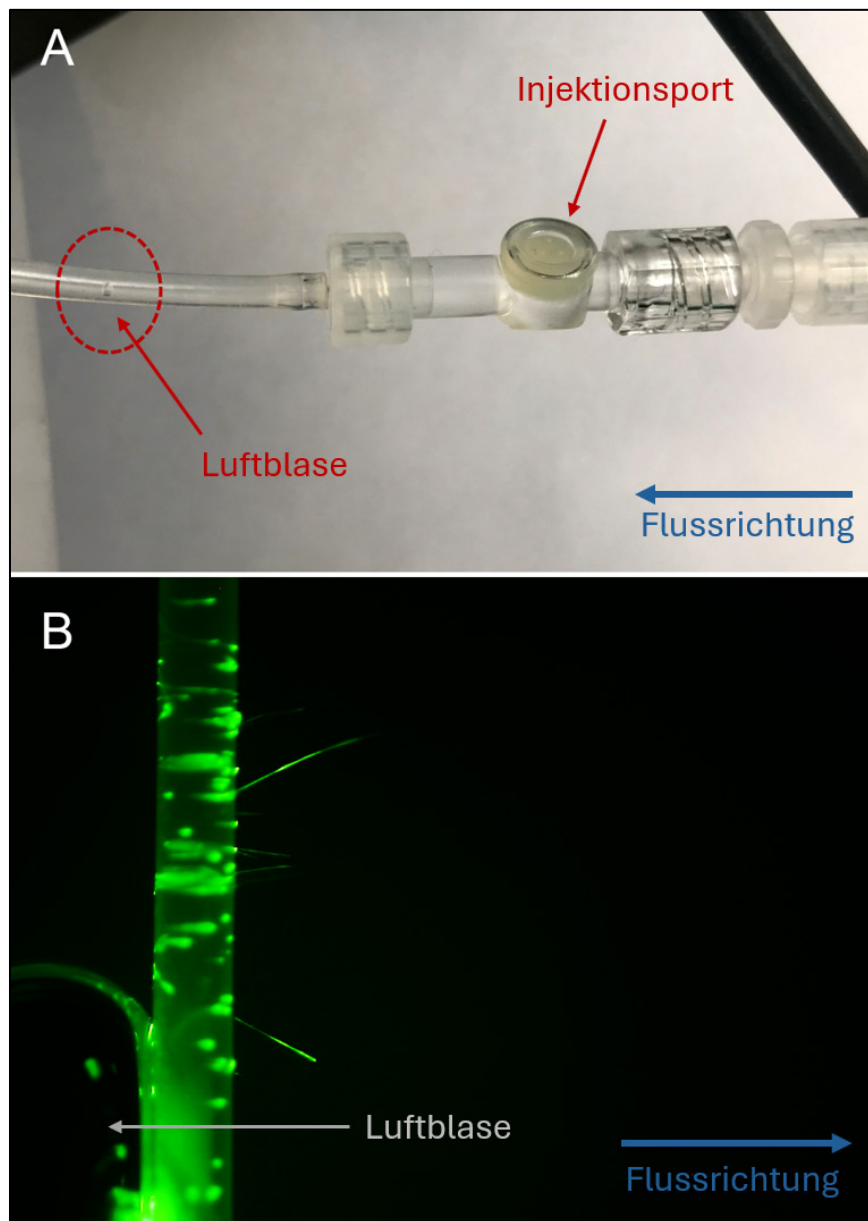


Abbildung 14: Die Probeneinbringung über den Injektionsport verursachte häufig Luftblasen im Schlauchsystem (A) und vor der Gasfaser in der Strömungskammer (B). Grüne Strukturen auf der Gasfaser zeigen DNA-Ablagerungen von geschädigten PMNs.

2.10.6 Auswertestrategie dynamische Versuche

Die durch Sytox™ Green grün fluoreszierenden DNA-Anlagerungen erscheinen auf der Gasfaseroberfläche (Abbildung 15, definiert als „Bereich Gasfaser“) und in Strömungsrichtung neben der Gasfaser (Abbildung 15, definiert als „Bereich Filamente“). Diese Bereiche wurden in jedem der 700 Bilder eines Versuches identifiziert und die zeitabhängige Fläche in mm² der fluoreszierenden DNA-Anlagerungen ausgewertet.

Bedingt durch die vierfache Vergrößerung des Objektives (4x PlanApo-Objektiv, Nikon, Tokio, Japan) im Keyence-Fluoreszenzmikroskop ließ sich nicht die gesamte Breite von 5,0 mm der Strömungskammer visualisieren, sondern lediglich ein Bereich von 3,3 mm. Dabei wurde darauf geachtet, dass jeweils 1,65 mm von der Mitte der Gasfaser in beide Richtungen zur Analyse zur Verfügung stand. Das hatte den entschiedenen Vorteil, dass sich potenzielle Auswirkungen von Strömungsveränderungen durch Klebereste am Ende der Gasfaser in der Strömungskammer nicht in den Auswertungen wiederfinden sollten. Somit ergab sich für die eingeklebten Gasfasern eine „Region of Interest“ von 1,25 mm² (Höhe · Breite der Gasfaser in der Strömungskammer; 3,30 mm · 0,38 mm) und für den Bereich der Filamente eine Auswertungsfläche von 10,56 mm² (Höhe · Breite des Bereichs stromabwärts hinter der Gasfaser in der Strömungskammer; 3,30 mm · 3,20 mm).

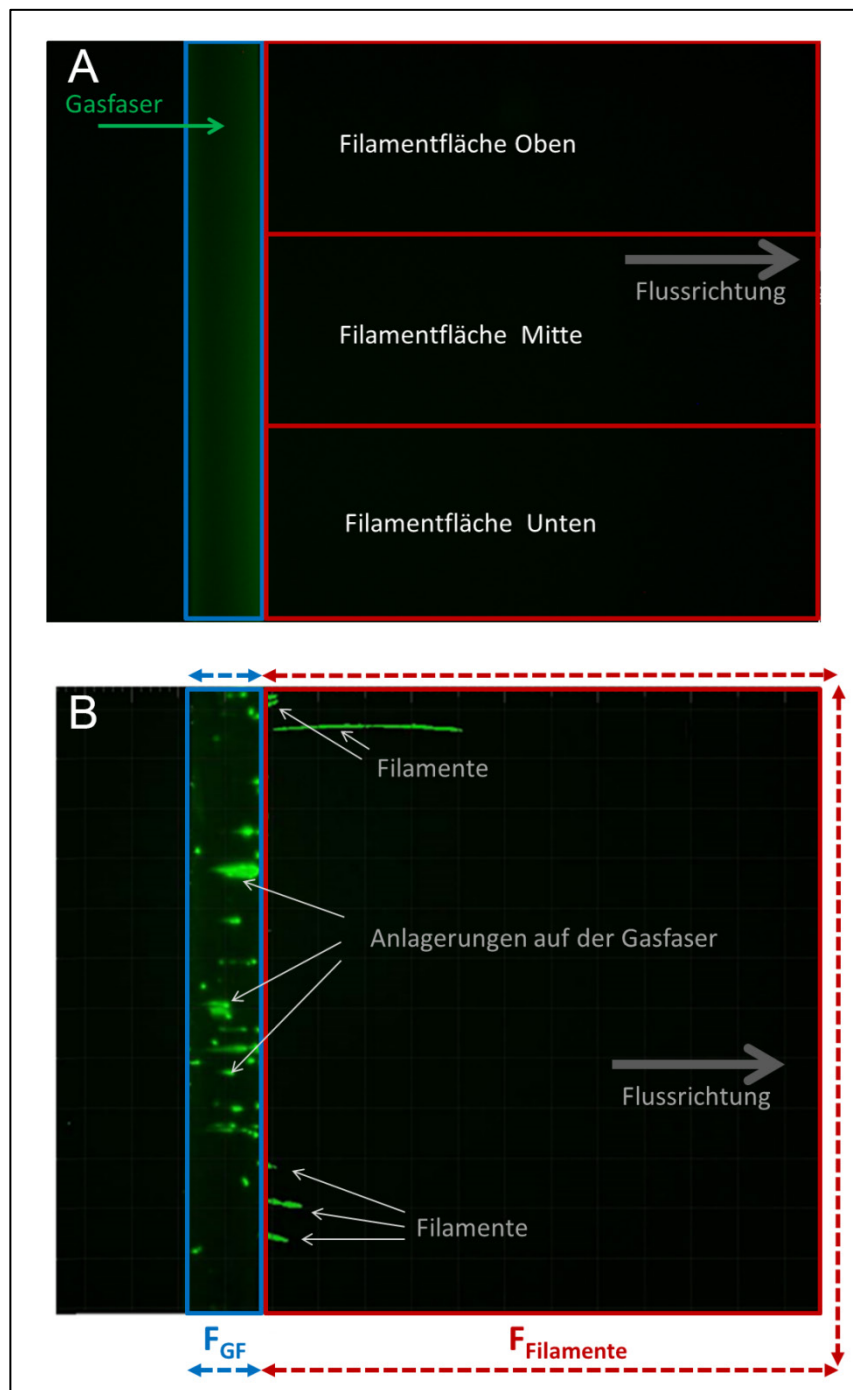


Abbildung 15: (A) Auswertungsbereiche: Filamentflächen oben, in der Mitte und unten. (B) Analysebereich der Gasfaseroberfläche (F_{GF}) und der stromabwärts der Gasfaser liegenden Filamente ($F_{Filamente}$).

Zur automatischen Erkennung und Quantifizierung der strömungsinduzierten Ablagerungen auf der ECMO-Gasfaser und der sichtbaren Filamente wurde ein vom Labor für Biofluidmechanik der Ostbayerischen Technischen Hochschule Regensburg speziell entwickeltes Computerprogram „Netosis detection by BFM“ eingesetzt. Basierend auf der materialinduzierten Autofluoreszenz wurde die Position der Gasfaser in der Strömungskammer erkannt und in der darauffolgenden Auswertung berücksichtigt. Der zugrundeliegende Algorithmus erkannte sowohl die zellulären Anlagerungen auf den Gasfasern als auch die entstandenen Filamente (Abbildung 16). Anschließend wurden die Flächen der Anlagerungen sowie die Filament-Flächen berechnet. Für die korrekte automatische Erkennung der DNA-Anlagerungen war eine Grünfärbung erforderlich.

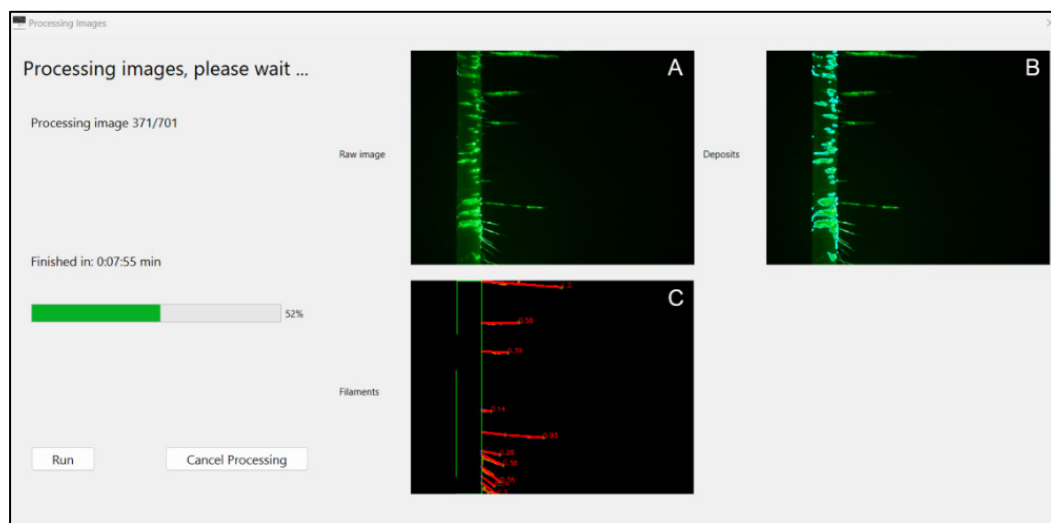


Abbildung 16: NETosis Detection by BFM-Analysesoftware.

Das Verarbeitungsfenster der NETosis Detection by BFM-Analysesoftware zeigt, den Fortschritt der Bildauswertung an. Aus dem mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop aufgenommenen Rohbild (A) werden die detektierten Ablagerungen auf der Gasfaser (B) und Filamente (C) visualisiert. Alle erkannten Ablagerungen werden vom Softwareprogramm für die spätere Analyse aufgezeichnet. Die BFM-Analysesoftware ist über das Labor für Biofluidmechanik der Ostbayerischen Technischen Hochschule Regensburg erhältlich und kann dort für Forschungs- und Analysezwecke bezogen werden.

2.11 Statistische Auswertung

Für die statistischen Auswertungen der statischen und dynamischen NETose-Experimente wurde das Softwareprogramm SigmaPlot 13.0 (Systat, Erkrath, Deutschland) verwendet. Dabei wurde bei mehreren normalverteilten Vergleichsgruppen eine einfaktorielle ANOVA durchgeführt. Die Voraussetzung der Varianzhomogenität wurde mittels Levene-Test geprüft. Die anschließende Post-hoc-Testung erfolgte nach Bonferroni.

Bei mehreren nicht normalverteilten Vergleichsgruppen wurde eine Kruskal-Wallis-ANOVA on Ranks durchgeführt. Zur Post-hoc-Analyse erfolgte ein paarweiser Gruppenvergleich mittels Dunn-Test.

Bei zwei unabhängigen, nicht normalverteilten Stichproben kam entsprechend des Shapiro-Wilk-Tests der Mann-Whitney-U-Test zum Einsatz.

Die statistische Signifikanz wurde entsprechend bei einem $p\text{-Wert} < 0,05$ angenommen.

3. Ergebnisse

Die Ergebnisse der statischen Versuche (Kapitel 3.1) wurden bereits publiziert [46]. Im Rahmen dieser Monographie wurden die Ergebnisse dennoch ausführlich dargestellt. Das Kapitel 3.2 beinhaltet die Resultate der durchgeführten dynamischen Experimente.

3.1 Ergebnisse der statischen NETose-Versuche

Der Zeitraum für eine potenzielle Adhäsion der PMNs auf dem Testmaterial lag bei 30 Minuten. Daraufhin wurden die überzähligen PMNs durch Mediumwechsel aus dem System entfernt. Die Anschließend Bildungsphase von NETs dauerte 3 Stunden um möglichst alle Reaktionen der neutrophilen Granulozyten auf die verschiedenen Oberflächenbeschichtungen zu erfassen. Die Negativkontrolle der Versuche galt als korrekt, wenn nach drei Stunden Versuchsdauer mikroskopisch kaum eine morphologische Veränderung der PMNs auf den Poly-L-Lysin-beschichteten Glasträgern nachweisbar war (Abbildung 17 A). Um die Vitalität und Funktionalität der neutrophilen Granulozyten während der Versuchsreihen zu belegen, mussten diese nach der Aktivierung mit PMA eine ausgeprägte netotische Reaktion (Abbildung 17 B) zeigen. Deshalb galt der Kontakt mit PMA mit ausgeprägten DNA-Ausläufern (DNA-Fasern und Netzstrukturen) als Positivkontrolle.

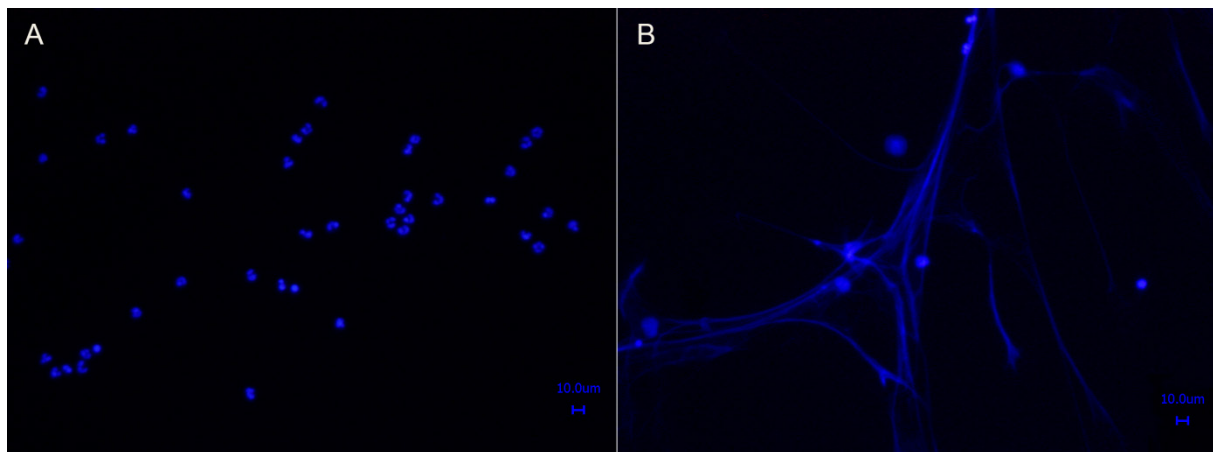


Abbildung 17: Exemplarische Negativ- und Positivkontrollen der statischen PMN-Versuche. Adhärente PMNs nach 3-stündiger Inkubation mit (A) Puffer (negative Kontrolle) und (B) PMA (positive Kontrolle) in 200-facher Vergrößerung. Die durch PMA induzierte NETose-Bildung zeigt unterschiedliche Kernmorphologien (überwiegend vollständig ausgeworfene DNA) [46].

3.1.1 Material-induzierte Zelladhäsion und NET-Induktion

Für die statischen Versuche wurden die Zelldichte und der prozentuale Anteil an netotischen Kernen bestimmt. Unabhängig von der Oberflächenbeschichtung der Gasfasern adhärten PMNs gleichmäßig auf den Oberflächen aller Gasfasern. Die Auswertung der Zelldichte erfolgte bei 100-facher Vergrößerung (Abbildung 18).

Die mediane Zelldichte (IQR) betrug 78 [72-85] Zellkerne pro mm^2 und war unabhängig von den Gasfaserbeschichtungen. Es gab keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,180$) in der Zelldichte der adhären PMNs beim Vergleich von unbeschichteten GF mit allen anderen oberflächenbeschichteten Gasfasern oder auch untereinander (Abbildung 19).

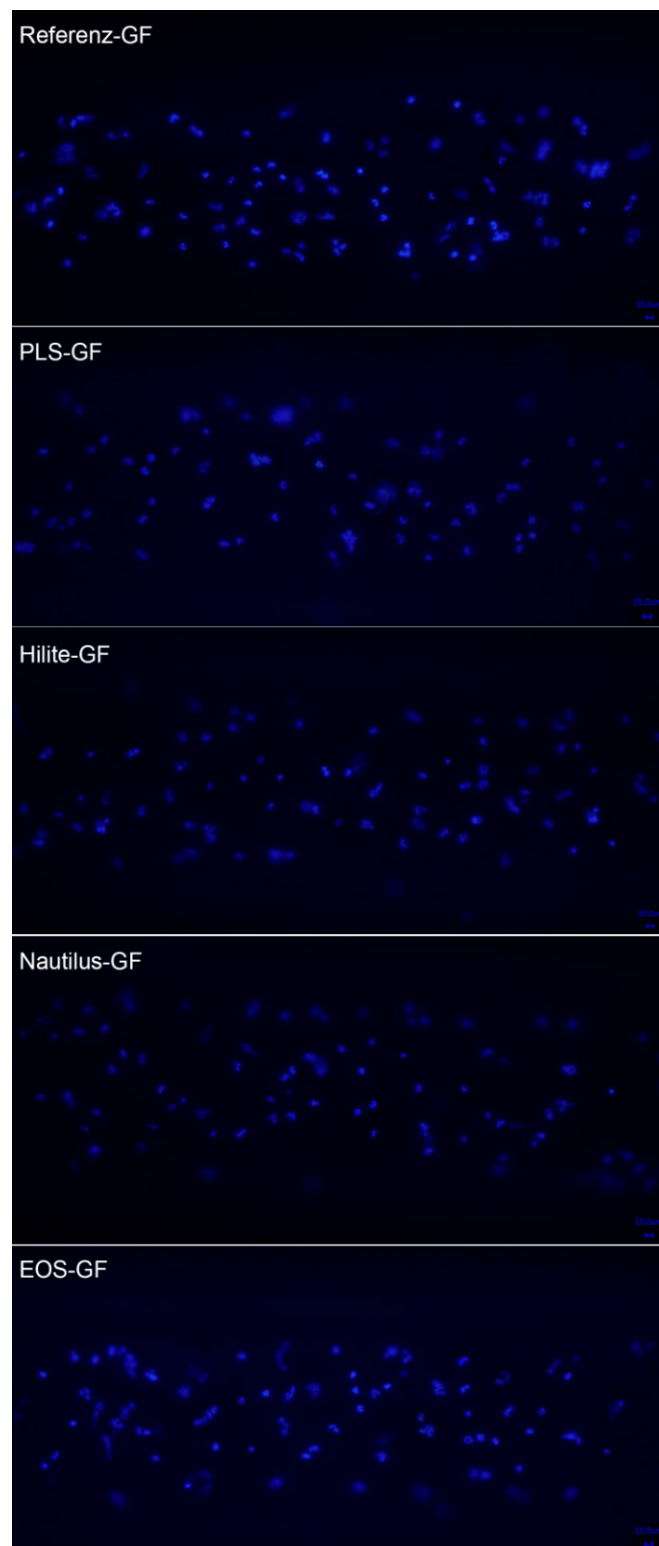


Abbildung 18: Adhärierende PMNs auf der Oberfläche der einzelnen GF-Typen. Die repräsentativen Proben von DAPI-gefärbten PMNs auf einer Gasfaser jedes Membranoxygenator-Typs zeigen in einer 100-fachen Vergrößerung eine gleichmäßige Verteilung der PMNs [Eigene Aufnahmen].

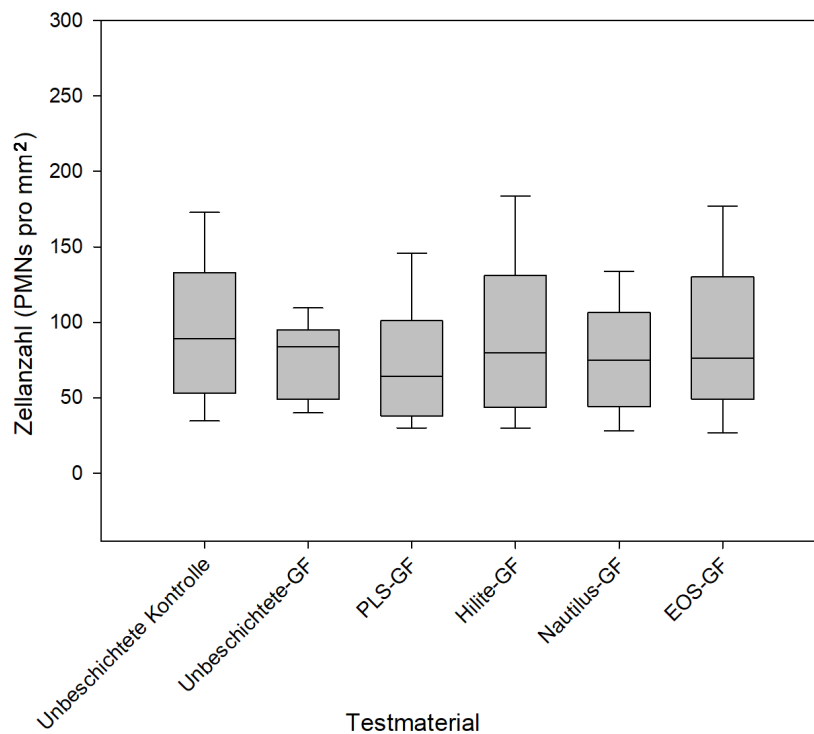


Abbildung 19: Vergleich der PMNs-Adhäsion auf verschiedenen ECMO-Oberflächenbeschichtungen. Aus insgesamt 60 zufällig ausgewählten fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von jeweils 10 Gasfasern pro Materialprobe (fünf Proben) wurde ein Boxplot mit Median, 25/75 (Box) und 5/95 Perzentilen zusammengefasst. Dabei zeigte sich bei den adhären PMNs kein signifikanter Unterschied ($p = 0,180$) in der Zelldichte. Statistik: Kruskal-Wallis-Test (ANOVA on Ranks).

Die Abbildung 20 und Abbildung 21 zeigen repräsentative Aufnahmen verschiedener Kernmorphologien (normale, geschwollene Kerne und ausgeworfene DNA) nach einer 3-stündigen Inkubation von isolierten PMNs der verschiedenen Materialproben in 200-facher Vergrößerung. Der Anteil der netotischen Kernstrukturen war bei den unbeschichteten GF-Proben im Vergleich zu allen oberflächenbeschichteten Gasfasern (Abbildung 22) signifikant (***, $p < 0,001$) höher. Darüber hinaus gab es keinen Unterschied zwischen den beschichteten Materialproben untereinander. Im Gegensatz dazu war der Anteil der netotisch veränderten PMNs auf allen Gasfasern signifikant höher (***, $p < 0,001$) als in der Negativkontrolle mit Poly-L-Lysin-beschichteten Glasoberflächen (Abbildung 22).

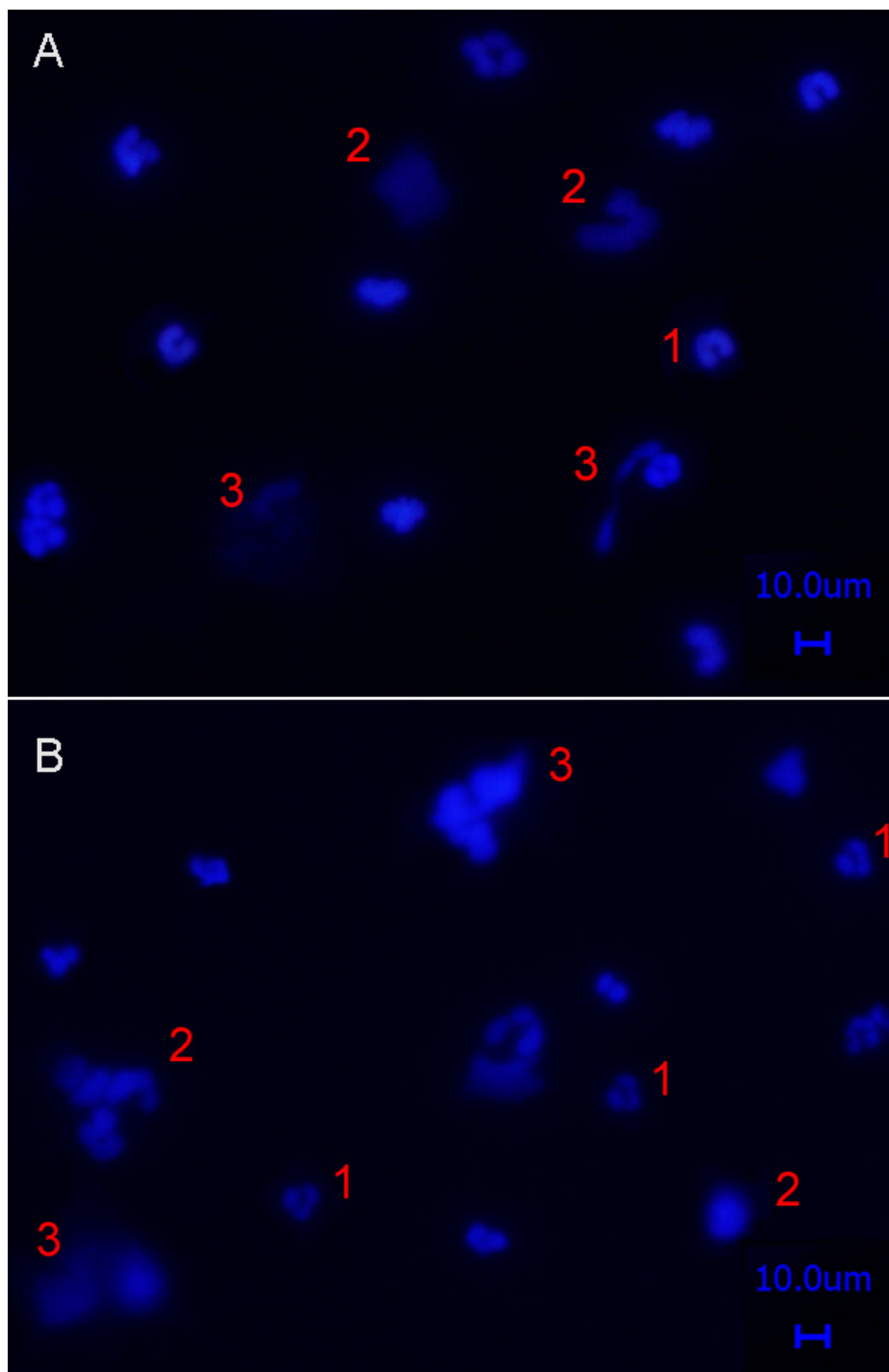


Abbildung 20: Morphologische PMN-Veränderungen auf Gasfasern am Beispiel einer PLS-Gasfaser (A) und unbeschichteten Gasfaser (B). Veränderte PMNs ohne morphologische Veränderungen in 200-facher Vergrößerung (1). Geschwollene neutrophile Granulozyten (2) der Phase II und solche, die kurz vor der Ruptur der Plasmamembran in Phase III standen oder in denen bereits NETose sichtbar ist (3) [46].

Ergänzende Darstellungen morphologischer PMN-Veränderungen auf einer Hilite-Gasfaser (Abbildung 43), einer Nautilus-Gasfaser (Abbildung 44) und einer EOS-Gasfaser (Abbildung 45) finden sich im Anhang in Kapitel 6.3.

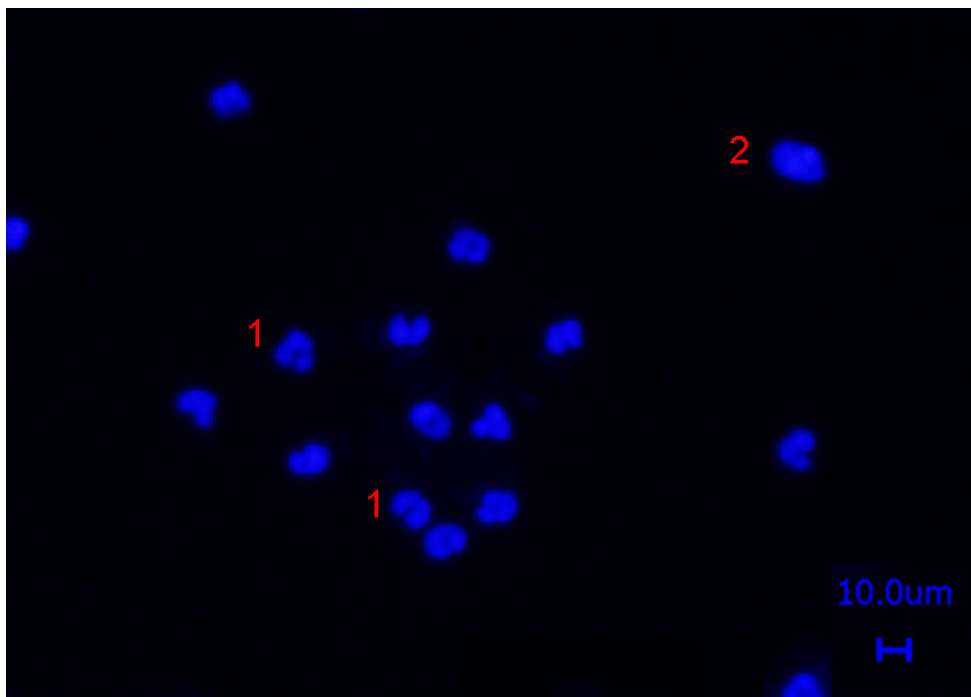


Abbildung 21: PMNs auf Poly-L-Lysin-beschichteten Glasträgern (Negativkontrolle). Veränderte PMNs ohne morphologische Veränderungen in 200-facher Vergrößerung (1). Geschwollene neutrophile Granulozyten (2) der Phase II und solche, die kurz vor der Ruptur der Plasmamembran in Phase III standen oder in denen bereits NETose sichtbar ist (3) [46].

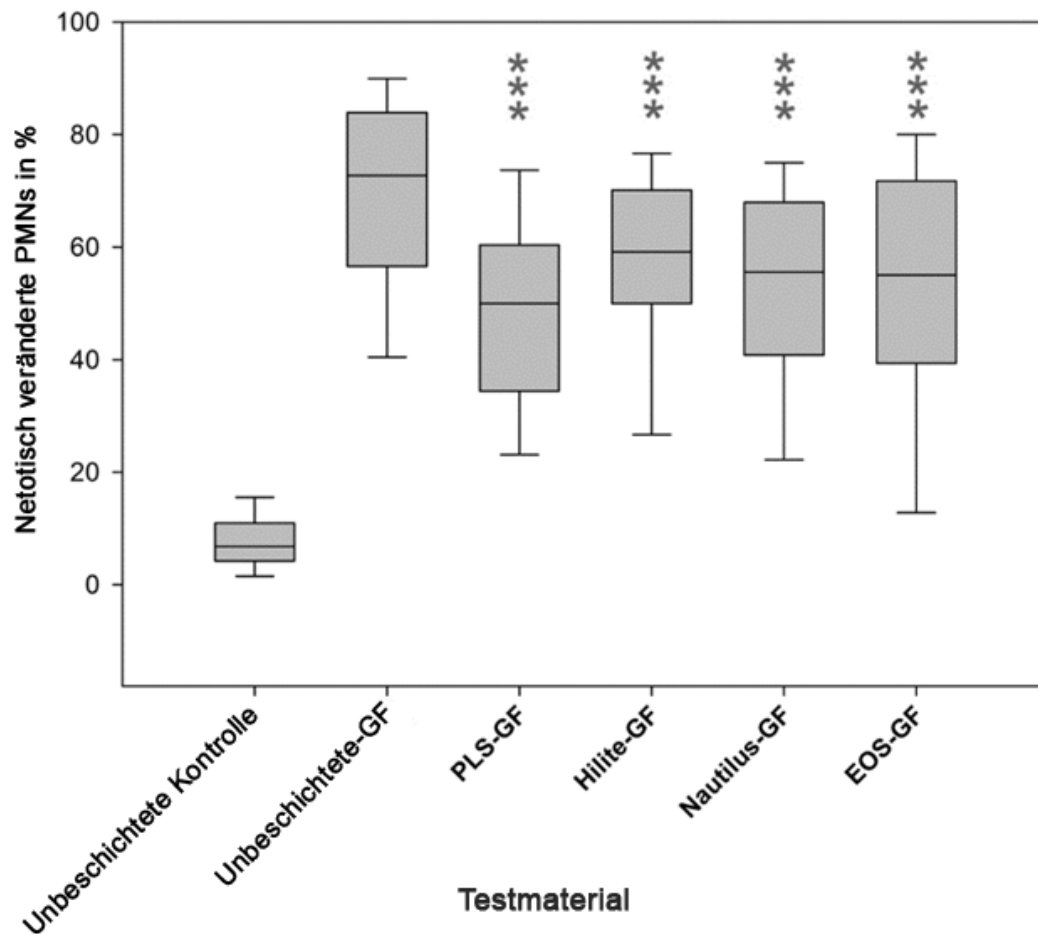


Abbildung 22: Verhältnis von netotisch veränderten PMNs zu allen Nuklei.

Zur quantitativen Analyse der morphologischen Veränderungen der PMNs wurden insgesamt 180 mikroskopische Aufnahmen bei einer 200-fachen Vergrößerung ausgewertet. Für jede der sechs Materialproben wurden fünf nicht überlappende Fluoreszenzmikroskopaufnahmen ohne Kettfäden in die Analyse einbezogen. Dieses Vorgehen wurde sowohl für die vier antithrombotischen Beschichtungen als auch für die unbeschichtete PMP-Oberfläche angewandt. Der Prozentsatz der netotisch veränderten Zellen war bei den unbeschichteten GF signifikant höher als bei allen anderen GFs. (***, $p < 0.001$). Unbeschichtete und beschichtete GFs weisen im Vergleich zur Negativkontrolle auf Glasoberflächen eine signifikant höhere Anzahl von netotisch veränderten PMNs auf (***, $p < 0,001$) [46]. Statistik: Kruskal-Wallis-Test (ANOVA on Ranks).

Die Behandlung von adhärenenten Granulozyten mit PMA bewies deren Fähigkeit, NETose auf den verschiedenen Oberflächen zu induzieren (Abbildung 23). Während die Inkubation von adhärenenten Granulozyten auf Poly-L-Lysin-beschichteten Glasträgern (Negativkontrolle) kaum Auswirkungen auf die Kernmorphologie hatte, führte die Behandlung mit PMA (Positivkontrolle) zur Freisetzung von extrazellulärer DNA. In diesem Zusammenhang führte die Exposition mit PMA zur Bildung von mehr als 90 % netotischen Kernen. Die darauffolgende Behandlung der netotischen Nuklei mit DNase I führte zu einer vollständigen Entfernung der extrazellulären DNA (Abbildung 23). Normale Zellkerne blieben an der Oberfläche der PLS-Gasfaser haften.

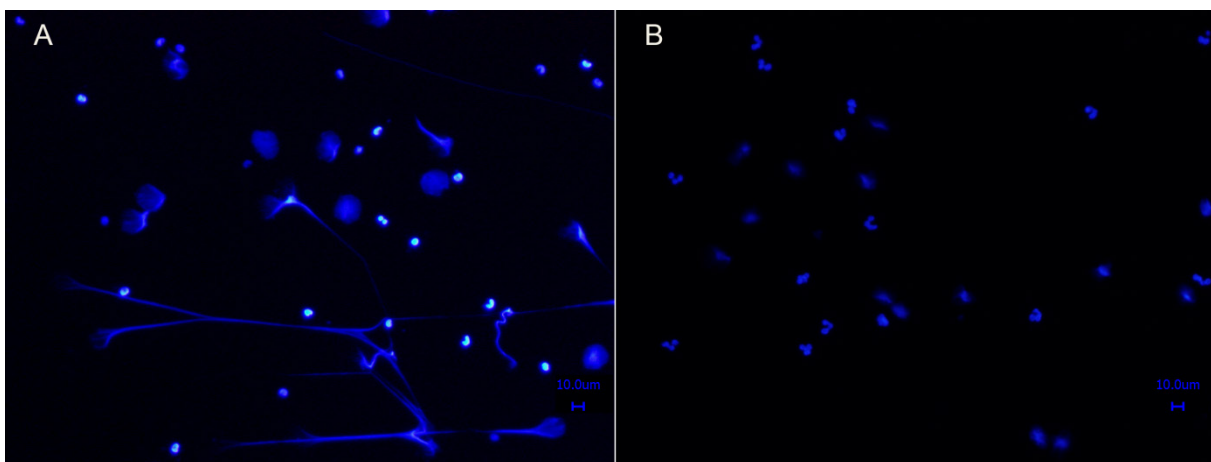


Abbildung 23: DNase I Auswirkungen auf PMA-behandelte PMNs auf einer PLS-Gasfaser. (A) Die mit PMA-behandelte Granulozyten auf einer PLS-Gasfaser bildeten NETose, deren Auswirkungen nach einer DNase I-Behandlung entfernt werden konnte (B) [46].

ECMO-Membranoxygenatoren bestehen nicht nur aus Gasfasern, sondern beinhalten auch Wärmetauscherfasern (WT). Die Materialproben der WTs bestanden aus verschiedenen Materialien (Tabelle 1) mit hoher Eigenlumineszenz. Diese physikalische Eigenschaft verhindert die Erkennung und Quantifizierung von DAPI-gefärbten adhärenenten Granulozyten. Daher wurden Wärmetauscherfasern von den Adhäsionsversuchen ausgeschlossen. Die materialinduzierte Aktivierung von PMNs durch Wärmetauscherfasern jedoch wurde mittels FACS-Analyse (Fluorescence

Activated Cell Sorting) untersucht (siehe Kapitel 3.1.2 Materialinduzierte Zellaktivierung und 6.2 FACS-Funktionsweise).

3.1.2 Materialinduzierte Zellaktivierung

Der Kontakt von isolierten PMNs mit künstlichen Oberflächen wie Gasfasern und Wärmetauscherfasern konnten einen oxidativen Burst und Expressionsveränderungen aktivierungsrelevanter Marker (CD11b/CD18, CD62L) von nicht adhärenen Zellen im Überstand auslösen.

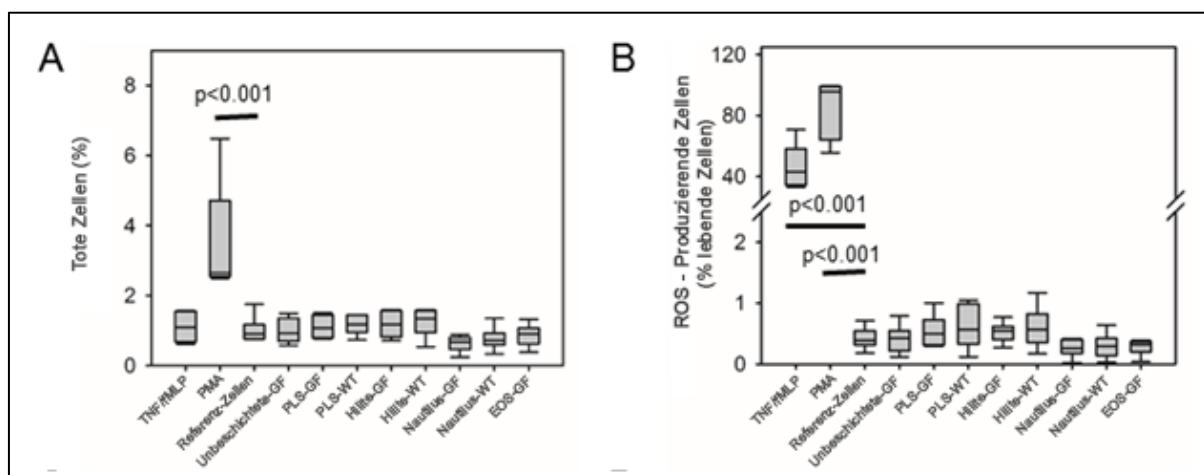


Abbildung 24: FACS-basierter Nachweis von PMN-Interaktionen mit Oberflächenbeschichtungen. Es wurden FACS-Analysen durchgeführt, um zu quantifizieren, ob PMNs nach dem Kontakt mit den beschichteten ECMO-Oberflächen eine gesteigerte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und damit einen ausgeprägten oxidativen Burst zeigen. Für jede Messung wurden 100 μ l PMN-Suspension aus dem Überstand nach einem dreistündigen Kontakt mit den jeweiligen Oberflächen analysiert. Die Exposition isolierter Granulozyten im Überstand der Adhäsionsexperimente ($n = 6$) gegenüber den Testmaterialien beeinträchtigte die Vitalität der PMNs kaum ($> 98\%$) (A) und führte lediglich zu einer sehr geringen ROS-Produktion (B). Zudem zeigten isolierte, vitale PMNs nach Stimulation mit TNF/fMLP oder PMA eine signifikant erhöhte ROS-Produktion ($p < 0,001$) im Vergleich zu Referenzzellen sowie zu PMNs, die den Testmaterialien ausgesetzt waren. (Gasfasermembranen (GF), Wärmetauschermembranen (WT)) [46]. Statistik: Einwege-Varianzanalyse (ANOVA).

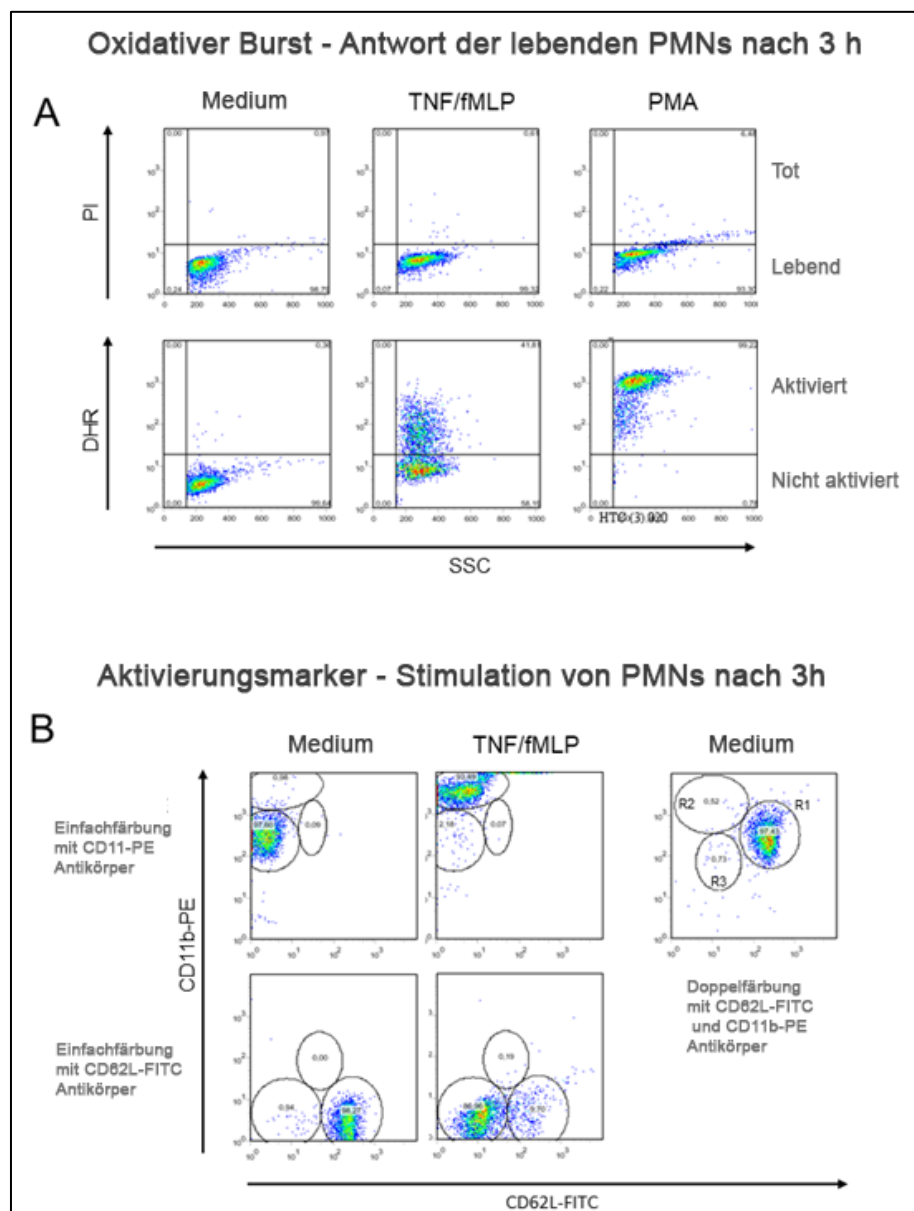


Abbildung 25: Oxidativer Burst und Expression von Aktivierungsmarkern. Quantifizierung des oxidativen Bursts (A) und der Expression von Aktivierungsmarkern (CD11b/CD18, CD62L) (B) mittels FACS-Analyse. Isolierte PMNs wurden mit Medium, TNF/fMLP oder PMA, wie im Abschnitt Methode beschrieben, behandelt. (A) Mit Propidiumiodid (PI) konnten tote Zellen (PI-positiv) und lebende Zellen (PI-negativ) detektiert werden. PI-negative Zellen wurden ausgewählt, um ROS-produzierende Zellen (Dihydrorhodamin, DHR-positiv, aktiviert) zu erkennen. Der Anteil der lebenden Zellen, die DHR-positiv waren, wurde analysiert. (B) Einfachfärbungen ermöglichten die Kompensation der FACS-Kanäle. PMNs im Medium zeigten eine mäßige CD11b-PE (hohe CD62L-FITC) Fluoreszenzintensität, während die Stimulation mit TNF/fMLP die Signale verstärkte (verringerte). Die Zellen im Überstand wurden mit beiden Antikörpern gefärbt und in einem Dotplot von CD62L-FITC gegen CD11b-PE dargestellt (rechts). Gated-Zellpopulationen sind definiert als nicht aktiviert (R1, CD62L-/CD11b-) und aktiviert (R2, CD62L-/CD11b+; R3, CD62L-/CD11b-) [46].

Dabei zeigten Referenzzellen (ohne Kontakt zum Testmaterial) nach der Inkubation mit PMA einen signifikanten Anstieg des Anteils toter Zellen, während TNF/fMLP bzw. Medium keinen Einfluss auf deren Vitalität hatte (Abbildung 24 A). Die Werte nach PMA-Stimulation lagen jedoch immer unter 7%, sodass sie als vernachlässigbar eingestuft wurden.

Die Inkubation der vitalen Zellen mit PMA oder TNF/fMLP führte zu einer vollständigen (96 [64-99] %) oder teilweisen (43 [34-58] %) Provokation der PMNs und zur Auslösung eines oxidativen Bursts (Abbildung 24 B).

Im Gegensatz dazu zeigten isolierte PMNs, die 3 Stunden lang mit den beschichteten oder unbeschichteten Testmaterialien in Kontakt waren, keinen signifikanten Unterschied in der ROS-Produktion im Vergleich zu den Referenzzellen (Abbildung 24 B).

Mit Propidiumiodid (PI) konnten lebende Zellen (PI-negativ) detektiert werden, um dann mittels Dihydrorhodamin (DHR-positiv) aktivierte, ROS-produzierende Zellen zu erkennen und zu analysieren (Abbildung 25 A). Im direkten Vergleich der ausgelösten zellspezifischen PMN-Reaktionen in Form eines oxydativen Bursts wird in der FACS-Analyse ersichtlich, dass PMA eine erheblich stärkere Zelltoxizität entfaltet als TNF/fMLP (Abbildung 25 A). Demzufolge zeigte sich bei vitalen PMNs nach Stimulation mit PMA oder TNF/fMLP eine stärkere Bildung reaktiver Sauerstoffspezies im Vergleich zu den Referenzzellen, die sich ohne Materialkontakt im Medium befanden.

Neben der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies sind Expressionsveränderungen aktivierungsrelevanter Marker charakteristische Eigenschaften von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten. Dabei zeigten PMNs im Medium ohne Exposition gegenüber Testmaterialien (Abbildung 25 B) eine konstitutive Expression von CD11b/CD18 (bezeichnet als CD11b-) und eine hohe Expression von CD62L (bezeichnet als CD62L+). Die Expression von (CD11b/CD18) nahm nach Inkubation mit TNF/fMLP zu, während die Expression von CD62L sich reduzierte (Abbildung 25 B).

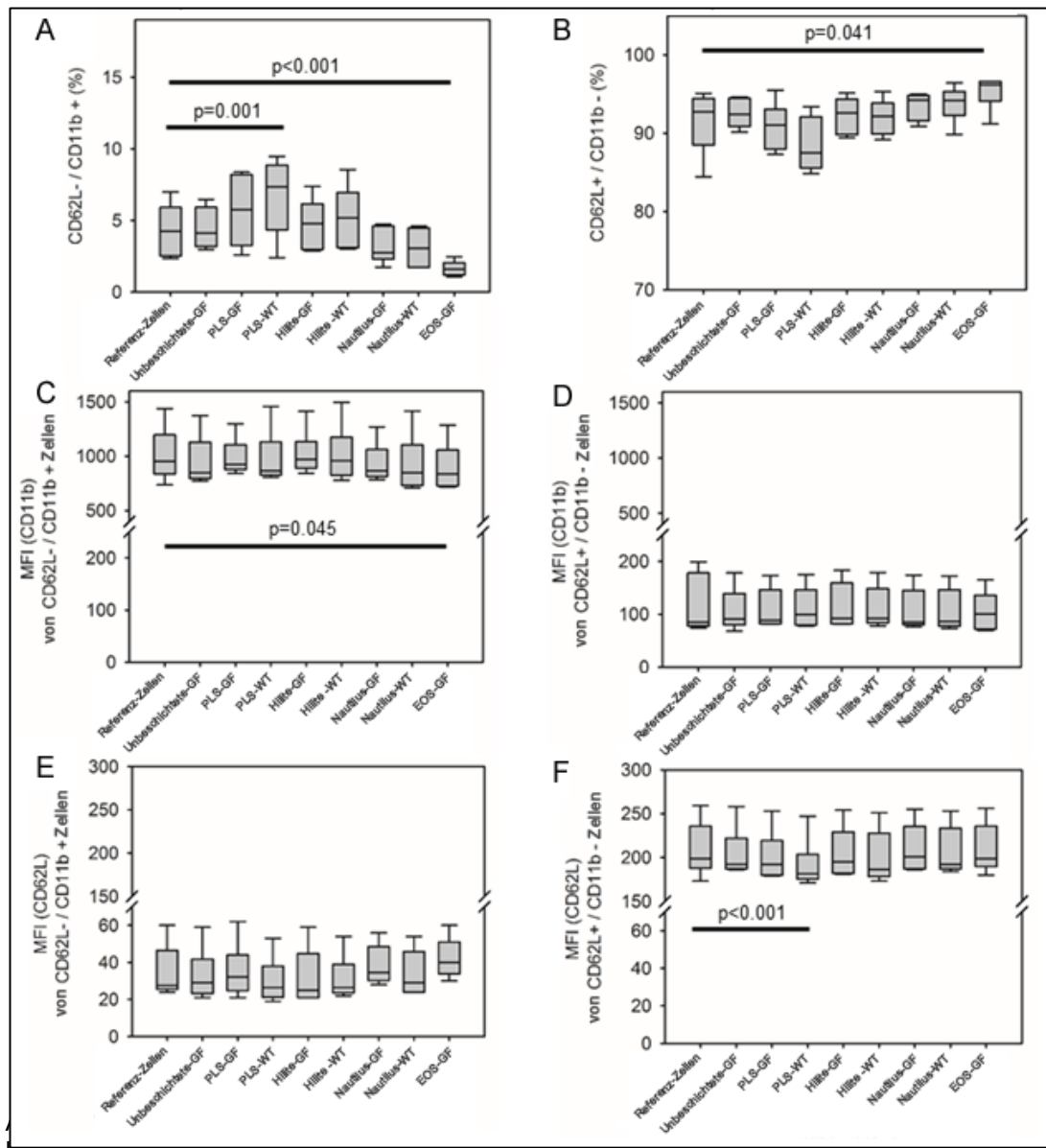


Abbildung 26: Aktivierungsmarker L-Selektin (CD62L) und (CD11b/CD18) im FACS. Zur Bestimmung der Aktivierungsmarker CD62L und CD11b wurde eine FACS-Analyse durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass der Kontakt von isolierten Granulozyten im Überstand der Adhäsionsexperimente (n=6) mit Testmaterialien die Zellen nur geringfügig aktivierte ohne die Expression von CD11b und CD62L wesentlich zu verändern. In den FACS-Analysen lag der Anteil aktivierter PMNs (CD62L⁺/CD11b⁺) (A) unter 10 %, wohingegen mehr als 90 % der Zellen dem nicht aktivierten Phänotyp (CD62L⁺/CD11b⁻) (B) zugeordnet waren.

Die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) von CD11b (C, D) und CD62L (E, F) blieb auf dem Niveau der Referenz (nicht stimulierte Zellen ohne Kontakt mit Testmaterialien) [46]. Statistik: Einwege-Varianzanalyse (ANOVA). (Gasfaser (GF), Wärmetauscherfasern (WT)).

Die Exposition der PMNs mit den Gasfaser-Testmaterialien führte zu keiner ausgeprägten Veränderung der Aktivierungsmarker CD62L und (CD11b/CD18) (Abbildung 26 A). Im Gegensatz dazu wurde eine signifikante Zunahme ($p = 0,001$) aktivierter polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten (PMNs) nach Kontakt mit PLS-WT-Fasern beobachtet, welche auf eine stimulierende Wirkung dieser Fasern auf den Aktivierungsstatus der Zellen hinweist, während die EOS-GF-Proben eine signifikante Reduktion der Zellaktivierung ($p < 0,001$) zeigten (Abbildung 26 A). Im Kontext der Subpopulationseinteilung blieb der Anteil der nicht aktivierten CD62L+/CD11b- Zellen (Abbildung 26 B) mit Ausnahme eines marginal höheren Anteils ($p = 0,041$) nach Exposition gegenüber EOS-GF konstant, während sich der Anteil der aktivierten CD62L-/CD11+ Zellen (Abbildung 26 A) minimal unterschiedlich zeigte.

Die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) von (CD11b/CD18) (Abbildung 26 C, Abbildung 26 D) und CD62L (Abbildung 26 E, Abbildung 26 F) verblieb auf dem Niveau der Referenz von nicht stimulierten PMNs ohne Kontakt mit Testmaterialien. Die angegebenen Unterschiede sind gering und damit nicht relevant.

Zwischen den Gasfaserproben und den Wärmetauscherproben war bis auf PLS-WT-Fasern ($p < 0,001$), welche weniger nicht aktivierte PMNs zeigten (Abbildung 26 F), kein weiterer signifikanter Unterschied feststellbar. Darüber hinaus blieb die mediane Fluoreszenzintensität der Zellen im Überstand unverändert und lag auf dem Niveau der Referenzzellen (Abbildung 26 C-F).

3.2. Ergebnisse der dynamischen NETose-Versuche

Der Strömungskanal der Objektträger hatte im Bereich ohne eingebrachte Gasfasern eine Querschnittsfläche von $2,0 \text{ mm}^2$ für den Volumenstrom. Eine eingebrachte GF nahm eine Fläche von $1,9 \text{ mm}^2$ ein, was dazu führte, dass 95 % der Querschnittsfläche des Strömungskanals durch eine eingebrachte Gasfaser blockiert wurden. Der Abstand zwischen der jeweiligen GF und den oberen Rand des Objektträgers betrug maximal $20 \text{ }\mu\text{m}$.

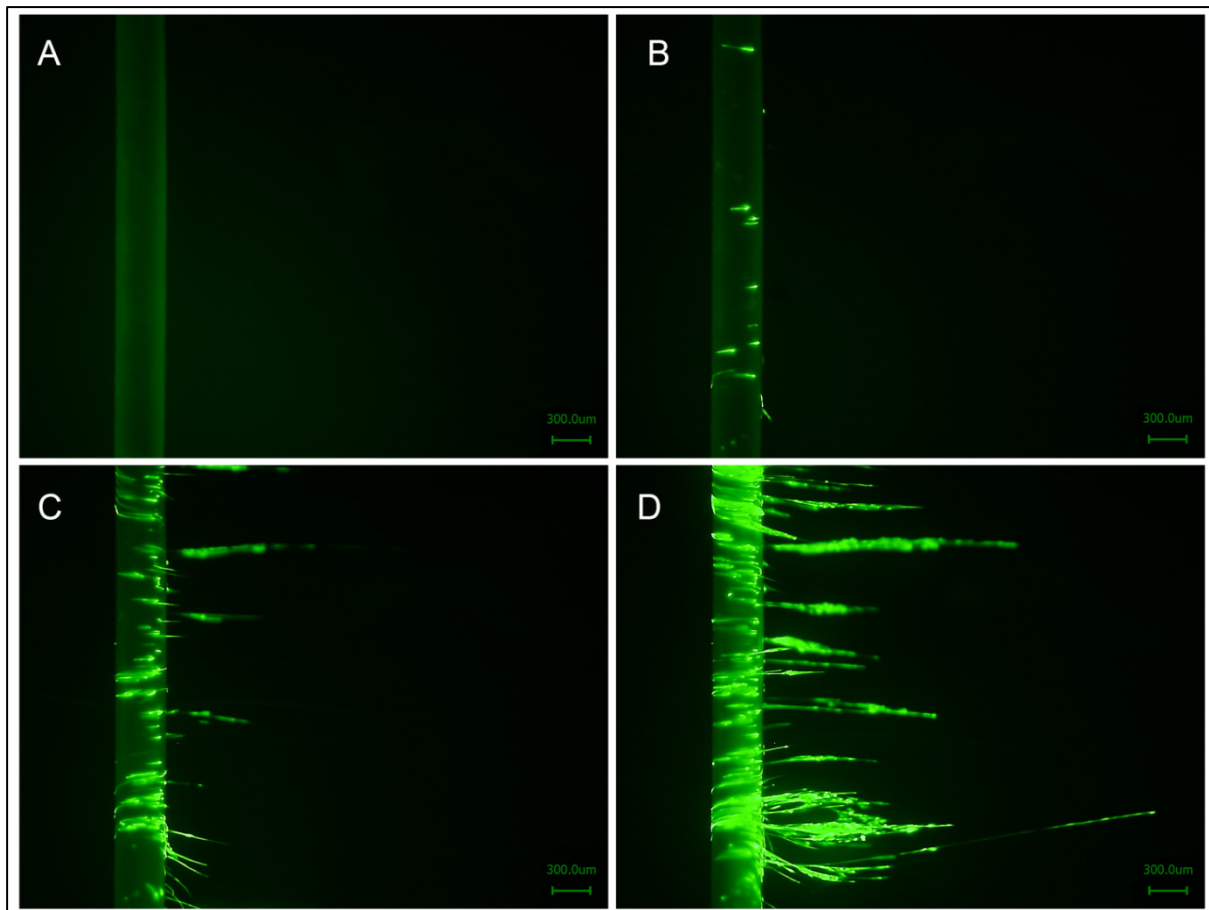


Abbildung 27: NETotische Anlagerungen auf unbeschichteter Gasfaser. Die exemplarische netotischen Anlagerungen nach 5 (A), 30 (B), 60 (C) und 90 (D) Minuten am Beispiel einer unbeschichteten Gasfaser (Flussrichtung von links nach rechts).

Bei einem Volumenstrom von 5 ml/min formierten sich auf den in einem Objektträger fixierten Gasfasern kleine Zellablagerungen, welche mit dem zeitlichen Verlauf zunahmten (Abbildung 27 A-D). Darüber hinaus zeigten sich kurze und feine DNA-Filamente, die an der GF entlang der Flussrichtung der PMNs im Perfusionsmedium, von links nach rechts im Strömungskanal, zeitabhängig wuchsen und an Dicke zunahmten.

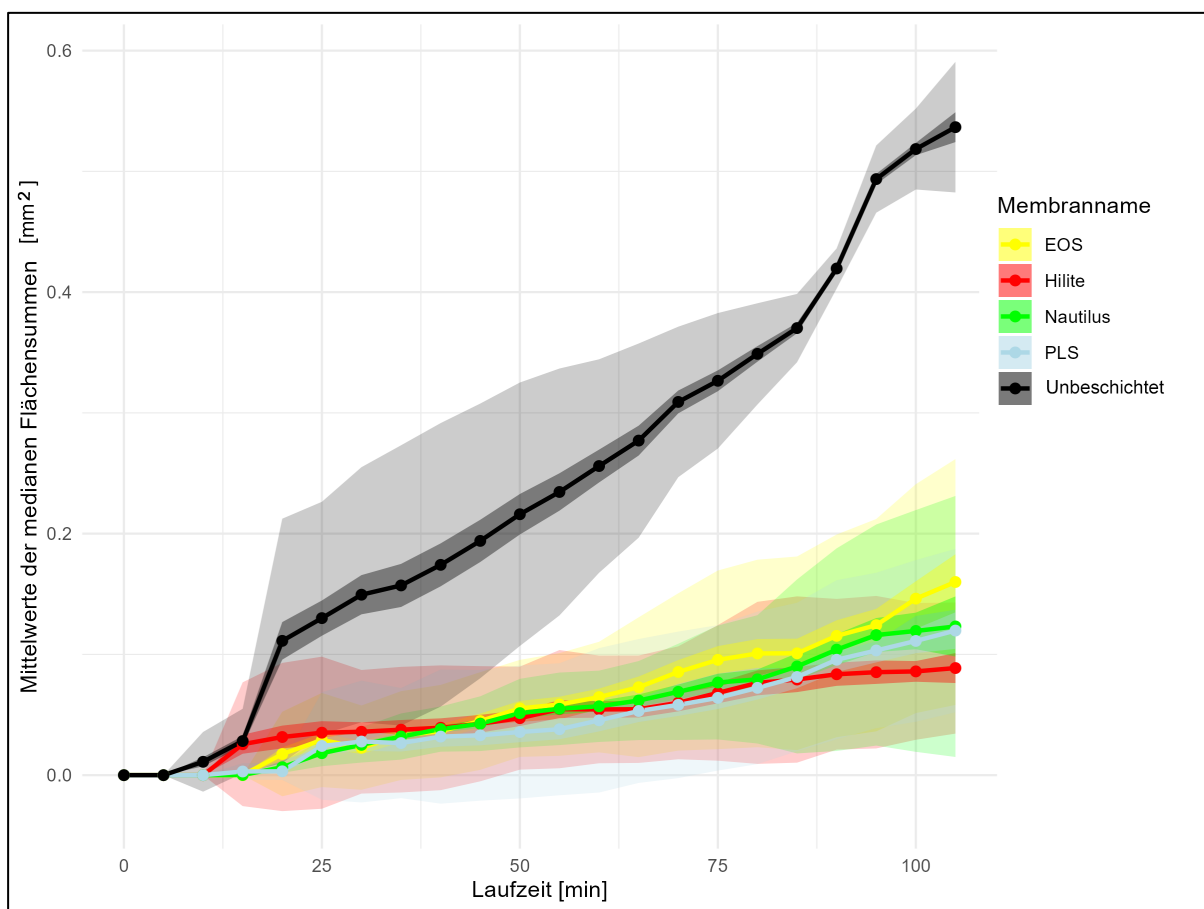


Abbildung 28: Kumulative Anlagerungen von Gasfasern und DNA-Filamenten. Zeitlicher Verlauf der Anlagerungen auf den Gasfasern sowie der gebildeten Filamente über die gesamte Versuchsdauer aus fünf unabhängigen Versuchen. Die dunklen Bereiche stellen die 95 %-Konfidenzintervalle dar, während die helleren Bereiche die Standardabweichungen zeigen. Die Daten verdeutlichen, dass die Streuung mit wachsender Fläche geringer ausfällt. Zur besseren visuellen Übersicht sind die Fehlerbalken (Standardabweichung) der Anlagerungsflächen aus jeweils fünf unabhängigen Versuchen der einzelnen Gasfasern exemplarisch für den Zeitpunkt T = 90 min in Abbildung 46 dargestellt. Statistik: Kruskal-Wallis-Test (ANOVA on Ranks).

Die verwendenden Gasfasern aus den verschiedenen ECMO-Oxygenatoren sind durch herstellerepezifische nicht-thrombogene Oberflächenbeschichtungen charakterisiert (Tabelle 1). Bei allen untersuchten GFs zeigte sich im Verlauf der einzelnen Versuche eine kontinuierliche Zunahme der summierten Anlagerungen auf den Gasfasern und den dazugehörigen sichtbaren Filamente (Abbildung 28).

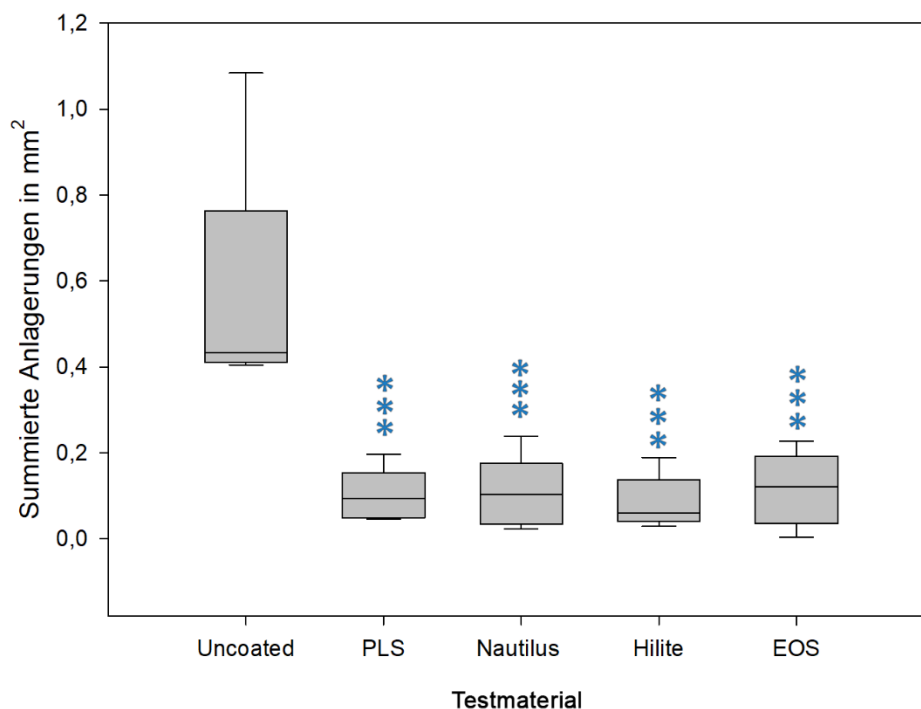


Abbildung 29: Anlagerungen von DNA auf Gasfasern und Filamenten nach $T = 90$ min. Die kumulierten Anlagerungen auf bzw. an den unbeschichteten GFs waren signifikant höher im Vergleich zu allen beschichteten GFs (***, $p < 0,001$). Boxplot mit Median, 25/75 (Box) und 5/95 Perzentilen (Whiskers) aus fünf unabhängigen Versuchen. Statistik: Kruskal-Wallis-Test (ANOVA on Ranks).

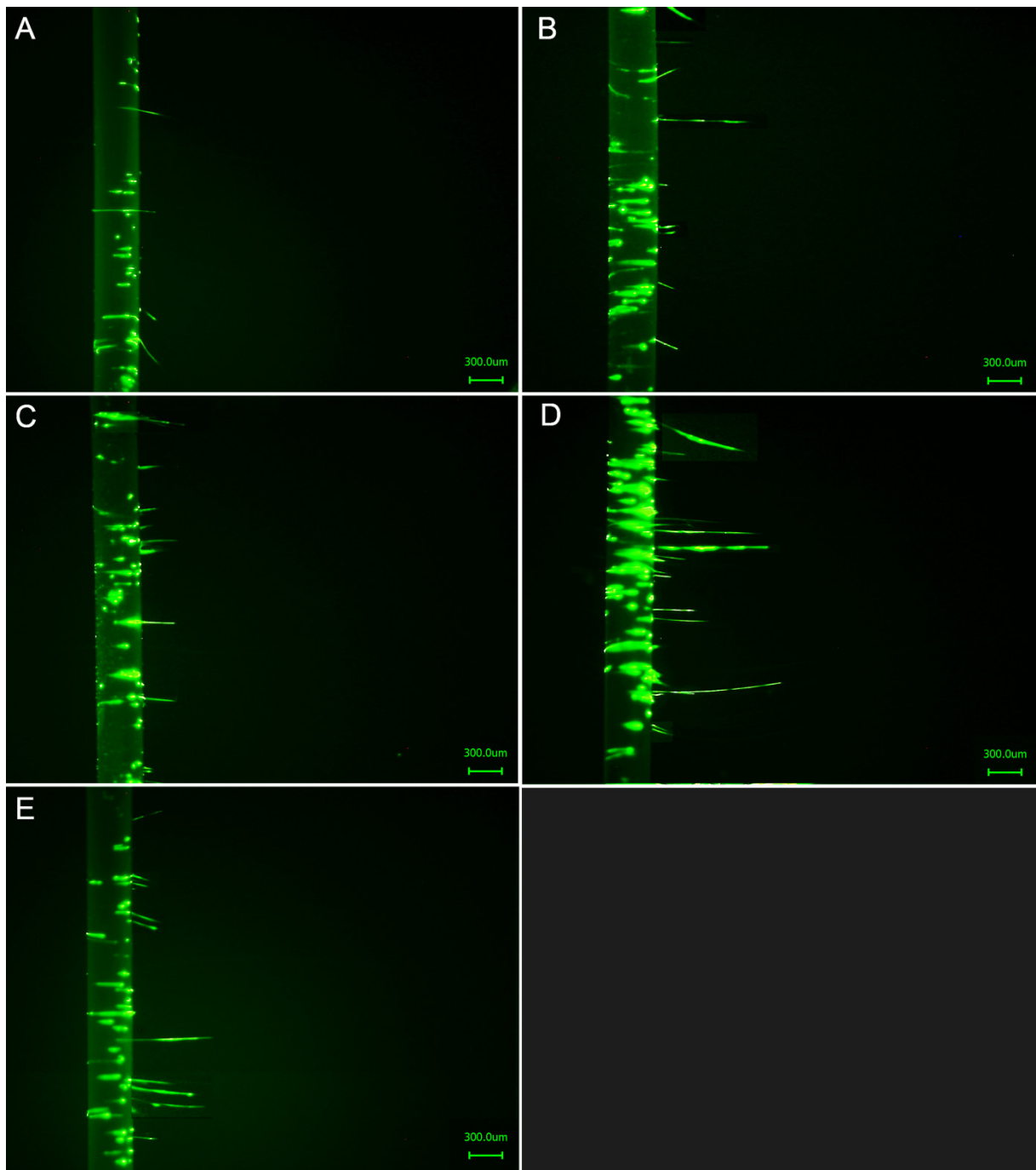


Abbildung 30: Exemplarische DNA-Anlagerungen zum Messzeitpunkt $T = 90$ min im Vergleich von beschichteter Nautilus- (A), PLS- (B), Hilite- (C) unbeschichteter (D) und EOS-Gasfaser (E). Die unbeschichtete Gasfaser (D) zeigte eine höhere Anzahl an Anlagerungen im Vergleich zu den antithrombotisch beschichteten Gasfasern. Die Anlagerungen der Filamente waren stromabwärts an der unbeschichteten Gasfaser ausgeprägter.

Die beschichteten Gasfasern der PLS-, Nautilus-, Hilite- und EOS-Oxygenatoren zeigten nach einer Perfusionszeit von 90 Minuten untereinander keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,922$) in den summierten Anlagerungen auf den Gasfasern und den dazugehörigen stromabwärts entstandenen Filamenten.

Alle beschichteten GFs unterschieden sich aber nach 90 minütiger Versuchszeit signifikant (***, $p < 0,001$) zu den unbeschichteten Gasfasern in Bezug auf die mediane Summe der Flächenanlagerungen (Abbildung 29). Die unbeschichteten Gasfasern zeigten eine um Faktor 5- bis 6-fach erhöhte DNA-Freisetzung in Relation zu den unbeschichteten Gasfasern. Stromabwärts der unbeschichteten Gasfaser (Abbildung 27, Abbildung 30) zeigten sich die Filamentanlagerungen besonders deutlich.

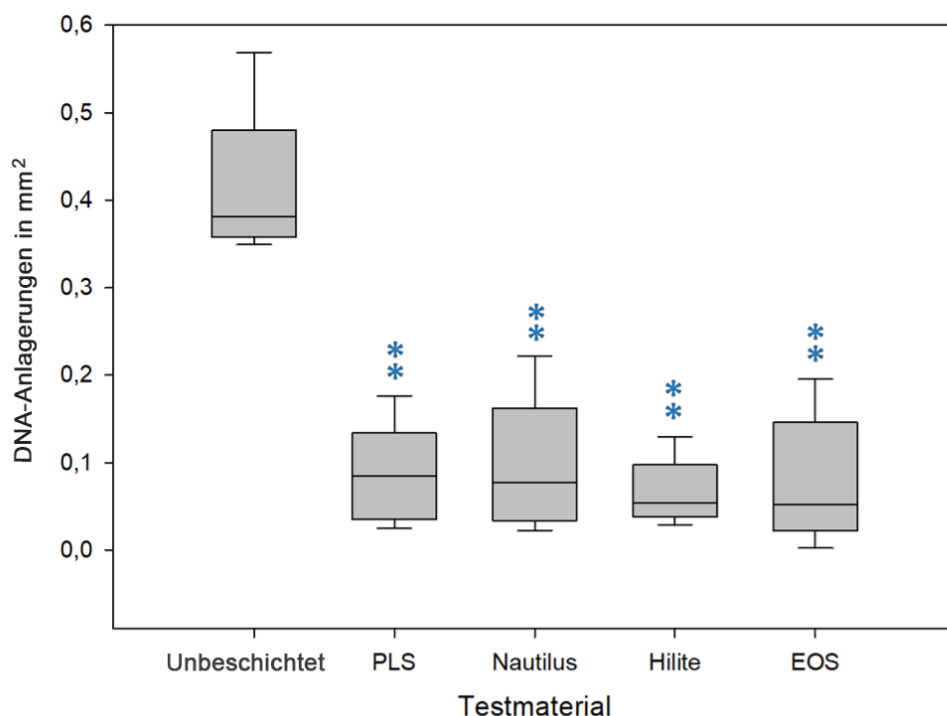


Abbildung 31: DNA-Filamente nach 90 Minuten.

Bei der Betrachtung der DNA-Anlagerungen auf den Gasfasern nach 90 Minuten zeigte sich ein signifikanter Unterschied (**, $p = 0,008$) in den summierten Anlagerungen zwischen unbeschichteten Gasfasern und allen antithrombotischen Oberflächenbeschichtungen. Boxplot mit Median, 25/75 (Box) und 5/95 Perzentilen (Whiskers) aus 5 unabhängigen Versuchen. Statistik: Kruskal-Wallis-Test (ANOVA on Ranks).

Die Anlagerungen auf den unbeschichteten Gasfasern (Abbildung 31) unterschieden sich signifikant (**, $p = 0,008$) von allen anti-thrombogenen Oberflächenbeschichtungen. So zeigten sich beispielsweise nach 90 Minuten auf der unbeschichteten Gasfasern eine Anlagerungsfläche von im Median $0,38 [0,36-0,48] \text{ mm}^2$, wohingegen auf den PLS-Gasfasern im Median $0,08 [0,04-0,13] \text{ mm}^2$ Anlagerungen nachweisbar waren. Die Anlagerungen auf den Gasfasern von PLS, Nautilus mit $0,08 [0,03-0,16] \text{ mm}^2$, Hilite mit $0,05 [0,04-0,10] \text{ mm}^2$ und EOS mit $0,05 [0,02-0,15]$ unterschieden sich nicht signifikant ($p = 0,972$) voneinander. Der Anteil der Anlagerungen an den Gasfasern betrug nach 90 Minuten im Median $0,08 [0,04-0,21] \text{ mm}^2$ der summierten Flächen (Gasfasern und Filamente) und entsprach damit 87,6%.

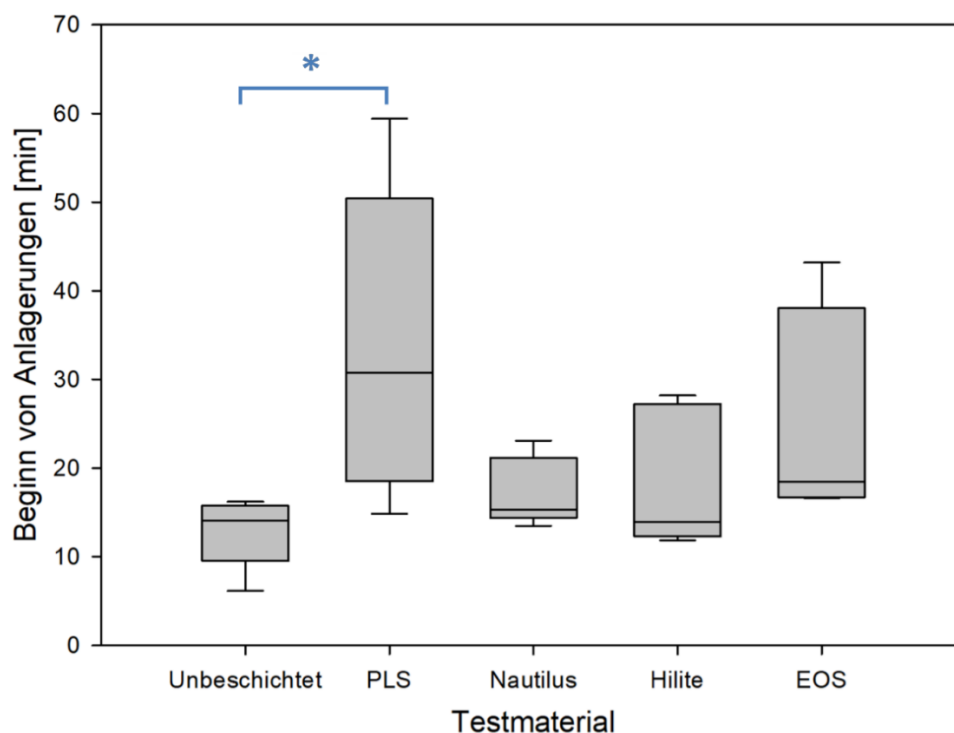


Abbildung 32: Beginn der Anlagerungen auf Gasfasern.

Die Anhaftungen an den PLS-Gasfasern setzten im Verhältnis zum unbeschichteten Basismaterial signifikant später ein (*, $p = 0,049$). Zu allen weiteren Zeitpunkten bestanden keine signifikanten Unterschiede. Boxplot mit Median, 25/75 (Box) und 5/95 Perzentilen (Whiskers) aus 5 unabhängigen Versuchen. Statistik: Einwege-Varianzanalyse (ANOVA).

Nur die früheren Startzeiten (Abbildung 32) der normalverteilten Werte der Anlagerungen auf den unbeschichteten Gasfasern im Mittel von $12,9 \pm 3,9$ min und den späteren Startzeiten auf den PLS-Gasfasern $33,7 \pm 17,4$ min unterschieden sich signifikant (*, $p = 0,049$) voneinander. Die Startzeiten der Anlagerungen auf den Nautilus-Gasfasern mit $17,3 \pm 17,4$ min, den Hilite-Gasfasern $18,6 \pm 7,9$ min und den EOS-Gasfasern $25,6 \pm 11,9$ min sowie den PLS-Gasfasern unterschieden sich nicht signifikant ($p = 0,131$).

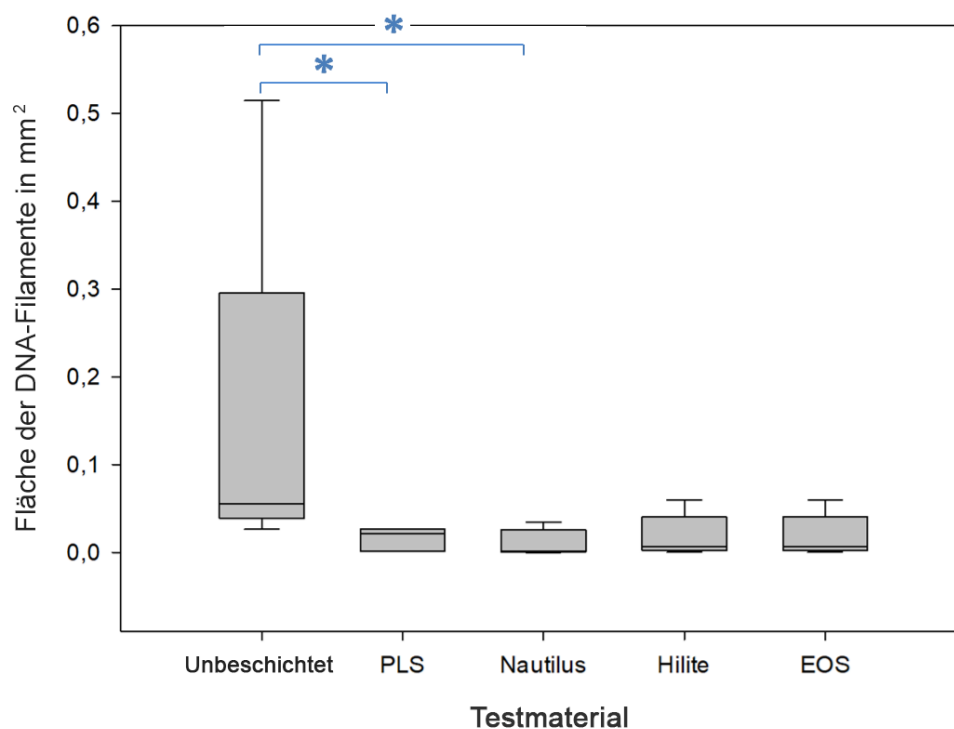


Abbildung 33: DNA-Filamentbildung in der Strömungskammer.

Nach 90 Minuten zeigte sich stromabwärts der Gasfasern ein signifikanter Unterschied in den gemessenen Flächen der DNA-Filamente zwischen unbeschichteten Gasfasern und PLS-Gasfasern sowie zwischen unbeschichteten und Nautilus-Gasfasern (*, $p = 0,016$). Boxplot mit Median, 25/75 (Box) und 5/95 Perzentilen (Whiskers) aus 5 unabhängigen Versuchen Statistik: Kruskal-Wallis-Test (ANOVA on Ranks).

Bei den DNA-Filamenten stromabwärts der Gasfaser (Abbildung 33) zeigten sich nach 90 Minuten eine signifikant höhere Fläche von DNA-Filamenten ($p = 0,016$) bei den unbeschichteten Gasfasern mit $0,055 [0,039-0,295] \text{ mm}^2$ im Verhältnis zur PLS-Beschichtung mit $0,021 [0,002-0,027] \text{ mm}^2$ und Nautilus-Beschichtung mit $0,001 [0,001-0,026] \text{ mm}^2$. In der Relation der DNA-Filamente-Flächenn von unbeschichteten Gasfaser zur Hilite-Beschichtung mit $0,007 [0,002-0,040] \text{ mm}^2$ ergab sich kein signifikanter Unterschied ($p = 0,167$). Entsprechend zeigte sich im Verhältnis der DNA-Filament-Fläche der unbeschichteten Gasfasern und der EOS-Beschichtung mit $0,032 [0,014-0,065] \text{ mm}^2$ keine signifikante Differenz ($p = 0,310$). Die PLS-, Nautilus-, Hilite- und EOS-Oberflächenbeschichtung waren untereinander nicht signifikant ($p = 0,223$) unterschiedlich. Der Medianwert des Anteils der Filamentanlagerungen an der Gesamtfläche aus Gasfasern und Filamenten betrug nach 90 Minuten $0,021 [0,002-0,051]$, entsprechend 12,4%.

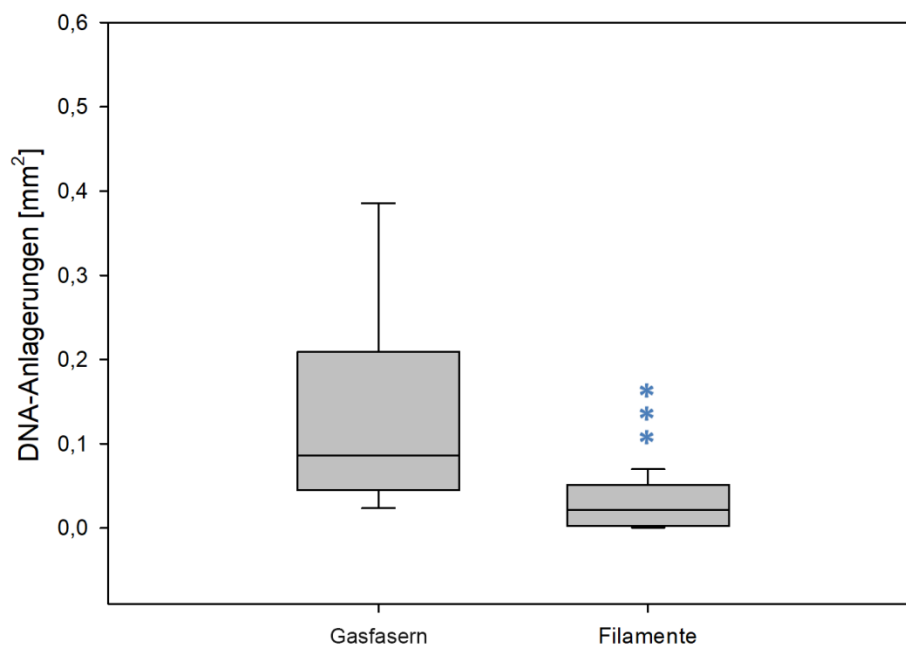


Abbildung 34: Vergleich der Gasfaseranlagerungen und DNA-Filamente. Bei der Gegenüberstellung der Anlagerungen auf den Gasfasern und den Filamentbereichen über 25 Einzelversuche zeigte sich nach 90 Minuten signifikant (***, $p < 0,001$) höhere Anlagerungen an den Gasfasern in Relation zu den DNA-Filamenten. Statistik: Mann-Whitney U Statistic.

Beim direkten Vergleich der Gasfaseranlagerungen und der DNA-Filamente der 25 Einzelversuche ergab sich nach 90 Minuten ein signifikanter Unterschied (***, $p < 0,001$) zwischen den Gasfaseranlagerungen mit $0,086 [0,045-0,209]$ mm² und der Filamentfläche mit $0,021 [0,002-0,051]$ mm² (Abbildung 34).

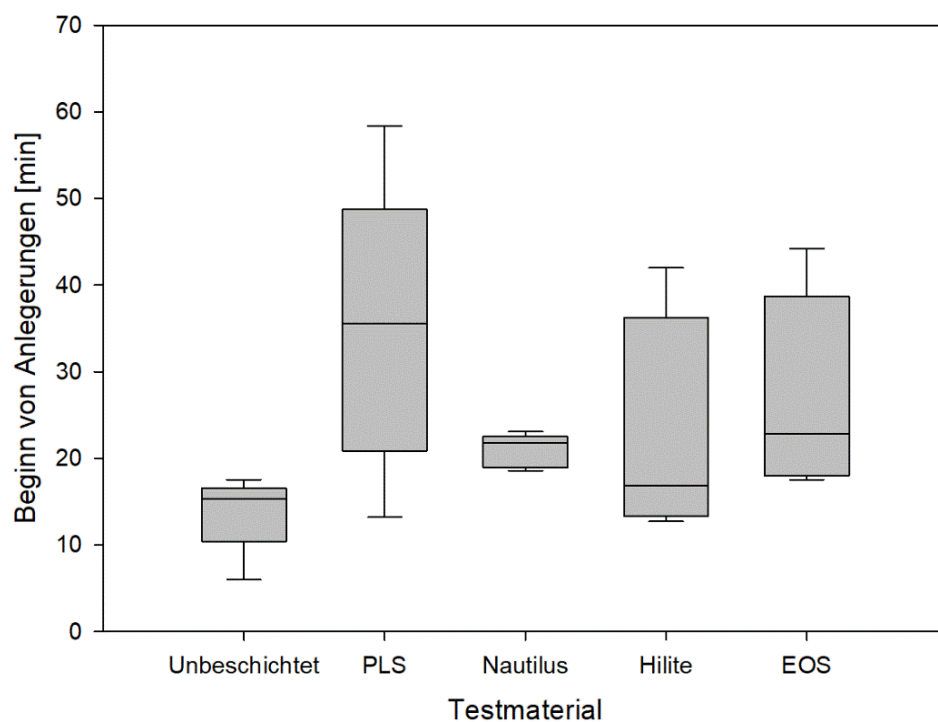


Abbildung 35: Beginn der DNA-Filamentbildung nach Experimentstart. Zwischen dem unbeschichteten Basismaterial und den verschiedenen Oberflächen lag kein signifikanter Unterschied ($p = 0,067$) vor. Boxplot mit Median, 25/75 (Box) und 5/95 Perzentilen (Whiskers) aus 5 unabhängigen Versuchen. Statistik: Einwege-Varianzanalyse (ANOVA).

Beim Beginn der DNA-Filamentbildung stromabwärts der Gasfaser (Abbildung 35) zeigte sich zwischen den unbeschichteten Gasfasern mit $13,9 \pm 4,5$ min, den PLS-Gasfasern mit $35,0 \pm 16,4$ min, den Nautilus-Gasfasern mit $20,9 \pm 1,9$ min, den Hilite-

Gasfasern mit $23,2 \pm 12,7$ min und den EOS-Gasfasern mit $27,2 \pm 11,3$ min kein signifikanter Unterschied ($p = 0,067$).

Die Anlagerungen setzen im Median nach $16,7 [14,0-27,2]$ min zunächst an den Gasfasern ein, bevor nach $19,2 [15,5-31,7]$ min die Bildung von Filamenten beobachtet wurde. Zwischen dem Beginn der gasfaserassoziierten Anlagerungen und der Filamentbildung ließ sich kein signifikanter Unterschied ($p = 0,269$) feststellen.

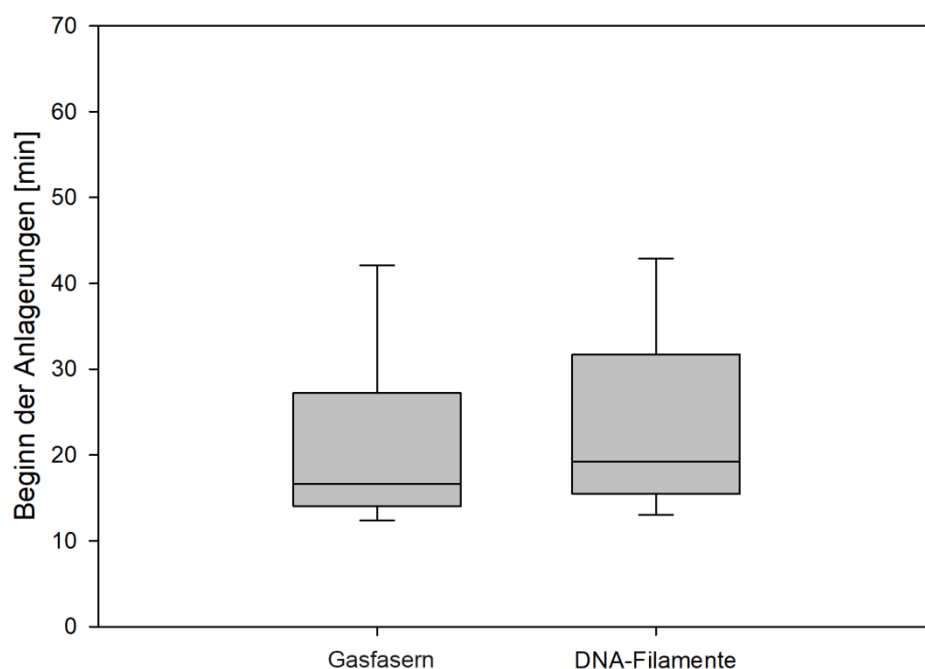


Abbildung 36: Beginn der DNA-Anlagerungen.

In den 25 Einzelversuchen zeigte sich, dass zunächst Anlagerungen an den Gasfasern entstanden, bevor die Filamentbildung einsetzte. Zwischen dem Auftreten gasfaserassoziierten Anlagerungen und der anschließenden Filamentbildung bestand kein signifikanter zeitlicher Unterschied ($p = 0,269$) Statistik: Mann-Whitney U Statistic.

Im weiteren Verlauf wurden die DNA-Filamentbildung in den drei Gasfaserbereichen (oberer, mittlerer und unterer Abschnitt) gemäß Abbildung 37 sowie die Anzahl (Abbildung 40) und Länge der Filamente (Abbildung 42) analysiert.

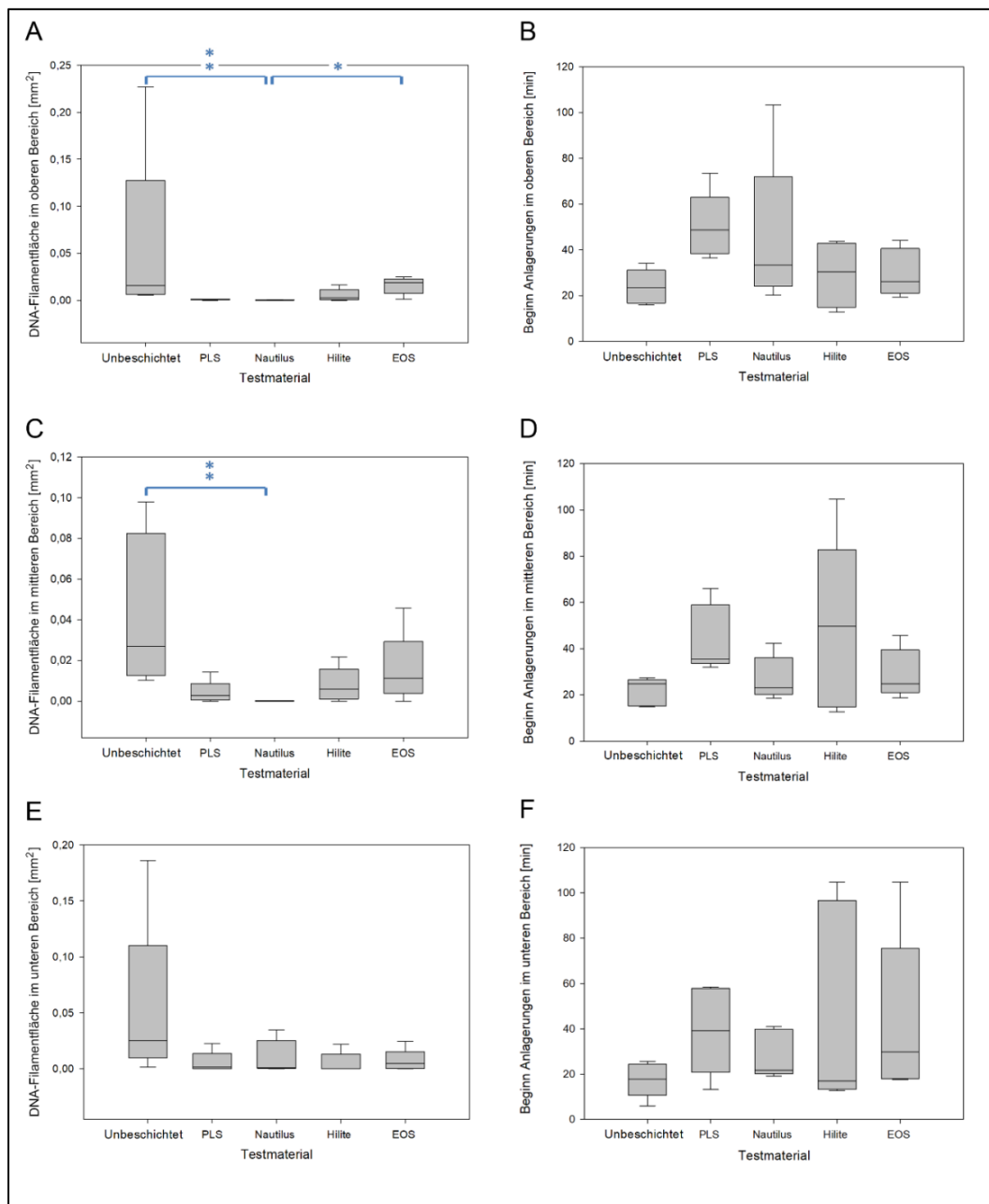


Abbildung 37: DNA-Filamentbildung in verschiedenen Bereichen der Gasfasern nach 90 Minuten stromabwärts und Beginn der Filament-Bildung. Die Nautilus-Gasfasern zeigten im oberen Filamentbereich (A) stromabwärts der Gasfasern signifikant weniger Anlagerungen im Verhältnis zu den unbeschichteten Gasfasern (**, $p = 0,007$) und den EOS-Gasfasern (*, $p = 0,017$). Ähnlich zum oberen Filamentbereich zeigte sich auch bei den DNA-Anlagerungen im mittleren Filamentbereich (C) in der Relation von unbeschichteten Basismaterial und Nautilus-Gasfasern ein signifikanter Unterschied (**, $p = 0,004$). Im unteren Filamentbereich (E) war kein signifikanter Unterschied bei den Filamentanlagerungen nachweisbar.

Bei den Startzeiten der Filamentanlagerungen hinter der Gasfaser im oberen (B) Gasfaserbereich ($P = 0,091$), des mittleren (D) Gasfaserbereichs ($p = 0,151$) und dem unteren (F) Gasfaserbereich ($p = 0,458$) zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Statistik: Kruskal-Wallis-Test (ANOVA on Ranks).

Bedingt dadurch, dass in der Strömungskammer die Strömungsgeschwindigkeiten abhängig von der Entfernung zum Rand des Kanal-Objektträgers sind (Abbildung 12), wurden die Filamentbereiche stromabwärts hinter der Gasfaser in die drei Bereiche: Oben, Mitte und Unten unterteilt (Abbildung 15). Dabei zeigte sich, dass die DNA-Filamentanlagerungen im oberen Bereich (Abbildung 37 A) zwischen unbeschichteter Gasfaser mit 0,0156 [0,0063-0,1270] mm² und Nautilus-Gasfaser mit 0,0001 [0,0001-0,0005] mm² sich signifikant ($p = 0,007$) unterschieden. Darüber hinaus zeigten sich signifikant höhere Filamentanlagerungen ($p = 0,017$) im oberen Bereich zwischen EOS-Gasfasern mit 0,0190 [0,0073-0,0226] mm² in Relation zu den Nautilus-Gasfasern.

Am frühesten begannen die Filament-Anlagerungen im oberen Bereich stromabwärts hinter der Gasfaser (Abbildung 37 B) bei den unbeschichteten Gasfasern nach 23,6 [16,7-31,2] min. Am spätesten wurden Filament-Anlagerungen im oberen Bereich stromabwärts hinter der Gasfaser bei den PLS-Gasfasern nach 48,6 [38,3-63,0] min detektiert. Jedoch ergab sich kein signifikanter Unterschied ($p = 0,091$) zwischen dem unbeschichteten Basismaterial, den PLS-Gasfasern, den Nautilus-Gasfasern mit 33,5 [24,1-72,0] min, den Hilite-Gasfasern mit 30,5 [14,9-42,9] min und den EOS-Gasfasern mit 26,1 [21,1-40,7] min.

Ähnlich wie im oberen Filamentebereich zeigten sich auch im mittleren Filamentebereich (Abbildung 37 C) bei den unbeschichteten Gasfasern mit 0,0270 [0,0126-0,0824] mm² signifikant ($p = 0,004$) mehr Filamentanlagerungen im Verhältnis zu den Nautilus-Gasfasern 0,001 [0,0001-0,0002] mm². PLS-Gasfasern mit 0,0026 [0,0004-0,0086] mm², Hilite-Gasfasern mit 0,0059 [0,0010-0,0158] mm² und EOS mit 0,0113 [0,0038-0,0293] mm² und Nautilus-Gasfasern unterscheiden sich nicht signifikant ($p = 0,087$) voneinander.

Im mittleren Filamentebereich begannen die Filamentanlagerungen stromabwärts hinter den Gasfasern bei den Nautilus-Gasfasern mit 23,1 [20,3-36,2] min knapp vor den unbeschichteten Gasfasern mit 24,8 [15,2-26,6] min und den EOS-Gasfasern mit 24,9 [21,1-39,5] min (Abbildung 37 D). Es zeigte sich aber kein signifikanter

Unterschied ($p = 0,0151$) zwischen dem unbeschichteten Basismaterial, den PLS-GFs mit $35,6 [33,6-59,1]$ min, den Nautilus-GFs, den Hilite-GFs mit $49,7 [14,8-82,8]$ min und den EOS-GFs hinsichtlich des Beginns der Filamentbildung in den mittleren Filamentbereichen.

Bei den Filamentflächen stromabwärts hinter dem unteren Drittel der Gasfasern der Strömungskammer (Abbildung 37 E) zeigten sich bei den unbeschichteten Gasfasern mit $0,0251 [0,0010-0,1110]$ mm², den PLS-GFs mit $0,0016 [0,0001-0,0138]$ mm², den Nautilus-GFs mit $0,0009 [0,0005-0,0252]$ mm², den Hilite-GFs mit $0,0001 [0,0001-0,0132]$ mm², und den EOS-GFs mit $0,0046 [0,0003-0,0154]$ mm² kein signifikante Differenz ($p = 0,187$).

Die Bildung von DNA-Ablagerungen im unteren, stromabwärts hinter den Gasfasern gelegenen Bereich der Strömungskammer (Abbildung 37 F) wurde zuletzt bei den Hilite-Gasfasern nach $47,4 \pm 45,3$ min detektiert. Es war aber kein signifikanter Unterschied ($p = 0,458$) zwischen dem unbeschichteten Basismaterial mit $17,5 \pm 7,6$ min, den PLS-Gasfasern mit $39,3 \pm 19,3$ min, den Nautilus-Gasfasern mit $28,3 \pm 10,6$ min, den Hilite-Gasfasern und den EOS-Gasfasern mit $43,4 \pm 36,2$ min beim Beginn der Anlagerungen an den Gasfasern nachweisbar.

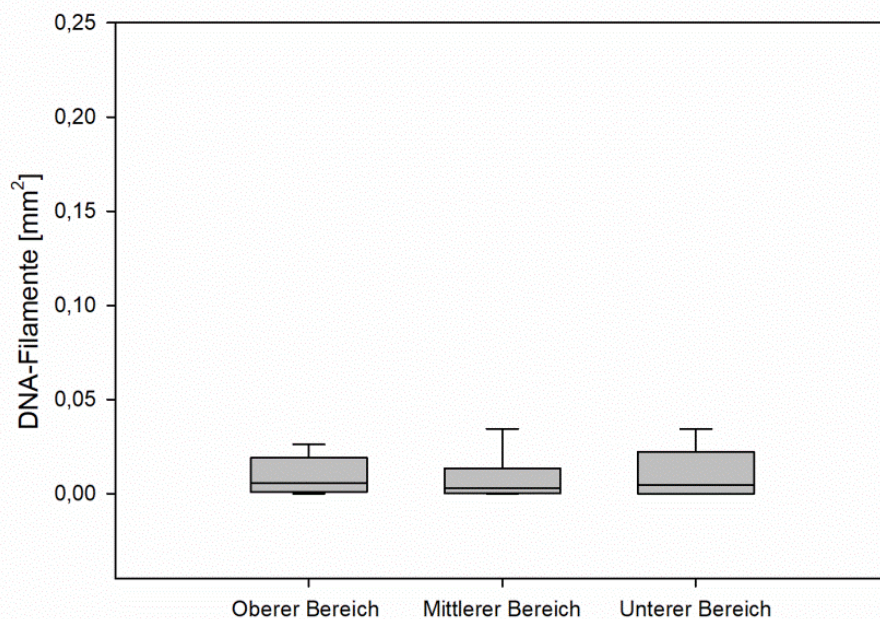


Abbildung 38: Lokalisation der DNA-Filamentflächen im Strömungskanal. Untersucht wurde die räumliche Verteilung der DNA-Filamentflächen im Strömungskanal hinter den Gasfasern. Nach 90 Minuten zeigten sich dabei keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,733$) zwischen dem oberen, mittleren und unteren Bereich. Boxplot mit Median, 25/75 (Box) und 5/95 Perzentilen (Whiskers) aus 25 unabhängigen Versuchen. Statistik: Kruskal-Wallis-Test (ANOVA on Ranks).

Beim Vergleich der DNA-Ablagerungen in Abhängigkeit von der Position hinter den Gasfasern (Abbildung 38) zeigte sich zwischen dem oberen Bereich mit $0,0056 [0,0092-0,0190] \text{ mm}^2$, dem mittleren Bereich mit $0,0030 [0,0002-0,0136] \text{ mm}^2$ und dem unteren Bereich mit $0,0046 [0,0001-0,022] \text{ mm}^2$ kein signifikanter Unterschied ($p = 0,733$). Dabei wurden 34,0 % der Filamente im oberen Bereich der Gasfasern, 30,7 % im mittleren und 35,3 % im unteren Bereich im Verhältnis zur Gesamtanzahl der Filamentfläche detektiert.

Im Verlauf der gesamten Versuchsdauer nahm die DNA-Filamentbildung stromabwärts hinter den einzelnen Bereichen (oberer, mittlerer und unterer Abschnitt) der Gasfasern mit verschiedenen Oberflächenbeschichtungen zu (Abbildung 39). In allen Versuchen ließ sich unabhängig von der jeweiligen Oberflächenbeschichtung bis zu einem Untersuchungszeitraum von 90 Minuten eine reduzierte Bildung von DNA-Filamenten im Vergleich zur unbeschichteten Gasfaser beobachten.

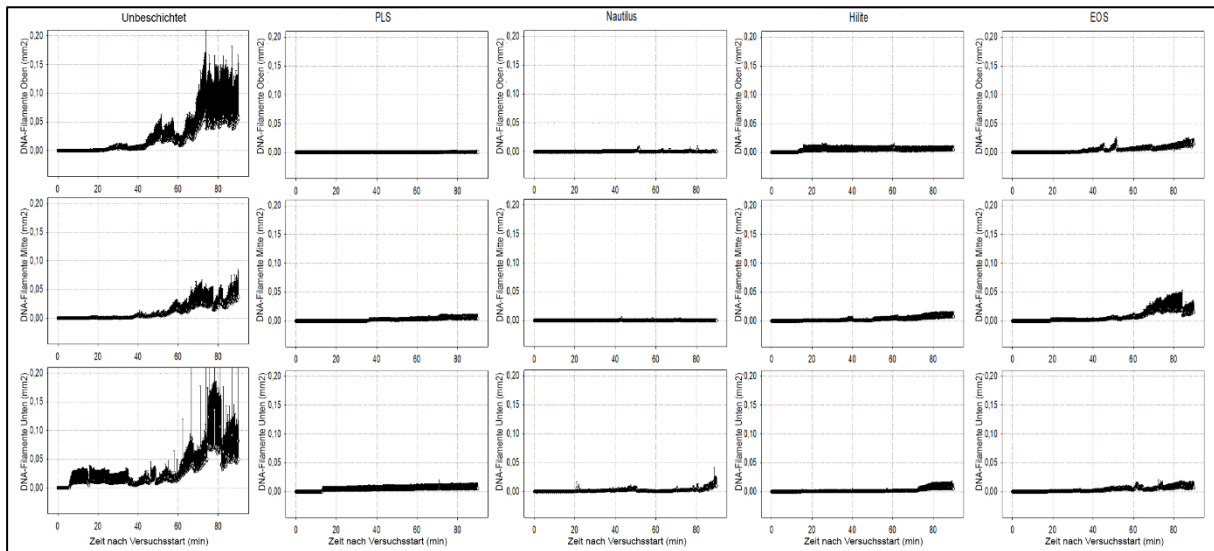


Abbildung 39: Exemplarische Darstellung der DNA-Filamentbildung auf Gasfasern mit und ohne Oberflächenbeschichtungen, differenziert nach dem Lokalisationsbereich (oberer, mittlerer und unterer Abschnitt) stromabwärts der einzelnen Fasern. In allen Versuchen trat bis zu 90 Minuten unabhängig von der Oberflächenbeschichtung eine reduzierte DNA-Filamentbildung im Vergleich zu den unbeschichteten Gasfasern auf. Statistik: Kruskal-Wallis-Test (ANOVA on Ranks).

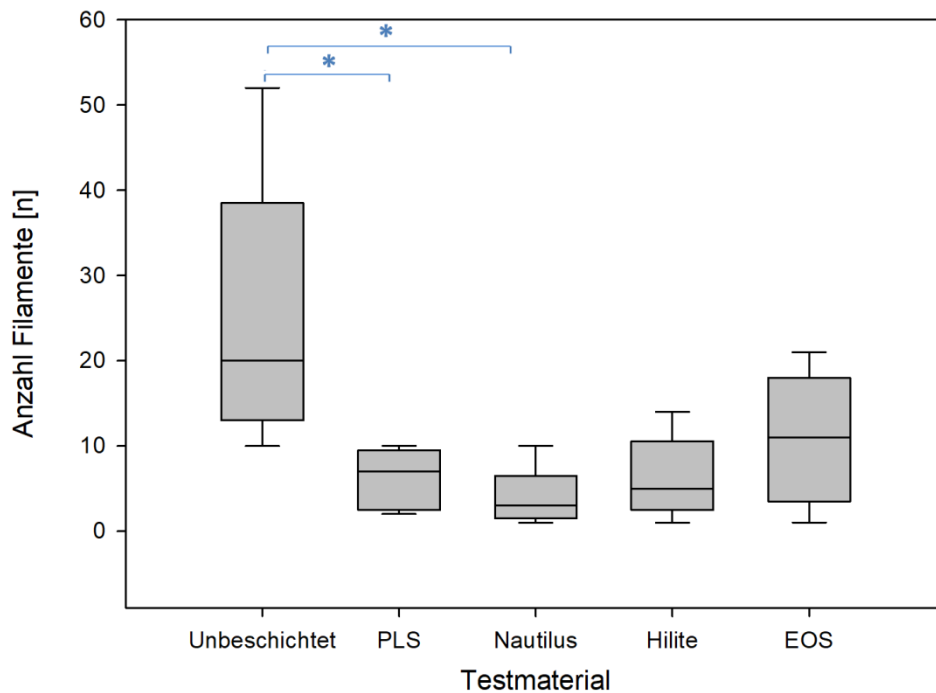


Abbildung 40: Die summierte Anzahl von DNA-Filamenten.

Die Anzahl der Filamente, die sich im Strömungskanal hinter den Gasfasern gebildet hatten, wurde in fünf unabhängigen Versuchen quantifiziert. Dabei zeigte sich, dass unbeschichtete Gasfasern innerhalb von 90 Minuten signifikant (*, $p = 0,024$) mehr DNA-Filamente aufwiesen als die PLS- und Nautilus-beschichteten Gasfasern. Boxplot mit Median, 25/75 (Box) und 5/95 Perzentilen (Whiskers). Statistik: Kruskal-Wallis-Test (ANOVA on Ranks).

In der kumulierten Anzahl der innerhalb von 90 Minuten gebildeten DNA-Filamente (Abbildung 40) zeigten sich signifikant höhere Werte (*, $p = 0,024$) bei den unbeschichteten Gasfasern mit 20,0 [13,0-38,5] Filamenten in Relation zu den PLS-Gasfasern mit 7,0 [2,5-9,5] Filamenten und den Nautilus-Gasfasern mit 3,0 [1,5-6,5] Filamenten. Die Anzahl der Filamente stromabwärts hinter Hilite-Gasfasern mit 5,0 [2,5-10,5] Filamenten und EOS-Gasfasern mit 11,0 [3,5-18,0] Filamenten unterschied sich nicht signifikant in der Anzahl der DNA-Filamente in Relation zu den unbeschichteten, den PLS- und Nautilus-Gasfasern.

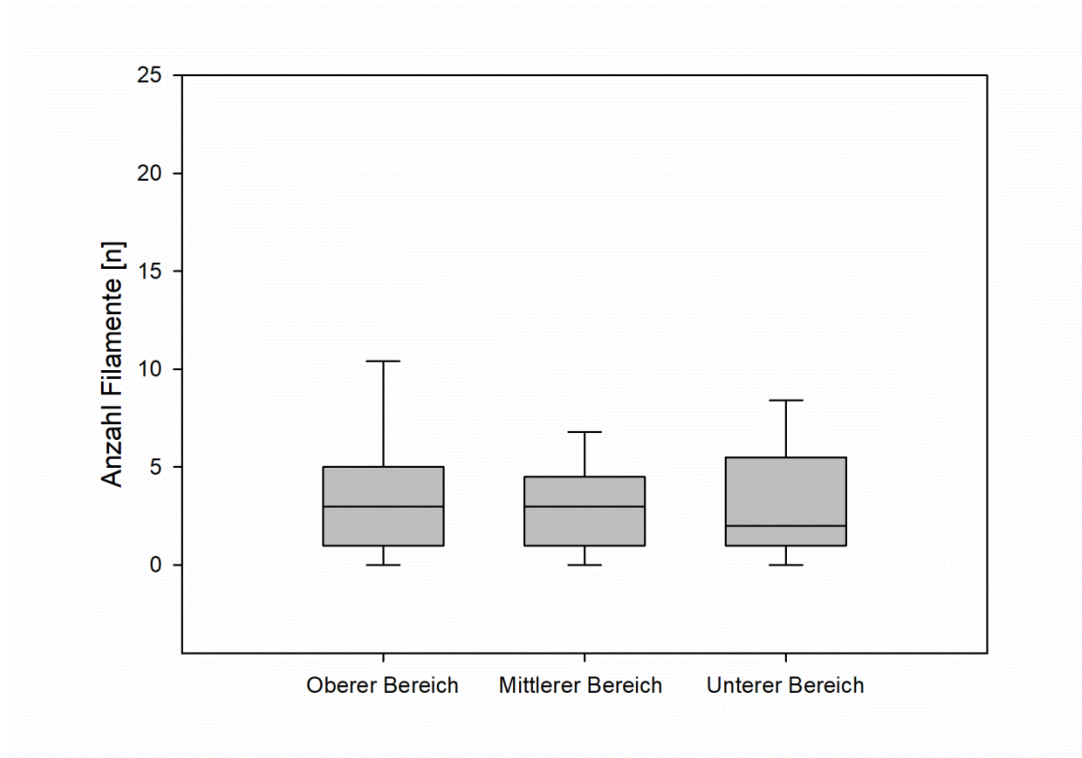


Abbildung 41: Anzahl der DNA-Filamente in Relation zum Anlagerungsbereich im Strömungskanal. Die aus 25 unabhängigen Versuchen zusammengefasste Anzahl der DNA-Filamente in den oberen, mittleren und unteren Bereichen der Gasfasern zeigte über einen Zeitraum von 90 Minuten keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,707$). Statistik: Kruskal-Wallis-Test (ANOVA on Ranks).

Die Analyse der summierten Anzahl der DNA-Filamente der unterschiedlichen Gasfaserbereiche (Abbildung 41) oberer Abschnitt mit 3,0 [1,0-5,0], mittlerer Abschnitt mit 3,0 [1,0-4,5] und unterer Abschnitt mit 2,0 [1,0-5,5] ergab über 90 Minuten keine signifikanten ($p = 0,707$) Unterschiede.

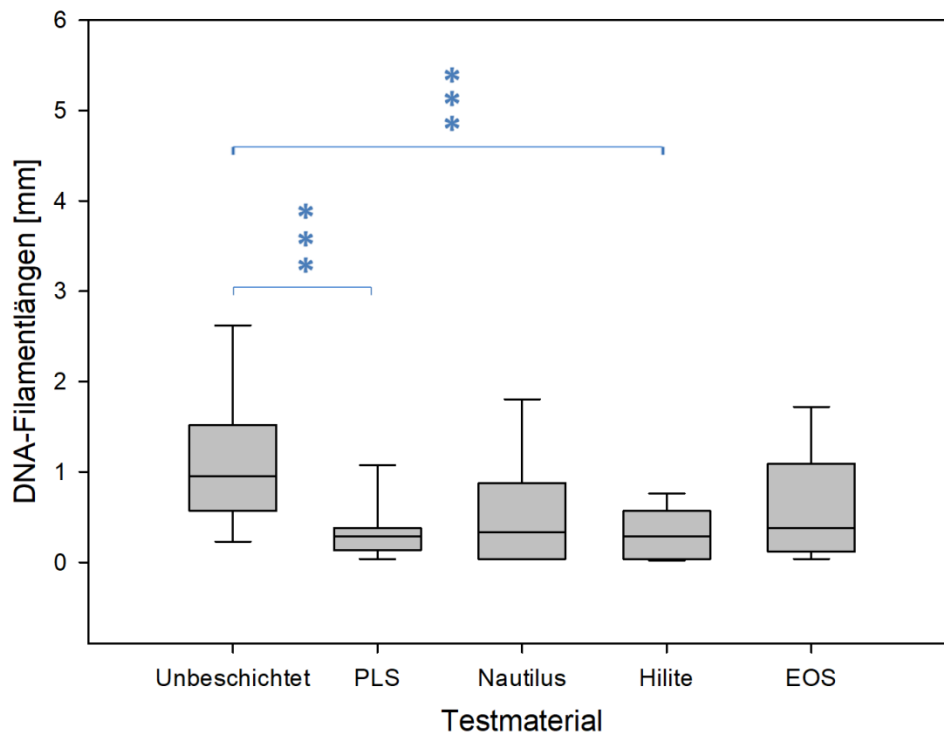


Abbildung 42: DNA-Filamentlängen.

Die Filamentlängen im Strömungsbereich hinter der Gasfaser wurden in fünf unabhängigen Versuchen analysiert. Dabei zeigte sich, dass die an Gasfasern mit Bioline-Beschichtung (PLS) bzw. X.ELLENCE-Beschichtung (Hilite) gebildeten Filamente signifikant kürzer ausfallen (***, $p < 0,001$) als jene an unbeschichteten Gasfasern. Statistik: Kruskal-Wallis-Test (ANOVA on Ranks).

Stromabwärts hinter den unbeschichteten Gasfasern zeigten sich mit 0,95 [0,57-1,52] mm signifikant (***, $p < 0,001$) längere Filamente in Relation zu den PLS-Gasfasern mit 0,29 [0,13-0,38] mm und den Hilite-Gasfasern mit 0,29 [0,04-0,57] mm (Abbildung 42). Die Filamentlänge an den Nautilus-Gasfasern mit 0,33 [0,04-0,88] mm und den EOS-Gasfasern mit 0,38 [0,12-1,09] mm unterschied sich nicht signifikant zu den alternativ beschichteten Gasfasern.

4. Diskussion

In der vorliegenden wissenschaftlichen Untersuchung wurde deutlich, dass handelsübliche bioaktive und biopassive Beschichtungen auf PMP-Gasfasern zwar nicht die Adhäsion von Granulozyten verhindern konnten, es zeigte sich jedoch eine Hemmung der „Neutrophil Extracellular Traps“-Bildung durch die Beschichtungen sowohl unter statischen als auch dynamischen Bedingungen. Dagegen blieb die Funktion der nicht-adhärenenten polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten hinsichtlich des oxidativen Bursts und der Expression von Aktivierungsmarkern nahezu unverändert.

Die gleichmäßige Adhäsion der PMNs auf den unbeschichteten und beschichteten Gasfasern geht mit klinischen Beobachtungen einher [9,13,57,58]. In den klinischen Studien wurde gezeigt, dass nach Einsatz am Patienten die Oberfläche von Gasaustauschmembranen in handelsüblichen ECMO-Oxygenatoren mit Leukozyten bedeckt waren [9,11,13,57,58]. Diese wurden nicht nur in den thrombotischen Auflagerungen, sondern insbesondere auch auf den makroskopisch nicht belegten Gasfaseroberflächenarealen nachgewiesen [12,14]. Lehle et al. [14] isolierten und charakterisierten diese Zellen, die die Eigenschaft besitzen, in endotheliale bzw. mesenchymale Zellen auszdifferenzieren. Trotz der kleinen Probenzahl wurde eine Abhängigkeit vom Oxygenatortyp und dem klinischen Hintergrund diskutiert. Die Fähigkeit zur Zellbesiedlung hängt von den Oberflächeneigenschaften der ursprünglich unbeschichteten PMP-Membran des Herstellers (OxyPlus 90/200, Membrana/3M, Obernburg, Deutschland) ab. So konnten Wiegmann et al. [59] unter in vitro Bedingungen eine vollständige Endothelialisierung von Heparin/Albumin-beschichteten PMP-GFs unter statischen und dynamischen Bedingungen nachweisen. Dies steht im Einklang mit Laluppa et al. [58], die die Adhäsion und Expansion von mononukleären Zellen des peripheren Blutes und CD34⁺ Vorläuferzellen auf PMP-Oberflächen nachwiesen. Um die in vivo Situation zu simulieren, wurden in der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit die PMP-Oberflächen mit 30 % Humanserum vorbeschichtet. Es ist mittlerweile anerkannt, dass unmittelbar nach dem Kontakt eines Biomaterials mit Blut ein breites Spektrum

an Plasmaproteinen innerhalb von Sekunden an der Oberfläche adsorbiert [32]. Zu diesen Proteinen gehören Albumin, Fibrinogen, hochmolekulares Kininogen, die Gerinnungsfaktoren XI und FXII/XIIa, Plasmaprekallikrein, Immunglobuline (IgG, IgM), Komplementproteine, Vitronectin, Fibronectin, Apolipoproteine sowie der Von-Willebrand-Faktor (vWF). Die Zusammensetzung der Proteinschicht hängt von den spezifischen Eigenschaften der Oberfläche ab und kann sich im Laufe der Zeit verändern [60,61]. Dies ist ein Ausgangspunkt für die Aktivierung verschiedener zellulärer und blutbasierter proteolytischer Kaskaden [61]. Zu den Entzündungsreaktionen gehören die materialinduzierte Aktivierung zirkulierender Granulozyten und eine verstärkte Adhäsion an der künstlichen Oberfläche [62].

Auslöser für die Leukozytenaktivierung auf Materialien sind hauptsächlich adsorbierte Proteine wie Fibrinogen, Fibronectin sowie iC3b und anhaftende Thrombozyten. Die Hochregulierung von (CD11b/CD18), die Reduktion von L-Selektin (CD62L), die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (oxidativer Burst), NE, Cathepsin G oder IL-8 sind typische Aktivierungsmarker [32]. Im Mittelpunkt steht die Expression von (CD11b/CD18), die für die Bindung an Fibrinogen bzw. dem Komplementfaktor iC3b verantwortlich gemacht wird [63]. Beide Proteine sind Bestandteil des AB-Serums, die offensichtlich auf den Oberflächen der ECMO-Materialien, unabhängig von der Beschichtungsart, adsorbierten. Eine systematische Überprüfung dieser Adsorption wurde nicht durchgeführt. Der Kontakt der isolierten Granulozyten, die im nicht-aktivierten Zustand vorlagen (geringer oxidativer Burst, mäßige Expression von (CD11b/CD18), hohe Expression von CD62L) mit unbeschichteten und beschichteten PMP-Oberflächen führte nach 3 Stunden nur bei den Wärmetauscherfasern des PLS-Systems zu einer minimalen Aktivierung der Granulozyten (CD11b+/CD62L-). Dagegen lagen die meisten der nicht-adhärenenten Zellen unabhängig vom Material in einem nicht-aktivierten Zustand (CD11b-/CD62L+) vor. Allerdings reicht offensichtlich die konstitutive Expression von (CD11b/CD18) aus, um eine Zelladhäsion an PMP-Oberflächen zu bewirken [64]. Der Aktivierungsgrad der adhärenenten Granulozyten wurde in der vorliegenden wissenschaftlichen Untersuchung nicht evaluiert. Eine erhöhte Expression von (CD11b/CD18) wurde auch in in vivo Studien nachgewiesen,

unter anderem auf der Oberfläche von Stents [65], Oxygenatoren [66] und Hämodialysemembranen [67].

Die verschiedenen Strategien der biopassiven und bioaktiven Oberflächenbeschichtungen haben das Ziel, die Thrombogenität des künstlichen Materials zu reduzieren [68]. Gepfropfte Polymerbürsten (Nautilus-Membranen), zwitterionische Beschichtungen (Phosphorylcholin, EOS-Membranen) und Heparin-Beschichtungen (PLS- und Hilitemembranen) verringerten die Fibrinogen- und Thrombozytenadhäsion. Dabei ist die klinische Wirksamkeit jedoch nicht vollständig nachgewiesen [68]. Analog zu den *in vitro* Ergebnissen der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit gab es auch in der klinischen Anwendung keine Prävalenz für eine spezifische ECMO-Oberflächenbeschichtung, die die Entwicklung einer Gerinnungsstörung, die zu einer geräteinduzierten Thrombose (z. B. Oxygenator-Thrombose) führte, reduzierte oder verhinderte [3,4]. Darüber hinaus wird die Bedeutung der Leukozyten bei der Thrombogenese häufig vernachlässigt. Wie in der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit gezeigt wurde, scheinen die Entzündungsreaktionen von den Oberflächenbeschichtungen beeinflusst zu sein und könnten daher primär für die Bildung von Thromben in den Oxygenatoren verantwortlich sein. Nur eine klinische Studie analysierte die Oberflächenbeschichtung verschiedener Gasfasern. Dropco et al. stellten eine signifikant höhere Zellakkumulation auf PLS-Gasfasern im Vergleich zu Hilite-Gasfasern von klinisch verwendeten Oxygenatoren fest [9]. Es wurden jedoch zufällig ausgewählte Proben aus den Oxygenatoren verwendet, ohne die Lage der Proben im Oxygenator oder das Vorhandensein von darüber liegenden Thromben zu berücksichtigen. Außerdem gab es ein deutliches Missverhältnis in der Anzahl der Proben für die einzelnen Oxygenator-Typen (Hilite, n=7; PLS, n=26). Dies lässt eine von der Oxygenator-Variante abhängige Leukozytenadhäsion als kausale Grundlage für die Thrombogenese fraglich erscheinen.

Auffallend war bei den durchgeführten statischen Versuchen, dass die 3-stündige Inkubation von Granulozyten auf dem Basismaterial PMP eine bis zu 83 %ige Veränderung der Kernmorphologie zur Folge hatte. Die morphologischen

Veränderungen manifestierten sich primär in einer Volumenzunahme des Zellkerns sowie in der partiellen Freisetzung nukleärer DNA. Beide zellulären Erscheinungsformen wurden während der NET-Bildung nach Stimulation der adhärennten Granulozyten mit PMA zu verschiedenen Zeitpunkten festgestellt. Die Kernschwellung wurde als Vorläuferform der NET-Bildung definiert [55]. Diese NET-Strukturen weisen eine ausgeprägte Thrombogenität [69] auf und wurden in Thromben der Koronararterien [70], in thrombosierten Stents [71] sowie in ECMO-Oxygenatoren [8] nachgewiesen. Sperling und Maitz konnten auf hydrophoben Oberflächen, wie Teflon AF und selbstorganisierten Monoschichten aus methylterminierten Alkanethiolen, eine stärkere Präsenz von NET-Verbindungen (bestehend aus DNA, citrullinierten Histonen und neutrophiler Elastase) feststellen als auf hydrophilen Materialien wie PEMA oder Polyethylen-alt-maleinsäureanhydrid [18]. Die Autoren spekulierten, dass NETs zur biomaterialinduzierten Thrombogenität beitragen könnten [18]. Inwieweit die verschiedenen Beschichtungen der PMP-Oberflächen, die die hydrophilen Eigenschaften der Oberflächen [18,72] erhöhten, ein Grund für das reduzierte Auftreten von NET-artigen Kernmorphologien waren und damit eine verbesserte Biokompatibilität definieren, kann nicht beantwortet werden [72].

In welchem Umfang die beobachteten Veränderungen der Kernmorphologie auf unbeschichteten sowie beschichteten PMP-Gasfasern auf eine NET-Induktion hinweisen, kann aus den statischen Ergebnissen nicht abschließend bestätigt werden, da nur Kernfärbungen mittels DAPI als Detektionsmarker eingesetzt wurden. Etablierte NET-Marker, wie beispielsweise CitH3 oder granuläre Enzyme wie Neutrophilenelastase oder Myeloperoxidase, wurden nicht untersucht. So könnten die veränderten Kernmorphologien auch auf den statischen Versuchsaufbau mit unphysiologischen Bedingungen durch eine serumfreie Kultivierung zurückzuführen sein. Zudem wurden isolierte PMNs verwendet, bei denen das Präparationsprotokoll, insbesondere die Zentrifugationsschritte, auch zu einer veränderten Adhäsion oder einer verminderten Funktionalität der neutrophilen Granulozyten führen könnte [73]. Die durch PMA-induzierte Reaktion belegt, dass adhärennte polymorphkernige neutrophile Granulozyten die Fähigkeit zur NETose besaßen. Diese verursachte eine

Ruptur fast aller Zellkerne. Die anschließende Behandlung mit DNase zerstörte die DNA-Grundlage der NETs, welche sich in der vollständigen Entfernung der ausgestoßenen DNA zeigte. Auch diese Beobachtung spricht für einen NETose-Prozess.

Innerhalb der im zweiten Teil der wissenschaftlichen Arbeit durchgeführten Perfusionsversuche konnte eine scherkraftabhängige DNA-Freisetzung an isolierten Gasfasern verschiedener ECMO-Membranoxygenatoren nachgewiesen werden. Diese bestätigen ebenfalls eine NET-Bildung an ECMO-Gasfasern. Dabei wurden zunächst DNA-Anlagerungen auf den Gasfasern sichtbar, die mit den geschädigten PMNs auf den Gasfasern aus den statischen Versuchen vergleichbar sein könnten. Die zusätzlichen Scherkräfte im ex vivo Perfusionsmodell lösten eine NETose aus, die sich in Form von langen DNA-Filamenten stromabwärts darstellte. In einer noch nicht publizierten Untersuchung wurde der Nachweis von DNA-Filamenten mittels CitH3-Immunfluoreszenzfärbung erbracht.

Die verschiedenen antithrombogen Oberflächenbeschichtungen führten zu einer signifikanten Verringerung der an den Gasfasern adhärierenden netotischen Zellen und den dazugehörigen DNA-Filamenten im Vergleich zum unbeschichteten Basismaterial Polymethylpenten. Auch hieraus kann ein positiver Einfluss der verschiedenen Oberflächenbeschichtungen abgeleitet werden. Denn im dynamischen Perfusionsmodell fand NETose vorwiegend auf den Gasfasern, insbesondere auf den unbeschichteten Gasfasern, statt. Damit scheinen die Oberflächenbeschichtungen nicht nur eine antithrombogene, sondern auch eine antiinflammatorische Wirkung zu besitzen. Eine Detektion dieses Effekts ist nur durch die Wechselwirkung zwischen Materialeigenschaften und applizierten Scherkräften nachweisbar.

Aktuelle klinische Untersuchungen heben die Bedeutung von NETose im Verlauf einer ECMO-Unterstützung hervor. So waren netotisch veränderte Zellkerne und zellfreie DNA im Blut von ECMO-Patienten [8,74,75] nachweisbar. Es scheint damit eine Korrelation zu existieren, die belegt, dass das verwendete dynamische

ex vivo Perfusionsmodell und der gewählte statische Ansatz die Realität widerspiegeln.

Die im Plasma klinisch detektierten NETs bei ECMO-Patienten können auch aus präexistenten, entzündungsbedingten Prozessen stammen und sind daher nicht notwendigerweise auf die ECMO-Unterstützung zurückzuführen, sondern könnten auch auf die Grunderkrankung der kritisch kranken Patienten hinweisen [75]. Besonders auffällig war auf den Gasfasern klinisch verwendeter Membranoxygenatoren der Nachweis von bis zu 15 % stark geschwollener und vollständig dekondensierter Zellkerne innerhalb der adhärenen Zellpopulation, die die gesamte Zellstruktur ausfüllten. [12]. Diese morphologischen Veränderungen des Chromatins wurden in systematischen Untersuchungen zur Wirkung von 100 nM PMA auf polymorphkernige neutrophile Granulozyten als eine mögliche Vorstufe im Prozess der NETose beschrieben [55]. Vergleichbare Beobachtungen auf den Gasfasern unterschiedlicher Membranoxygenatoren wurden in der Arbeit von Wilm et al. [13] berichtet, ohne jedoch eine Einordnung der beobachteten Zellkerne als Ausdruck von NETose vorzunehmen. Auch in der Dissertation von Felix Steinkirchner [76] wurden mittels DAPI-Färbung verschiedene Kernmorphologien nachgewiesen. Wie bereits bei Wagner et al. [12] waren auch hier große Kerne mit einer Anzahl von etwa 10-20 % und Zellen mit zerstörtem Zellkern (DNA-Netze oder DNA-Filamente) mit einer Häufigkeit von ca. 5 % detektierbar. In diesem Zusammenhang wurde in einer weiteren Dissertationsarbeit die Anzahl von NET-Strukturen (mittels Kernfärbung mit Sytoxgreen und dem Nachweis von MPO auf den DNA-Strukturen) auf Gasfasern von sechs gebrauchten PLS-Oxygenatoren untersucht. Die Ergebnisse stehen noch aus (Dissertationsarbeit von S. Waldbauer, noch nicht veröffentlicht).

Die Analyse klinisch verwendeter Membranoxygenatoren sowie experimenteller Ansätze aus Tierversuchen könnte Einblicke in den Einfluss physiologischer Parameter wie Durchblutungsbedingungen und inflammatorische Prozesse auf die NETose-Bildung gewähren. Tiermodelle zur ECMO-Unterstützung verwenden in der Regel große Tiere [8] und sind daher sehr komplex und kostspielig. Zudem sind

klinische Studien immer mit verschiedenen Einflussfaktoren, wie Grunderkrankung, Geschlecht, Gerinnungsstatus verbunden, die einen Nachweis des Zusammenhangs von NET-Bildung und Thrombose während der ECMO-Unterstützung erschweren. Dennoch könnte mit dem Nachweis von extrazellulärer DNA (cfDNA) ein Indikator gefunden sein, der auf eine Thrombogenese im ECMO-Oxygenator hinweist [8,75].

Diese Promotionsarbeit weist mehrere Einschränkungen auf. Es handelt sich um eine in vitro bzw. ex vivo Studie, bei der isolierte Granulozyten von gesunden Freiwilligen verwendet wurden. Sowohl die Isolierung als auch das Kultivierungsprotokoll könnten die Lebensfähigkeit und Funktion der Zellen beeinflussen. Darüber hinaus sollte in weitergehenden Untersuchungen unter Verwendung des ex vivo Perfusionsmodells statt der in die Strömungskammer eingeklebten Gasfasern eine Strömungskammer mit optimierten Strömungsbedingungen verwendet werden, beispielsweise eine IBIDI-Strömungskammer mit einer Kammerhöhe von 0,8 mm. Diese würde es erlauben, dass die zu untersuchenden Gasfasern durch eine Bohrung orthogonal zur Strömung in die Strömungskammer eingebracht werden könnten. Diese strömungstechnisch optimierten Strömungskammern (Labor für Biofluidmechanik der Ostbayerischen Technischen Hochschule Regensburg) stehen erst seit kurzer Zeit zur Verfügung.

In zukünftigen Studien sollte evaluiert werden, ob nach der Entwicklung neuer Oberflächen oder Oberflächenbeschichtungen nicht nur die Thrombogenität, sondern auch ihre NET-bildenden Eigenschaften verringert sind. Das verwendete ex vivo Perfusionsmodell könnte zudem die tierexperimentelle Forschung reduzieren, so dass nur noch optimierte Oberflächenmaterialien in einer solchen getestet werden müssten. Dieses könnte auch ein attraktives Konzept für alternative Antikoagulationsstrategien sein.

5. Zusammenfassung

Neutrophil Extracellular Traps (NETs) wurden in Blutproben und in zellulären Anlagerungen an Oxygenatormembranen während der extrakorporalen Membranoxygenierung (ECMO) nachgewiesen und könnten für eine Thrombogenese verantwortlich sein. Das Ziel war es, die Wirkung des Basismaterials Polymethylpenten (PMP) von Gasfaser- und Wärmeaustauschmembranen sowie verschiedener antithrombogener Beschichtungen auf isolierte Granulozyten von gesunden Probanden unter statischen und dynamischen Kulturbedingungen zu untersuchen.

Der Kontakt von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) mit Membranen aus verschiedenen ECMO-Oxygenatoren und damit unterschiedlichen Oberflächenbeschichtungen und unbeschichteten Gasfasern unter statischen Bedingungen ermöglichte den Nachweis von adhärenenten Zellen und netotischen Kernstrukturen (normal, geschwollen, rupturiert) mittels Kernfärbung. Die Durchflusszytometrie wurde verwendet, um die Zellaktivierung (CD11b/CD62L, oxidativer Burst) von nicht-adhärenenten Zellen zu identifizieren. Unbeschichtete Gasfasern dienten als Referenz. PMNs hafteten auf allen Oberflächen in gleichem Maße. Im Gegensatz dazu war das Verhältnis von netotischen zu normalen Zellen signifikant höher ($p < 0,001$) bei unbeschichteten Gasfasern (56-83 %) im Vergleich zu allen beschichteten Gasfasern (34-72 %), wobei sich kein Unterschied zwischen den verschiedenen Oberflächenbeschichtungen untereinander nachweisen ließ. Die netotischen Kerne zeigten überwiegend eine dekondensierte und damit aufgequollene Form. Im Gegensatz dazu blieben die nicht-adhärenenten Zellen im Überstand nach dem Materialkontakt vital, mit unveränderter oxidativer Burst-Funktion und gleichbleibender Expression von (CD11b/CD18) bzw. CD62L. Die Expression von Aktivierungsmarkern war unabhängig von der Beschaffenheit des Gasfasermaterials.

Aus den statischen Untersuchungen kann ein hemmender, material-induzierter Effekt der antithrombogenen Beschichtungen im Vergleich zu unbeschichteten Oberflächen hinsichtlich NET-Induktion nachgewiesen werden.

Der zusätzliche Einfluss von Scherkräften auf eine NET-Bildung an unterschiedlich beschichteten Gasfasern wurde in einem ex vivo Perfusionsmodell untersucht. Unter definierten Strömungsbedingungen konnten die Ablagerung von DNA-Aggregaten auf den Gasfasern und die Bildung von DNA-Filamenten in Flussrichtung mittels DNA-Färbung und live-cell Imaging im Strömungskanal dargestellt und quantifiziert werden. Es stellte sich eine um Faktor 5-6 signifikant höhere DNA-Freisetzung an den unbeschichteten (im Vergleich zu den beschichteten) Gasfasern heraus, was einer scherkraft-abhängigen NET-Bildung gleichzusetzen ist.

Schlussfolgernd zeigte sich eine materialinduzierte NET-Reaktion in den statischen und eine scherkraftinduzierte NET-Bildung im Perfusionsmodell. Aufgrund der hemmenden Eigenschaften der antithrombogenen Beschichtungen erwiesen sich beide Testverfahren als geeignet, um auch neue Oberflächen oder Beschichtungen für zukünftige ECMO-Systeme und langfristig implantierbare künstliche Lungen zu evaluieren.

6. Anhang

6.1 Funktionsweise des Cell Counter and Analyzer Systems

Die Technologie des Cell Counter and Analyzer Systems (CASY) basiert auf dem Prinzip der Electrical Current Exclusion (ECE), bei dem Veränderungen des elektrischen Stromflusses zur Charakterisierung suspendierter Partikel genutzt werden. Beim Transit einzelner Zellen durch eine hochpräzise definierte Messpore innerhalb eines elektrisch leitfähigen Elektrolyten wird der durch die Zelle verursachte Stromverdrängungseffekt detektiert und quantitativ ausgewertet. Zellen mit strukturell intakter, elektrisch isolierender Plasmamembran verhalten sich als nichtleitende Partikel und verdrängen den Elektrolyten proportional zu ihrem effektiven Verdrängungsvolumen. Diese volumetrisch bedingte Stromverdrängung resultiert in einem charakteristischen elektrischen Puls, dessen Amplitudenhöhe in direkter Proportionalität zur Zellgröße steht. Im Gegensatz dazu können Zellen mit kompromittierter Plasmamembran sowie nekrotische Zellen den elektrischen Strom nicht vollständig verdrängen. Ihre Detektion erfolgt daher primär auf Grundlage des verbleibenden leitfähigen Volumens, das im Wesentlichen dem Volumen des Zellkerns entspricht [77].

Die Messsignale werden mit einer zeitlichen Auflösung von 1 MHz digital verarbeitet, wobei die Pulsflächenanalyse die Signalamplitude sowie den vollständigen Pulsverlauf integriert. Dadurch entsteht eine hochauflösende quantitative Datengrundlage. Die anschließende Verarbeitung der Signalfächen im Multikanalanalysator ermöglicht eine volumenlineare und präzise Bestimmung der Partikelgrößenverteilung [78].

Aufgrund der hohen Messbereichsdynamik können Zellfragmente, vitale und nicht-vitale Einzelzellen sowie Zellaggregate simultan innerhalb einer einzigen Messung erfasst werden. Das Verfahren ist nicht-invasiv und erfordert keine Färbung mit Viabilitätsmarkern wie Trypanblau oder Propidiumiodid [79].

CASY ermöglicht eine reproduzierbare, normierte und quantitative Bestimmung von Zellkonzentration, zellulärem Volumenprofil, Aggregationsgrad und Viabilität. Das

Verfahren dient der qualitativen und quantitativen Charakterisierung von Zellpopulationen und wird vielfältig in der Toxikologie, Zellbiologie und pharmazeutischen Forschung eingesetzt [77].

6.2 Funktionsweise des Fluorescence-activated cell sorting

Ein FACS-Analysegerät ist eine Variante des Durchflusszytometers, die die Vitalität und die funktionellen Reaktionen von Granulozyten quantifizieren und charakterisieren kann. Die Zellen passieren dabei einzeln einen Laserstrahl und das gestreute oder emittierte Licht wird detektiert, um verschiedene zelluläre Eigenschaften zu erfassen. Neutrophile Granulozyten streuen einen Teil des vom Laser generierten Lichtes im FACS-Analysegerät, und dieses Streulicht wird von Photomultipliern erfasst. Das vorwärts gestreute Licht (FSC = Forward Scatter) resultiert, wenn ein Granulozyt im Strömungskanal den Lichtstrahl bricht und das Licht in flachem Winkel weiterläuft. Ein im Lichtweg positionierter Detektor erfasst das Signal, dessen Intensität mit dem Zellvolumen korreliert und somit die Quantifizierung der Partikelgröße von Zellen oder Zellfragmenten ermöglicht [80].

Das seitliche Streulicht (SSC, Sideward Scatter) entsteht, wenn der Laserstrahl durch die innere Struktur der Granulozyten abgelenkt und von einem Detektor erfasst wird, der orthogonal zur Laserstrahlachse positioniert ist. Die Signalstärke des seitlich gestreuten Lichts gibt Aufschluss über die Granularität der Zelle, insbesondere über Anzahl und Eigenschaften der intrazellulären Granula, und ermöglicht eine genaue Beurteilung ihres Aufbaus und ihrer Zusammensetzung. Zellen mit ausgeprägterer Granularität und komplexerer innerer Struktur, wie beispielsweise neutrophile Granulozyten, streuen seitlich mehr Laserlicht und erzeugen dadurch ein intensiveres Seitenstreusignal als weniger granuläre und strukturell einfache Zellen.

Durch die Anregung mit einem Laser geeigneter Wellenlänge emittieren fluoreszierende Moleküle Licht. Das Fluoreszenzsignal entsteht durch Fluoreszenzfarbstoffe oder fluoreszenzmarkierte Antikörper, die spezifisch zur Detektion der Zellen eingesetzt werden. Diese Marker binden spezifisch an bestimmte Zellstrukturen oder Oberflächenmoleküle. Der Einsatz der Farbstoffe 4',6-

Diamidin-2-phenylindol (DAPI) und Propidiumiodid (PI) ermöglicht es, die Fluoreszenzintensität quantitativ auszuwerten. Die Fluoreszenzfarbstoffe DAPI und Propidiumiodid binden an DNA, wobei DAPI an AT-reiche Bereiche der doppelsträngigen DNA bindet und Propidiumiodid zwischen die Basenpaare interkaliert. [81].

6.3 Zusätzliche Ergebnisse zu den statischen Versuchen

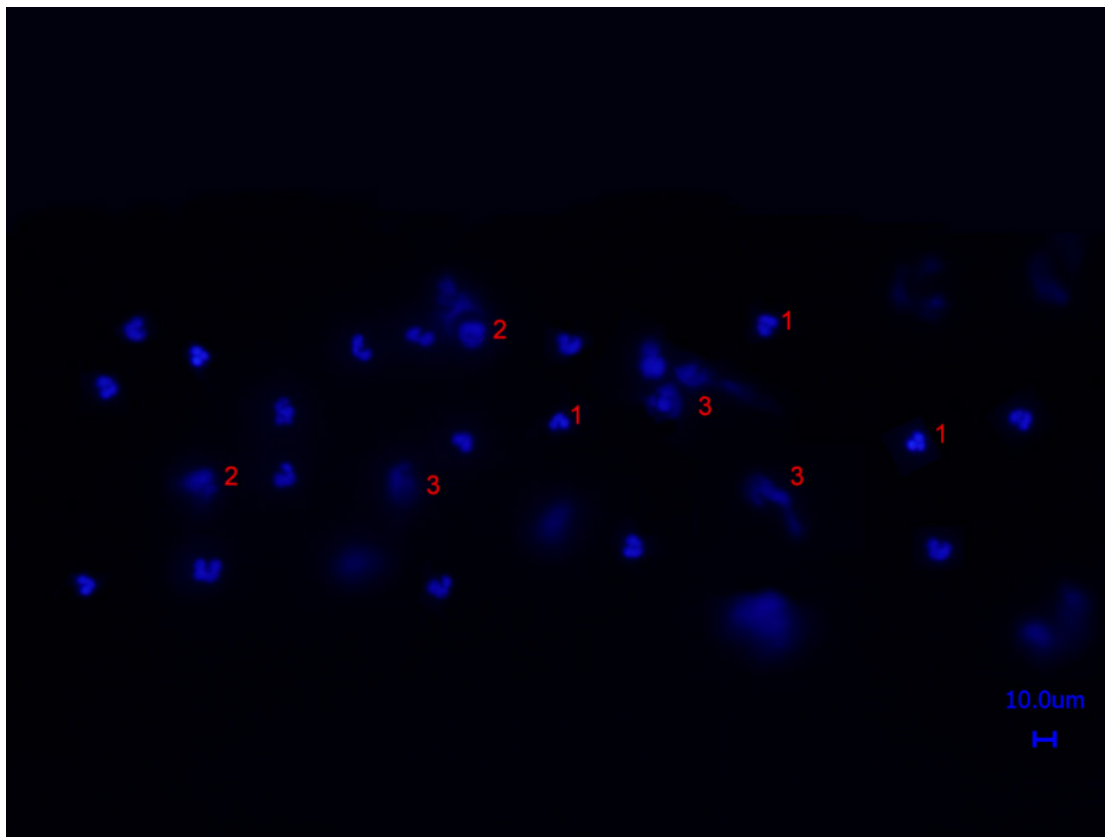


Abbildung 43: Morphologische Veränderungen auf einer Hilite-Gasfaser. Veränderte PMNs ohne morphologische Veränderungen in 200-facher Vergrößerung (1). Geschwollene neutrophile Granulozyten (2) der Phase II und solche, die kurz vor der Ruptur der Plasmamembran in Phase III standen oder in denen bereits NETose sichtbar ist (3) [46].

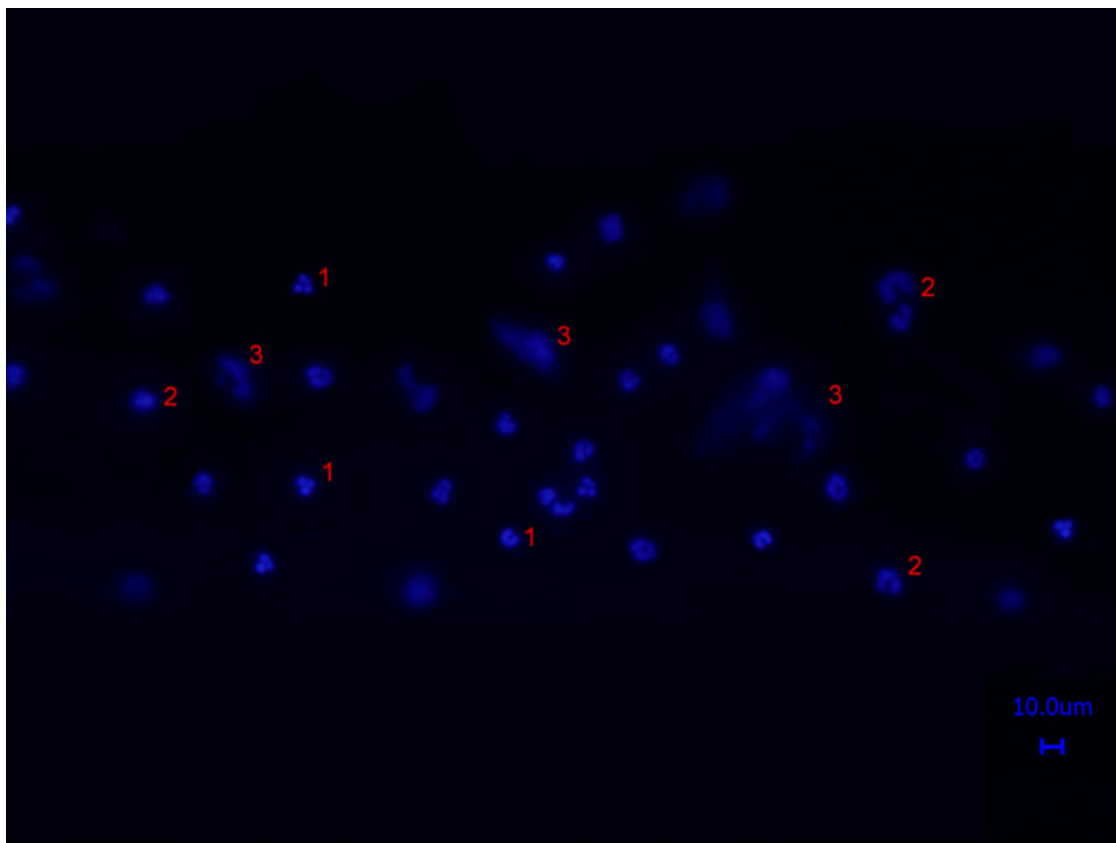


Abbildung 44: Morphologische Veränderungen auf einer Nautilus-Gasfaser. Veränderte PMNs ohne morphologische Veränderungen in 200-facher Vergrößerung (1). Geschwollene neutrophile Granulozyten (2) der Phase II und solche, die kurz vor der Ruptur der Plasmamembran in Phase III standen oder in denen bereits NETose sichtbar ist (3) [46].

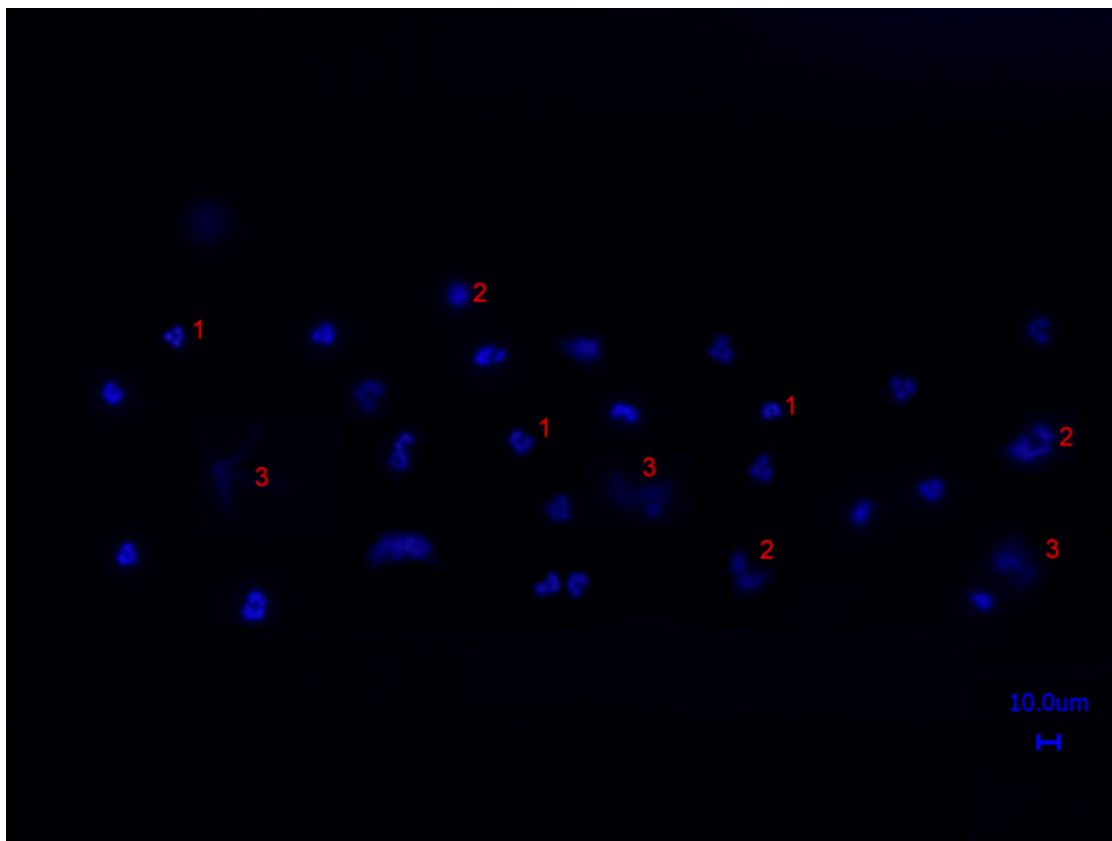


Abbildung 45: Morphologische Veränderungen auf einer EOS-Gasfaser. Veränderte PMNs ohne morphologische Veränderungen in 200-facher Vergrößerung (1). Geschwollene neutrophile Granulozyten (2) der Phase II und solche, die kurz vor der Ruptur der Plasmamembran in Phase III standen oder in denen bereits NETose sichtbar ist (3) [46].

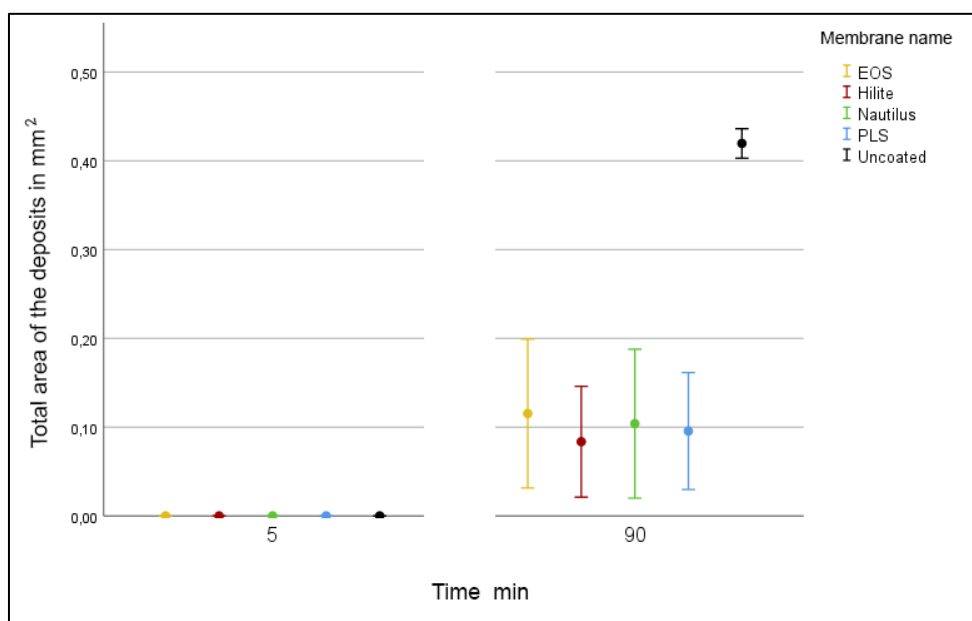


Abbildung 46: Fehlerbalken der summierten Anlagerungsflächen (Gasfasern und Filamente), basierend auf jeweils fünf unabhängigen Versuchen der verschiedene Membranoxygenatorgasfaserbeschichtungen. Statistik: Kruskal-Wallis-Test (ANOVA on Ranks).

6.4 Verbrauchsmaterialien

6.4.1 Hepes-Tyrode Puffer für statischen Versuche

Bei der Durchführung der statischen Versuche wurde Hepes-Tyrode Puffer (HTP) für die Benetzung der Oxygenatormembranen vor der Beschichtung mit 30% Humanserum, zum Verdünnen der Dapi-Lösung und anschließendem Waschen sowie zum Spülen nach der Formalin-Fixierung benötigt.

Zusammensetzung Hepes-Tyrode-Puffer:

pH 7,4; steril filtriert

	MW	g/200ml	g/1000ml	g/500ml
129 mm NaCl	58,44	1,5	7,54	3,77
9,9 mM NaHCO ₃	84,01	0,166	0,83	0,415
2,9 mM KCl	74,56	0,043	0,216	0,108
0,8 mM KH ₂ PO ₄	136,09	0,038	0,108	0,054
5,6 mM Glucose	198,17	0,2219	1,109	0,5545
10mM Hepes	238,31	0,476	2,38	1,19
(1mM MgCl ₂	203,3	0,040	0,203	0,1015)
(1mM Ca Cl ₂	110,99	0,029	0,147	0,0735)
a.d. ml		200	1000	500

CaCl₂ und MgCl₂ erst kurz vor Gebrauch zugegeben**6.4.2 HTP-BSA 0,5%**

Zum Waschen der Granulozyten nach der Auftrennung und zur Herstellung der Granulozyten-Suspension wurde HTP-BSA 0,5% (10% BSA mit Hepes-Tyrode-Puffer 1:20 verdünnt und steril filtriert) hergestellt. Dabei wurde das CaCl₂ und MgCl₂ erst kurz vor Gebrauch zugegeben.

Darüber hinaus wurde HTP-BSA 0,5% zur Benetzung der Oxygenatormembranen bzw. der Objektträger vor dem Auftragen der Granulozyten-Suspension sowie zum Waschen nach der Inkubation der Granulozyten-Suspension auf den Oxygenatormembranen und Objektträgern vor und nach der PMA-Aktivierung der neutrophilen Granulozyten und vor der Fixierung benötigt.

6.4.3 Probenvorbereitung Oxydativer-Burst

*PBS + DHR + SNARF die jeweilige Gesamtmenge vorbereiten und bereits gemischt auf die Zellen geben!

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Probe	LW	FMLP + TNF	PMA	LW	FMLP + TNF	PMA	Granulos	Granulos	Granulos	Granulos	Granulos	Granulos	Granulos	Granulos
	Granulos	Granulos	Granulos	Granulos	Granulos	Granulos	3h	3h	3h	3h	3h	3h	3h	3h
	0h	0h	0h	3h	3h	3h	PLS OM	Hilite OM	EOS OM	Nautilus OM	PMP OM	PLS WT	Hilite WT	Nautilus WT
6,6e4 Z in Ca 100µl	Granulos	Granulos*	Granulos*	Granulos*	Granulos*	Granulos*	Granulos	Granulos	Granulos	Granulos	Granulos	Granulos	Granulos	Granulos
*1000 µl +10µl DHR +SNARF-1	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
Kurz vortexen (Rack mit Proben kurz auf Vortexer stellen) 10min. bei 37°C (CO2-Inkubator) inkubieren														
10µl		TNF				TNF								
10µl		FMLP			FMLP									
10µl			PMA*			PMA*								
Kurz vortexen 20min. bei 37°C (CO2-Inkubator) inkubieren														
Proben vor Zugabe von PI auf 4°C bringen (Kühlschrank)														
10µl		PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI	PI

Reagenzien:

DHR (Dihydrorhodamin)	+1000µl PBS	1mM=100µl – 10mg/26,2ml DMF	D632 Invitrogen	
-----------------------	-------------	-----------------------------	-----------------	--

SNARF	+1000µl PBS	10µM = 1mg+1,7ml DMF	C1271 Invitrogen	
TNF-a	unverdünnt	1µg/ml in PBS+0,1%BSA	PeptoTech	
FMLP	+ 1000µl PBS	10µl 1mM = 1mg+2,3ml DMF	Sigma F3506	
PMA	+1000µl PBS	(10µl 1mM = 1mg+1,5ml DMF	Sigma P8139	kurz vorher zugeben, da nur 30min. haltbar!
PI (Propidiumiodid)	gebrauchsfertig		P1304MP Invitrogen	

7. Literaturverzeichnis

References

1. Bernhardt AM, Schrage B, Schroeder I, Trummer G, Westermann D, Reichenspurner H. Extracorporeal Membrane Oxygenation. *Dtsch Arztebl Int.* 2022; 119:235–44. doi: 10.3238/arztebl.m2022.0068 PMID: 35037618.
2. Herrmann J, Schade J, Meybohm P, Paschke N, Hübsch ME, Notz Q, et al. Impact of bleeding and thrombosis on outcome of 945 COVID-19 VV-ECMO cases from a German registry. *Front Med (Lausanne).* 2025; 12:1649217. Epub 2025/08/20. doi: 10.3389/fmed.2025.1649217 PMID: 40909455.
3. 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. *Artif Organs.* 2022; 46:1669–81. Epub 2022/03/03. doi: 10.1111/aor.14218 PMID: 35192198.
4. Lubnow M, Philipp A, Foltan M, Bull Enger T, Lunz D, Bein T, et al. Technical complications during veno-venous extracorporeal membrane oxygenation and their relevance predicting a system-exchange--retrospective analysis of 265 cases. *PLoS One.* 2014; 9:e112316. Epub 2014/12/02. doi: 10.1371/journal.pone.0112316 PMID: 25464516.
5. Allen S, Holena D, McCunn M, Kohl B, Sarani B. A review of the fundamental principles and evidence base in the use of extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) in critically ill adult patients. *J Intensive Care Med.* 2011; 26:13–26. doi: 10.1177/0885066610384061 PMID: 21262750.
6. Lehle K, Philipp A, Gleich O, Holzamer A, Müller T, Bein T, et al. Efficiency in extracorporeal membrane oxygenation-cellular deposits on polymethylpentene membranes increase resistance to blood flow and reduce gas exchange

- capacity. *ASAIO J.* 2008; 54:612–7. doi: 10.1097/MAT.0b013e318186a807 PMID: 19033775.
7. Philipp A, Somer F de, Foltan M, Bredthauer A, Krenkel L, Zeman F, et al. Life span of different extracorporeal membrane systems for severe respiratory failure in the clinical practice. *PLoS One.* 2018; 13:e0198392. Epub 2018/06/01. doi: 10.1371/journal.pone.0198392 PMID: 29856834.
 8. 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; 221:173–82. Epub 2022/11/05. doi: 10.1016/j.thromres.2022.10.019 PMID: 36402603.
 9. Dropco I, Philipp A, Foltan M, Lunz D, Lubnow M, Lehle K. Extended Cellular Deposits on Gas Exchange Capillaries Are Not an Indicator of Clot Formation: Analysis of Different Membrane Oxygenators. *ASAIO J.* 2023; 69:e134-e141. Epub 2023/02/13. doi: 10.1097/MAT.0000000000001892 PMID: 36780695.
 10. Beely BM, Campbell JE, Meyer A, Langer T, Negaard K, Chung KK, et al. Electron Microscopy as a Tool for Assessment of Anticoagulation Strategies During Extracorporeal Life Support: The Proof Is on the Membrane. *ASAIO J.* 2016; 62:525–32. doi: 10.1097/MAT.0000000000000394 PMID: 27258220.
 11. 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. *Artif Organs.* 2019; 43:1065–76. Epub 2019/07/30. doi: 10.1111/aor.13513 PMID: 31192471.
 12. Wagner MS, Kranz M, Krenkel L, Pointner D, Foltan M, Lubnow M, et al. Computer based visualization of clot structures in extracorporeal membrane oxygenation and histological clot investigations for understanding thrombosis in membrane lungs. *Front Med.* 2024; 11. doi: 10.3389/fmed.2024.1416319.

13. Wilm J, Philipp A, Müller T, Bredthauer A, Gleich O, Schmid C, et al. Leukocyte Adhesion as an Indicator of Oxygenator Thrombosis During Extracorporeal Membrane Oxygenation Therapy. *ASAIO J.* 2018; 64:24–30. doi: 10.1097/MAT.0000000000000586 PMID: 28475562.
14. Lehle K, Friedl L, Wilm J, Philipp A, Müller T, Lubnow M, et al. Accumulation of Multipotent Progenitor Cells on Polymethylpentene Membranes During Extracorporeal Membrane Oxygenation. *Artif Organs.* 2016; 40:577–85. Epub 2015/10/29. doi: 10.1111/aor.12599 PMID: 26510997.
15. Kapoor S, Opneja A, Nayak L. The role of neutrophils in thrombosis. *Thromb Res.* 2018; 170:87–96. Epub 2018/08/09. doi: 10.1016/j.thromres.2018.08.005 PMID: 30138777.
16. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004; 303:1532–5. doi: 10.1126/science.1092385 PMID: 15001782.
17. Bont CM de, Boelens WC, Pruijn GJM. NETosis, complement, and coagulation: a triangular relationship. *Cell Mol Immunol.* 2019; 16:19–27. Epub 2018/03/23. doi: 10.1038/s41423-018-0024-0 PMID: 29572545.
18. Sperling C, Fischer M, Maitz MF, Werner C. Neutrophil extracellular trap formation upon exposure of hydrophobic materials to human whole blood causes thrombogenic reactions. *Biomater Sci.* 2017; 5:1998–2008. doi: 10.1039/c7bm00458c PMID: 28745733.
19. Stryer L, Berg Jeremy, Tymoczko J, Gatto Gregory, editors. *Stryer Biochemie.* 8th ed. Springer Spektrum; 2018.
20. Brandes R, Lang F, Schmidt RF, editors. *Physiologie des Menschen.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2019.
21. Lüllmann-Rauch R, Asan E, editors. *Taschenlehrbuch Histologie.* Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2024.

22. Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S, Klinker R, Bleich M, Draguhn A, et al., editors. Physiologie. 10th ed. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 2023.
23. Summers, C., Rankin, S. M., Condliffe, A. M., Singh, N., Peters, A. M. Neutrophil kinetics in health and disease. Trends Immunol,. 2010; 31(8):318–24.
doi: 10.1016/j.it.2010.05.006.
24. Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin. J Cell Biol. 2012; 198:773–83.
doi: 10.1083/jcb.201203170 PMID: 22945932.
25. Ivetic A, Hoskins Green HL, Hart SJ. L-selectin: A Major Regulator of Leukocyte Adhesion, Migration and Signaling. Front Immunol. 2019; 10:1068. Epub 2019/05/14. doi: 10.3389/fimmu.2019.01068 PMID: 31139190.
26. Kishimoto TK, Jutila MA, Berg EL, Butcher EC. Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. Science. 1989; 245:1238–41. doi: 10.1126/science.2551036 PMID: 2551036.
27. Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Koch H-G, editors. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2022.
28. Lukácsi S, Gerecsei T, Balázs K, Francz B, Szabó B, Erdei A, et al. The differential role of CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) in the adherence, migration and podosome formation of human macrophages and dendritic cells under inflammatory conditions. PLoS One. 2020; 15:e0232432. Epub 2020/05/04. doi: 10.1371/journal.pone.0232432 PMID: 32365067.
29. Schittenhelm L, Hilken CM, Morrison VL. β 2 Integrins As Regulators of Dendritic Cell, Monocyte, and Macrophage Function. Front Immunol. 2017; 8:1866. Epub 2017/12/20. doi: 10.3389/fimmu.2017.01866 PMID: 29326724.
30. Qiu X, Li J, Yang X, Tang J, Shi J, Tong Y, et al. Is neutrophil CD11b a special marker for the early diagnosis of sepsis in neonates? A systematic review and

- meta-analysis. *BMJ Open*. 2019; 9:e025222. Epub 2019/05/01. doi: 10.1136/bmjopen-2018-025222 PMID: 31048432.
- 31.** Weirich E, Rabin R, Maldonado Y, Modler Siv. Neutrophil CD11b expression as a diagnostic marker for early-onset neonatal infection. *J Pediatr*; 1998:445-51. doi: 10.1016/s0022-3476(98)70018-6.
- 32.** Gorbet MB, Sefton MV. Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. *Biomaterials*. 2004; 25:5681–703. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.01.023 PMID: 15147815.
- 33.** Rousseau Y, Carreno M-P, Poignet J-L, Kazatchkine M, Hae!ner-Cavaillon N. Dissociation between complement activation, integrin expression and neutropenia during hemodialysis. *Biomaterials*. 1999:1959–67.
- 34.** Finn A, Moat N, Rebuck N, Klein, N, Strobel, S, Elliott M. Changes in neutrophil CD11b/CD18 and I -selectin expression and release of interleukin 8 and elastase in paediatric cardiopulmonary bypass. *Agents Actions*. 1993.
- 35.** Videm V. Endpoint-attached heparin blocks neutrophil sticking and spreading. *Biomaterials*. 2004; 25:43–51. doi: 10.1016/S0142-9612(03)00470-8.
- 36.** Diamond M, Alon R, Parkos C, Quinn M, Springer Timothy. Heparin Is an Adhesive Ligand for the Leukocyte Integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J Cell Biol*. 1995:1473–82.
- 37.** Borowiec J, Bylock A, van der Linden J, Thelin S. Heparin Coating Reduces Blood Cell Adhesion to Arterial Filters During Coronary Bypass: A Clinical Study. A Clinical Study. *Ann Thorac Surg*. 1993:1540–5.
- 38.** Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*. 2007; 176:231–41. Epub 2007/01/08. doi: 10.1083/jcb.200606027 PMID: 17210947.

- 39.** Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol.* 2018; 18:134–47. Epub 2017/10/09. doi: 10.1038/nri.2017.105 PMID: 28990587.
- 40.** Abaricia JO, Farzad N, Heath TJ, Simmons J, Morandini L, Olivares-Navarrete R. Control of innate immune response by biomaterial surface topography, energy, and stiffness. *Acta Biomater.* 2021; 133:58–73. Epub 2021/04/18. doi: 10.1016/j.actbio.2021.04.021 PMID: 33882355.
- 41.** Vitkov L, Krautgartner W-D, Obermayer A, Stoiber W, Hannig M, Klappacher M, et al. The initial inflammatory response to bioactive implants is characterized by NETosis. *PLoS One.* 2015; 10:e0121359. Epub 2015/03/23. doi: 10.1371/journal.pone.0121359 PMID: 25798949.
- 42.** Bieber S, Muczynski KA, Lood C. Neutrophil Activation and Neutrophil Extracellular Trap Formation in Dialysis Patients. *Kidney Med.* 2020; 2:692-698.e1. Epub 2020/09/22. doi: 10.1016/j.xkme.2020.06.014 PMID: 33319194.
- 43.** Nakayama M, Miyakawa H, Ohama K, Kimura H. A Critical Role of Neutrophil-Driven Amplification of Chronic Microinflammation in the Biocompatibility of Hemodialysis. 2025.
- 44.** Willers A, Arens J, Mariani S, Pels H, Maessen JG, Hackeng TM, et al. New Trends, Advantages and Disadvantages in Anticoagulation and Coating Methods Used in Extracorporeal Life Support Devices. *Membranes (Basel).* 2021; 11. Epub 2021/08/12. doi: 10.3390/membranes11080617 PMID: 34436380.
- 45.** Zhang M, Pauls JP, Bartnikowski N, Haymet AB, Chan C, Suen JY, et al. Anti-thrombogenic Surface Coatings for Extracorporeal Membrane Oxygenation: A Narrative Review. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2021:4402–19. doi: 10.1021/acsbomaterials.1c00758.
- 46.** Foltan M, Dinh D, Gruber M, Müller T, Hart C, Krenkel L, et al. Incidence of neutrophil extracellular traps (NETs) in different membrane oxygenators: pilot in

- vitro experiments in commercially available coated membranes. *J Artif Organs*. 2025. Epub 2025/01/08. doi: 10.1007/s10047-024-01486-4 PMID: 39775204.
47. Brash JL, Uniyal S. Dependence of albumin–fibrinogen simple and competitive adsorption on surface properties of biomaterials. *J polym sci., C Polym symp*. 1979; 66:377–89. doi: 10.1002/polc.5070660135.
48. Chuang HY, King WF, Mason RG. Interaction of plasma proteins with artificial surfaces: protein adsorption isotherms. *J Lab Clin Med*. 1978; 92:483–96.
49. Coleman RW, Clowes AW, George JN, Hirsh J, Marder V. Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Clinical Practice, Fourth Edition. Robert W. Colman, Jack Hirsh, Victor J. Marder, Alexander W. Clowes, and James N. George, eds. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001, 1578 pp., \$249.00, hardcover. ISBN 0-7817-1455-9. *Clinical Chemistry*. 2003; 49:345-a-346. doi: 10.1373/49.2.345/-a.
50. Charef S, Tapon-Bretonnière J, Fischer AM, Pflüger F, Jozefowicz M, Labarre D. Heparin-like functionalized polymer surfaces: discrimination between catalytic and adsorption processes during the course of thrombin inhibition. *Biomaterials*. 1996; 17:903–12. doi: 10.1016/0142-9612(96)83286-8 PMID: 8718936.
51. Silver JH, Hart AP, Williams EC, Cooper SL, Charef S, Labarre D, et al. Anticoagulant effects of sulphonated polyurethanes. *Biomaterials*. 1992; 13:339–44. doi: 10.1016/0142-9612(92)90037-o PMID: 1610956.
52. Grasel TG, Cooper SL. Properties and biological interactions of polyurethane anionomers: effect of sulfonate incorporation. *J Biomed Mater Res*. 1989; 23:311–38. doi: 10.1002/jbm.820230304 PMID: 2715157.
53. Tanzi MC. Bioactive technologies for hemocompatibility. *Expert Rev Med Devices*. 2005; 2:473–92. doi: 10.1586/17434440.2.4.473 PMID: 16293086.

54. Vertellus Biomaterials. PC coatings improve the biocompatibility of medical devices. 2024 [cited 1 Jul 2024]. Available from: <https://www.medicaldevice-network.com/contractors/material-solutions/vertellus-bio/>.
55. Neubert E, Meyer D, Rocca F, Günay G, Kwaczala-Tessmann A, Grandke J, et al. Chromatin swelling drives neutrophil extracellular trap release. *Nat Commun*. 2018; 9:3767. Epub 2018/09/14. doi: 10.1038/s41467-018-06263-5 PMID: 30218080.
56. S. Klaus, S. Körfer, K. Mottaghy, H. Reul, B. Glasmacher. In Vitro Blood Damage by High Shear Flow: Human versus Porcine Blood. *The International Journal of Artificial Organs*. 2002:306–12.
57. Doyle AJ, Hunt BJ. Current Understanding of How Extracorporeal Membrane Oxygenators Activate Haemostasis and Other Blood Components. *Front Med (Lausanne)*. 2018; 5:352. Epub 2018/12/12. doi: 10.3389/fmed.2018.00352 PMID: 30619862.
58. Laluppa JA, McAdams TA, Papoutsakis ET, Miller WM. Culture materials affect ex vivo expansion of hematopoietic progenitor cells. *J Biomed Mater Res*. 1997; 36:347–59. doi: 10.1002/(sici)1097-4636(19970905)36:3<347::aid-jbm10>3.0.co;2-b.
59. Wiegmann B, Seggern H von, Höffler K, Korossis S, Dipresa D, Pflaum M, et al. Developing a biohybrid lung - sufficient endothelialization of poly-4-methyl-1-pentene gas exchange hollow-fiber membranes. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2016; 60:301–11. Epub 2016/02/11. doi: 10.1016/j.jmbbm.2016.01.032 PMID: 26919566.
60. Vroman L, Adams AL, Fischer GC, Munoz PC. Interaction of high molecular weight kininogen, factor XII, and fibrinogen in plasma at interfaces. *Blood*. 1980; 55:156–9. doi: 10.1182/blood.V55.1.156.156.
61. Brash JL, Horbett TA, Latour RA, Tengvall P. The blood compatibility challenge. Part 2: Protein adsorption phenomena governing blood reactivity. *Acta Biomater*.

- 2019; 94:11–24. Epub 2019/06/18. doi: 10.1016/j.actbio.2019.06.022 PMID: 31226477.
- 62.** 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; 94:25–32. Epub 2019/06/19. doi: 10.1016/j.actbio.2019.06.020 PMID: 31226478.
- 63.** Wright S, Weitz JI, Huang A, Levin S, Silverstein S, Loike John. polymorphonuclear leukocytes recognizes fibrinogen Complement receptor type three CD11b/CD18) of human. 1988; 20:7734–8. doi: 10.1073/pnas.85.20.7734.
- 64.** Cai T-Q, Wright S. Human Leukocyte Elastase Is an Endogenous Ligand for the Integrin CR3 (CD11b/CD18, Mac-I, c~[32) and Modulates Polymorphonuclear Leukocyte Adhesion. *J. Exp. Med.* 1996:1213–23.
- 65.** Serruys PW, Strauss BH, van Beusekom HM, van der Giessen WJ. Stenting of coronary arteries: has a modern Pandora's box been opened. *J Am Coll Cardiol.* 1991; 17:143B-154B. doi: 10.1016/0735-1097(91)90951-5 PMID: 2016472.
- 66.** Jobes DR. Safety issues in heparin and protamine administration for extracorporeal circulation. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 1998; 12:17–20.
- 67.** Grooteman 1997 Mechanisms of intra-dialyser granulocyte activation a sequential dialyser elution study.
- 68.** Hong JK, Waterhouse A. Bioinspired Approaches to Engineer Antithrombogenic Medical Devices for Vascular Intervention. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2023; 43:797–812. Epub 2023/04/20. doi: 10.1161/ATVBAHA.122.318238 PMID: 37078288.
- 69.** Gould TJ, Vu TT, Swystun LL, Dwivedi DJ, Mai SHC, Weitz JI, et al. Neutrophil extracellular traps promote thrombin generation through platelet-dependent and platelet-independent mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;

- 34:1977–84. Epub 2014/07/10. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.304114 PMID: 25012129.
- 70.** Stakos DA, Kambas K, Konstantinidis T, Mitroulis I, Apostolidou E, Arelaki S, et al. Expression of functional tissue factor by neutrophil extracellular traps in culprit artery of acute myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2015; 36:1405–14. Epub 2015/02/07. doi: 10.1093/eurheartj/ehv007 PMID: 25660055.
- 71.** Riegger J, Byrne RA, Joner M, Chandraratne S, Gershlick AH, Berg JM ten, et al. Histopathological evaluation of thrombus in patients presenting with stent thrombosis. A multicenter European study: a report of the prevention of late stent thrombosis by an interdisciplinary global European effort consortium. *Eur Heart J.* 2016; 37:1538–49. Epub 2015/08/30. doi: 10.1093/eurheartj/ehv419 PMID: 26761950.
- 72.** Slepicka P, Kasalkova NS, Siegel J, Kolska Z, Bacakova L, Svorcik V. Nano-structured and functionalized surfaces for cytocompatibility improvement and bactericidal action. *Biotechnol Adv.* 2015; 33:1120–9. Epub 2015/01/14. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.01.001 PMID: 25596482.
- 73.** Hundhammer T, Gruber M, Wittmann S. Paralytic Impact of Centrifugation on Human Neutrophils. *Biomedicines.* 2022; 10. Epub 2022/11/11. doi: 10.3390/biomedicines10112896 PMID: 36428463.
- 74.** Haus M, Foltan M, Philipp A, Mueller T, Gruber M, Lingel MP, et al. Neutrophil extracellular traps - a potential trigger for the development of thrombocytopenia during extracorporeal membrane oxygenation. *Front Immunol.* 2024; 15:1339235. Epub 2024/02/21. doi: 10.3389/fimmu.2024.1339235 PMID: 38449869.
- 75.** Lingel MP, Haus M, Paschke L, Foltan M, Lubnow M, Gruber M, et al. Clinical relevance of cell-free DNA during venovenous extracorporeal membrane oxygenation. *Artif Organs.* 2023; 47:1720–31. Epub 2023/08/01. doi: 10.1111/aor.14616 PMID: 37525949.

- 76.** Steinkirchner Felix. Die Beteiligung von Neutrophil Extracellular Traps an der Thrombenentstehung im Membranoxygenator bei Extrakorporaler Membranoxygenierung (ECMO). ; 2023.
- 77.** OMNI Life Science GmbH. Casy Technology [cited 19 Oct 2025]. Available from: <https://www.ols-bio.com/casy-s-technology>.
- 78.** Krüger HM. Proliferationsverhalten humaner und boviner Linsenepithelzellen unter dem Einfluss von Dorzolamid und Prostaglandin F2-alpha. ; 2003.
- 79.** Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie der Universitätsmedizin Rostock. Förderung durch die Europäische Union Zellzählgerät CASY. Universitätsmedizin Rostock 2025 [cited 19 Oct 2025]. Available from: <https://strahlentherapie.med.uni-rostock.de/forschung/strahlenbiologisches-labor/gefoerderte-geraete>.
- 80.** Paulsen M, Rueda-Ordonez D, Paulsen M. Grundlagen moderner Methoden in der Durchflusszytometrie. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum; 2023.
- 81.** Tanious FA, Veal JM, Buczak H, Ratmeyer LS, Wilson WD. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites. 1992.

8. Danksagung

Zuallererst bedanke ich mich bei meiner Frau Andrea und meinen beiden Kindern Leon und Lina für ihr Verständnis meines wissenschaftlichen Engagements und meiner langen Anwesenheit im Labor an unendlich vielen dienstfreien Wochenenden.

Für die Möglichkeit, meine wissenschaftliche Arbeit in der Klinik für Herz-, Thorax- und herznahe Gefäßchirurgie zu realisieren, möchte ich Herrn Prof. Dr. Christof Schmid meinen Dank aussprechen.

Mein besonderer Dank richtet sich an Frau Prof. Dr. Karla Lehle für die engagierte Betreuung meiner Promotion sowie für die Vermittlung wertvoller Kenntnisse und Fähigkeiten im wissenschaftlichen Arbeiten.

Meinen herzlichen Dank richte ich an Frau Angelika Urbanek und Karin Hollnberger für ihre hochwertige Unterstützung bei Anleitung, Methodik und Durchführung von praktischen Fertigkeiten.

Für die fachlich fundierte und kollegiale Zusammenarbeit sowie die Erlaubnis zur Nutzung des Bildmaterials der Strömungskammersimulationen danke ich Herrn Prof. Dr.-Ing. Lars Krenkel und Herrn Dr. Michael Kranz vom Labor für Biofluidmechanik der Ostbayerischen Technischen Hochschule Regensburg.

Bei Herrn Dr. rer. nat. Michael Gruber möchte ich mich für sein tiefes Interesse an meiner Promotion und die wertvolle Förderung sowohl praxisnaher Fertigkeiten als auch methodischer Kenntnisse der wissenschaftlichen Vorgehensweise bedanken.

Frau PD Dr. Christina Hart und allen Mentoren meiner Promotion möchte ich meinen Dank für die exzellente Förderung meiner wissenschaftlichen Arbeit aussprechen.

9. Selbstständigkeitserklärung

“Ich, Maik Foltan geboren am 19.03.1968 in Seesen, 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*in oder andere Personen) in Anspruch genommen.

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

Regensburg,

Ort, Datum

eigenhändige Unterschrift
des/der Promovenden*in