

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

Interaktion von Granulozyten mit Oxygenator-Gasfasern im ECMO-Modell

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Leon Weidner

2026

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

Interaktion von Granulozyten mit Oxygenator-Gasfasern im ECMO-Modell

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Leon Weidner

2026

Dekan:

Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatterin:

Prof. Dr. Karla Lehle

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Martin Kieninger

Tag der mündlichen Prüfung:

16. Juli 2026

Zusammenfassung

Die Extracorporale Membranoxygenierung (ECMO) stellt eine lebensrettende Therapie für schwer erkrankte Patientinnen und Patienten dar. Als eine der wichtigsten Komplikationen gelten Thrombosen in den Membranoxygenatoren, bei deren Entstehung zunehmend eine Beteiligung von Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Betracht gezogen wird. Ziel dieser Arbeit war, Wechselwirkungen zwischen Polymorphkernigen Neutrophilen (PMNs) und isolierten ECMO-Oxygenator-Gasfasern unter Einwirkung verschiedener Scher- und Zentrifugationskräfte, in einem Flussmodell fluoreszenzmikroskopisch zu untersuchen.

Dazu zirkulierten zuvor aus Vollblut gesunder Spenderinnen und Spender isolierte, PMNs in einem ECMO-Oxygenator-Modell. Es bildeten sich Ablagerungen freier DNA auf den Gasfasern, die fluoreszenzmikroskopisch mit SytoxTMGreen beobachtet wurden. Die Zellen waren während der Isolierung unterschiedlichen Zentrifugationskräften, nach Hundhammer et al. definiert „*g*-times“, ausgesetzt (1). Die an den Gasfasern abgelagerte DNA wurde *g*-time und zirkulationszeitabhängig hinsichtlich der sichtbaren Flächen ausgewertet und statistisch verglichen. Zusätzlich wurden zirkulierende Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

Alle eingesetzten Zellen zeigten im Versuchsverlauf eine DNA-Freisetzung an den Gasfasern in Form von DNA-Ablagerungen auf und als DNA-Fäden stromab der Gasfasern. Das vorausgehende Einwirken erhöhter *g*-time führte dabei zu signifikant früherer Freisetzung der DNA-Ablagerungen ($p < 0.001$) und DNA-Fäden ($p = 0.011$). Auch die maximale Fläche der DNA-Fäden war durch das Einwirken gesteigerter *g*-time erhöht ($p = 0.09$). Das Einwirken erhöhter Scherkräfte während der Zirkulation führte ebenfalls zu einer früheren Freisetzung der DNA-Ablagerungen und der DNA-Fäden. Die maximale Fläche der DNA-Ablagerungen und DNA-Fäden nahm mit steigenden Scherkräften ab. Zusätzlich konnten Aussagen über die Strömungsverhältnisse an der Gasfaser sowie die Veränderung der eingesetzten Zellen mittels Durchflusszytometrie getroffen werden.

Zusammenfassend konnte in dem in vitro ECMO-Oxygenator-Modell die Freisetzung von DNA an einer isolierten Gasfaser gezeigt werden. Dabei führt sowohl der Einfluss erhöhter Zentrifugationskräfte bei der Zellisolation als auch der Einfluss erhöhter Scherkräfte während der Zirkulation zu einer deutlich beschleunigten DNA-Freisetzung von PMNs an der Gasfaser.

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	5
1.1	Aufbau der ECMO	5
1.1.1	Membranoxygenator	6
1.1.2	Gerinnungsmanagement während der ECMO-Therapie	6
1.2	Komplikationen der ECMO-Therapie	7
1.2.1	Thrombenbildung innerhalb des Membranoxygenators.....	7
1.3	NETose und ihr Einfluss auf die Gerinnung	8
1.3.1	Neutrophil Extracellular Traps	8
1.3.2	Zusammenhang zwischen NETs und Thrombosen	9
1.3.3	Wechselwirkungen zwischen PMNs und Scherkräften.....	9
1.3.4	Wechselwirkungen zwischen NETs, Gerinnung und hydrophoben Biomaterialien	10
1.4	NETs und Thrombosen in Membranoxygenatoren	10
2	Fragestellung und Studienplanung	12
2.1	Fragestellung	12
2.2	Studienplanung.....	12
3	Material und Methode	16
3.1	Erster experimenteller Teil	16
3.1.1	Studiengruppen.....	16
3.2	Zweiter experimenteller Teil	17
3.2.1	Studiengruppen.....	17
3.3	Versuchsreihe Durchflusszytometrie	17
3.4	Blutentnahme.....	17
3.5	Leukozytenisolation	18
3.6	Herstellung der Strömungskammer und verwendete Gasfasern für das ECMO-Modell	19
3.7	Perfusionsmodell	22
3.8	Verwendetes Mikroskop, Farbstoffe und Zellfärbung	25
3.9	Fluoreszenzmikroskopie.....	27
3.10	Bildverarbeitung und Auswertung	27
3.11	Statistik.....	30
3.12	Durchflusszytometrie	31
4	Ergebnisse	33
4.1	Nachweis von DNA-Strukturen an den Gasfasern mittels Kernfarbstoff	33
4.1.1	Nachweis von freier DNA an der Gasfaser mittels DNase	33
4.2	Teil 1: Einfluss des Isolationsverfahrens von Granulozyten auf die Bildung Scherkraft-abhängiger DNA-Strukturen an Gasfasern.....	34
4.2.1	Visualisierung von DNA-Strukturen von unterschiedlich präparierten Granulozyten	34
4.2.2	Unterschiede in der Bildungsgeschwindigkeit von DNA-Ablagerungen und DNA-Fäden in Abhängigkeit von der Studiengruppe	38
4.2.3	Unterschiede in der maximalen Fläche der DNA-Fäden	40

4.3	Teil 2: Einfluss vom Volumenstrom auf Granulozyten bei der Bildung von DNA-Strukturen an Gasfasern im Perfusionsmodell	41
4.3.1	Visualisierung von DNA-Strukturen bei verschiedenen Volumenströmen	41
4.3.2	Unterschiede in der Bildungsgeschwindigkeit der DNA-Ablagerungen und DNA-Fäden bei verschiedenen Scherkräften im Perfusionssystem.....	43
4.3.3	Einfluss von unterschiedlichen Volumenströmen auf die maximale Flächensumme der DNA-Ablagerungen und DNA-Fäden	45
4.4	Ablagerung vitaler Zellen an der Gasfaser.....	47
4.5	Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messungen	49
4.5.1	Zellzahl vitaler Zellen	49
4.5.2	Zellgröße	51
4.5.3	Zellgranularität	53
4.6	Einfluss einer schonenden Isolationsmethode von Granulozyten auf die DNA-Freisetzung an Gasfasern im Perfusionsmodell	54
5	Diskussion	56
5.1	An der Gasfaser lagerte sich freie DNA in Form von DNA-Ablagerungen und DNA-Fäden ab	56
5.2	Zentrifugation bei der Zellpräparation führt zu schnellerer und stärkerer DNA-Freisetzung	58
5.3	Scherkräfte im ECMO-Modell haben Einfluss auf die Menge und Geschwindigkeit der DNA-Freisetzung	60
5.4	Anwendung auf den klinischen ECMO-Einsatz	61
6	Zusammenfassung	63
7	Anhang	64
7.1	Manuskript und Poster.....	64
7.2	Verwendete Materialien und Hilfsmittel.....	64
7.2.1	Hilfsmittel, Analysegeräte und Software	64
7.2.2	Einwegmaterialien.....	65
7.2.3	Reagenzien und Farbstoffe	65
7.3	Abkürzungsverzeichnis	66
7.4	Abbildungsverzeichnis	66
7.5	Tabellenverzeichnis.....	69
7.6	Formelverzeichnis	70
8	Literaturverzeichnis.....	71
9	Danksagung	79
10	Lebenslauf	80
11	Erklärung	81

1 Einleitung

Die Extracorporale Membranoxygenierung (ECMO) stellt eine wichtige Behandlung für schwere Krankheitsbilder wie Herz-Kreislaufversagen oder das Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) dar (2,3). Auch wenn diese hochtechnisierte Behandlung vielfältige Möglichkeiten und Chancen für kritisch kranke Patientinnen und Patienten bietet, ist sie sehr komplikationsträchtig. Zu den wichtigsten Komplikationen zählen Blutungen und Thrombosen, die sowohl in Patientinnen und Patienten als auch im extracorporalen Teil des Systems auftreten können. Thrombenbildungen in den Blutpumpen und den Membranoxygenatoren, finden sich in etwa einem Drittel aller behandelten Patientinnen und Patienten wobei der Anteil bei COVID-19-erkrankten Patientinnen und Patienten während ECMO-Therapie noch höher liegt (4–6).

Ursächlich für die Thrombenbildung könnten Fremdkörperreaktionen zwischen Blut und der großen Kunststoffoberfläche des Membranoxygenators oder das Einwirken hoher Scherkräfte sein. Als möglicher Mechanismus wird dabei die Bildung von Neutrophil Extracellular Traps (NETs, NETose) diskutiert, die in Zusammenhang mit Thrombenbildungen stehen soll (7,8).

1.1 Aufbau der ECMO

Die Funktionsweise einer ECMO besteht darin, dass venöses Blut über eine Kanüle aus Patientinnen und Patienten entnommen und dann durch einen Membranoxygenator (MO) gepumpt wird, um das Blut mit Sauerstoff anzureichern und zu dekarbonisieren. Das Blut wird daraufhin entweder arteriell oder venös in den Körperkreislauf zurückgegeben.

Es besteht die Möglichkeit, eine ECMO als Venovenöses (VV) oder Venoarterielles (VA) System (Extracorporal Life Support (ECLS)) an Patientinnen und Patienten einzusetzen (9). So ersetzt das VV-System nur die Lunge und wird benutzt, um das Blut der Patientinnen und Patienten mit Sauerstoff anzureichern und zu dekarbonisieren, während das VA-System zusätzlich zur Lunge auch die Pumpfunktion des Herzens ersetzen kann. Das Blut wird dabei über Kanülen von Patientinnen und Patienten entnommen, die an große Gefäße angeschlossen werden. Für den Transport des Blutes im System sorgt eine Pumpe, wobei bei vielen ECMO-Systemen für einen kontinuierlichen Blutfluss Zentrifugalpumpen zum Einsatz kommen. Für den Gasaustausch sorgt ein Membranoxygenator (siehe auch 1.1.1).

1.1.1 Membranoxygenator

Es gibt unterschiedliche Modelle von Membranoxygenatoren (Tabelle 1). Je nach Hersteller unterscheiden sich die Membranoxygenatoren in Aufbau (gestapelte oder gewundene Fasermatten), Gasaustauschfläche (1.2 bis 1.9 m²) und Beschichtung (z. B. Albumin/Heparin, Polyethylenoxide, Phosphorylcholin).

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

Tabelle 1: Gasfaser-Oberflächenbeschichtungen und Wärmetauschermaterialien der im Handel erhältlichen ECMO-Membranoxygenatoren. Das Grundlagematerial aller beschichteten oder unbeschichteten Gasaustauschflächen besteht aus Polymethylpentene (PMP) (10).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein unbenutzter PLS-Membranoxygenator verwendet. Dieser besteht aus rechtwinklig übereinander geschichteten Fasermatten (97 Gasaustauschfasermatten aus Poly 4-methyl 1-penten (PMP) und 22 Wärmeaustauschfasermatten) (Tabelle 1). Das Lumen der Gasfasern wird von Sauerstoff durchflossen, während die ungefähr 21000 Gasfasern des Oxygenators von außen mit Blut umspült werden. Die Anpassung des Gasflusses und des Sauerstoffgehaltes am Membranoxygenator erlaubt eine Adaption an die Bedürfnisse der Patientinnen und Patienten.

1.1.2 Gerinnungsmanagement während der ECMO-Therapie

Die ECMO-Therapie erfordert ein abgestimmtes Management von Gerinnung und Antikoagulation an Patientinnen und Patienten. Dies dient dazu, thrombotischen Komplikationen innerhalb des ECMO-Systems sowie in Patientinnen und Patienten vorzubeugen und gleichzeitig die Patientinnen und Patienten vor dem Verbluten zu schützen. Grundsätzlich erfolgt dabei eine systemische Antikoagulation der Patientinnen und

Patienten und zusätzlich eine gerinnungshemmende Beschichtung der mit Blut in Kontakt tretenden Systemteile. Unfraktioniertes Heparin (UFH) stellt das am häufigsten benutzte systemische Antikoagulans während der ECMO Therapie dar, zudem werden Bivalirudin oder Argatroban genutzt (11).

1.2 Komplikationen der ECMO-Therapie

Aufgrund der systemischen Antikoagulation der Patientinnen und Patienten stellen Blutungsereignisse eine schwerwiegende Gefahr dar. Ebenfalls sehr gefürchtet sind technische Komplikationen. Darunter fallen neben Materialversagen auch thrombotische Ereignisse, die insbesondere innerhalb des Pumpenkopfes oder des Membranoxygenators auftreten. Um sie zu beheben, ist meist der Austausch des gesamten ECMO-Systems nötig. Das bedeutet für Patientinnen und Patienten ein großes Risiko, sowie einen hohen Blutverlust.

So musste in einer retrospektiven Studie aus dem Jahr 2014, in der technische Komplikationen einer VV-ECMO Behandlung untersucht wurden, bei ca. einem Drittel der Patientinnen und Patienten mindestens ein Systemwechsel während der ECMO Behandlung vorgenommen werden (5). Nur ein kleiner Anteil der Systemwechsel entfiel auf mechanisches Versagen, während der Großteil auf thrombotische Komplikationen im Zusammenhang mit dem System zurückzuführen war (5). Die thrombotischen Komplikationen äußerten sich in langsamer heranwachsenden Thromben sowie auch akuten Thrombosen am Pumpenkopf oder im Membranoxygenator, die einen notfallmäßigen Austausch des Systems nach sich zogen (5).

In einer ebenfalls retrospektiven Studie zu VV-ECMO-Therapie aus dem Jahr 2018, die Häufigkeit und Gründe für Systemwechsel bei verschiedenen Herstellern von VV-ECMO-Systemen untersuchte, musste ebenfalls bei ca. einem Drittel der Studienpopulation ein Systemwechsel erfolgen (4). Bei den Ursachen der akuten Systemwechsel entfielen wiederum 65% auf thrombotische Ereignisse entweder in der Pumpe oder im MO. Akute Wechsel aufgrund mechanischen Versagens waren in dieser Studie mit insgesamt 35% von verschiedenen Systemkomponenten verursacht (4).

1.2.1 Thrombenbildung innerhalb des Membranoxygenators

Akut auftretende oder langsam anwachsende Thromben innerhalb des Membranoxygenators sind häufig Ursache für notfallmäßige oder elektive Systemwechsel (4,5). Akute Oxygenatorthrombosen (AOT) machen einen notfallmäßigen Systemwechsel als einzige

Therapie notwendig. Doch auch eine sich langsam entwickelnde Thrombosierung des Membranoxygenators stellt eine gefürchtete Komplikation dar, da auch hier ein Systemwechsel als Therapie vorgenommen werden muss. Akute Thrombosen des Membranoxygenators können verschiedene Veränderungen des Systems hervorrufen. So wird im Allgemeinen ein plötzlicher, hoher Abfall des Druckes über dem Membranoxygenator oder ein reduzierter Blutfluss bei gleicher Pumpgeschwindigkeit als Indikator für eine akute Membranoxygenator-Thrombose beschrieben (12,13). Indikatoren für AOT sind zudem erhöhte D-Dimere und eine allgemein verschlechterte Gasaustauschfähigkeit des Systems (5).

Bei genauerer Untersuchung thrombotischer Ablagerungen auf den Gasfasermatten gebrauchter Membranoxygenatoren konnten u. a. zelluläre Strukturen unterschiedlicher Dichte an den PMP-Gasfasern festgestellt werden (13–16). Bis zu 44% der Zellen wurden als CD45-positive Leukozyten identifiziert, die in einer Zelldichte bis hin zur Ausbildung von zellulären Pseudomembranen vorlagen (14). Der Nachweis von Änderungen in der Kernmorphologie, die sich in angeschwollenen Zellkernen sowie großflächigen DNA-Ablagerungen äußern, wird mit der Bildung von Neutrophil Extracellular Traps (NETs) verglichen und könnte ein möglicher Mechanismus der Thrombenbildung darstellen. Die Anwesenheit von Leukozyten und NETs in thrombotischen Ablagerungen gebrauchter Membranoxygenatoren stellt daher einen wichtigen Baustein für die Forschungshypothese dieser Arbeit dar.

1.3 NETose und ihr Einfluss auf die Gerinnung

1.3.1 Neutrophil Extracellular Traps

Neutrophil Extracellular Traps beschreiben die Fähigkeit Polymorphkerniger Neutrophiler (PMNs), ein Netz aus dekondensierter DNA, dekoriert mit Proteinen und Histonen auszustoßen. Damit werden im Rahmen der Immunabwehr Pathogene angegriffen. NETs wurden erstmals im Jahr 2004 als Abwehrmaßnahme von Granulozyten gegen Bakterien beschrieben (17), inzwischen sind aber multiple Stimuli bekannt, um NETose auszulösen. Ursprünglich als Zelltodform ähnlich der Nekrose oder Apoptose beschrieben, tritt NETose zudem auch vital ohne die Lyse der Zelle auf (18).

Die Auslösung von NETose benötigt aktivierte Zellen. So wird NETose nicht bei ruhenden oder unstimulierten PMNs beobachtet (19). Die Auslösung von NETose kann mit oder ohne Beteiligung von Oberflächenrezeptoren der Zelle erfolgen (19). So ist beispielsweise die Beteiligung von Toll-like-Rezeptor 2 ebenso beschrieben wie Tumor-Nekrose-Faktor-alpha,

Interleukin-1-beta, Interleukin-8 oder Komplement-Faktor-3 (20,21). Bakterielle Toxine oder Reaktive Sauerstoff Spezies können auch ohne Rezeptorbeteiligung NETose induzieren (22,23). Dabei muss die Entwicklung von NETs nicht immer immunologisch getriggert sein, auch hohe Scherkräfte oder die Exposition gegenüber hydrophoben Biomaterialien können unter sterilen Bedingungen NETose auslösen (24,25).

Die NETs spannen sich als große netzähnliche Strukturen mit etwa 200 nm großen Poren extrazellulär auf (26). Sie sind in der Lage, Pathogene wie Bakterien oder Pilze zu immobilisieren und zu eliminieren (17,27). Zusätzlich sind NETs mit Proteinen aus intrazellulären Granula besetzt (28). Die Proteine sind im Großteil positiv geladen und können so mit der bakteriellen, negativen Lipiddoppelschicht interagieren, während die DNA selbst mikrobizid wirkt (29,30). Allerdings wird zunehmend auch die Rolle von NETs im Zusammenhang mit pathologischen Mechanismen wie sterilen Entzündungsreaktionen, Autoimmunerkrankungen oder auch thrombotischen Ereignisse bekannt (31,32).

1.3.2 Zusammenhang zwischen NETs und Thrombosen

NETose spielt in der Entstehung verschiedener thrombotischer Krankheitsbilder, wie bei der Entstehung und Behandlung von Myokardinfarkten aufgrund von Koronararterienverschlüssen sowie bei ischämischen Schlaganfällen (33,34). Verantwortlich dafür sind Wechselwirkungen von NETs mit der Gerinnung, wobei Interaktionen mit Plättchen, von Willebrand Faktor (vWF), Gerinnungsfaktoren selbst sowie Bestandteilen des Komplementsystems nachgewiesen wurden (35–38).

Die Interaktion zwischen Plättchen und NETose beeinflusst die Thrombusstabilität (8,35). das Protein High-Mobility Group Box 1 (HMGB1) spielt als Mediator eine wichtige Rolle in der Interaktion zwischen Neutrophilen und Plättchen, da es von Plättchen präsentiert bei PMNs über Toll-like-Rezeptoren NETose induzieren kann (39–41). Eine Blockierung von vWF führt ebenfalls zu einer deutlich verminderten, Plättchen-assoziierten NETose (35).

1.3.3 Wechselwirkungen zwischen PMNs und Scherkräften

Scherkräfte sind zusätzlich zur Plättchenaktivierung auch in der Lage, PMNs direkt zu aktivieren und diese zur Ausführung von NETose zu triggern (24,42). Hohe mechanische Scherkräfte erhöhen bei kurzer Expositionszeit den Grad der Aktivierung von Leukozyten, die Phagozytosefähigkeit und die Menge an Leukozyten-Plättchen-Aggregaten in einem Fluss-Modell (42). Nur Scherkräfte arterieller Bedingungen sind in der Lage, NETose auszulösen, während diese nicht unter Scherkräften venöser Bedingungen auftritt (24). Interessanterweise konnten die Leukozyten im venösen System aber durch abrupte

Steigerung der Bedingungen auf ein arterielles Scherkraft-Level massiv zu NETose angeregt werden (24).

Auch auf Zellen einwirkende Zentrifugationskräfte haben eine deutliche Wirkung auf die Funktionalität von PMNs. Hundhammer et al. beschrieben eine reduzierte chemotaktische Migration, reduzierte Produktion von reaktiven Sauerstoff Spezies und eine veränderte Regulation von Oberflächenrezeptoren (1). Zudem regt Zentrifugation im Rahmen von Zellisolierung PMNs eher zur Bildung von NETose an (43,44).

1.3.4 Wechselwirkungen zwischen NETs, Gerinnung und hydrophoben Biomaterialien

Biomaterialien interagieren stark sowohl mit NETs als auch mit Bestandteilen des Gerinnungssystems. Hydrophobe Eigenschaften der großen Oberflächen von Oxygenator-Membranen verursachen eine ungewollte Adsorption von Proteinen, was über eine Veränderung der Proteinkonformation einen prothrombogenen Effekt hat (protein fouling) (45). Dieser Prozess mit seinen verschiedenen Ausprägungen hängt stark von den Eigenschaften der jeweiligen Oberfläche ab und erleichtert Protein-Zell Interaktionen sowie Zellanlagerung an der Biomaterial-Oberfläche (45). Zudem sind einige hydrophobe Biomaterialien in der Lage, unter sterilen Bedingungen bei PMNs direkt NETose zu induzieren (25).

1.4 NETs und Thrombosen in Membranoxygenatoren

NETose scheint eine wichtige Rolle bei der Entstehung thrombotischer Ablagerungen in Membranoxygenatoren zu spielen. Leukozyten konnten in gebrauchten Membranoxygenatoren in hoher Dichte auf Gasfasern nachgewiesen werden (14,15). Zudem gelang der direkte Nachweis von NETose in gebrauchten Membranoxygenatoren eines ovinen in vivo ECMO-Modells durch Zhang et al. (7). Die gleiche Studie fand bei zunehmender Laufzeit des ECMO-Systems einen Anstieg NETose spezifischer Marker wie citrulliniertem Histon 3 (citH3) oder freier doppelsträngiger DNA (dsDNA) (7). Zellfreie DNA und NETs wurden auch im Plasma von ECMO-Patienten nachgewiesen. (46,47) Zudem konnten auf den Gasaustauschfasern von gebrauchten Membranoxygenatoren NETotische Kerne identifiziert werden (48).

In Membranoxygenatoren wurden kernhaltige Zellen in einer engen räumlichen Nähe sowohl zu Plättchen als auch zu vWF gefunden (49). Angesichts der ausführlichen Interaktionen der verschiedenen Faktoren untereinander könnten Interaktionen dieser

Dreiecksbeziehung maßgeblich für die Entstehung von Thrombosen in Membranoxygenatoren sein. Besonders die Einwirkung hoher Scherkräfte muss dabei in Betracht gezogen werden, da diese sowohl Plättchen aktivieren, als auch NETose direkt auslösen können (24,50). Auch die Bindung von DNA aus NETose an vWF wird durch Scherkraftaktivierung von vWF positiv beeinflusst (36). Hohe Scherkräfte treten innerhalb von ECMO-Systemen beispielsweise in Membranoxygenatoren sowie in Zentrifugalpumpen auf, wobei Zentrifugalpumpen noch durch unterschiedlich hohe Laufraten zusätzliche Zentrifugalkräfte auf die PMNs einwirken lassen (51).

Zusammenfassend ergeben sich deutliche Hinweise darauf, dass scherkraftbedingte NETose und andere scherkraftbedingte Faktoren an der Entstehung von thrombotischen Ablagerungen in Membranoxygenatoren beteiligt sein könnten. In dieser Arbeit wird daher versucht, die Interaktionen zwischen PMNs und Oxygenator-Gasfasern unter dem Einfluss verschiedener Zentrifugal- und Scherkräfte genauer zu untersuchen.

2 Fragestellung und Studienplanung

2.1 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von Polymorphkernigen Neutrophilen und die Beteiligung von NETose an der Thrombose-Entstehung innerhalb von ECMO-Oxygenatoren unter in vitro-Bedingungen in einem Perfusionsmodell näher zu untersuchen. In einem vereinfachten ECMO-Modell sollte der Einfluss von Zentrifugationskräften während der Zellisolierung und von Scherkräften im ECMO-Perfusionsmodell auf die Freisetzung von DNA an einzelnen ECMO-Gasfasern untersucht werden.

2.2 Studienplanung

Basierend auf einem etablierten ECMO-Perfusionsmodell (52) wurde die Auswirkung von Zentrifugationskräften während der Zellisolierung und von Scherkräften anhand verschiedener Volumenströme auf die Interaktion von Granulozyten mit einer isolierten Gasfaser mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Endpunkt war dabei die Oberfläche und Entstehungsgeschwindigkeit von DNA-Strukturen an der Gasfaser. Zusätzlich wurden Zellveränderungen durchflusszytometrisch ausgewertet.

Dafür wurden Granulozyten aus Vollblut gesunder Spenderinnen und Spender isoliert und in das ECMO-Modell verbracht. Im ersten Teil der Dissertation wurde der Einfluss eines zweiten Zentrifugationsschrittes während der Zellisolierung, nach Hundhammer et al. (1) definiert als höhere einwirkende g -time, auf die Freisetzung von DNA an der Gasfaser untersucht. Im zweiten Teil wurde der Einfluss verschiedener Volumenströme innerhalb des ECMO-Systems auf die Freisetzung von DNA an der Gasfaser untersucht. Mittels Durchflusszytometrie wurde dabei die Zellmorphologie und -zahl abgeschätzt.

Nach dem folgenden Schema (Abbildung 1) wird die Systematik der vorliegenden experimentellen Dissertation gegliedert.

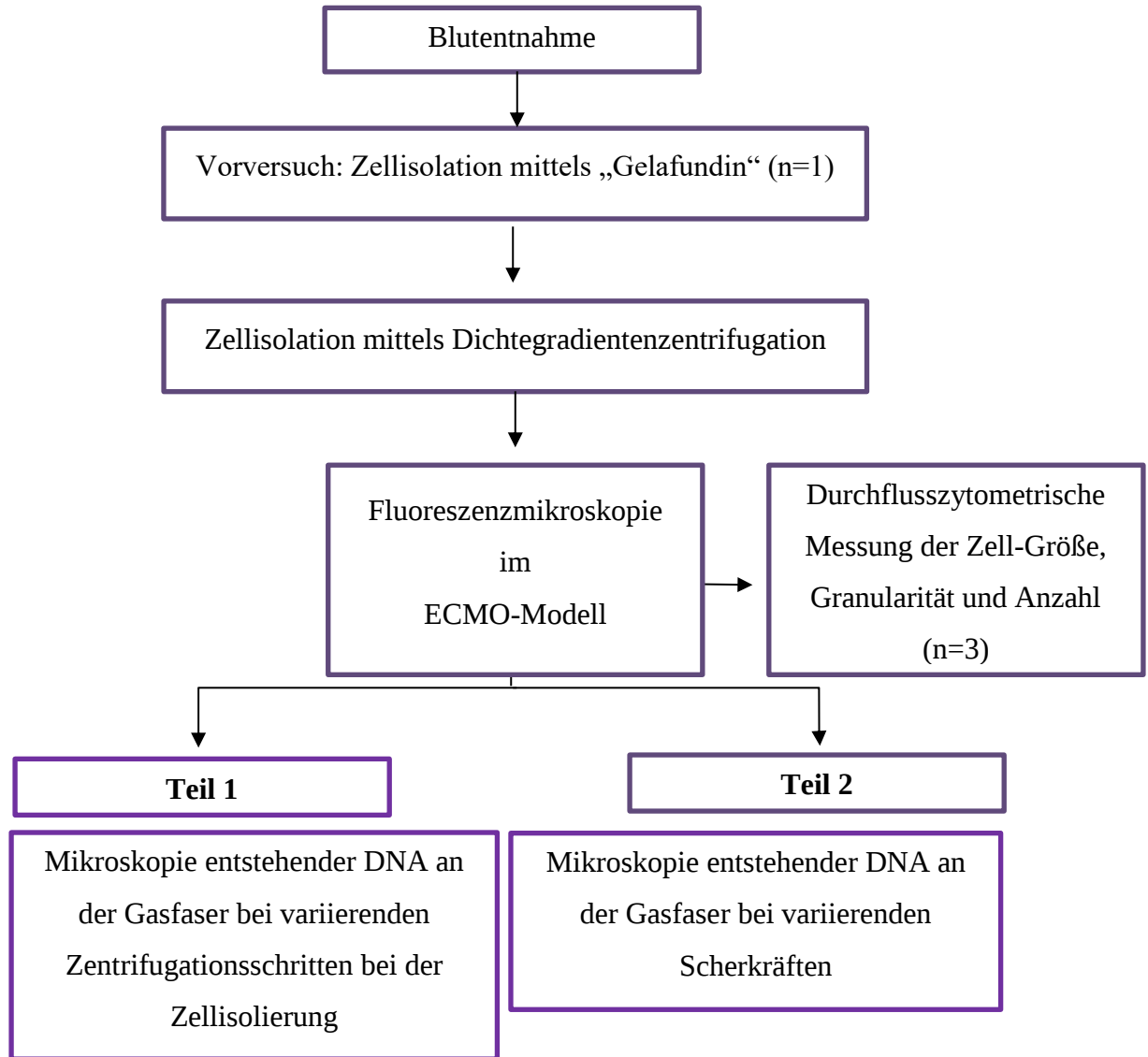


Abbildung 1: Systematische Gliederung der experimentellen Arbeiten.

Abbildung 2 zeigt die Systematik der Versuche des ersten Teils der Dissertation.

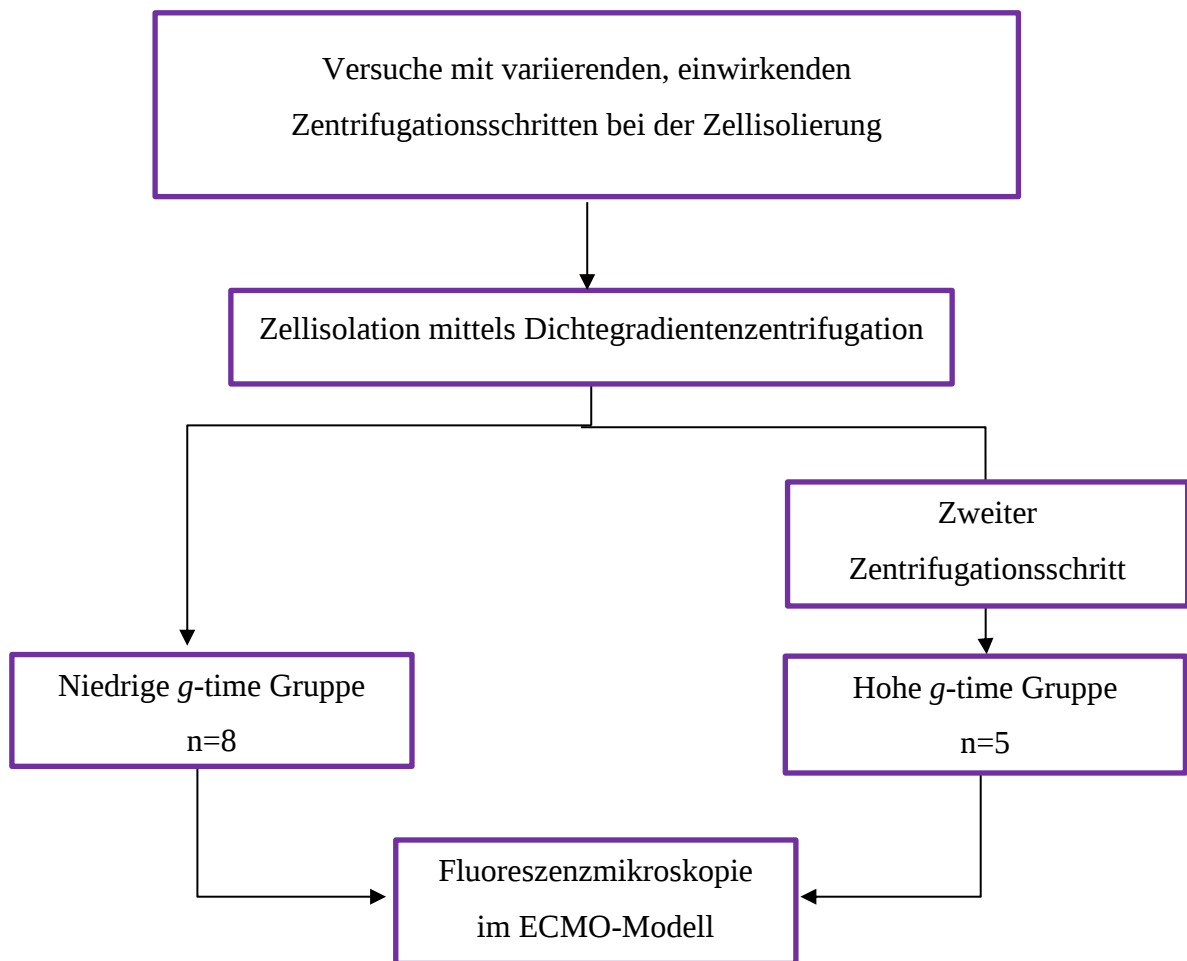


Abbildung 2: Systematik der Versuche variierender einwirkender Zentrifugationsschritte.

Abbildung 3 zeigt die Systematik des zweiten Teils der Dissertation.

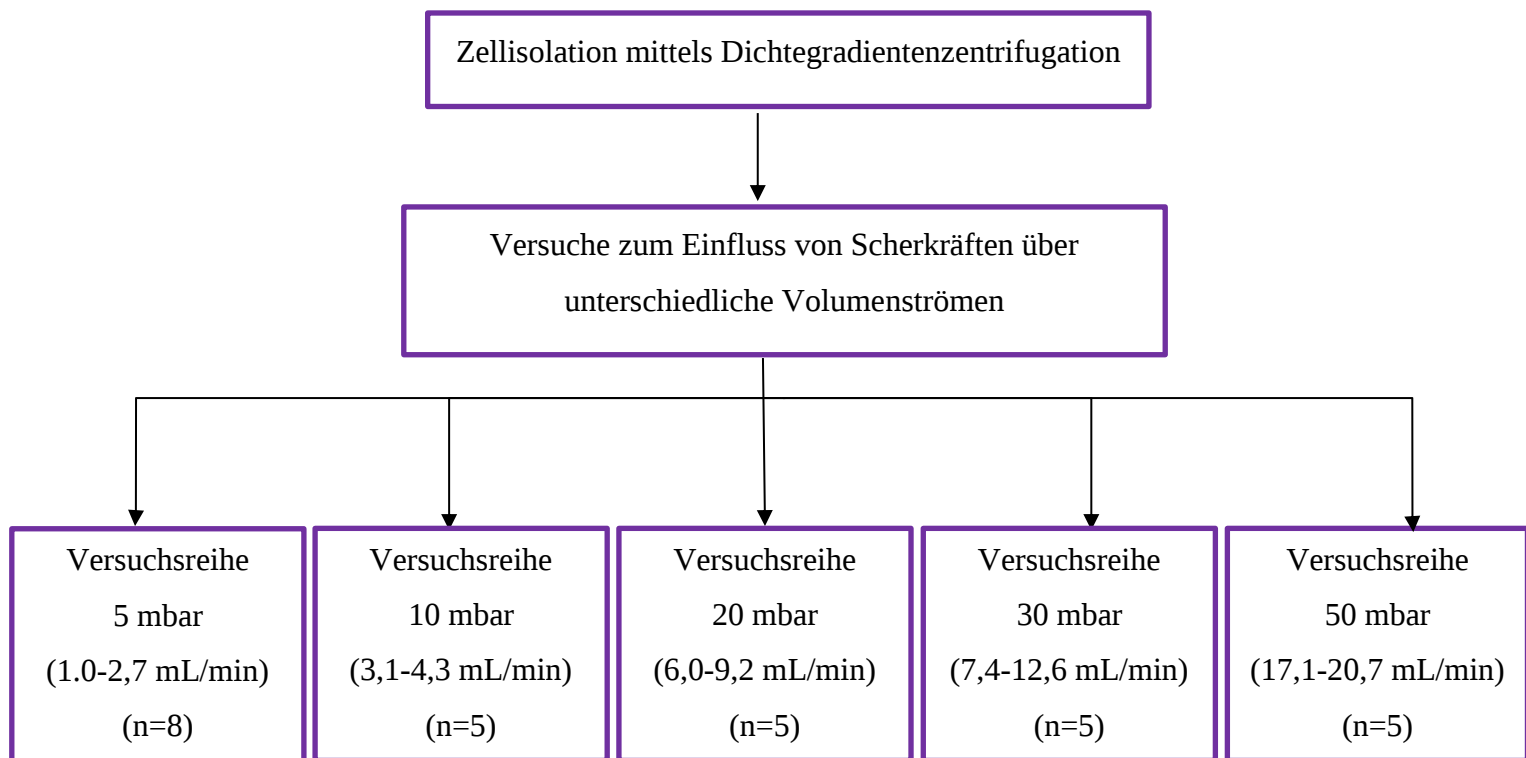


Abbildung 3: Systematik der Versuche unterschiedlicher Volumenströme.

3 Material und Methode

Im Folgenden wird auf die Versuchsaufbauten und die zur Durchführung benötigten Materialien eingegangen.

3.1 Erster experimenteller Teil

Hundhammer et al. (2023) ermittelten, dass das Zentrifugationsregime bei der Neutrophilenisolation zu einer Abnahme der Zellfunktionalität führt (1). Daher wurde im ersten Teil der Dissertation der Einfluss von Zentrifugationskräften bei der Zellisolation auf die Freisetzung und Anlagerung von DNA an der Gasfaser untersucht.

3.1.1 Studiengruppen

Bei der Leukozytenisolation (siehe Kapitel 3.5) wurde ein Teil der Zellen zusätzlich einem zweiten Zentrifugationsschritt unterzogen. Über die auf Zellen einwirkende g -time (1) wurden zwei Studiengruppen definiert (Abbildung 2). Hundhammer et al. definiert dabei g -time als

Formel 1:

$$g\text{-time [gs]} = (\text{RCF [g]} * \text{CT [s]})$$

*Formel 1: Berechnung der g -time; RCF = g -Zahl der Zentrifugation;
CT = Zentrifugationsdauer; gs = g -seconds*

Auf die Kontrollgruppe wirkte nur der Zentrifugationsschritt während der Isolierung, also eine g -time von: $756 \text{ g} * 1200 \text{ s} = 907200 \text{ gs} = 907,20 \text{ kgs}$ ein. Diese Gruppe wird im Folgenden als **niedrige g -time Gruppe** bezeichnet (n=8).

Auf die Studiengruppe wirkte nach der Isolation ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt, also eine summierte g -time von: $2404 \text{ g} * 300 \text{ s} + 907200 \text{ gs} = 1628400 \text{ gs} = 1628,4 \text{ kgs}$ ein. Diese Gruppe wird im Folgenden als **hohe g -time Gruppe** bezeichnet (n=5).

Es wurden pro Versuch 9 Mio Zellen in das Perfusionssystem eingespritzt und bei 5 mbar (1,0-2,7 mL/min) die Bildung von DNA an der Gasfaser für 120 min fluoreszenzmikroskopisch beobachtet.

3.2 Zweiter experimenteller Teil

Yu et al. (24) zeigten, dass hohe hämodynamische Kräfte zu einer NET-Induktion in einem in vitro Perfusionsmodell führten. Daher wurde im zweiten Teil der Dissertation der Einfluss von Scherkräften über variierende Volumenströme innerhalb des Perfusionssystems auf die Bildung von DNA an der Gasfaser untersucht.

3.2.1 Studiengruppen

Zur Untersuchung des Einflusses von Scherkräften auf DNA-Freisetzung und Anlagerung an der Gasfaser wurden fünf Versuchsgruppen (Abbildung 3) gebildet. Für jede Versuchsreihe wurde das System (siehe Kapitel 3.7) mit einem definierten Volumenstrom perfundiert, erzeugt durch konstanten Druck einer Luftdruckpumpe (Tabelle 2). Versuchsreihen wurden durchgeführt mit Druckwerten 5 mbar (n=8), 10 mbar (n=5), 20 mbar (n=5), 30 mbar (n=5) und 50 mbar (n=5). Dazu wurden je 9 Mio isolierte Zellen (siehe Kapitel 3.5) in das System eingespritzt und für 120 min die Freisetzung und Anlagerung von DNA an der Gasfaser fluoreszenzmikroskopisch beobachtet.

3.3 Versuchsreihe Durchflusszytometrie

Zur Beobachtung der Zellzahl und -morphologie innerhalb des Systems wurden Zellen mit Calcein lebendgefärbt (siehe Kapitel 3.8) und durchflusszytometrisch analysiert (n=3).

Dazu wurden bei gleicher Isolation 9 Mio mit Calcein vorinkubierte Zellen bei 5 mbar in das System eingespritzt und für 120 min die Gasfaser fluoreszenzmikroskopisch beobachtet. Aus dem System wurden dabei in zehnminütigen Abständen Zellproben entnommen, die durchflusszytometrisch analysiert wurden (siehe Kapitel 3.12).

3.4 Blutentnahme

Die benötigten Vollblutproben wurden vor jedem Versuch von gesunden Probandinnen und Probanden entnommen. Diese wurden vor der Entnahme über den Vorgang selbst, die möglichen Risiken und die Datenschutzbestimmungen aufgeklärt (positives Ethikvotum 20-1843-101).

Dazu wurde nach Stauung und Desinfektion eine Vene in der Ellenbeuge mit einer Safety-Multifly®-Kanüle (Kanülendurchmesser 21G, SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland) punktiert und 7 mL Vollblut mit einer Lithium-Heparin S-Monovette® (LH liquid:19I.U./mL, SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland) entnommen.

3.5 Leukozytenisolation

In Vorversuchen wurden Granulozyten mit Gelafundin isoliert (n=3). Dazu wurde Vollblut in einem Eppendorf-Gefäß mit 10 % des Vollblutvolumens an Gelafundin (40 mg/mL; B. Braun SE, Melsungen, Deutschland) vermischt. Das Gemisch wurde für 40 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und der entstandene Überstand entnommen. Die Zellen im gewonnenen Überstand wurden gezählt und ohne weitere Behandlung ins System eingespritzt. Die Granulozyten für alle weiteren durchgeführten Experimente wurden mittels der Leuko Spin Methode isoliert (53). Dazu wurden nach dem Herstellerprotokoll im gleichen Verhältnis 6 mL Leuko Spin Medium (pluriSelect, Leipzig, Deutschland) und darauf 6 mL PBMC Spin Medium (pluriSelect, Leipzig, Deutschland) in ein konisches 50 mL Zentrifugenröhrchen (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) vorgelegt. Darauf wurde 6 mL heparinisiertes Vollblut pipettiert, ohne die Schichten zu vermischen (Abbildung 4). Das Zentrifugenröhrchen wurde daraufhin zentrifugiert (756 g, 20 min ohne Bremse). Nach der Zentrifugation zeigte sich die Auftrennung der verschiedenen Blutbestandteile (Abbildung 4). Der Überstand wurde vorsichtig abgezogen, sodass pro Zentrifugenröhrchen 1 mL des Granulozytenrings vorsichtig abgenommen, in einem Eppendorf-Gefäß aufbewahrt und in der Neubauer Zählkammer ausgezählt werden konnte. Dazu wurde 10 µL der gewonnenen Zellsuspension zwischen die Neubauer Zählkammer und die Deckplatte gegeben, die Zellzahl in einem der Mittelquadrate mikroskopisch ausgezählt und auf das Gesamtvolumen der gewonnenen Zellsuspension hochgerechnet.

Für den ersten Teil der Dissertation wurden einige Zellen erhöhter *g*-time ausgesetzt. Dazu wurde ein Milliliter des abgenommenen Granulozytenrings nochmals zentrifugiert (2404 g, 5 min.), der Überstand abgezogen und das entstandene Zellpellet in 500 µL RPMI 1640 (PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland) resuspendiert.

Die gewonnenen Granulozyten wurden bis zum Einspritzen in das System bei Raumtemperatur 5-10 min gelagert.

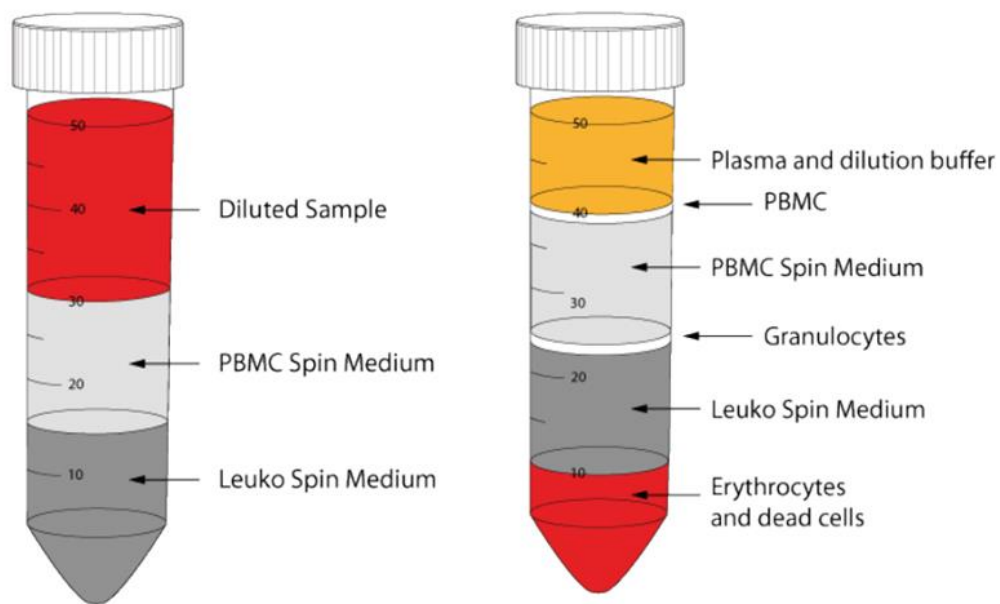


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Schichtung der Dichtegradientenzentrifugation vor Zentrifugation (links) und nach Zentrifugation (rechts) (54).

3.6 Herstellung der Strömungskammer und verwendete Gasfasern für das ECMO-Modell

Als Strömungskammer mit eingebauter Gasfaser wurde ein 0,4 mm Sticky-Slide (IBIDI, Martinsried, Deutschland) mit einem mittigen Kanal und zwei Luer Konnektoren gewählt (Abbildung 6, Abbildung 7). Für die Gewinnung der verwendeten Gasfasern wurden die parallel zueinander liegenden und mit einem Kettfaden verbundenen Poly 4-methyl 1-penten (PMP) Gasfasern passend zugeschnitten und vom Kettfaden befreit (Abbildung 6). Die verwendeten Gasfasern wurden alle im August 2019 aus einem unbenutzten PLS-Oxygenator (Maquet, Rastatt, Deutschland) gewonnen. Alle Gasfasern bestanden aus PMP und waren mit Bioline® beschichtet.

Die Gasfaser wurde zwischen dem Deckel und dem Boden der Strömungskammer in dem Kanal quer eingespannt. Abbildung 5 zeigt einen Querschnitt durch die Strömungskammer mit eingeklebter Gasfaser.

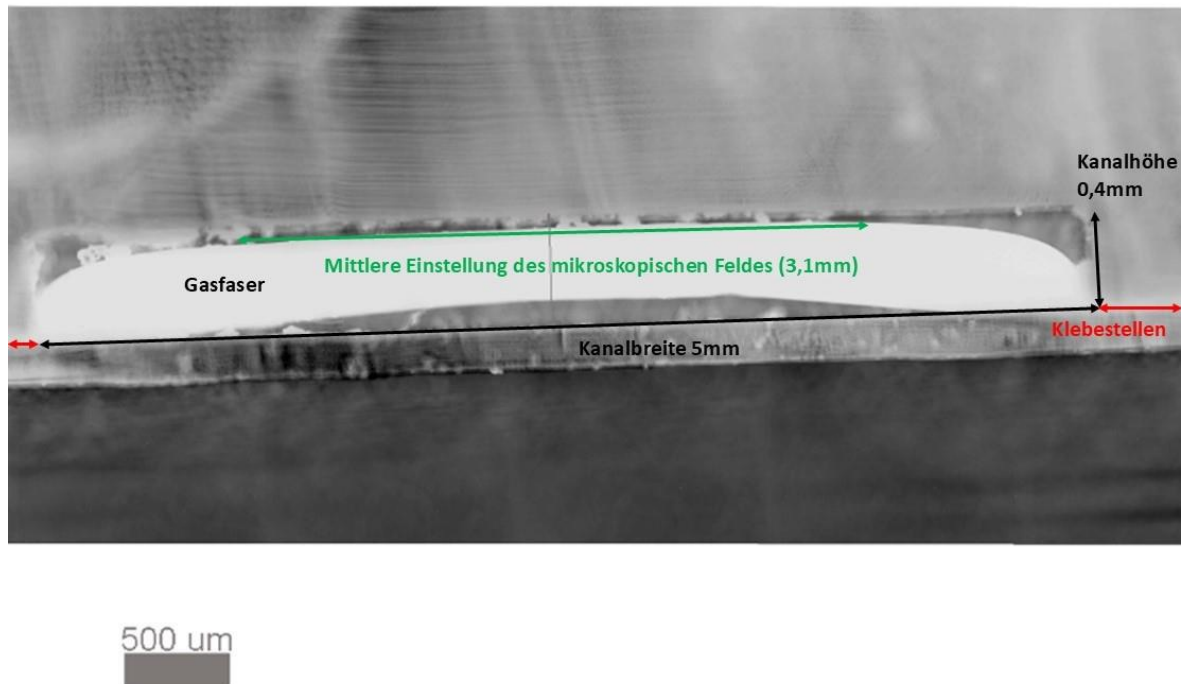


Abbildung 5: Blick auf die Lage der Gasfaser im quergeschnittenen Kanal der Strömungskammer.

Die Strömungskammer wurde daraufhin in einer Klemme gemäß Herstellerprotokoll im Brutschrank gepresst, bis der Kleber wasserdicht aushärtete. So konnte die Gasfaser quer zur Strömungsrichtung im Kanal von der Flüssigkeit im System umspült werden. Das System wurde über zwei Luer Konnektoren an die Strömungskammer angeschlossen. Zur Beobachtung wurde die Strömungskammer im Mikroskop eingespannt, sodass das Objektiv auf die Gasfaser (Abbildung 9) ausgerichtet war. Das mikroskopische Feld wurde so eingestellt, dass die Gasfaser mittig lag (Abbildung 5). Dadurch wurden die Kleberänder nicht in die Analyse einbezogen. Daher wurden von der theoretisch 5 mm langen Gasfaser lediglich 3,1 mm sichtbar gemacht.

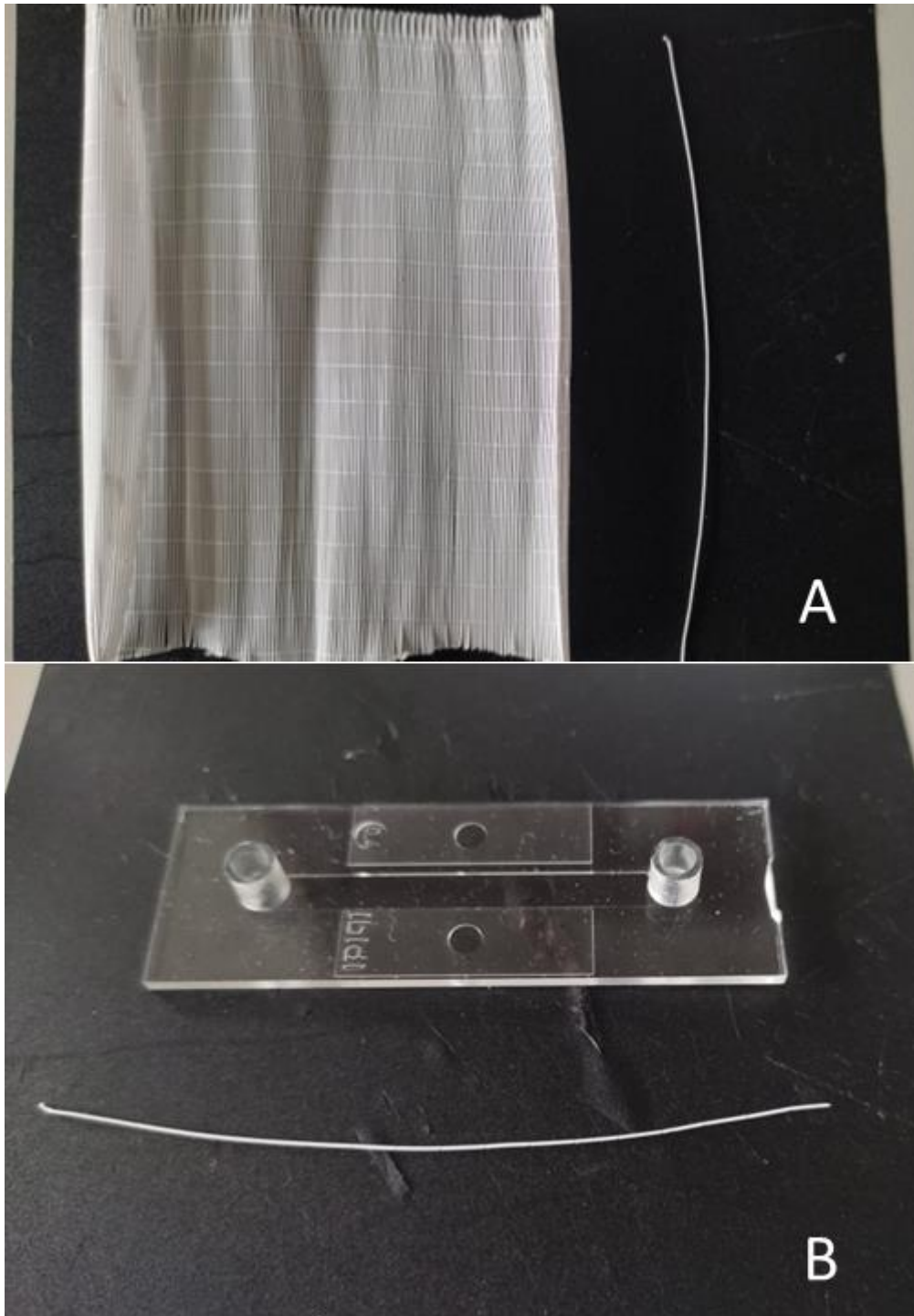


Abbildung 6: Bild der verwendeten Gasfasermatten mit daraus entnommener Gasfaser (A) und Bild der verwendeten Strömungskammer mit isolierter Gasfaser (B).

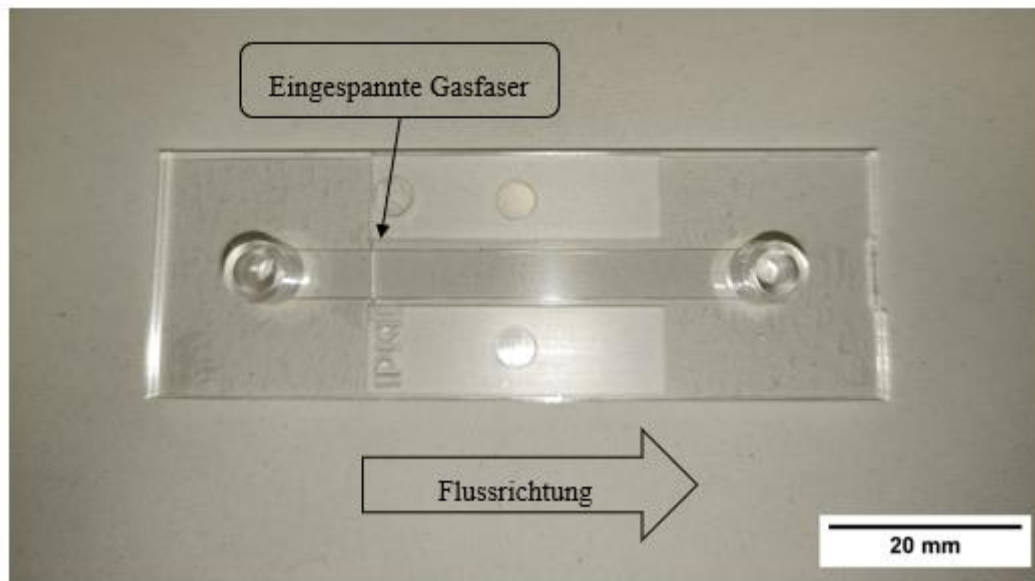


Abbildung 7: Bild der verwendeten Strömungskammer mit eingespannter Gasfaser.

3.7 Perfusionsmodell

Das verwendete Perfusionssystem basiert auf einem computergesteuerten Druckluft-Pumpsystem (IBIDI, Martinsried, Deutschland) mit dem zugehörigen Zwei-Kammer-Perfusionsset (IBIDI) (

Abbildung 8) (52). Die Pumpe erzeugt in ihren Druckkammern einen definierten Druck, der mit unterschiedlichen Volumenströmen das System mit kontinuierlichem Fluss perfundiert (Tabelle 2).

Systemdruck	Fluss min. [mL/min]	Fluss max. [mL/min]
5 mbar	1,0	2,7
10 mbar	3,1	4,3
20 mbar	6,0	9,2
30 mbar	7,4	12,6
50 mbar	17,1	20,7

Tabelle 2: Vom Flusssensor gemessene minimale und maximale Flussraten innerhalb des Systems bei definierten Drücken.

Das Pumpsystem war in einem auf 37 °C temperierten und mit 5 % CO₂ angereichertem Brutschrank platziert. Von der Pumpe reicht ein Schlauch mit einem Membran-Port für das Einspritzen der Zellen und des Farbstoffes sowie einem zwischengeschalteten Flusssensor zu der Strömungskammer. Die Strömungskammer ist im Mikroskop außerhalb des Brutschranks eingespannt. Ein weiterer Schlauch führt die Flüssigkeit zum Brutschrank über ein zwischengeschaltetes Thermometer zurück (Abbildung 8, Abbildung 9). Die Gesamtlänge der verwendeten Verbindungsschläuche betrug 42 cm. Um das System auch außerhalb des Brutschranks auf Temperatur zu halten, wurde es durch einen Heizlüfter mit Warmluft angeblasen und in einem Temperaturbereich zwischen 35,0 °C und 37,6 °C gehalten.

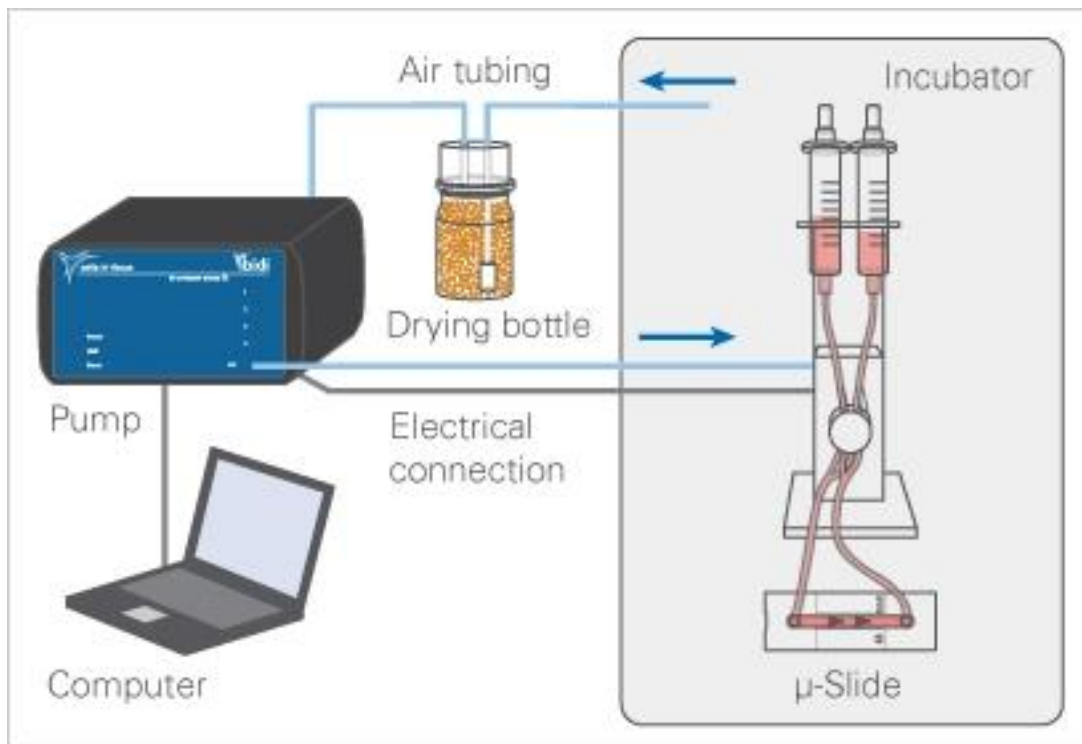


Abbildung 8: Schematische Darstellung des verwendeten Pumpsystems nach (55).

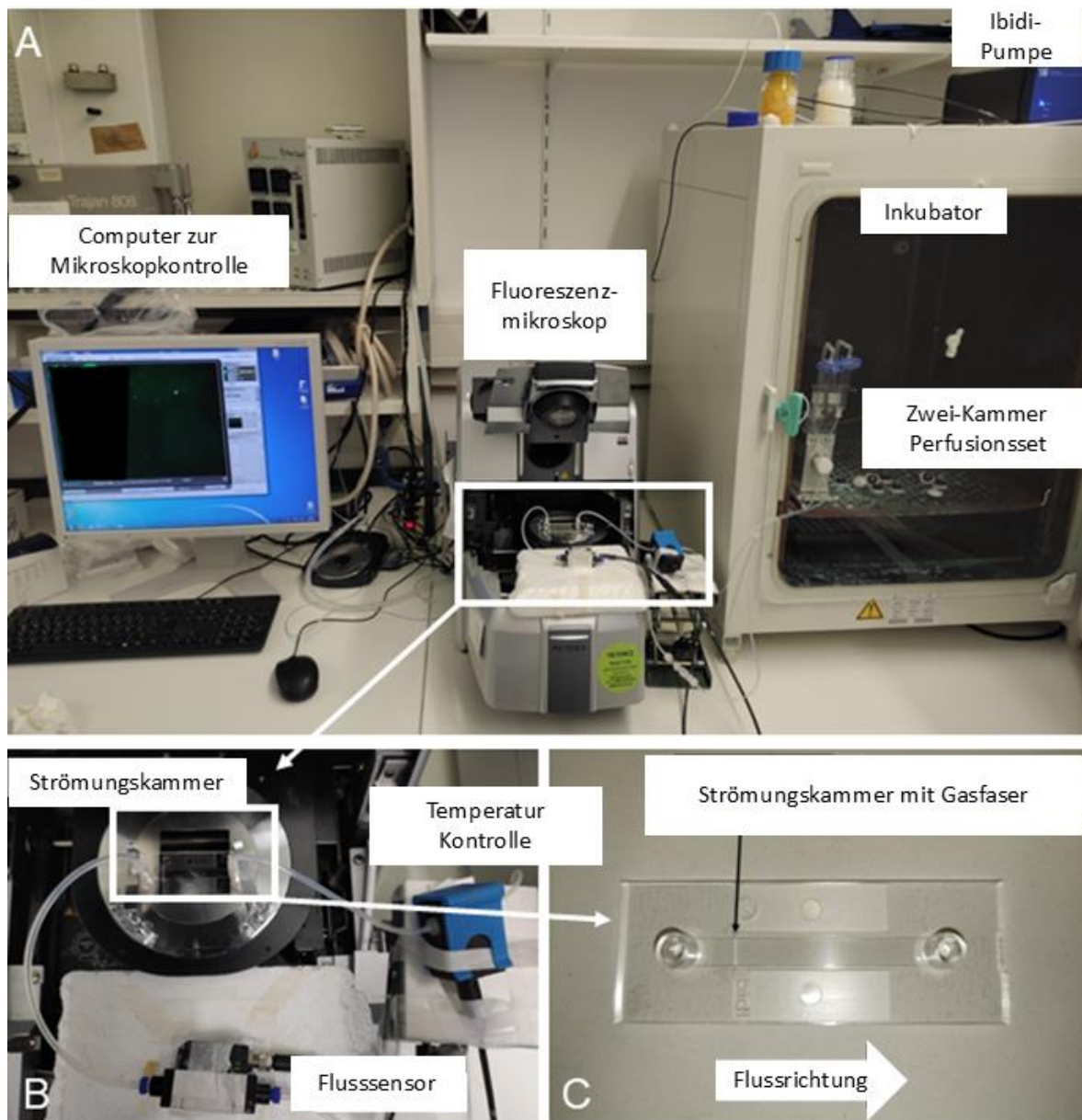


Abbildung 9: Übersichtsbild des verwendeten Systems (A), Position der Strömungskammer im Fluoreszenzmikroskop (B), verwendete Strömungskammer mit eingespannter Gasfaser (C).

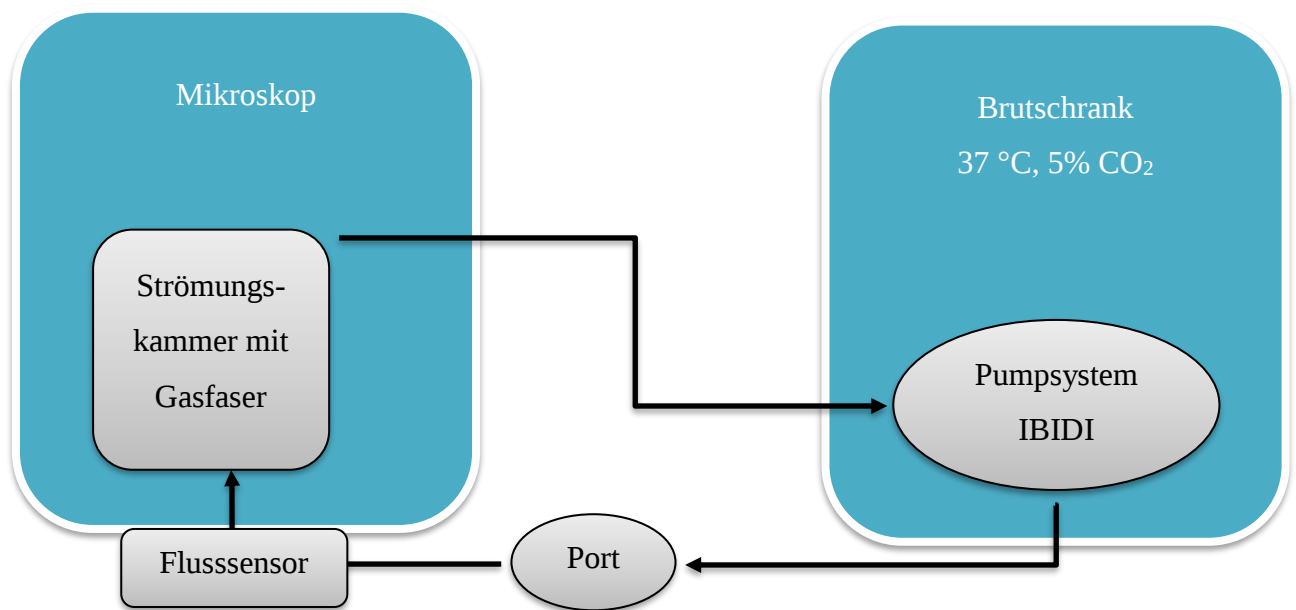


Abbildung 10: Schematischer Aufbau des verwendeten Systems.

Das System wurde mit ca. 18 mL durch einen Spritzenfilter RC (Porengröße 0,45 µm, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) filtriertem RPMI 1640 befüllt. Bevor die Zellen zum System gegeben wurden, wurde das System ca. 60 min aufgeheizt, um es auf Arbeitstemperatur im oben beschriebenen Temperaturbereich zu bringen.

Um Reinheit des Systems zu gewährleisten, wurde jeder Versuch mit einer neuen Strömungskammer durchgeführt. Vor dem nächsten Versuch wurde das System nochmals mit entionisiertem Wasser gespült und in Leerläufen mit entionisiertem Wasser und RPMI 1640 die Reinheit des Systems vor Start des eigentlichen Versuches mikroskopisch kontrolliert. Verunreinigungen konnten dabei mit dem Mikroskop in der Strömungskammer beobachtet werden. Das Schlauchsystem mit den Reservoirs wurde gründlich nach dem Versuch mit entionisiertem Wasser gespült und zusätzlich mit einer 1:1 Mischung aus CASY Clean (OMNI Life Science, Bremen, Deutschland) mit entionisiertem Wasser gereinigt, um letzte verbliebene Zellen und Verunreinigungen aus dem System auszuwaschen. Dazu wurden 15 mL CASY Clean mit 15 mL entionisiertem Wasser verdünnt und 20 min durch das System gepumpt.

3.8 Verwendetes Mikroskop, Farbstoffe und Zellfärbung

Während der Versuche wurden Farbstoffe eingesetzt, um DNA sichtbar zu machen. Die Aufnahmen erfolgten mittels Fluoreszenzmikroskopie.

Als Mikroskop wurde das Keyence BZ8100E (Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland) mit der zugehörigen Software, der BZ observation application (Keyence) verwendet. Dazu wurde ein 4x PlanApo Objektiv (Nikon, Tokio, Japan) und eine 120 W Quecksilberdampflampe genutzt. Die Aufnahmen wurden mit dem BZ-Filter GFP-BP (Erregungswellenlänge 470/40 nm, Dichromatische Spiegelwellenlänge 495 nm, Absorptionswellenlänge 535/50 nm) und dem BZ-Filter DAPI-GP (Erregungswellenlänge 360/40 nm, Dichromatische Spiegelwellenlänge 400 nm, Absorptionswellenlänge 460/50 nm) durchgeführt (beide: Keyence). Dabei wurden Belichtungszeiten von 1/1.1 s für Sytox™ Green und Calcein AM (beide: Thermo Fisher, Waltham, USA), sowie 1/2 s für 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) genutzt. Alle Versuche aus Teil 1 und Teil 2 der Dissertation wurden mit Sytox™Green als nicht membranpermeablem DNA-Farbstoff durchgeführt. Sytox™Green ist ein hochaffiner, grüner Fluoreszenzfarbstoff, der durch Interkalation an doppelsträngige DNA bindet, was zu einer 500-fachen Fluoreszenzverstärkung führt. Aufgrund seiner Unfähigkeit intakte Zellmembranen zu durchdringen, eignet er sich spezifisch als Marker für tote Zellen mit kompromittierten Membranen (56). Der Farbstoff wurde in einer Arbeitskonzentration von 0,01 μ M innerhalb des Systems eingesetzt. Dazu wurde 1 μ L der Stammlösung (5 mM) mit 99 μ L RPMI verdünnt und 3,6 μ L der entstandenen Lösung in das System über den Port eingespritzt. Die Zellen wurden hierbei nicht vor Versuchsbeginn mit Farbstoff inkubiert. Der Nachweis von DNase-vermittelter Netosis (NETose) erfolgt primär durch den enzymatischen Abbau extrazellulärer DNA-Fallen (NETs) mittels DNase I, was die strukturelle Integrität der NETs zerstört (32). Der Abbau der DNA-Strukturen in der Strömungskammer mittels DNase 1 wird als ein deutlicher Hinweis für die strömungsinduzierte Bildung von NETs gewertet. Dazu wurden 20 μ L einer DNase Lösung (Roche Pharma AG, Edenkoben, Deutschland) mit einer Konzentration von 10 mg/mL in das System eingespritzt und damit eine Systemkonzentration von 10 μ g/mL erreicht. Für die durchflusszytometrische Versuchsreihe wurden die Zellen mit Calcein vital gefärbt. Calcein-AM ist eine membrangängiger Vitalfarbstoff, der in stoffwechselaktiven Zellen durch intrazelluläre Esterasen verstoffwechselt wird (es entsteht stark grün fluoreszierendes Calcein) und anschließend die vitalen Zellen grün erscheinen lässt. Dafür wurden 1 mL isolierter Zellüberstand in einem 1,5 mL Eppendorf-Gefäß mit einer Konzentration von 5 μ M Calcein beim ersten Versuch und 0,5 μ M Calcein bei den beiden folgenden Versuchen für 10 min dunkel inkubiert. Hierbei wurden beim ersten Versuch 5 μ L der Stammlösung (1 mM) und bei den beiden folgenden Versuchen 10 μ L einer Verdünnung aus 50 μ L der

Stammlösung mit 950 μL RPMI direkt auf die isolierten Zellen gegeben. Die Zellen wurden daraufhin ohne weitere Behandlung in das System eingespritzt.

Um die DNA-Fäden zusätzlich zur Lebendfärbung mit Calcein beobachten zu können, wurde bei der durchflusszytometrischen Versuchsreihe der blau fluoreszierende Kernfarbstoff DAPI eingesetzt. DAPI bindet an Adenin-Thymin-reiche Regionen der DNA und ist meist membranundurchlässig. Die Bindung verstärkt die Fluoreszenz um das ca. 20-fache und ist damit weniger sensitiv als SytoxTMGreen. Dazu wurden 20 μL der Stammlösung (50 $\mu\text{g/mL}$) statt SytoxTMGreen über den Port ins System eingespritzt (Systemkonzentration, 0,159 μM). Die DNA-Strukturen erscheinen blau (Anregung 358 nm / Emission 461 nm).

3.9 Fluoreszenzmikroskopie

Die Mikroskopie erfolgte anhand von Bildsequenzen, die das Mikroskop hintereinander aufnahm. Die DNA-Färbung mittels SytoxTMGreen konnte im Mikroskop im FITC-Kanal sichtbar gemacht werden (Beispielbild siehe Abbildung 11). So konnte der Versuch über die gesamte Versuchsdauer von bis zu 120 min mit dicht aufeinander folgenden Bilderintervallen (Abstand ab 9 s) verfolgt und aufgezeichnet werden.

Für die durchflusszytometrische Versuchsreihe, wo Calcein-gefärbte Granulozyten mit DAPI in die Perfusionsanlage eingespritzt wurden, wurden Bilder im FITC- und im DAPI-Kanal aufgenommen. Dadurch verlängerte sich die Bildersequenz auf 15 s.

3.10 Bildverarbeitung und Auswertung

Die Bildverarbeitung und Auswertung der Bildsequenzen erfolgte mit IMARIS 9.02 (Oxford Instruments, Abingdon, UK). Die Auswertung wurde aufgeteilt in DNA-Ablagerungen auf der Gasfaser (Abbildung 11B, 1) und DNA-Fäden stromabwärts (rechts) der Gasfaser (Abbildung 11B, 2). Dabei wurden für jedes Bild die Oberflächen der DNA-Ablagerungen (Surface Detail 200, Background Substraction 1000) und DNA-Fäden (Surface Detail 200, Background Substraction 2000) mit IMARIS berechnet.

Die entstandenen Werte wurden als Flächenberechnung in eine Excel (Microsoft, Redmond, USA) Tabelle überführt. Mit Excel erfolgte die Berechnung der Gesamtfläche für jeden Zeitpunkt aus den berechneten Einzelflächen.

Mit den so erhaltenen Werten wurden durch PHOENIX64 (Certara, New Jersey, USA) E_{max} und ET_{50} Werte einer auf den Einzelwerten basierenden sigmoidalen Kurve berechnet, bei der die Zeit [min] (X-Achse) gegen die Flächensumme [mm^2] (Y-Achse) aufgetragen wurde

(Abbildung 12). $E_{\max}$ [mm²] gibt die maximal erreichte Flächensumme an und ET_{50} [min] den Zeitpunkt, an dem die halbmaximale Flächensumme erreicht ist.

Für die Berechnung der sigmoidalen Kurve bei PHOENIX64 wurde aus technischen Gründen der erste Anstieg der Flächensumme als Anstieg der berechneten sigmoidalen Kurve definiert. Versuche, bei denen die Flächensumme durch das Abreißen größerer Fäden wieder absank, wurden ab dem Zeitpunkt des Abreisens von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Zudem wurde aus den Kurvenverläufen der DNA-Oberflächen die Zeit bis zum Auftreten der ersten DNA-Fäden ermittelt und als lag-time zwischen den Studiengruppen verglichen.

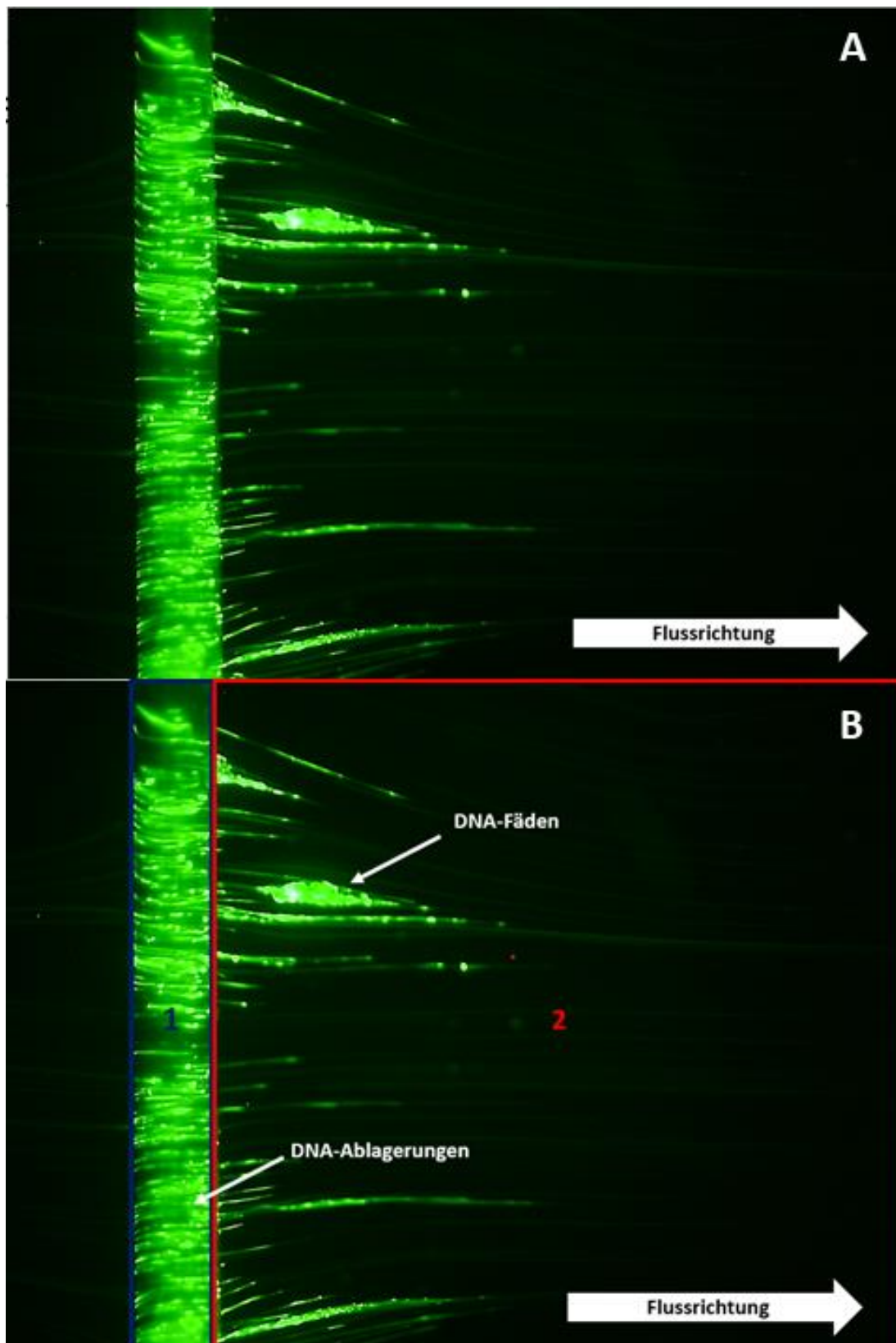
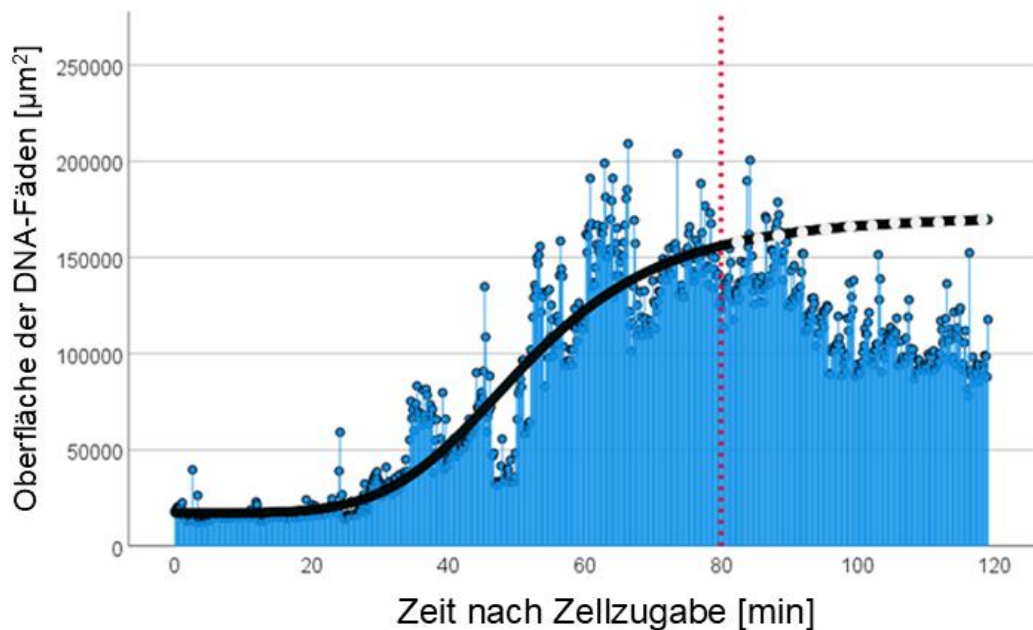


Abbildung 11: Beispielbild aus einer Bilderfolge mit SytoxTMGreen-gefärbten DNA-Strukturen an der Gasfaser. Granulozyten wurden in das Perfusionssystem eingesetzt und nach 5 min wurden SytoxTMGreen-gefärbte DNA-Ablagerungen auf den Gasfasern (links, 1) und SytoTMGreen-gefärbte DNA-Fäden stromabwärts (rechts der Gasfaser, 2) sichtbar. Dargestellt ist der mittlere Teil der Gasfaser (3.1 mm Gasfaserlänge).



$$\text{Flächensumme } [\mu\text{m}^2] = 17308.4 + \frac{154901 * t^{4.88623}}{51.5061^{4.88623} + t^{4.88623}}$$

Abbildung 12: Beispiel der Berechnungen. Die resultierende Flächensumme pro Zeit wurde benutzt, um eine sigmoidale Kurve zu berechnen (schwarze Linie), bestehende aus DNA-Flächensumme (Y-Achse) in Abhängigkeit der Zeit (X-Achse, blaue Punkte). Durch vorzeitiges Abreißen der DNA-Fäden verursachte reduzierte DNA-Flächensumme wurde von der Berechnung ausgeschlossen. In diesem speziellen Fall wurden die Werte ab 80min (rote Linie) von der weiteren Berechnung ausgeschlossen. Die Kurve der DNA-Flächensumme wurde mit der angegebenen Formel berechnet.

3.11 Statistik

Die statistische Auswertung, graphische Darstellung und Auswertung aller Daten erfolgte mit SPSS Statistics (IBM, Armonk, USA). Versuche, die von SPSS rechnerisch als Ausreißer erkannt wurden, wurden nicht in die Berechnung der unten vorgestellten statistischen Auswertung und in die graphische Darstellung miteinbezogen.

Auf Normalverteilung der Daten wurde mit dem Test nach Kolmogorov-Smirnov untersucht. Folgten die Ergebnisse dann einer homogenen Varianzverteilung nach Levene, wurde der Bonferroni-Korrekturtest durchgeführt, um die Gruppen zu vergleichen. Zeigte der Test nach Levene eine nicht-homogene-Varianzverteilung, wurde der Dunnett-T3-Test durchgeführt, um die Gruppen zu vergleichen.

3.12 Durchflusszytometrie

Um die Veränderung der lebenden Zellen innerhalb des Systems zu beobachten, wurde eine Versuchsreihe ($n=3$) mit Calcein als Vitalfärbung durchgeführt und durchflusszytometrisch ausgewertet (siehe Kapitel 3.8). Die Auswertung erfolgte mit dem FACSCalibur (Laser 488 nm, Bandpass Filter 530/30, BD, Heidelberg, Deutschland). Alle Messungen wurden im FL-1 Kanal durchgeführt, mit dem nur Calcein-positive Zellen erfasst wurden. Die Identifizierung der Granulozytenwolke aus der Gesamtmenge der erfassten Calcein-positiven Zellen erfolgte dabei aufgrund von Größe und Granularität. Aus dem System wurden zu den Zeitpunkten $t=10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120$ min Proben von $100\ \mu\text{L}$ über den Port mit einer Spritze entnommen. $50\ \mu\text{L}$ der entnommenen Probenflüssigkeit wurden mit $150\ \mu\text{L}$ (beim 1. Versuch) bzw. $200\ \mu\text{L}$ (bei den folgenden) Phosphate-Buffered Saline (PBS) verdünnt und durchflusszytometrisch analysiert. Der Forward Scatter analysierte die Größe der Calcein gefärbten Zellen während der Side Scatter die Granularität der gefärbten Zellen maß (Abbildung 13). Die Größe und Granularität der Calcein gefärbten Granulozyten wurde in drei unabhängigen Versuchen über die Versuchslaufzeit verfolgt. Zudem wurde die Anzahl der Calcein positiven Granulozyten im Verlauf des Versuches analysiert und über die Versuchslaufzeit in den drei unabhängigen Versuchen verfolgt. Die Veränderung der Zellzahl, Zellgröße und Granularität wurden als Gerade im Rahmen einer Regressionsanalyse als lineare Interpolation über die Versuchsdauer berechnet.

Als Positivkontrolle dienten isolierte, gefärbte Zellen, die in der Färbelösung über die Laufzeit des Versuchs bei Raumtemperatur in einem Eppendorf-Gefäß gelagert und nach Versuchsende analysiert wurden. Als Negativkontrolle dienten isolierte, ungefärbte Zellen, mit denen gleich verfahren wurde.

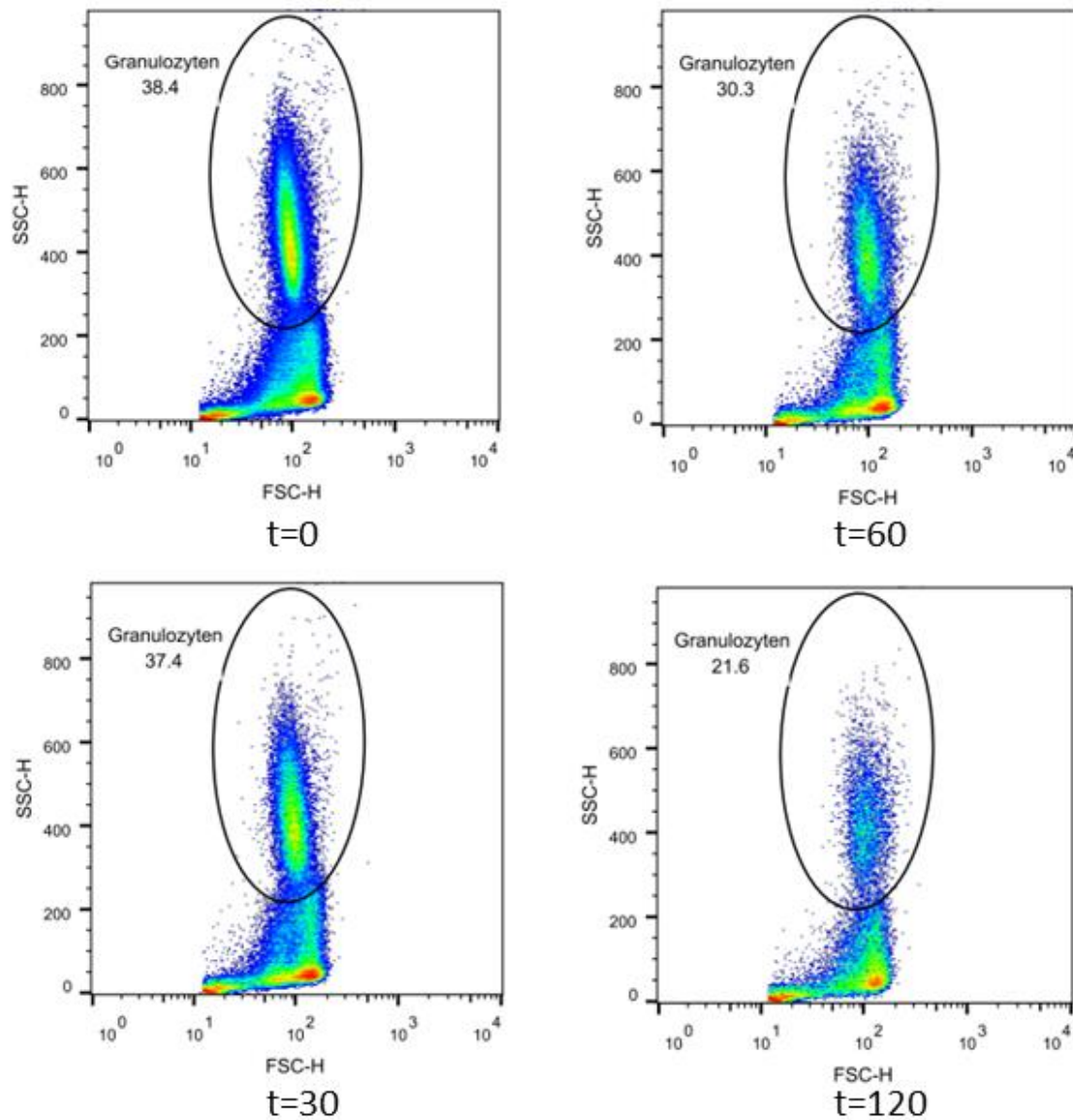


Abbildung 13: Beispieldarstellung der durchflusszytometrischen Auswertung zu verschiedenen Zeitpunkten. Aufgetragen ist der Forward Scatter (FSC-H, [RI](relative Intensity)) gegen den Side Scatter (SSC-H, [RI]).

4 Ergebnisse

4.1 Nachweis von DNA-Strukturen an den Gasfasern mittels Kernfarbstoff

Der DNA-Farbstoff Sytox™Green im Perfusionsmedium färbt lediglich extrazelluläre DNA-Strukturen, die unter definierten Flussbedingungen als DNA-Ablagerungen auf den Gasfasern und als DNA-Fäden stromabwärts der Gasfaser entstehen (Abbildung 11). Die DNA-Ablagerungen bedeckten die Oberfläche der Gasfaser, während sich die DNA-Fäden stromabwärts der Gasfaser bildeten, dabei aber immer mit der Gasfaser in Kontakt standen. Allerdings war die Verteilung der beiden Strukturen entlang der Gasfasern uneinheitlich. Meist wurden DNA-Strukturen vermehrt am oberen bzw. unteren Bildrand detektiert (Abbildung 14, roter Bereich).

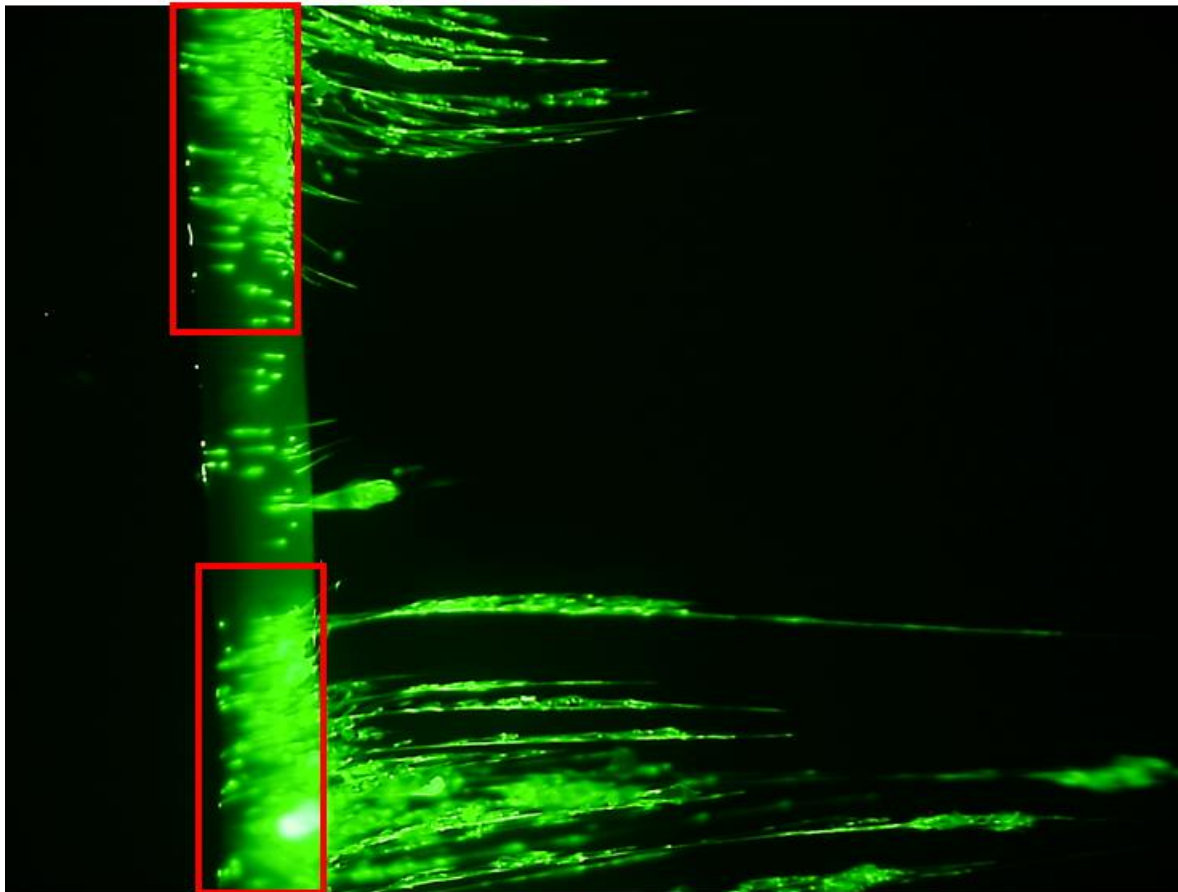


Abbildung 14: Fluoreszenzmikroskopisches Beispielbild: DNA-Strukturen wurden vermehrt am oberen und unteren Bildrand (rote Bereiche) detektiert.

4.1.1 Nachweis von freier DNA an der Gasfaser mittels DNase

Am Versuchsende wurde bei drei Ansätzen DNase zugegeben, wodurch insbesondere die stromabwärts gelegenen grünen Fäden innerhalb von 1-2 Minuten aufgelöst werden konnten

(Abbildung 15). Da dies nur bei drei Versuchen überprüft wurde, erfolgte keine quantitative Auswertung.

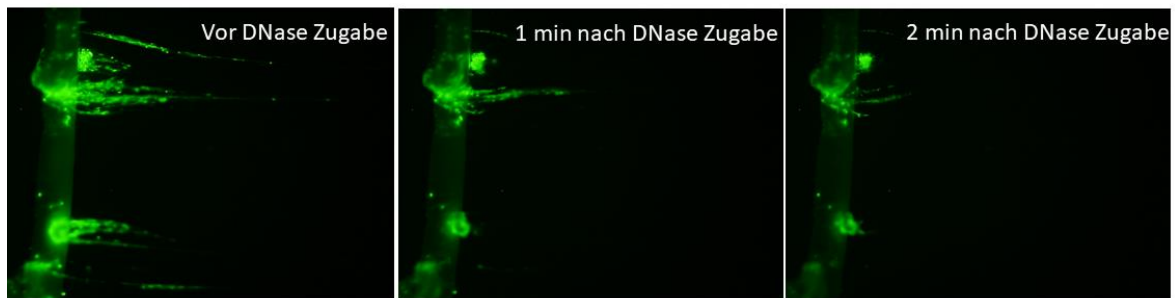


Abbildung 15: Fluoreszenzmikroskopisches Beispielbild von DNA-Ablagerungen und DNA-Fäden vor, sowie 1 und 2 Minuten nach DNase Zugabe.

4.2 Teil 1: Einfluss des Isolationsverfahrens von Granulozyten auf die Bildung Scherkraft-abhängiger DNA-Strukturen an Gasfasern

Im ersten Teil der Dissertation wurde der Einfluss von unterschiedlichen Zentrifugationskräften während der Zellisolierung auf die Freisetzung von DNA an der Gasfaser im ECMO-Modell untersucht.

4.2.1 Visualisierung von DNA-Strukturen von unterschiedlich präparierten Granulozyten

Wie in Abbildung 16 gezeigt, nahm das Ausmaß der DNA-Strukturen über die Zeit zu. Bei gleichen Zeitpunkten erschien sowohl die Oberfläche der DNA-Ablagerungen als auch die Oberfläche der DNA-Fäden größer. In 5 von 5 durchgeführten Versuchen der hohen *g*-time Gruppe war die Gasfaser in den seitlichen Bereichen gegen Ende der Versuchslaufzeit komplett mit DNA-Ablagerungen bedeckt. Gleichzeitig beobachtete man, dass sich dabei die DNA-Fäden zu dicken Strängen zusammen lagerten oder knotenartige Aggregate bildeten. Im Gegensatz dazu war die Reaktion der Zellen aus der niedrigen *g*-time Gruppe schwächer.

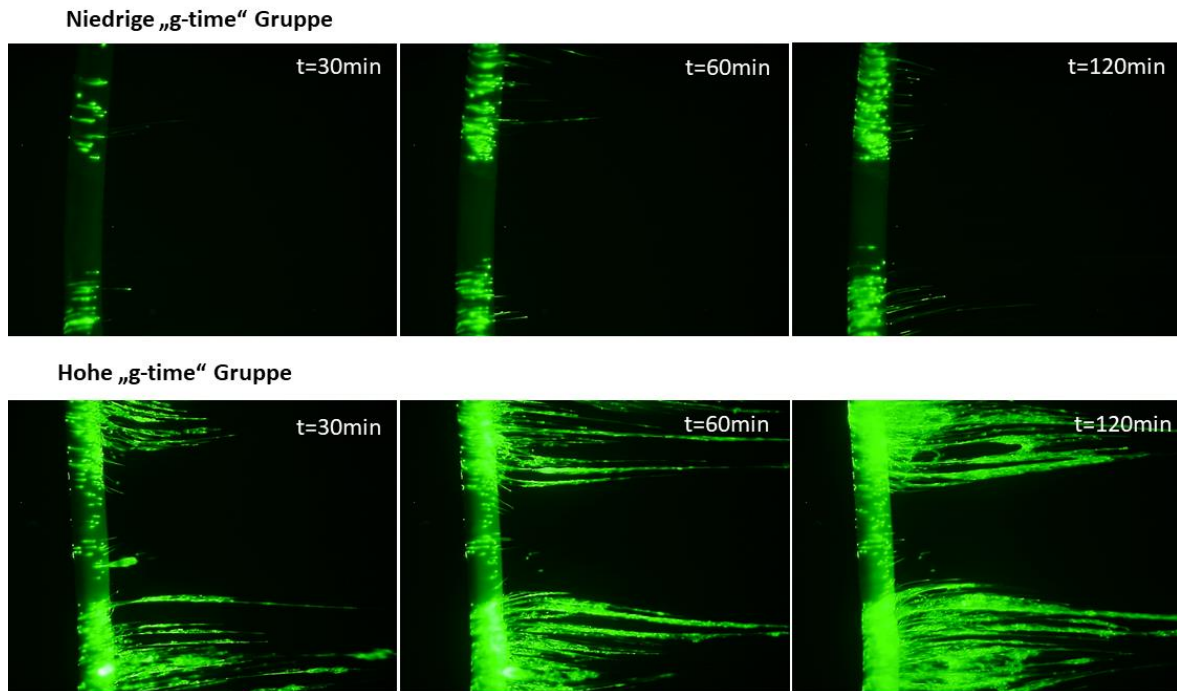


Abbildung 16: Beispielhafte Fluoreszenzbilder aus einer Versuchsreihe der niedrigen g-time Gruppe (oben) und der hohen g-time Gruppe (unten). Dargestellt sind die SytoxGreen-gefärbten DNA-Ablagerungen auf der Gasfaser (links) und die stromabwärts (von links nach rechts verlaufend) gebildeten DNA-Fäden nach 30, 60 und 120 min nach Zellzugabe.

Für jeden durchgeführten Versuch aus beiden Versuchsgruppen wurden die Oberflächen der SytoxTMGreen-gefärbten DNA-Strukturen quantifiziert und über die Zeit in den folgenden Abbildungen dargestellt. Es zeigte sich ein sigmoidaler Verlauf sowohl für die Oberflächen der DNA-Ablagerungen (Abbildung 17) als auch der DNA-Fäden (Abbildung 18). Im Folgenden werden zuerst die Entstehungsgeschwindigkeiten der DNA-Ablagerungen und DNA-Fäden mittels des ET_{50} -Wertes verglichen, anschließend die entstandene Flächensumme mittels des E_{max} -Wertes.

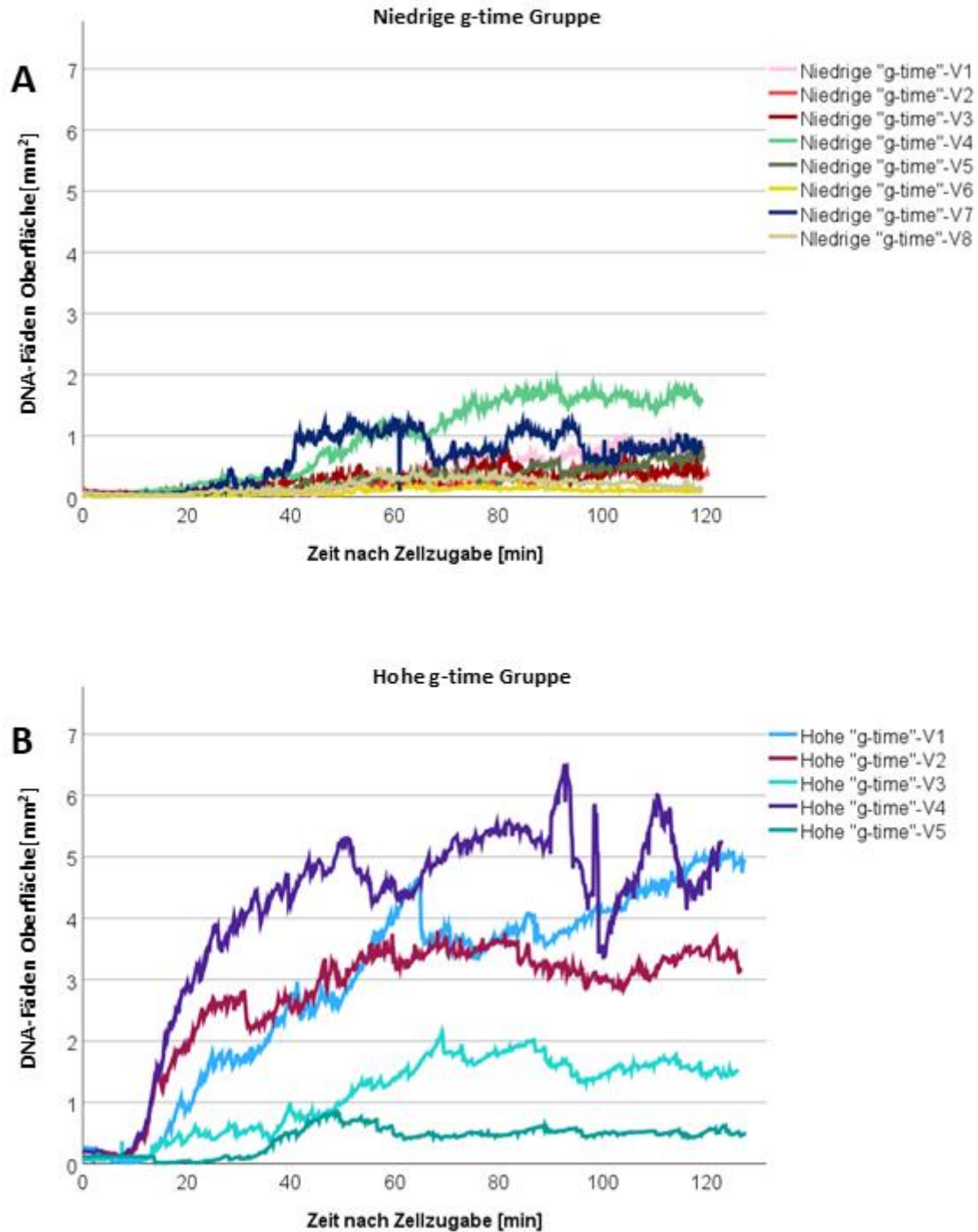


Abbildung 17: Zeitlicher Verlauf der Oberflächen der DNA-Ablagerungen auf der Gasfaser. Darstellung der einzelnen Versuche als Kurvenschar von (A) Zellen der niedrigen g-time Gruppe (n=8) und (B) Zellen der hohen g-time Gruppe (n=5).

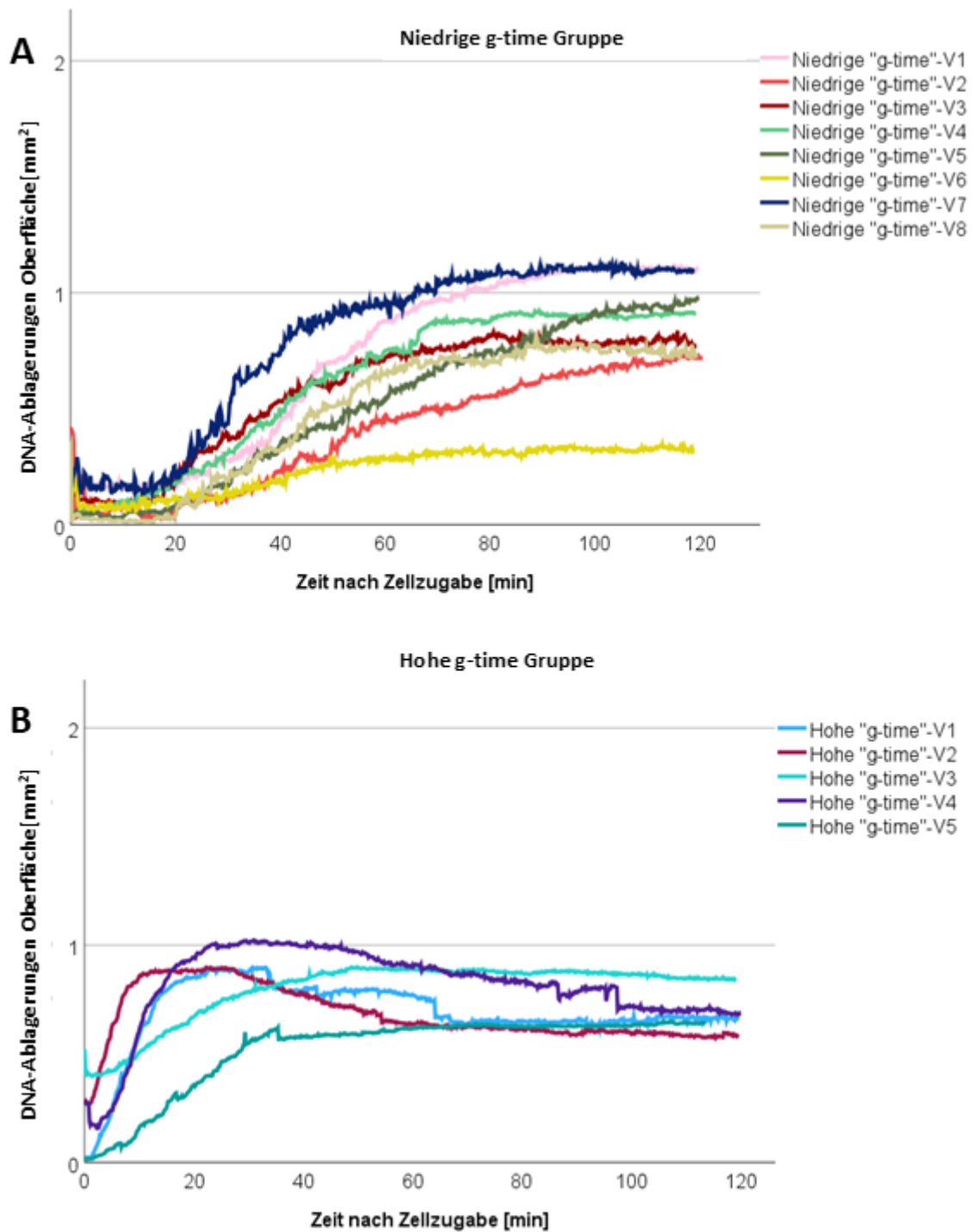


Abbildung 18: Zeitlicher Verlauf der Oberflächen der DNA-Fäden stromabwärts der Gasfasern. Darstellung der einzelnen Versuche als Kurvenschar von (A) Zellen der niedrigen g-time Gruppe (n=8) und (B) Zellen der hohen g-time Gruppe (n=5).

Aus den Kurvenverläufen wurde die Zeit ermittelt, zu der erstmals DNA-Ablagerungen (Abbildung 19, links) bzw. DNA-Fäden (Abbildung 19, rechts) (lag time) gebildet wurden. Für beide Strukturen war die lag time in der hohen *g*-time Gruppe signifikant niedriger als in der niedrigen *g*-time Gruppe. Die Ablagerungen tauchten etwa zur selben Zeit auf, zu der auch die DNA-Fäden entstanden (nicht signifikant).

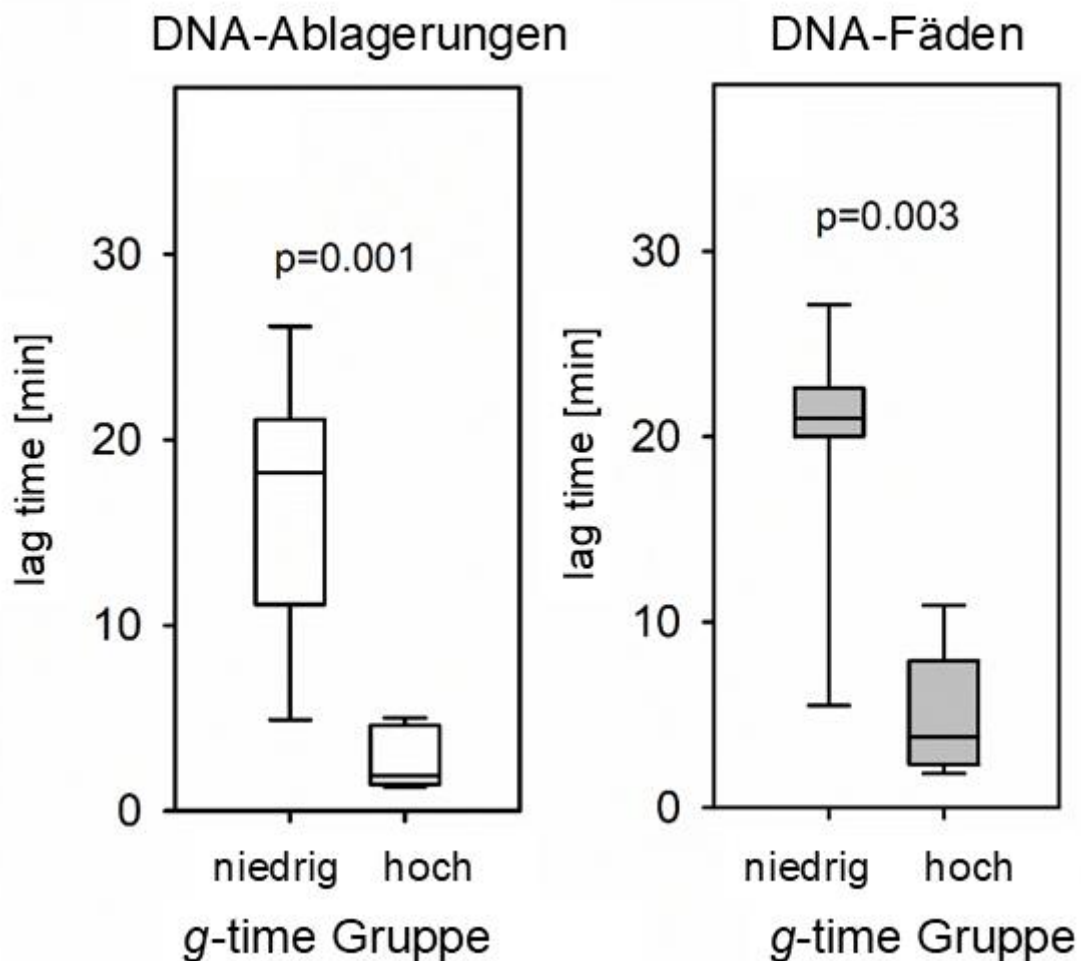


Abbildung 19: Ermittlung der Zeit, wo erstmals DNA-Ablagerungen (links) bzw. DNA-Fäden (rechts) auftauchen. Es ergaben sich für beide Strukturen signifikante Unterschiede zwischen der hohen und niedrigen *g*-time Gruppe.

4.2.2 Unterschiede in der Bildungsgeschwindigkeit von DNA-Ablagerungen und DNA-Fäden in Abhängigkeit von der Studiengruppe

Die Bildungsgeschwindigkeit der DNA-Strukturen wurde ermittelt. Daraus wurde der Zeitpunkt, an dem die halbmaximale Flächensumme der DNA-Ablagerungen und DNA-Fäden erreicht wurde (ET_{50}), berechnet. Alle errechneten ET_{50} -Werte folgten nach Kolmogorov-Smirnov einer Normalverteilung. Es zeigten sich dabei signifikante Unterschiede zwischen der hohen *g*-time Gruppe und der niedrigen *g*-time Gruppe. Der

ET₅₀-Wert der Entstehung der DNA-Ablagerungen auf der Gasfaser wurde bei der hohen *g*-time Gruppe im Mittel 34 min früher erreicht als in der niedrigen *g*-time Gruppe ($p < 0.001$) (Abbildung 20, Tabelle 3). Der ET₅₀-Wert der Entstehung der DNA-Fäden wurde ebenfalls bei der hohen *g*-time Gruppe im Mittel 25 min früher erreicht als in der niedrigen *g*-time Gruppe ($p = 0.011$) (Abbildung 21, Tabelle 3). Innerhalb derselben *g*-time Gruppen gab es allerdings keinen signifikanten Unterschied bei der Entstehung der DNA-Ablagerungen und DNA-Fäden.

<i>g</i> -time Gruppe	ET ₅₀ [min] DNA-Ablagerungen	N	ET ₅₀ [min] DNA-Fäden	N
Niedrig	46 ± 12	8	51 ± 12	6
Hoch	12 ± 7	5	26 ± 14	5
Gesamt	29 ± 9	13	39 ± 13	11

Tabelle 3: ET₅₀ -Werte (Mittelwert ± Standardabweichung) der Entstehung der DNA-Ablagerungen in Abhängigkeit der *g*-time Gruppe.

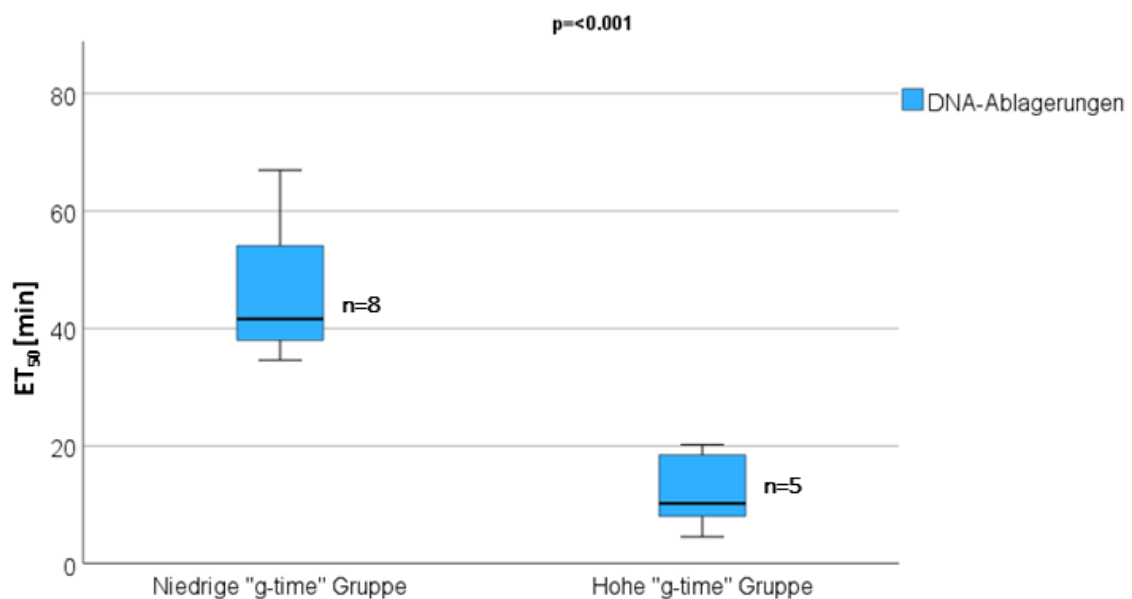


Abbildung 20: ET₅₀-Werte der Entstehung der DNA-Ablagerungen Flächensumme.

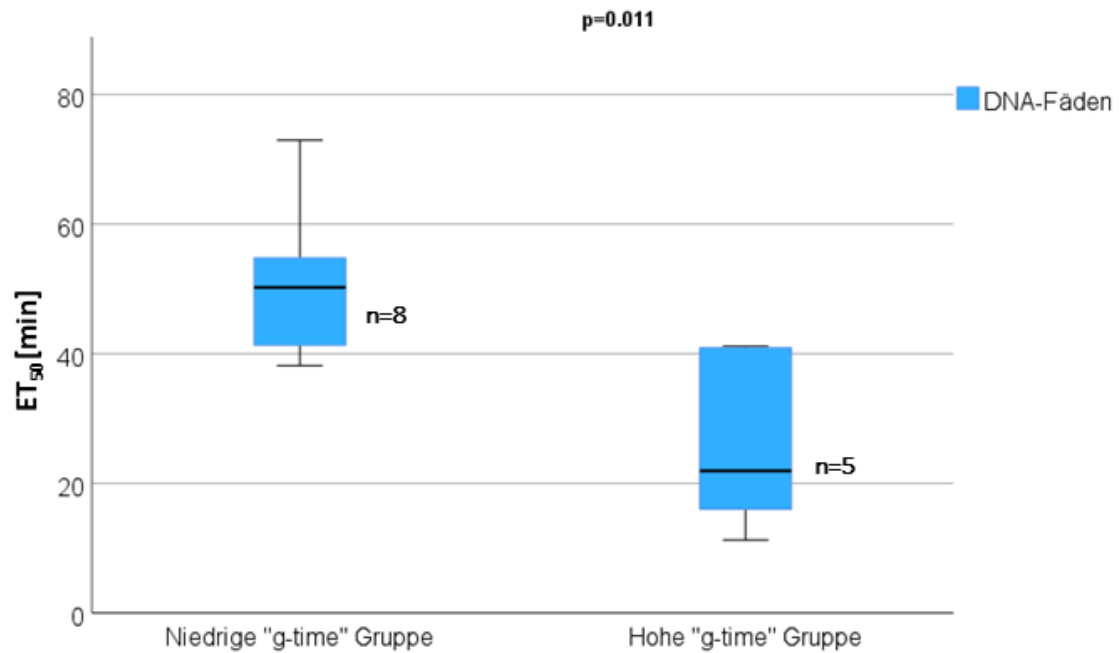


Abbildung 21: ET_{50} -Werte der Entstehung der DNA-Fäden Flächensumme.

4.2.3 Unterschiede in der maximalen Fläche der DNA-Fäden

Der $E_{\max}$ -Wert zeigt die maximal erreichte Flächensumme der DNA-Fäden. Für die DNA-Ablagerungen wurde kein $E_{\max}$ -Wert berechnet. Alle errechneten $E_{\max}$ -Werte folgten nach Kolmogorov-Smirnov einer Normalverteilung. Die DNA-Fäden der hohen g -time Gruppe zeigten im Vergleich zu der niedrigen g -time Gruppe im Mittel tendenziell die dreifache DNA-Fäden Flächensumme ($p=0.09$) (Abbildung 22, Tabelle 4).

g -time Gruppe	$E_{\max}$ [mm ²] DNA-Fäden	N
Niedrig	$0,9 \pm 0,8$	8
Hoch	$3,2 \pm 2,3$	5
Insgesamt	$2,1 \pm 1,6$	13

Tabelle 4: $E_{\max}$ -Werte (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung) der DNA-Fäden in Abhängigkeit der g -time Gruppe.

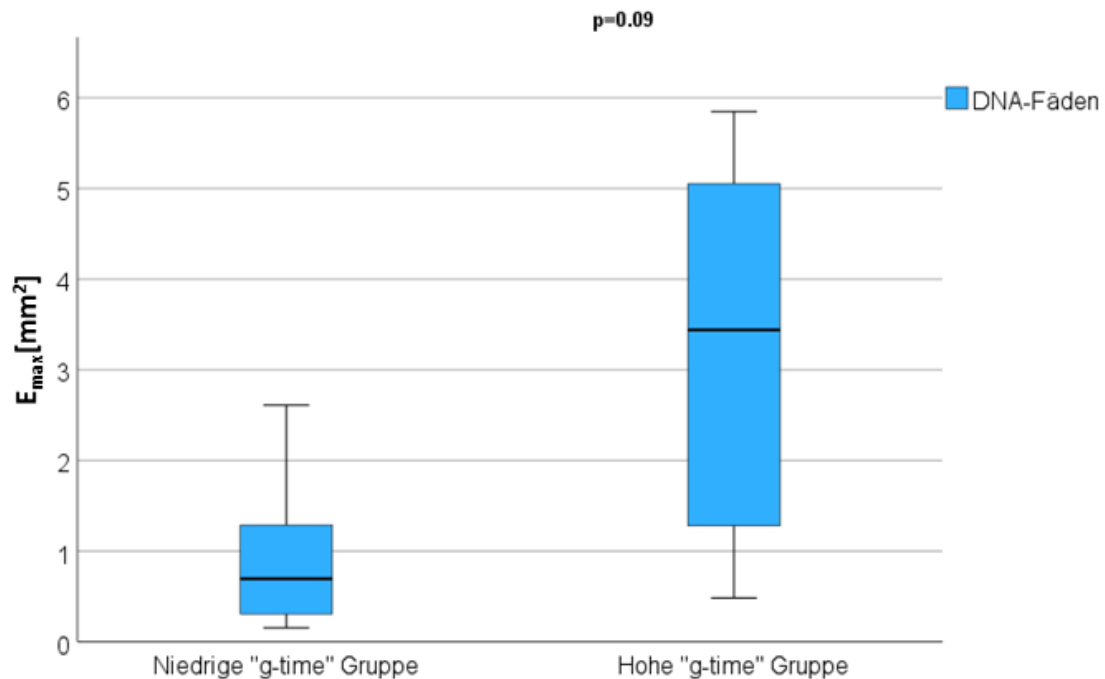


Abbildung 22: E_{max} -Werte der DNA-Fäden in Abhängigkeit der g-time Gruppe.

4.3 Teil 2: Einfluss vom Volumenstrom auf Granulozyten bei der Bildung von DNA-Strukturen an Gasfasern im Perfusionsmodell

Im zweiten Teil der Dissertation wurde der Einfluss des Volumenstroms im System auf die Bildung von DNA an der Gasfaser untersucht.

4.3.1 Visualisierung von DNA-Strukturen bei verschiedenen Volumenströmen

Die Zellen wurden verschiedenen Volumenströmen im System ausgesetzt. Diese wurden über die Luftdruckpumpe mit verschiedenen Drücken im System erzeugt (Tabelle 2). Es wurden dazu Versuchsreihen mit 5 mbar (1,0 - 2,7 mL/min), 10 mbar (3,1 - 4,3 mL/min), 20 mbar (6,0 - 9,2 mL/min), 30 mbar (7,4 - 12,6 mL/min) und 50 mbar (17,1 - 20,7 mL/min) durchgeführt.

Im Folgenden wurde die Bildung von DNA-Strukturen an der Gasfaser zu definierten Zeitpunkten (30, 60 und 120 min) bei unterschiedlichen Volumenströmen in einzelnen Fluoreszenzbildern exemplarisch dargestellt (Abbildung 23-Abbildung 27). Analog zum ersten Teil der Dissertation belegten die DNA-Ablagerungen eher die seitlichen Bereiche der Gasfaser, während der mittlere Teil der Gasfaser weniger mit DNA-Ablagerungen belegt war (Abbildung 14). Weiterhin werden die DNA-Fäden mit zunehmenden Flussraten kürzer (Fadenlängen nicht gemessen). Das Ausmaß der gebildeten DNA-Ablagerungen geht dabei

mit dem Ausmaß der gebildeten DNA-Fäden einher. D. h. je mehr DNA-Ablagerungen auf der Gasfaser entstehen, desto mehr DNA-Fäden entstehen.

Versuchsreihe 5mbar

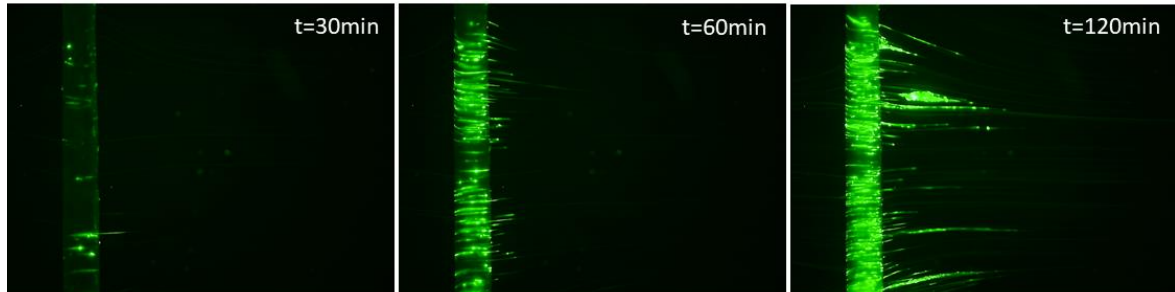


Abbildung 23: Beispielhafte fluoreszenzmikroskopische Darstellung von gebildeten DNA-Strukturen aus einer Versuchsreihe mit 5 mbar (1,0-2,7 mL/min). Bereits bei der kleinsten Flussrate werden DNA-Ablagerungen und DNA-Fäden an der Gasfaser sichtbar.

Versuchsreihe 10mbar

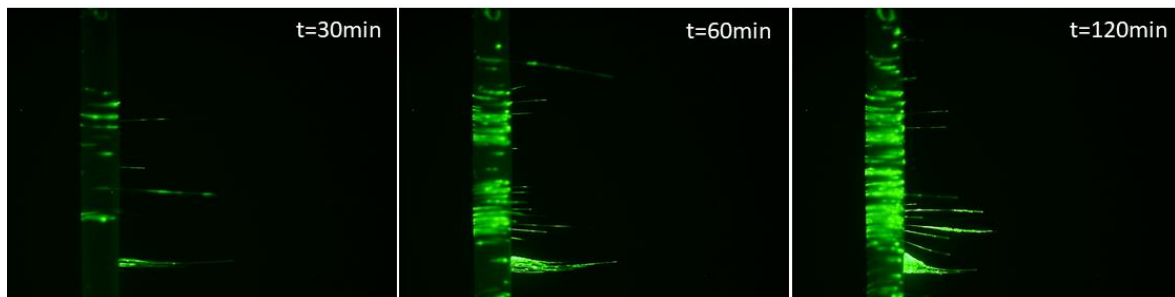


Abbildung 24: Beispielhafte fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Versuchsreihe mit 10 mbar (3,1-4,3 mL/min).

Versuchsreihe 20mbar

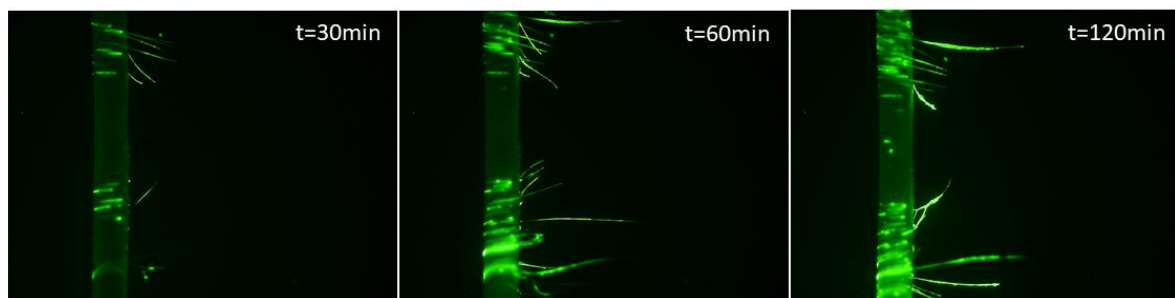


Abbildung 25: Beispielhafte fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Versuchsreihe mit 20 mbar (6,0-9,2 mL/min).

Versuchsreihe 30mbar

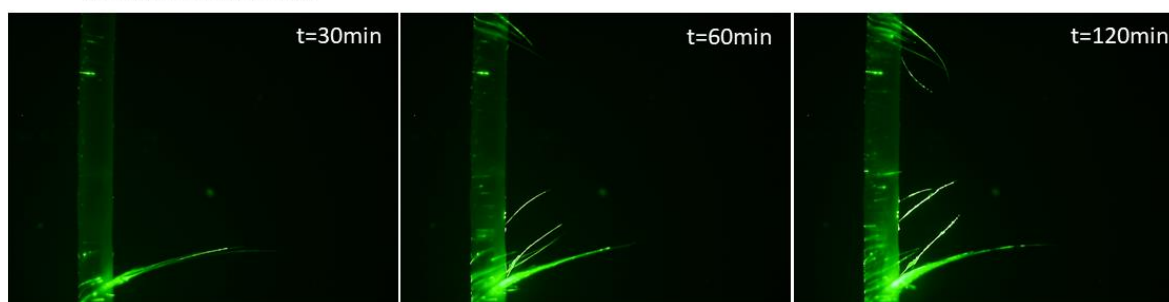


Abbildung 26: Beispielhafte fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Versuchsreihe mit 30 mbar (7,4-12,6 mL/min).

Versuchsreihe 50mbar

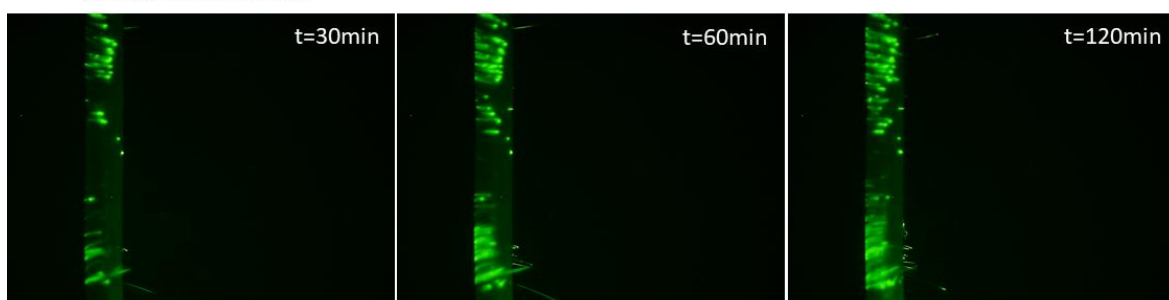


Abbildung 27: Beispielhafte fluoreszenzmikroskopische Darstellung von gebildeten DNA-Strukturen aus einer Versuchsreihe mit 50 mbar (17,1-20,7 mL/min). Bei hohen Flussraten wurden zwar DNA-Ablagerungen auf der Gasfaser sichtbar, jedoch wurden nur einzelne kurze DNA-Fäden gebildet.

4.3.2 Unterschiede in der Bildungsgeschwindigkeit der DNA-Ablagerungen und DNA-Fäden bei verschiedenen Scherkräften im Perfusionssystem

Analog zu Teil 1 wurde in Abhängigkeit vom Volumenstrom die Bildungsgeschwindigkeit der DNA-Strukturen und daraus der ET_{50} -Wert berechnet (Tabelle 5). Die errechneten ET_{50} -Werte wurden in Abhängigkeit vom Druck (Volumenstrom) in Abbildung 28 und Abbildung 29 dargestellt. Trotz der hohen Streuung deutet sich eine Abnahme des ET_{50} -Wertes (für beide DNA-Strukturen) mit steigendem Volumenstrom ab. Alle errechneten ET_{50} -Werte der DNA-Ablagerungen und DNA-Fäden folgten nach Kolmogorov-Smirnov einer Normalverteilung. Die statistischen Unterschiede sind jedoch fraglich, da die Fallzahl sehr klein war. Für die Bildung der DNA-Ablagerungen zeigte sich ein statistischer Unterschied zwischen den Gruppen 30 mbar und 50 mbar ($p=0.036$), der Unterschied der Gruppen 20 mbar und 30 mbar erreichte knapp nicht die Signifikanz ($p=0.051$). Alle anderen Gruppen der DNA-Ablagerungen unterschieden sich nicht signifikant voneinander (Abbildung 28). Die ET_{50} -Werte der DNA-Fäden unterschieden sich in keiner Gruppe signifikant voneinander (Abbildung 29). Die DNA-Ablagerungen traten mit einem ET_{50} -Mittelwert von

43 min früher auf als die DNA-Fäden mit einem ET_{50} -Mittelwert von 53 min. Ein statistischer Vergleich zwischen den ET_{50} -Werten der DNA-Ablagerungen und der DNA-Fäden nach Druck getrennt ergab jedoch keine statistische Relevanz.

Druck [mbar]	Volumenstrom [mL/min] (Min.-Max.)	ET_{50} [min] DNA-Ablagerungen	N	ET_{50} [min] DNA-Fäden	N
5	1,0-2,7	46 ± 12	8	58 ± 20	7
10	3,1-4,3	$46 \pm 0,5$	3	88 ± 84	4
20	6,0-9,2	36 ± 6	5	47 ± 8	5
30	7,4-12,6	58 ± 9	3	40 ± 19	4
50	17,1-20,7	35 ± 10	5	30 ± 11	4
Gesamt		43 ± 11	24	53 ± 38	24

Tabelle 5: ET_{50} -Werte (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung) der Entstehung von DNA-Ablagerungen und DNA-Fäden in Abhängigkeit des volumenstromerzeugenden Drucks.

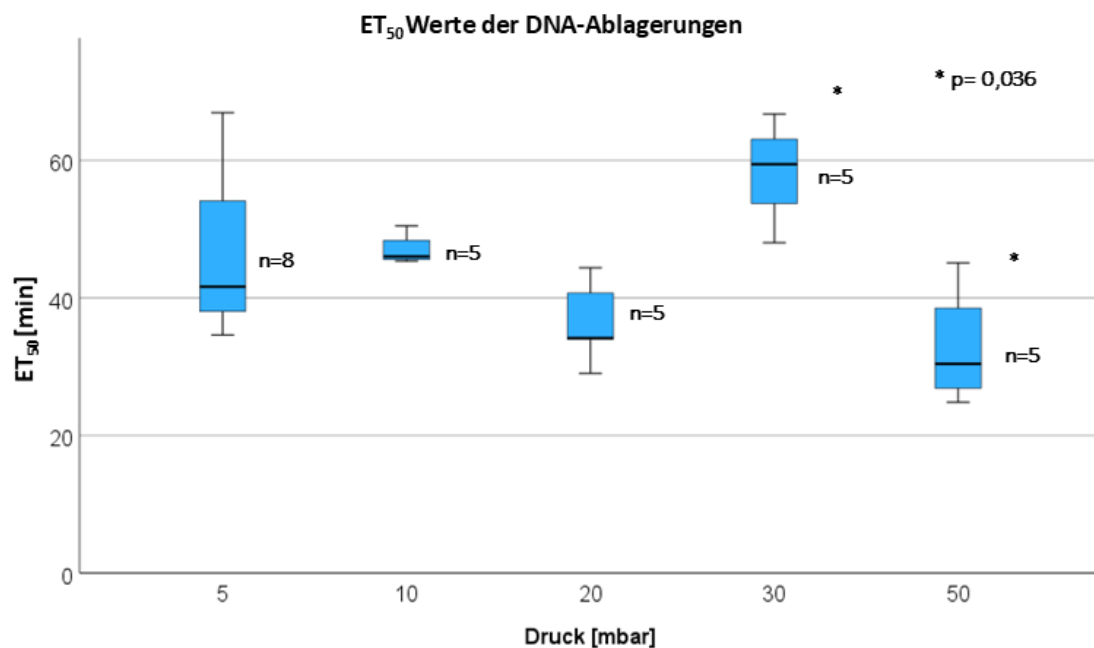


Abbildung 28: Unterschied in den ET_{50} -Werten der Entstehung der DNA-Ablagerungen Flächensumme in Abhängigkeit des volumenstromerzeugenden Drucks.

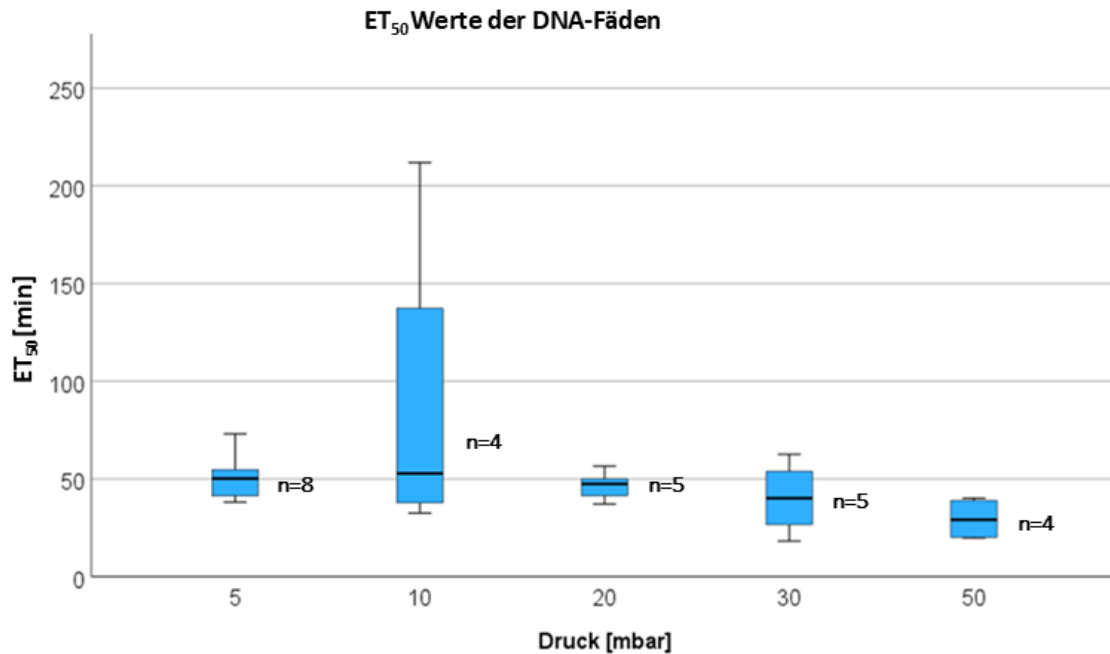


Abbildung 29: Unterschied in den ET_{50} -Werten der Entstehung der DNA-Fäden Flächensumme in Abhängigkeit des volumenstromerzeugenden Drucks.

4.3.3 Einfluss von unterschiedlichen Volumenströmen auf die maximale Flächensumme der DNA-Ablagerungen und DNA-Fäden

Trotz der hohen Streuung deutet sich eine Abnahme des $E_{\max}$ -Wertes (für beide DNA-Strukturen) mit steigendem Volumenstrom an. Alle errechneten $E_{\max}$ -Werte (Tabelle 6) folgten nach Kolmogorov-Smirnov einer Normalverteilung. Bei 5 mbar war die maximale Flächensumme der DNA-Ablagerungen signifikant höher als bei 50 mbar ($p=0.010$, Abbildung 30). Weitere Signifikanzen konnten nicht ermittelt werden. Die maximale Flächensumme der DNA-Fäden zeigte keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 31).

Druck [mbar]	Volumenstrom [mL/min] (Min.-Max.)	$E_{\max}$ [mm ²] DNA-Ablagerungen	N	$E_{\max}$ [mm ²] DNA-Fäden	N
5	1,0-2,7	$0,90 \pm 0,17$	8	$0,92 \pm 0,83$	8
10	3,1-4,3	$0,50 \pm 0,31$	5	$0,39 \pm 0,35$	4
20	6,0-9,2	$0,59 \pm 0,07$	5	$0,46 \pm 0,25$	5
30	7,4-12,6	$0,54 \pm 0,25$	5	$0,31 \pm 0,25$	5
50	17,1-20,7	$0,38 \pm 0,27$	5	$0,12 \pm 0,09$	4
gesamt		$0,58 \pm 0,21$	28	$0,44 \pm 0,35$	26

Tabelle 6: $E_{\max}$ -Werte (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung) der Entstehung von DNA-Ablagerungen und DNA-Fäden in Abhängigkeit des volumenstromerzeugenden Drucks.

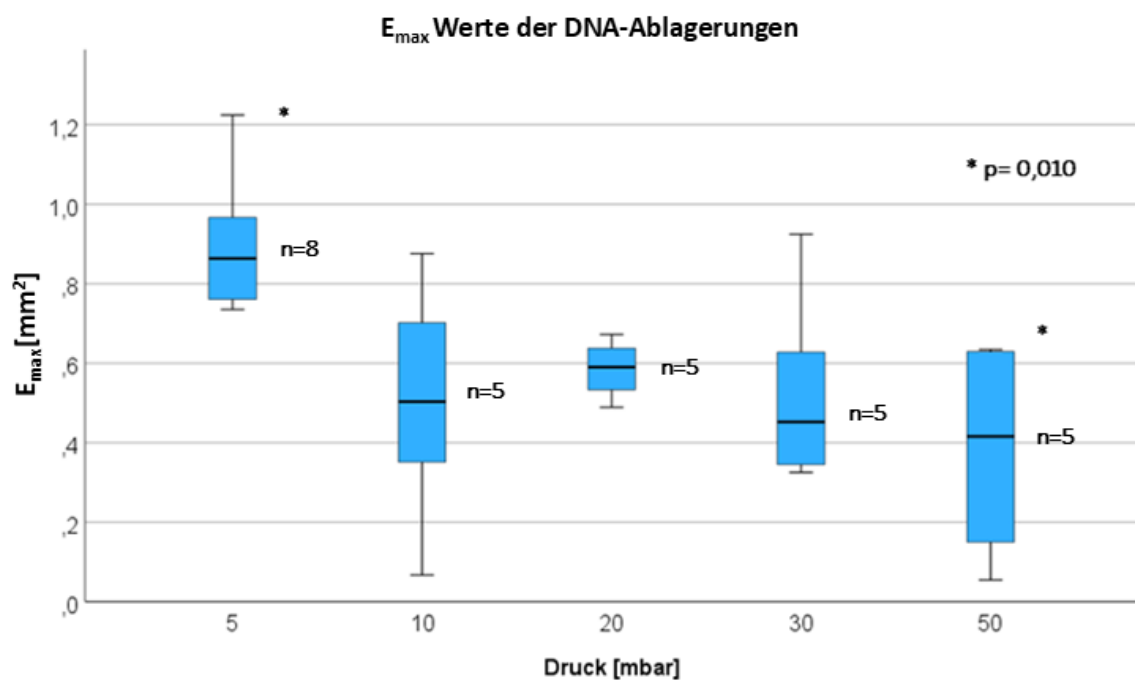


Abbildung 30: $E_{\max}$ -Werte der DNA-Ablagerungen in Abhängigkeit des volumenstromerzeugenden Drucks.

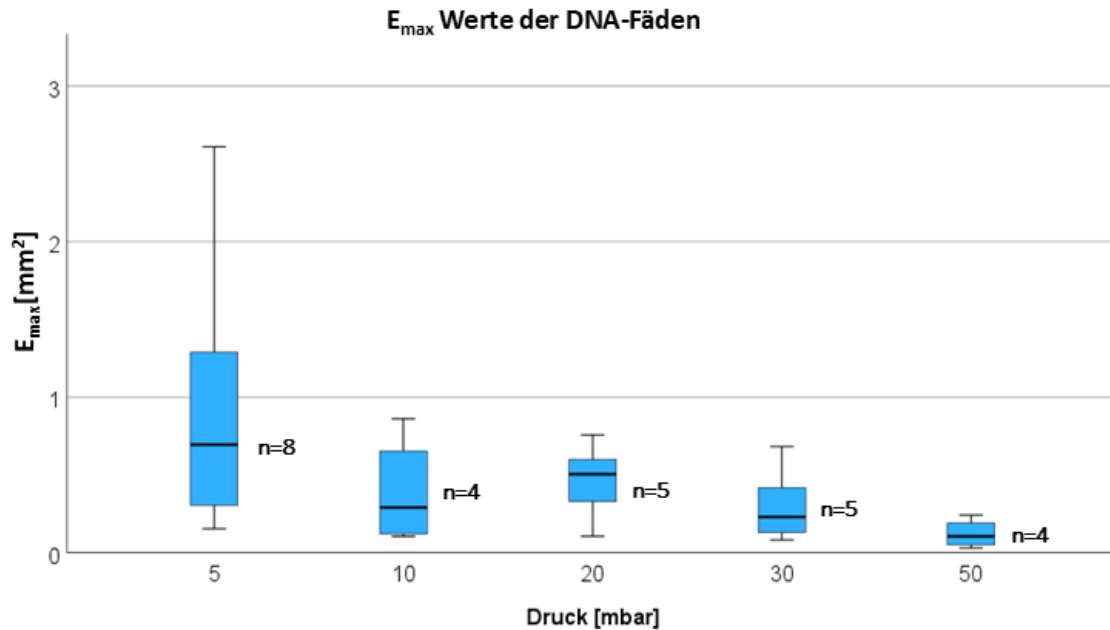


Abbildung 31: E_{max} -Werte der DNA-Fäden in Abhängigkeit des volumenstromerzeugenden Drucks.

4.4 Ablagerung vitaler Zellen an der Gasfaser

Die Gasfaser nimmt mit ihrem Querschnitt (Durchmesser, 380 μm) einen großen Teil des Kanals der Strömungskammer (Kanalhöhe, 400 μm) ein. Dabei ist sie in der Mitte dem oberen Ende des Kanals dichter anliegend als an den Seiten des Kanals, wo die Gasfaser der unteren Begrenzung des Kanals aufgrund der Klebestellen vollständig anliegt (Abbildung 5). Diese Anordnung lässt einen hohen Widerstand und damit hohe Scherkräften an der Gasfaser erwarten. Allerdings war eine strömungsdynamische Berechnung der Scherkräfte nicht möglich (Aussage von Prof. Dr. Lars Krenkel, OTH Regensburg).

Aus der Gesamtheit der durchgeführten Versuche zeichnete sich ab, dass der mittlere Teil der Gasfaser immer eine geringe Belegung mit DNA-Fäden und DNA-Ablagerungen zeigte, während diese an den seitlichen Teilen der Gasfaser deutlicher ausgeprägt war. An dieser Stelle wird darauf verwiesen, dass diese Stellen nicht den Reaktionen an den Klebestellen entsprechen, da der mikroskopische Ausschnitt mittig auf der Gasfaser gewählt wurde, sodass die Klebestellen ausgespart waren (Abbildung 5). Bezieht man den Einzelversuch mit den Calcein-gefärbten Zellen mit ein, sind nur diese Stellen an der Gasfaser mit vitalen Zellen besetzt, während die überwiegende Oberfläche der Gasfaser frei von adhären Zellen war (Abbildung 32-Abbildung 35, links). Dagegen fanden sich die DAPI-gefärbten

DNA-Ablagerungen auf der Gasfaser. DNA-Fäden gingen von größeren DNA-Ablagerungen aus (Abbildung 35, rechts).

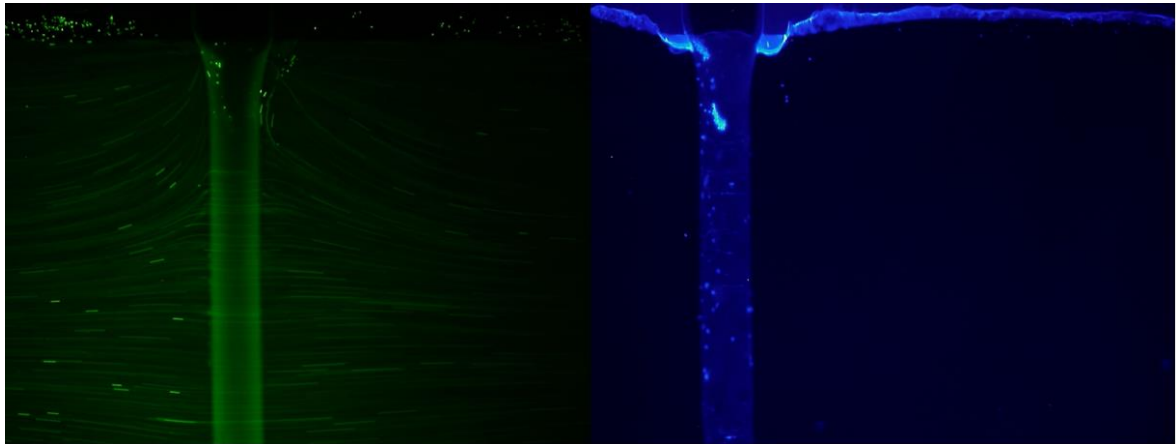


Abbildung 32: Strömungsverhältnisse am oberen Ende der Gasfaser mit Calcein (links) und DAPI (rechts) mit Fluss im System (5 mbar (1,0-2,7 mL/min)). Strömungsrichtung von links nach rechts.

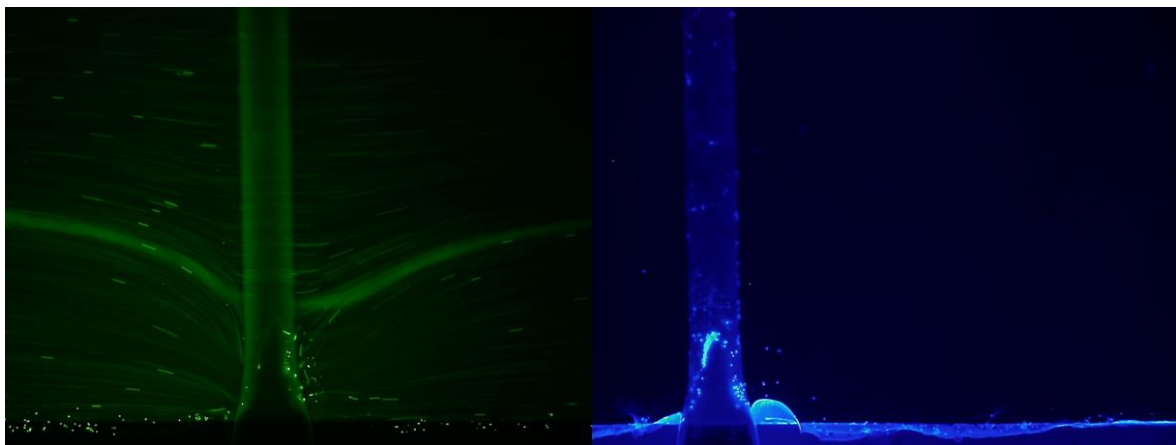


Abbildung 33: Strömungsverhältnisse am unteren Ende der Gasfaser mit Calcein (links) und DAPI (rechts) mit Fluss im System (5 mbar (1,0-2,7 mL/min)). Strömungsrichtung von links nach rechts.

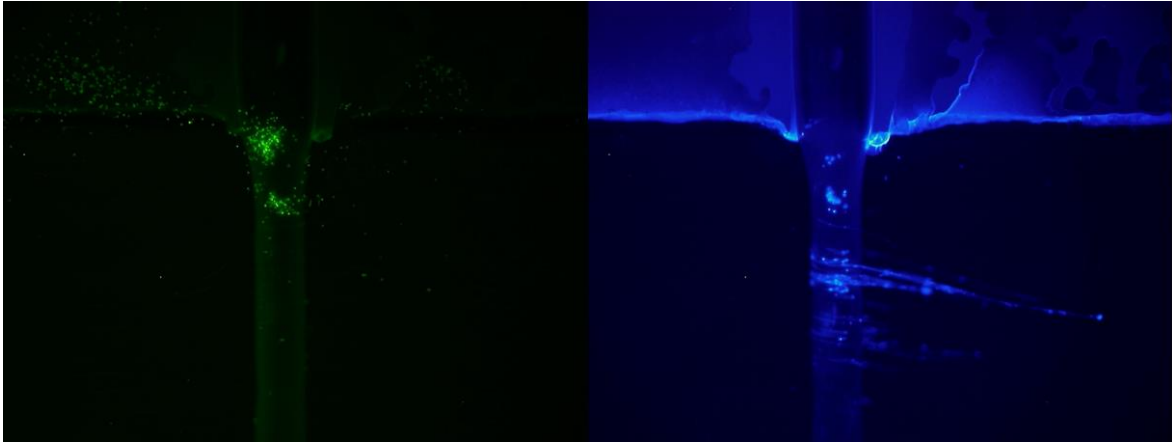


Abbildung 34: Belegung der Gasfaser am oberen Ende mit vitalen Zellen (grüne Punkte, Calcein, links) und DNA-Fäden/DNA-Ablagerungen (blaue Fäden und Punkte, DAPI, rechts) bei der nach dem Versuch mit entionisiertem Wasser gespülten Strömungskammer.



Abbildung 35: Belegung der Gasfaser am unteren Ende mit vitalen Zellen (grüne Punkte, Calcein, links) und DNA-Fäden/DNA-Ablagerungen (blaue Striche und Punkte, DAPI, rechts) bei der nach dem Versuch mit entionisiertem Wasser gespülten Strömungskammer.

4.5 Ergebnisse der durchflussszytometrischen Messungen

Mithilfe von Durchflussszytometrie wurden Proben analysiert, die während der drei Versuche aus dem System entnommen wurden. Die Zellen wurden im Hinblick auf Zellzahl, Größe und Granularität untersucht. Dabei analysierte der Forward Scatter (FSC-H) [RI] die Größe der Zellen und der Side Scatter (SSC-H) [RI] die Granularität. Abbildung 13 zeigt ein Beispiel der Auswertung zu den Zeitpunkten 0 min, 30 min, 60 min und 120 min nach Versuchsbeginn.

4.5.1 Zellzahl vitaler Zellen

Für die Messung der Zellzahl wurde die Anzahl der lebenden, Calcein-gefärbten Zellen in jeder Probe analysiert (Abbildung 36, Tabelle 7). Vitale Zellen innerhalb des Systems

konnten in jeder Messung zu jedem Zeitpunkt nachgewiesen werden. Die Abgrenzung der Granulozyten im Dotplot (FSC vs SSC, Abbildung 13) war schwierig. Zu Beginn der Versuchslaufzeit (10 min) ergab sich eine Zellzahl, die weit über den ursprünglich eingespritzten 9 Mio Zellen innerhalb des Systems lag ($9 \cdot 10^6$ Zellen in 18 mL = 500 Zellen/ μ L). Die Zellzahl fällt über die Dauer des Versuches im Schnitt um $8,3 \pm 1,4$ Zellen/ μ L pro Minute ($p < 0,001$) ab, bis am Ende der Versuchsdauer von 120 min nur noch 20 % der ursprünglich eingespritzten vitalen Zellen im System nachweisbar waren (Tabelle 7).

Zeitpunkt nach Zellzugabe [min]	Zellzahl [Zellen/ μ L]	Anteil Zellen [%]	N
10	931 ± 311	100	3
20	734 ± 167	79	3
30	799 ± 359	86	3
40	631 ± 62	68	3
50	616 ± 254	66	3
60	390 ± 93	42	3
70	424 ± 153	46	3
80	268 ± 91	29	3
90	210 ± 60	23	3
100	255 ± 155	27	3
110	134 ± 5	14	3
120	183 ± 132	20	2
gesamt			35

Tabelle 7: Anzahl Calcein-positiver Zellen (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung) innerhalb des Systems über die Versuchslaufzeit.

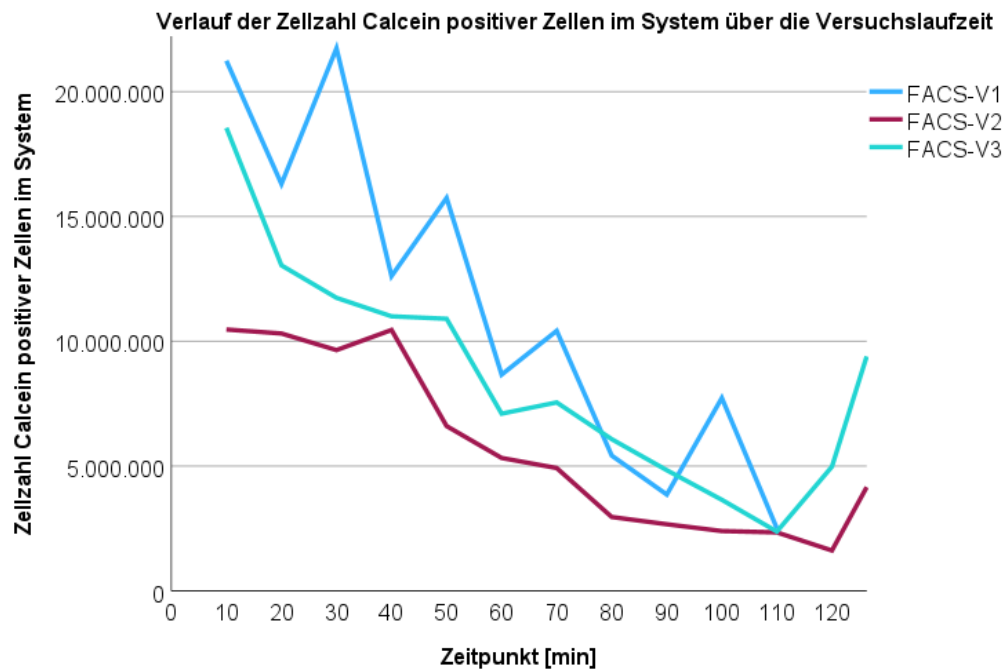


Abbildung 36: Anzahl der Calcein-positiven Zellen im System über die Versuchslaufzeit in drei unabhängigen Versuchen.

4.5.2 Zellgröße

Relative Größenveränderungen der Calcein-positiven Zellen wurden im Zeitverlauf mittels FSC analysiert (Abbildung 37, Tabelle 8). Dabei fiel auf, dass die Zellgröße sich über die Versuchslaufzeit nicht maßgeblich veränderte. Ab einer Versuchsdauer von 100 min nahmen die Zellen an Größe zu, allerdings war die Streuung (bei kleiner Fallzahl, $n=3$) zu hoch, sodass sich eine Signifikanz ergab. Für die Berechnung wurde der Mittelwert bei 0 min als 100 % definiert. Es zeigte sich eine Zunahme der Zellgröße um $(0,18 \pm 0,05) \%$ pro Minute über die Dauer von 120 min.

Zeitpunkt nach Zellzugabe [min]	Zellgröße relativ zu 0 min [Prozent]	N
0	100 ± 8	3
10	108 ± 13	3
20	106 ± 11	3
30	101 ± 2	3
40	103 ± 4	3
50	109 ± 5	3
60	110 ± 5	3
70	107 ± 4	3
80	107 ± 8	3
90	108 ± 2	3
100	123 ± 22	3
110	119 ± 2	3
120	130 ± 2	2
gesamt		39

Tabelle 8: Veränderung der Zellgröße Calcein-positiver Zellen (Mittelwert ± Standardabweichung über die Versuchslaufzeit.

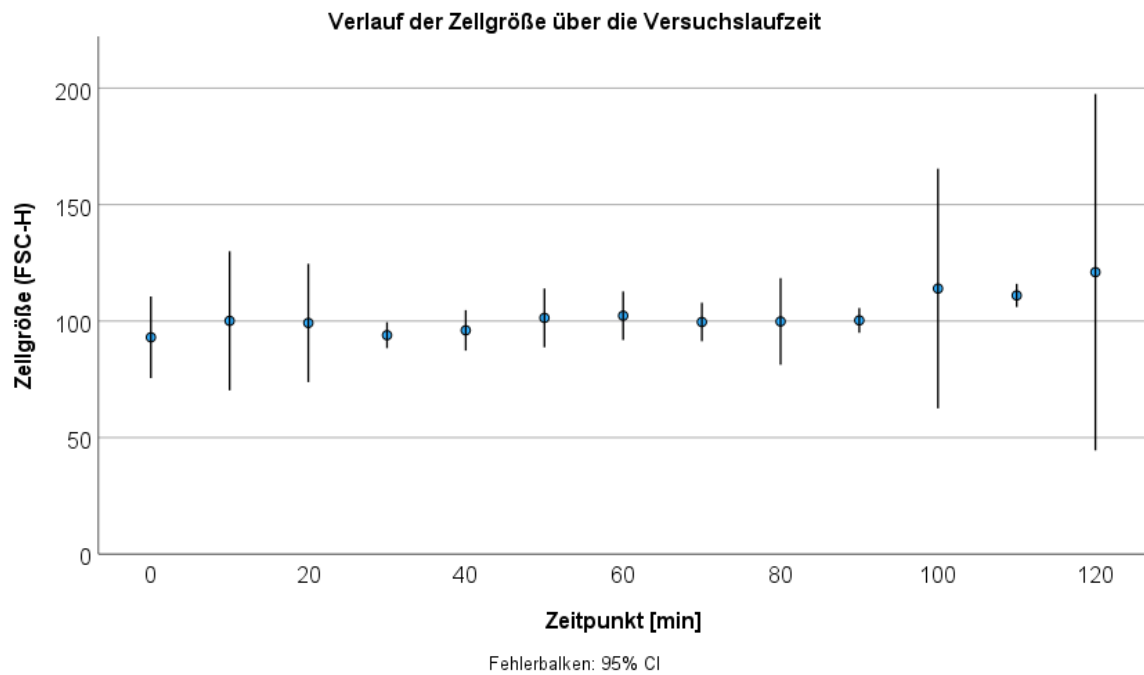


Abbildung 37: Zellgröße der Calcein-positiven Zellen über die Versuchslaufzeit (n=3).

4.5.3 Zellgranularität

Die Granularität der Calcein-positiven Zellen wurde für jede Probe durchflusszytometrisch bestimmt (Abbildung 38, Tabelle 9). Dabei blieb die Granularität über die gesamte Versuchsdauer weitestgehend unverändert. Für die Berechnung wurde der Mittelwert bei 0 min als 100 % definiert. Es zeigte sich eine Zunahme der Zellgranularität um $(0,005 \pm 0,14)$ % pro Minute über die Dauer von 120 min.

Zeitpunkt nach Zellzugabe [min]	Zellgranularität relativ zu 0 min [Prozent]	N
0	100 ± 38	3
10	98 ± 38	3
20	96 ± 38	3
30	99 ± 39	3
40	97 ± 39	3
50	103 ± 45	3
60	96 ± 38	3
70	9 ± 39	3
80	97 ± 38	3

90	97 ± 37	3
100	100 ± 35	3
110	97 ± 37	3
120	102 ± 29	2
gesamt		39

Tabelle 9: Zellgranularität der Calcein-positiven Zellen (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung über die Versuchslaufzeit).

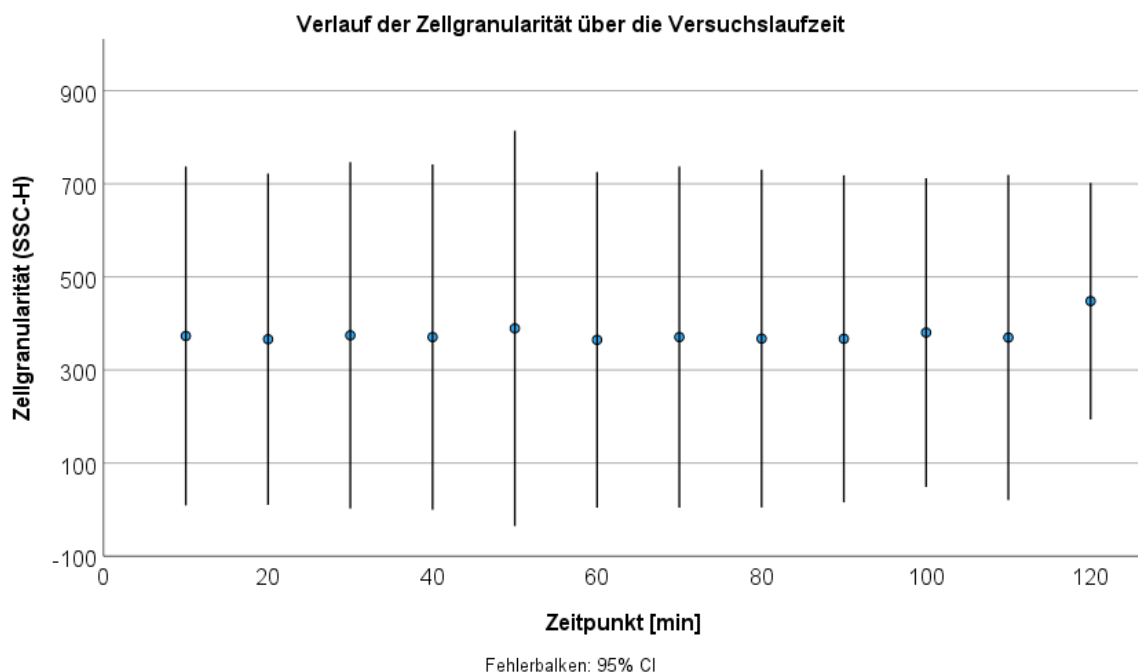


Abbildung 38: Zellgranularität der Calcein positiven Zellen über die Versuchslaufzeit.

4.6 Einfluss einer schonenden Isolationsmethode von Granulozyten auf die DNA-Freisetzung an Gasfasern im Perfusionsmodell

Aus Vorversuchen zum Einfluss der Isolationsmethode auf die Granulozytenfunktion war bekannt, dass eine Isolierung mit „GelaFundin“ (siehe Kapitel 3.5) schonender ist, als mit den in Teil 1 der Arbeit beschriebenen Methoden (43). In einem einzelnen Versuch konnte gezeigt werden, dass die mit GelaFundin isolierten Granulozyten zusammen mit den aus Vollblut mitisolierten Gerinnungsbestandteilen im Perfusionssystem bei 5 mbar (1,0-2,7 mL/min) eine Akkumulation thrombotischen Materials an der Gasfaser bildeten (Abbildung 39). Kleinere Aggregate waren bereits wenige Minuten nach Zugabe ins System sichtbar.

Die SytoxTMGreen-gefärbten Flächen konnten nicht ausgewertet werden, ein quantitativer Vergleich der Oberflächen von DNA-Ablagerungen und DNA-Fäden war nicht möglich. Am Ende des Versuches (120 min) nahm der Volumenstrom im System massiv ab. Das angelagerte Material verstopfte die Strömungskammer nahezu vollständig.

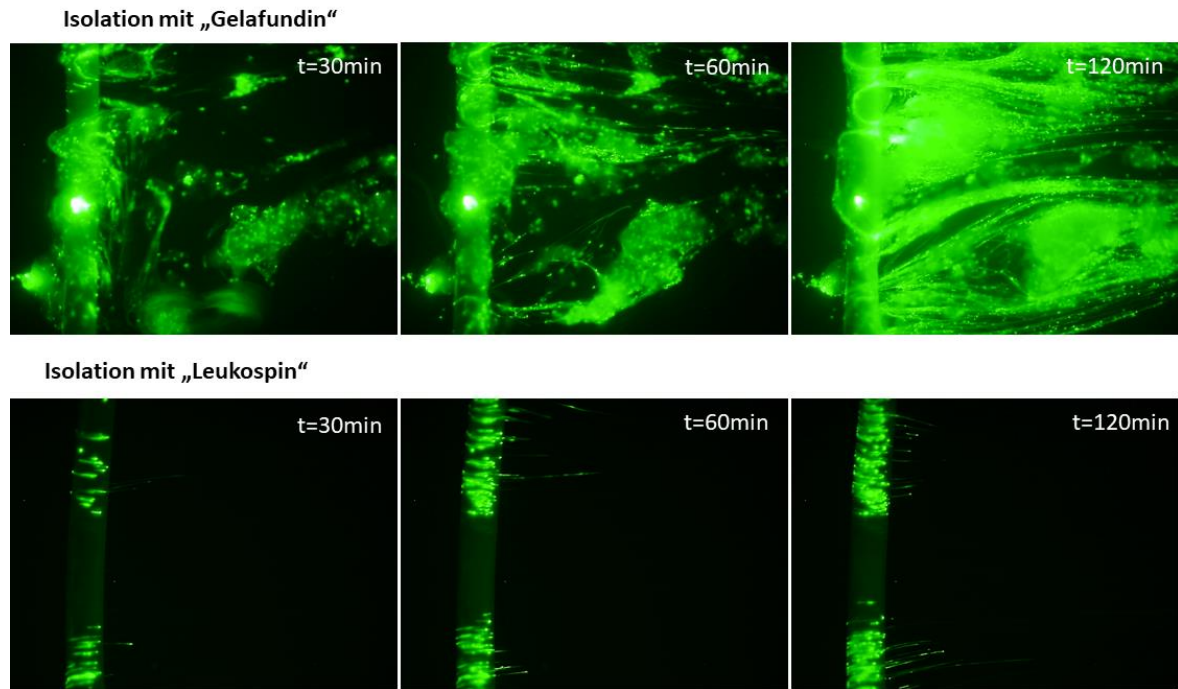


Abbildung 39: Vergleich der Isolationsmethoden "Gelafundin" (oben) und "Leukospin" (unten). Repräsentative Fluoreszenzbilder nach 30, 60 und 120 min. Grün: DNA-Färbung mittels SytoxTMGreen. Flussrichtung von links nach rechts.

5 Diskussion

5.1 An der Gasfaser lagerte sich freie DNA in Form von DNA-Ablagerungen und DNA-Fäden ab

Die ins System eingesetzten Granulozyten setzten während des Perfusionsversuches DNA frei, die sich in Form von DNA-Ablagerungen auf der Gasfaser und als DNA-Fäden hinter der Gasfaser zeigten. Die DNA-Fäden zeigten sich dabei über die Zeit in ihrer Länge stabil und verklebten teils zu Konglomeraten, allerdings kam es bei einzelnen, langen Fäden auch zum Abreißen.

Da die freigesetzten Ablagerungen und Fäden von dem eingesetzten, nicht membrangängigen DNA-Farbstoff SytoxTMGreen angefärbt wurden und sich durch den Einsatz von DNase auflösten, konnten sie als extrazelluläre DNA identifiziert werden. Isolierte Granulozyten stellten die größte zelluläre Komponente des Systems dar, daher muss die nachgewiesene extrazelluläre DNA von diesen abstammen. Durch durchflusszytometrische Messungen der Calcein gefärbten Zellen konnte dabei sichergestellt werden, dass sich zu jedem Zeitpunkt vitale Granulozyten im System befanden. Granulozyten konnten aufgrund ihrer Größe von anderen Zellpopulationen abgegrenzt werden, die das Granulozytenisolat verunreinigten. Eine genaue Quantifizierung des Anteils der Granulozyten im Isolat wurde nicht vorgenommen. Die Zellen wurden in ein Reservoir eingespritzt, während das System bereits durch die Pumpe perfundiert wurde. Es fiel eine anfänglich hohe Zellzahl in den Hochrechnungen der vitalen Zellen innerhalb des Systems auf, was durch ein anfängliches Verbleiben der Zellen im Reservoir, aus dem auch die Proben zur Zellzahlberechnung genommen wurden, erklärbar ist. Anschließend sank die Zellzahl über die Versuchslaufzeit mit der beginnenden Ablagerung von DNA an der Gasfaser kontinuierlich ab. Analog sank mit zunehmender Ablagerung von DNA an der Gasfaser auch der Fluss im System kontinuierlich ab.

Die Beobachtung der DNA-Freisetzung an der Gasfaser wirft die Frage auf, ob dafür NETose oder ein alternativer Prozess der DNA-Freisetzung verantwortlich ist. Bei der NETose handelt es sich um einen physiologischen Prozess, bei dem Zellen DNA als Abwehrmechanismus gegen Pathogene auswerfen (17), wobei sie sowohl durch hydrophobe Oberflächen von Biomaterialien als auch durch hohe mechanische Scherkräfte ausgelöst werden kann (24,25). Vor diesem Hintergrund wird bei der vorliegenden Arbeit davon ausgegangen, dass die beobachtete freie DNA an der Gasfaser eine mögliche Folge von

NETose sein kann. Eine Erhöhung von NETose Markern während einer ECMO-Therapie wurde bereits des Öfteren beschrieben und im ovinen in-vivo-Modell sowie direkt im entnommenen thrombotischen Gewebe des MO's nachgewiesen (7). Für die Anwesenheit von freier DNA spricht eine hier vorliegende Auflösbarkeit der DNA-Fäden durch DNase, wie in vivo und in vitro bereits gezeigt (57,58). Der Eindruck der DNA-Fäden folgt zudem morphologischen Charakteristika der NETose, welche nach ihrer spezifischen Ultrastruktur definiert sind und unter anderem wolkenförmige Konstrukte aus den Fasern bilden, sowie die 10-15 fache Fläche der ursprünglichen Zelle belegen können (59). Limitierend wurden in der hier vorliegenden Arbeit keine für NETose spezifischen Marker, wie beispielsweise citrulliniertes Histon 3 (citH3), gemessen (7).

In der Auswertung der Durchflusszytometrie zeigen sich keine für NETose spezifischen Befunde, wie etwa eine Zunahme der Granularität, bei den Calcein gefärbten Zellen (23). Ein Anschwellen Calcein gefärbter Zellen konnte erst bei Zeitpunkten ab ca. 100 min nach Versuchsbeginn beobachtet werden, als die DNA-Freisetzung schon weitestgehend in der Plateauphase der berechneten Kurve angekommen war. Entsprechend entstanden zu diesem Zeitpunkt nur noch wenig neue DNA-Fäden oder DNA-Ablagerungen an der Gasfaser.

Ebenfalls denkbar wäre eine DNA-Freisetzung in Folge einer mechanischen Schädigung der eingesetzten Zellen durch das System oder der Gasfaser selbst. Bislang kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Zellen bereits im Perfusionsset durch die Schaltventile oder beim Übergang der englumigen Schläuche in die Flusskammer mechanisch geschädigt werden und dadurch eine NETose induzieren können. Weiterhin liegt der Verdacht nahe, dass sich an der Gasfaser, die als mechanisches Hindernis einen großen Teil des Lumens der Strömungskammer ausfüllt (Durchmesser der Gasfaser, 380 µm; Kanalhöhe, 400 µm) (Abbildung 5), die Strömungsverhältnisse ändern (insbesondere in den seitlichen Bereichen der Gasfaser). Dort lassen sich meisten DNA-Ablagerungen und DNA-Fäden nachweisen (Abbildung 32, Abbildung 33). Die Vitalfärbung der Zellen mit Calcein erlaubte einen Vergleich der Belegung der Gasfaser mit vitalen Zellen im Vergleich mit DNA-Ablagerungen und DNA-Fäden, visualisiert mit DAPI. Es konnte gezeigt werden, dass sich die vitalen Zellen zusammenhängend zu den DNA-Ablagerungen und DNA-Fäden in den seitlichen Bereichen des beobachteten Bereiches der Gasfaser anlagerten. Eine DNA-Freisetzung ist in Folge einer mechanischen Schädigung der Zellen aufgrund der mechanischen Scherkräfte an diesen Stellen denkbar. Die Scherkräfte an diesen Stellen konnten nicht bestimmt werden, wodurch keine Korrelation zwischen Scherkräften und auftretenden DNA-Strukturen möglich war. Es wird spekuliert, dass durch die Einengung

des Lumens wahrscheinlich eine plötzliche Steigerung der Scherkräfte im System auftritt, die analog zu Yu et al. die Zellen zusätzlich zu NETose angeregt haben könnten (24). Yu et al. beschrieben, dass eine plötzliche Steigerung von Scherkräften eines venösen Levels auf ein arterielles Level, Zellen massiv zu NETose anregt, zudem hohe mechanische Scherkräfte auch ohne eine plötzliche Steigerung NETose triggern können (24).

Eine genauere Differenzierung, ob bei der beobachteten DNA-Freisetzung letztlich NETose oder ein anderer Mechanismus der DNA-Freisetzung vorliegt, kann in dieser Arbeit daher nicht weiter erfolgen. Allerdings ergeben sich Hinweise auf eine Beteiligung von NETose. Neben der Calcein-Färbung könnte auch die Expression von NETose-Markern bei PMNs im ECMO-Modell untersucht werden. Masuda et al. stellten dazu eine durchflusszytometrische Methode vor, wobei nach PMA-Stimulation eine verstärkte DNA-Bindung (SytoxTMGreen) gezeigt werden konnte, die mit Myeloperoxidase (MPO) kolokalisiert war (60), alternativ wäre auch der Nachweis anderer NETose-Marker wie beispielsweise citrullinierter Histone möglich (61,62). Eine entsprechende Analyse wurde in der vorliegenden Arbeit nicht eingeführt. Dagegen wurde versucht, die Fluoreszenzintensität der SytoxTMGreen-gefärbten zellfreien DNA im Perfusionsmedium im Fluorimeter nachzuweisen. Dabei war allerdings die Sensitivität des Messverfahrens zu schwach, um Unterschiede über die Zeit aufzuzeigen (Daten nicht gezeigt).

5.2 Zentrifugation bei der Zellpräparation führt zu schnellerer und stärkerer DNA-Freisetzung

Im ersten Teil der Dissertation wurde der Einfluss von Zentrifugationskräften auf die Bildung von DNA an der Gasfaser untersucht. Dabei zeigte sich, dass eine höhere einwirkende *g*-time zu einer signifikant früheren Freisetzung freier DNA an der Gasfaser führt. Zudem zeigte sich eine größere gemessene Oberfläche an DNA-Fäden bei den Zellen, die eine höhere *g*-time erfuhren.

Diese Beobachtung geht einher mit Untersuchungen von Hundhammer et al. (1). Die Autoren zeigten, dass eine erhöhte *g*-time wichtige Zellfunktionen Neutrophiler Granulozyten beeinflusst (1). Dabei zeigte sich eine deutlich reduzierte Fähigkeit für chemotaktische Migration und „oxidative burst“ der Zellen, sowie ein signifikanter Einfluss auf die Regulation von Oberflächenantigenen der Zellen durch Zentrifugation. Rimboeck et al. zeigten zudem Ergebnisse, die auf eine Beteiligung von Zentrifugationsschritten an der NETose-Fähigkeit der Zellen hindeuteten, wobei die beobachtete NETose ein Produkt der

Zentrifugationsschritte der Isolierung sei. Nicht zentrifugierte Zellen sterben im Vergleich eher apoptotisch (43,44).

Die hier vorgestellten Ergebnisse bestätigen diese vorhergegangenen Arbeiten. Es konnte gezeigt werden, dass steigende *g*-time mit einer schnelleren Freisetzung von DNA an der Gasfaser einhergeht. Der Unterschied der Oberflächen der DNA-Fäden erreichte keine Signifikanz, allerdings wurde auch hier mehr als die dreifache Flächensumme an DNA-Fäden erreicht. Durch die durch Zentrifugation erfahrenen Kräfte werden die Zellen dabei aktiviert oder zumindest vorgeschädigt, sodass sie schneller und leichter bei Kontakt mit der Gasfaser DNA ausstoßen. Zusätzlich stoßen die Zellen quantitativ mehr DNA aus. Limitierend war dabei, dass für die Isolation der Zellen zumindest ein Zentrifugationsschritt erfolgen musste. Die von Rimboeck et al. empfohlene Methode einer Isolation mit Gelafundin war für diese Arbeit aufgrund der fehlenden Reinheit der Zellen nicht praktikabel (43). Die dort aus dem Vollblut mit ins System gegeben Gerinnungsbestandteile und Thrombozyten führten in Kombination mit den DNA-Fäden innerhalb weniger Minuten zu einer massiven Akkumulation von thrombotischem Material an der Gasfaser (siehe auch 4.6). Trotzdem konnte durch die eingesetzte DNA-Färbung eine enge Verflechtung der DNA-Fäden innerhalb des thrombotischen Konstruktes gezeigt werden. Es ergab sich ein Eindruck eines Geflechts aus DNA-Fäden mit eingebetteten Bestandteilen, die vermutlich zellulären Ursprungs waren, wie beispielsweise Plättchen (Abbildung 39). Für weitere Untersuchungen kann daher nur eine schonende Behandlung der Zellen, insbesondere im Hinblick auf Zentrifugationskräfte, empfohlen werden, um diese nicht zusätzlich zu aktivieren.

Das eingesetzte Perfusionsmodell zeigte einige Limitationen auf. Neben den technischen Gegebenheiten der Perfusionsanlage mit integrierten Schaltventilen, die eine Zellschädigung verursachen könnten, stellt insbesondere die modifizierte Strömungskammer mit eingebauter Gasfaser eine wesentliche Limitation der Anlage dar. Da die Gasfaser fast das komplette Lumen der Kammer ausfüllt und die Orientierung (aufgrund des händischen Einbaus) nicht immer gleich verläuft, können die dort auftretenden Strömungsverhältnisse nicht berechnet werden. Es soll abschließend hervorgehoben werden, dass trotz dieser Limitationen Unterschiede in der DNA-Freisetzung bei unterschiedlich isolierten Zellen dargestellt werden konnte. Zukünftig sollten höhere Strömungskammern (0.8 mm) mit mittig eingebauten Gasfasern verwendet werden, wodurch auch Vorhersagen zu Strömungsverhältnissen an der Gasfaser möglich sein könnten.

5.3 Scherkräfte im ECMO-Modell haben Einfluss auf die Menge und Geschwindigkeit der DNA-Freisetzung

Im zweiten Teil der Dissertation wurde der Einfluss von Scherkräften (steigende Volumenströme) auf die Freisetzung von DNA an der Gasfaser untersucht. Augenscheinlich traten bei den höchsten Volumenströmen die DNA-Ablagerungen und DNA-Fäden früher auf. Die errechnete Signifikanz für ET_{50} -Werte bei 30 gegen 50 mbar bzw. die Tendenz von 20 auf 30 mbar ist fraglich, da dies nur aus den hohen Werten bei 30 mbar zurückzuführen ist. Ein großes Problem bei diesen Vergleichen ist die hohe Streuung und vor allem die kleine Fallzahl der Versuche pro Druckstufe. Bei der Auswertung der maximal erreichten Fläche (E_{max}) an DNA-Ablagerungen und DNA-Fäden zeigte sich ebenfalls, dass die gemessenen Oberflächen mit zunehmenden Scherkräften kleiner wurden. Eine statistische Signifikanz zeigte sich hier nur im Unterschied der DNA-Ablagerungen zwischen den Gruppen 5 mbar (1,0-2,7 mL/min) und 50 mbar (17,1-20,7 mL/min). Auch hier erschwerte die kleine Fallzahl ($n=5$) pro Versuchsreihe und die hohe Streuung der Einzelversuche die statistische Bewertung. Zudem wurde ein Abreißen der DNA-Fäden mit steigendem Volumenstrom beobachtet. Die augenscheinlich kürzeren DNA-Fäden bei hohem Volumenstrom demonstrieren die Instabilität der DNA-Strukturen.

Yu et al. beschrieben, dass hohe mechanische Scherkräfte NETose induzieren können (24). Passend dazu konnte in der vorliegenden Studie ein Unterschied zwischen Gruppen festgestellt werden, die unterschiedlich starken Scherkräften innerhalb des Systems ausgesetzt waren. So zeigte sich die Tendenz, dass mit zunehmendem Volumenstrom die Fläche sowohl der DNA-Ablagerungen als auch der DNA-Fäden abnahm. Dem einher geht die Beobachtung, dass die Freisetzung von DNA an der Gasfaser mit steigenden Scherkräften zunehmend früher auftrat. Es scheint dabei durch die erhöhten Scherkräfte analog zu der erhöhten g -time zu einer Aktivierung der Zellen durch den mechanischen Stress zu kommen, der in eine schnellere Freisetzung von DNA mündet. Überraschenderweise zeigte sich allerdings eine mit steigenden Volumenströmen sinkende Oberfläche an freigesetzter DNA an der Gasfaser. Dies könnte durch die beobachtete Fragilität der DNA-Fäden erklärbar sein, die bei steigendem Fluss zunehmend abrissen und weggespült wurden. Zudem ist zu erwarten, dass die Zellen durch die hohen Volumenströme verstärkten mechanischen Scherkräften an der Gasfaser, wie auch sonst im System ausgesetzt sind, wodurch es zu einer Schädigung kommen könnte, was nicht unbedingt in NETose erfolgt.

Das Abreißen der DNA-Fäden bei höheren Volumenströmen erschwerte die statistische Auswertung der Versuche. Die im Zeitverlauf entstandenen Oberflächen der DNA-Fäden wurden als eine sigmoidale Kurve berechnet. Rissen dabei Fäden ab, sank die Oberfläche stark ab, was die Berechnung erschwerte. Manche der Versuche mussten aufgrund dessen in der Auswertung gekürzt werden (siehe dazu auch: 3.10), was eine hohe Streuung der Einzelwerte zur Folge hatte. Limitierend war dabei nicht vermeidbar, dass die Zellen während der Isolation bereits mechanischen Scherkräften ausgesetzt waren, unter anderem durch das Pipettieren während der Isolation und das Einspritzen der Zellen ins System mit einer Kanüle.

Es scheint sich grundsätzlich auch bei steigenden Scherkräften zu bestätigen, dass erhöhter mechanischer Stress zu einer vermehrten Aktivierung oder Schädigung von Zellen beiträgt, was zu einer höheren DNA-Freisetzung führt. Zhang et al. beschrieben das gleiche Phänomen in vivo, da bei VA-ECMO Bedingungen die Marker für NETose im Blut deutlich höher waren als bei VV-ECMO Bedingungen, wobei bei VA-ECMO Bedingungen höhere Scherkräfte auf die Zellen einwirken (7).

5.4 Anwendung auf den klinischen ECMO-Einsatz

Da die Thrombosebildung in ECMO-Systemen, besonders in MOs, weiterhin eine relevante Komplikation darstellt, ist es notwendig, die genauen Zusammenhänge der Thromboseentstehung zu verstehen. So zeigte ein Drittel der Patientinnen und Patienten an einem VV-ECMO-System eine thrombotische Komplikation, die zu einem Wechsel des Systems führte (5). Als auslösende Mechanismen werden hohe Scherkräfte im Oxygenator und durch die Blutpumpe sowie der Kontakt von Blut mit fremden Oberflächen diskutiert, wobei speziell die Bildung von NETs diskutiert wird (7). Für diesen Mechanismus spricht die Beobachtung, dass in gebrauchten Oxygenatoren Leukozyten in hoher Dichte auf den Gasfasern als auch in thrombotischen Auflagerungen gefunden wurden (7,14,15). Zudem wurden auf den Gasfasern Vorläuferstrukturen von NETotischen Zellen gefunden. Diese stellen sich als stark aufgequollene Kerne mit wenig Kontrast (bis zu 20% der detektierten Kerne in DAPI-gefärbten Präparaten) wie auch komplett destruierte Kerne in Form von DNA-Netzen/Fäden (bis zu 5 % der detektierten Kerne) dar (16). Diese Kernmorphologien wurden von Neubert et al. in in-vitro-Studien definiert (63). Weiterhin konnte in jüngsten in- vitro-Untersuchungen gezeigt werden, dass bereits das Material (PMP mit Beschichtung) eine Granulozytenadhäsion und eine NET-Induktion auslösen (10). Diese stellen sich ebenfalls überwiegend als Zellen mit aufgequollenen Kernen dar.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die direkten Interaktionen zwischen Gasfaser und Granulozyten sowie ihrer NETose-Induktion sichtbar zu machen. Es konnte gezeigt werden, dass die eingesetzten Zellen die Fähigkeit besitzen, DNA-Ablagerungen auf der Gasfaser zu generieren und von dort ausgehend DNA-Fäden in Flussrichtung auszubilden. Das eingesetzte ECMO-Oxygenatormodell erwies sich als geeignet, eine DNA-Freisetzung, die sonst innerhalb der Oxygenatoren geschieht, in vitro an einer einzelnen Gasfaser zu simulieren.

NETs zeigen dabei die Fähigkeit, intensiv mit Bestandteilen der Gerinnung, vWF und auch Thrombozyten zu interagieren und wirken somit deutlich prothrombogen (36,37,40). Der Versuch, der mit Gelafundin isolierten Zellen durchgeführt wurde, zeigt dabei durch die fast vollständige Verlegung der Strömungskammer mit thrombotischen Ablagerungen diese Interaktionen auf. Durch die Interaktion mit den zusätzlichen Gerinnungsbestandteilen wurden die DNA-Fäden stabilisiert. Mit dem etablierten ECMO-Oxygenator Modell kann nun versucht werden, die zugrundeliegenden Mechanismen am konkreten Beispiel einer isolierten Gasfaser besser zu verstehen. Eine Verhinderung der NETose durch verschiedene Substanzen wäre ebenfalls überprüfbar (62).

Bemerkenswert ist auch die Beeinflussung von Zellen sowohl durch Zentrifugationskräfte als auch durch mechanische Scherkräfte. Zellen sind während der ECMO-Therapie innerhalb eines ECMO-Systems multiplen mechanischen Beanspruchungen ausgesetzt. Zudem werden für den Transport des Blutes Zentrifugalpumpen mit hohen Laufraten eingesetzt, die das Blut zusätzlichen Zentrifugationskräften aussetzen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Zentrifugationskräfte sowie mechanische Scherkräfte einen deutlichen Einfluss auf die Interaktion zwischen Zellen und der Gasfaser, sowie der DNA-Freisetzung an der Gasfaser haben und daher weiter als Ursache für Thrombenbildung in Oxygenatoren diskutiert und weiter untersucht werden müssen.

6 Zusammenfassung

In einem in-vitro-ECMO-Oxygenator-Modell wurde die DNA-Freisetzung von PMNs an isolierten Gasfasern unter dem Einfluss von Zentrifugationskräften und Scherkräften untersucht. Dabei zeigten alle eingesetzten Granulozyten im Versuchsverlauf eine DNA-Freisetzung an den Gasfasern in Form von DNA-Ablagerungen auf, und als DNA-Fäden stromab der Gasfasern unabhängig von der erfahrenen Behandlung oder den erfahrenen Scherkräften. Sowohl das Einwirken höherer g -time, als auch höherer Scherkräfte führte zu einer früheren Freisetzung von DNA an der Gasfaser. Während erhöhte einwirkende g -time auch zu einer erhöhten maximalen Fläche an DNA führte, nahm diese bei steigenden Scherkräften ab.

Zusammenfassend konnte dabei ein deutlicher Einfluss sowohl von g -time als auch von Scherkräften auf die DNA-Freisetzung von Zellen an Gasfasern gezeigt werden. Der Mechanismus der DNA-Freisetzung verbleibt weiterhin unklar. Es ergeben sich aber Hinweise, die auf eine Beteiligung von freier DNA an der Gasfaser in der Entstehung von thrombotischen Ablagerungen hindeuten, besonders im Zusammenhang mit erhöhten Scher- und Zentrifugationskräften.

7 Anhang

7.1 Manuskript und Poster

Ein Poster mit Teilen der vorliegenden Arbeit wurde auf dem Deutschen Anästhesiecongress 2023 in Düsseldorf vorgestellt.

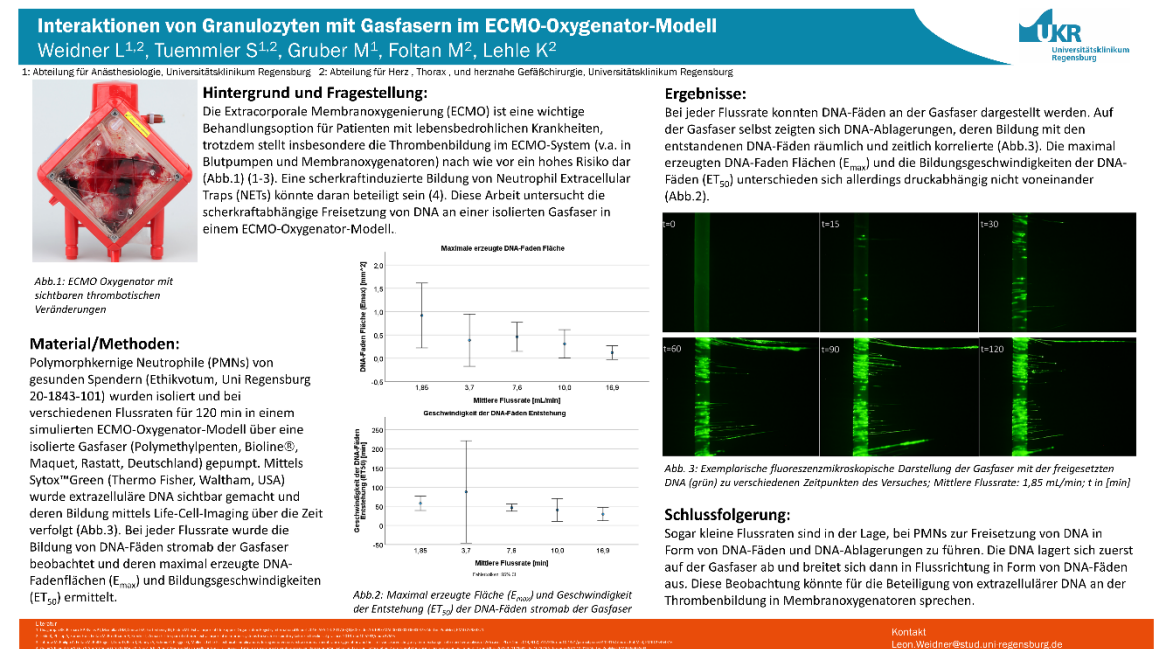


Abbildung 40: Vorgestelltes Poster in Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit.

Die Veröffentlichung von Teilen der Arbeit ist geplant unter dem Titel: „Circulating neutrophils g-time dependent form DNA-deposits in an ECMO model“ (aktuell in Vorbereitung)

7.2 Verwendete Materialien und Hilfsmittel

7.2.1 Hilfsmittel, Analysegeräte und Software

Name	Hersteller	Ort
Druckluft Pumpsystem	IBIDI	Martinsried, Deutschland
Zwei-Kammer Perfusionssystem	IBIDI	Martinsried, Deutschland
Keyence BZ8100E	Keyence	Neu-Isenburg, Deutschland
BZ observation application	Keyence	Neu-Isenburg, Deutschland
4x PlanApo Objektiv	Nikon	Tokio, Japan

BZ-Filter GFP-BP	Keyence	Neu-Isenburg, Deutschland
BZ-Filter DAPI-GP	Keyence	Neu-Isenburg, Deutschland
IMARIS	Oxford Instruments	Abingdon, UK
EXCEL	Microsoft	Redmond, USA
PHONIX64	Certara	New Jersey, USA
SPSS Statistics	IBM	Armonk, USA
FACSCalibur	BD	Heidelberg, Deutschland

7.2.2 Einwegmaterialien

Name	Hersteller	Ort
Safety-Multifly®-Kanüle (21G)	SARSTEDT	Nümbrecht, Deutschland
Lithium-Heparin S-Monovette	SARSTEDT	Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (50mL)	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
0,4mm Sticky Slide	IBIDI	Martinsried, Deutschland
Oxygenator Gasfasern (PLS Oxygenator)	Maquet	Rastatt, Deutschland
Spritzenfilter RC (Porengröße 0,45µm)	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland

7.2.3 Reagenzien und Farbstoffe

Name	Hersteller	Ort
Leuko Spin Medium	pluriSelect	Leipzig, Deutschland
PBMC Spin Medium	pluriSelect	Leipzig, Deutschland
RPMI 1640	PAN Biotech	Aidenbach, Deutschland
Gelafundin (40mg/mL)	B. Braun SE	Melsungen, Deutschland
CASY Clean	OMNI Life Science	Bremen, Deutschland
Sytox™ Green	Thermo Fisher	Waltham USA
Calcein AM	Thermo Fisher	Waltham USA
DAPI	Sigma Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
DNase1	Roche Pharma AG	Edenkoben, Deutschland

7.3 Abkürzungsverzeichnis

ECMO	Extracorporale Membranoxygenierung
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
NETs, NETose	Neutrophil Extracellular Traps
PMNs	Polymorphkernige Neutrophile
MO	Membranoxygenator
VV-System	Venovenöses-System
VA-System	Venoarterielles-System
ECLS	Extracorporal Life Support
PMP	Poly 4-methyl 1-penten
AOT	Akute Oxygenatorthrombosen
vWF	Van Willebrand Faktor
UFH	Unfraktioniertes Heparin
PMA	Phorbol 12-myristat 13-acetat
ctH3	Citrulliniertes Histon 3
dsDNA	Doppelsträngige DNA
DAPI	4', 6-Diamidin-2-phenylindol
PBS	Phosphate-Buffered Saline
MPO	Myeloperoxidase
Forward Scatter	FSC
Side Scatter	SSC

7.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Systematische Gliederung der experimentellen Arbeiten.	13
Abbildung 2: Systematik der Versuche variierender einwirkender Zentrifugationsschritte.	14
Abbildung 3: Systematik der Versuche unterschiedlicher Volumenströme.....	15
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Schichtung der Dichtegradientenzentrifugation vor Zentrifugation (links) und nach Zentrifugation (rechts) (54).....	19
Abbildung 5: Blick auf die Lage der Gasfaser im quergeschnittenen Kanal der Strömungskammer.....	20

Abbildung 6: Bild der verwendeten Gasfasermatten mit daraus entnommener Gasfaser (A) und Bild der verwendeten Strömungskammer mit isolierter Gasfaser (B).	21
Abbildung 7: Bild der verwendeten Strömungskammer mit eingespannter Gasfaser.....	22
Abbildung 8: Schematische Darstellung des verwendeten Pumpsystems nach (55).	23
Abbildung 9: Übersichtsbild des verwendeten Systems (A), Position der Strömungskammer im Fluoreszenzmikroskop (B), verwendete Strömungskammer mit eingespannter Gasfaser (C).....	24
Abbildung 10: Schematischer Aufbau des verwendeten Systems.	25
Abbildung 11: Beispielbild aus einer Bilderfolge mit Sytox™Green-gefärbten DNA-Strukturen an der Gasfaser. Granulozyten wurden in das Perfusionssystem eingesetzt und nach 5 min wurden Sytox™Green-gefärbte DNA-Ablagerungen auf den Gasfasern (links, 1) und Syto™Green-gefärbte DNA-Fäden stromabwärts (rechts der Gasfaser, 2) sichtbar. Dargestellt ist der mittlere Teil der Gasfaser (3.1 mm Gasfaserlänge).	29
Abbildung 12: Beispiel der Berechnungen. Die resultierende Flächensumme pro Zeit wurde benutzt, um eine sigmoidale Kurve zu berechnen (schwarze Linie), bestehende aus DNA-Flächensumme (Y-Achse) in Abhängigkeit der Zeit (X-Achse, blaue Punkte). Durch vorzeitiges Abreißen der DNA-Fäden verursachte reduzierte DNA-Flächensumme wurde von der Berechnung ausgeschlossen. In diesem speziellen Fall wurden die Werte ab 80min (rote Linie) von der weiteren Berechnung ausgeschlossen. Die Kurve der DNA-Flächensumme wurde mit der angegebenen Formel berechnet.....	30
Abbildung 13: Beispieldarstellung der durchflusszytometrischen Auswertung zu verschiedenen Zeitpunkten. Aufgetragen ist der Forward Scatter (FSC-H, [RI](relative Intensity)) gegen den Side Scatter (SSC-H, [RI]).	32
Abbildung 14: Fluoreszenzmikroskopisches Beispielbild: DNA-Strukturen wurden vermehrt am oberen und unteren Bildrand (rote Bereiche) detektiert.	33
Abbildung 15: Fluoreszenzmikroskopisches Beispielbild von DNA-Ablagerungen und DNA-Fäden vor, sowie 1 und 2 Minuten nach DNase Zugabe.....	34
Abbildung 16: Beispielhafte Fluoreszenzbilder aus einer Versuchsreihe der niedrigen g-time Gruppe (oben) und der hohen g-time Gruppe (unten). Dargestellt sind die SytoxGreen-gefärbten DNA-Ablagerungen auf der Gasfaser (links) und die stromabwärts (von links nach rechts verlaufend) gebildeten DNA-Fäden nach 30, 60 und 120 min nach Zellzugabe.....	35
Abbildung 17: Zeitlicher Verlauf der Oberflächen der DNA-Ablagerungen auf der Gasfaser. Darstellung der einzelnen Versuche als Kurvenschar von (A) Zellen der niedrigen g-time Gruppe (n=8) und (B) Zellen der hohen g-time Gruppe (n=5).	36

Abbildung 18: Zeitlicher Verlauf der Oberflächen der DNA-Fäden stromabwärts der Gasfasern. Darstellung der einzelnen Versuche als Kurvenschar von (A) Zellen der niedrigen g-time Gruppe (n=8) und (B) Zellen der hohen g-time Gruppe (n=5).	37
Abbildung 19: Ermittlung der Zeit, wo erstmals DNA-Ablagerungen (links) bzw. DNA-Fäden (rechts) auftauchen. Es ergaben sich für beide Strukturen signifikante Unterschiede zwischen der hohen und niedrigen g-time Gruppe.	38
Abbildung 20: ET ₅₀ -Werte der Entstehung der DNA-Ablagerungen Flächensumme.	39
Abbildung 21: ET ₅₀ -Werte der Entstehung der DNA-Fäden Flächensumme.	40
Abbildung 22: E _{max} -Werte der DNA-Fäden in Abhängigkeit der g-time Gruppe.....	41
Abbildung 23: Beispielhafte fluoreszenzmikroskopische Darstellung von gebildeten DNA-Strukturen aus einer Versuchsreihe mit 5 mbar (1,0-2,7 mL/min). Bereits bei der kleinsten Flussrate werden DNA-Ablagerungen und DNA-Fäden an der Gasfaser sichtbar.	42
Abbildung 24: Beispielhafte fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Versuchsreihe mit 10 mbar (3,1-4,3 mL/min).	42
Abbildung 25: Beispielhafte fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Versuchsreihe mit 20 mbar (6,0-9,2 mL/min).	42
Abbildung 26: Beispielhafte fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Versuchsreihe mit 30 mbar (7,4-12,6 mL/min).	43
Abbildung 27: Beispielhafte fluoreszenzmikroskopische Darstellung von gebildeten DNA-Strukturen aus einer Versuchsreihe mit 50 mbar (17,1-20,7 mL/min). Bei hohen Flussraten wurden zwar DNA-Ablagerungen auf der Gasfaser sichtbar, jedoch wurden nur einzelne kurze DNA-Fäden gebildet.....	43
Abbildung 28: Unterschied in den ET ₅₀ -Werten der Entstehung der DNA-Ablagerungen Flächensumme in Abhängigkeit des volumenstromerzeugenden Drucks.	44
Abbildung 29: Unterschied in den ET ₅₀ -Werten der Entstehung der DNA-Fäden Flächensumme in Abhängigkeit des volumenstromerzeugenden Drucks.	45
Abbildung 30: E _{max} -Werte der DNA-Ablagerungen in Abhängigkeit des volumenstromerzeugenden Drucks.	46
Abbildung 31: E _{max} -Werte der DNA-Fäden in Abhängigkeit des volumenstromerzeugenden Drucks.....	47
Abbildung 32: Strömungsverhältnisse am oberen Ende der Gasfaser mit Calcein (links) und DAPI (rechts) mit Fluss im System (5 mbar (1,0-2,7 mL/min)). Strömungsrichtung von links nach rechts.	48

Abbildung 33: Strömungsverhältnisse am unteren Ende der Gasfaser mit Calcein (links) und DAPI (rechts) mit Fluss im System (5 mbar (1,0-2,7 mL/min)). Strömungsrichtung von links nach rechts.	48
Abbildung 34: Belegung der Gasfaser am oberen Ende mit vitalen Zellen (grüne Punkte, Calcein, links) und DNA-Fäden/DNA-Ablagerungen (blaue Fäden und Punkte, DAPI, rechts) bei der nach dem Versuch mit entionisiertem Wasser gespülten Strömungskammer.	49
Abbildung 35: Belegung der Gasfaser am unteren Ende mit vitalen Zellen (grüne Punkte, Calcein, links) und DNA-Fäden/DNA-Ablagerungen (blaue Striche und Punkte, DAPI, rechts) bei der nach dem Versuch mit entionisiertem Wasser gespülten Strömungskammer.	49
Abbildung 36: Anzahl der Calcein-positiven Zellen im System über die Versuchslaufzeit in drei unabhängigen Versuchen.	51
Abbildung 37: Zellgröße der Calcein-positiven Zellen über die Versuchslaufzeit (n=3). ..	53
Abbildung 38: Zellgranularität der Calcein positiven Zellen über die Versuchslaufzeit. ...	54
Abbildung 39: Vergleich der Isolationsmethoden "Gelafundin" (oben) und "Leukospin" (unten). Repräsentative Fluoreszenzbilder nach 30, 60 und 120 min. Grün: DNA-Färbung mittels Sytox™Green. Flussrichtung von links nach rechts.....	55
Abbildung 40: Vorgestelltes Poster in Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit.....	64

7.5 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gasfaser-Oberflächenbeschichtungen und Wärmetauschermaterialien der im Handel erhältlichen ECMO-Membranoxygenatoren. Das Grundlagenmaterial aller beschichteten oder unbeschichteten Gasaustauschflächen besteht aus Polymethylpentene (PMP) (10).....	6
Tabelle 2: Vom Flusssensor gemessene minimale und maximale Flussraten innerhalb des Systems bei definierten Drücken.	22
Tabelle 3: ET_{50} -Werte (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung) der Entstehung der DNA-Ablagerungen in Abhängigkeit der g-time Gruppe.	39
Tabelle 4: E_{max} -Werte (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung) der DNA-Fäden in Abhängigkeit der g-time Gruppe.....	40
Tabelle 5: ET_{50} -Werte (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung) der Entstehung von DNA-Ablagerungen und DNA-Fäden in Abhängigkeit des volumenstromerzeugenden Drucks. 44	

Tabelle 6: $E_{\max}$ -Werte (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung) der Entstehung von DNA-Ablagerungen und DNA-Fäden in Abhängigkeit des volumenstromerzeugenden Drucks.	46
Tabelle 7: Anzahl Calcein-positiver Zellen (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung) innerhalb des Systems über die Versuchslaufzeit.....	50
Tabelle 8: Veränderung der Zellgröße Calcein-positiver Zellen (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung über die Versuchslaufzeit.....	52
Tabelle 9: Zellgranularität der Calcein-positiven Zellen (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung über die Versuchslaufzeit.	54

7.6 Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung der g-time; RCF = g-Zahl der Zentrifugation;.....	16
--	----

8 Literaturverzeichnis

1. Hundhammer T, Gruber M, Wittmann S. Paralytic Impact of Centrifugation on Human Neutrophils. *Biomedicines*. 2022;10(11). doi:10.3390/biomedicines10112896
2. Karagiannidis C, Bein T, Weber-Carstens S. Indikationen und Grenzen der ECMO-Therapie: Überlegungen zur Evidenz, Therapieentscheidung und ethischen Herausforderung [Indications and limitations of ECMO therapy: Considerations on evidence, treatment decisions and ethical challenges]. *Med Klin Intensivmed Notfmed*. 2019;114(3):207–13. ger. doi:10.1007/s00063-019-0533-3
3. Thiagarajan RR, Barbaro RP, Rycus PT, McMullan DM, Conrad SA, Fortenberry JD, Paden ML. Extracorporeal Life Support Organization Registry International Report 2016. *ASAIO J*. 2017;63(1):60–7. doi:10.1097/MAT.0000000000000475
4. Lehle K, Philipp A, Somer F de, Foltan M, Bredthauer A, Krenkel L, Zeman F. Life span of different extracorporeal membrane systems for severe respiratory failure in the clinical practice. 2018. doi:10.5283/epub.37626
5. Lubnow M, Philipp A, Foltan M, Bull Enger T, Lunz D, Bein T, Haneya A, Schmid C, Riegger G, Müller T, Lehle K. Technical complications during veno-venous extracorporeal membrane oxygenation and their relevance predicting a system-exchange--retrospective analysis of 265 cases. *PLoS One*. 2014;9(12):e112316. doi:10.1371/journal.pone.0112316
6. Lehle K, Philipp A, Foltan M, Schettler F, Ritzka M, Müller T, Lubnow M. Coagulation abnormalities in patients with COVID-19 on venovenous ECLS increased risk for technical complications and support times but had no impact on survival. *Artif Organs*. 2022;46(8):1669–81. doi:10.1111/aor.14218
7. Zhang Y, Peng R, Pei S, Gao S, Sun Y, Cheng G, Yu D, Wang X, Gao Z, Ji B, Zhou Z. Neutrophil extracellular traps are increased after extracorporeal membrane oxygenation support initiation and present in thrombus: A preclinical study using sheep as an animal model. *Thromb Res*. 2023;221:173–82. doi:10.1016/j.thromres.2022.10.019
8. Winnersbach P, Rossaint J, Buhl EM, Singh S, Lölsberg J, Wessling M, Rossaint R, Bleilevens C. Platelet count reduction during in vitro membrane oxygenation affects platelet activation, neutrophil extracellular trap formation and clot stability, but does

not prevent clotting. *Perfusion*. 2021;267659121989231.

doi:10.1177/0267659121989231

9. Beck L, Burg MC, Heindel W, Schülke C. Extrakorporale Membranoxygenierung bei Erwachsenen – Varianten, Komplikationen unter Therapie und die Rolle der radiologischen Diagnostik [Extracorporeal Membrane Oxygenation in Adults - Variants, Complications during Therapy, and the Role of Radiological Imaging]. *Rofo*. 2017;189(2):119–27. doi:10.1055/s-0042-118885
10. Foltan M, Dinh D, Gruber M, Müller T, Hart C, Krenkel L, Schmid C, Lehle K. Incidence of neutrophil extracellular traps (NETs) in different membrane oxygenators: pilot in vitro experiments in commercially available coated membranes. *J Artif Organs*. 2025;28(3):374–82. doi:10.1007/s10047-024-01486-4
11. Thomas J, Kostousov V, Teruya J. Bleeding and Thrombotic Complications in the Use of Extracorporeal Membrane Oxygenation. *Semin Thromb Hemost*. 2018;44(1):20–9. doi:10.1055/s-0037-1606179
12. Steiger T, Philipp A, Hiller K-A, Müller T, Lubnow M, Lehle K. Different mechanisms of oxygenator failure and high plasma von Willebrand factor antigen influence success and survival of venovenous extracorporeal membrane oxygenation. 2021. doi:10.5283/epub.45591
13. Lehle K, Philipp A, Gleich O, Holzamer A, Müller T, Bein T, Schmid C. Efficiency in extracorporeal membrane oxygenation-cellular deposits on polymethylpentene membranes increase resistance to blood flow and reduce gas exchange capacity. *ASAIO J*. 2008;54(6):612–7. doi:10.1097/MAT.0b013e318186a807.
14. Wilm J, Philipp A, Müller T, Bredthauer A, Gleich O, Schmid C, Lehle K. Leukocyte Adhesion as an Indicator of Oxygenator Thrombosis During Extracorporeal Membrane Oxygenation Therapy? *ASAIO J*. 2018;64(1):24–30. doi:10.1097/MAT.0000000000000586
15. 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. doi:10.1097/MAT.0000000000001892
16. Wagner MS, Kranz M, Krenkel L, Pointner D, Foltan M, Lubnow M, Lehle K. Computer based visualization of clot structures in extracorporeal membrane

oxygenation and histological clot investigations for understanding thrombosis in membrane lungs. *Front Med (Lausanne)*. 2024;111416319.

doi:10.3389/fmed.2024.1416319

17. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004;303(5663):1532–5. doi:10.1126/science.1092385
18. Yipp BG, Kubes P. NETosis: how vital is it? *Blood*. 2013;122(16):2784–94. doi:10.1182/blood-2013-04-457671
19. Thiam HR, Wong SL, Wagner DD, Waterman CM. Cellular Mechanisms of NETosis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2020;36:191–218. doi:10.1146/annurev-cellbio-020520-111016
20. Keshari RS, Jyoti A, Dubey M, Kothari N, Kohli M, Bogra J, Barthwal MK, Dikshit M. Cytokines induced neutrophil extracellular traps formation: implication for the inflammatory disease condition. *PLoS One*. 2012;7(10):e48111. doi:10.1371/journal.pone.0048111
21. Yipp BG, Petri B, Salina D, Jenne CN, Scott BNV, Zbytnuik LD, Pittman K, Asaduzzaman M, Wu K, Meijndert HC, Malawista SE, Boisfleur Chevance A de, Zhang K, Conly J, Kubes P. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat Med*. 2012;18(9):1386–93. doi:10.1038/nm.2847
22. Wang Y, Li M, Stadler S, Correll S, Li P, Wang D, Hayama R, Leonelli L, Han H, Grigoryev SA, Allis CD, Coonrod SA. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol*. 2009;184(2):205–13. doi:10.1083/jcb.200806072
23. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*. 2007;176(2):231–41. doi:10.1083/jcb.200606027
24. Yu X, Tan J, Diamond SL. Hemodynamic force triggers rapid NETosis within sterile thrombotic occlusions. *J Thromb Haemost*. 2018;16(2):316–29. doi:10.1111/jth.13907.

25. 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(10):1998–2008. doi:10.1039/c7bm00458c
26. Pires RH, Felix SB, Delcea M. The architecture of neutrophil extracellular traps investigated by atomic force microscopy. *Nanoscale.* 2016;8(29):14193–202. doi:10.1039/c6nr03416k
27. Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol.* 2006;8(4):668–76. doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00659.x
28. Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W, Brinkmann V, Jungblut PR, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 2009;5(10):e1000639. doi:10.1371/journal.ppat.1000639
29. Sørensen OE, Borregaard N. Neutrophil extracellular traps - the dark side of neutrophils. *J Clin Invest.* 2016;126(5):1612–20. doi:10.1172/jci84538
30. Halverson TWR, Wilton M, Poon KKH, Petri B, Lewenza S. DNA is an antimicrobial component of neutrophil extracellular traps. *PLoS Pathog.* 2015;11(1):e1004593. doi:10.1371/journal.ppat.1004593
31. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD, Wroblewski SK, Wakefield TW, Hartwig JH, Wagner DD. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(36):15880–5. doi:10.1073/pnas.1005743107
32. Hakkim A, Fürnrohr BG, Amann K, Laube B, Abed UA, Brinkmann V, Herrmann M, Voll RE, Zychlinsky A. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(21):9813–8. doi:10.1073/pnas.0909927107
33. Mangold A, Alias S, Scherz T, Hofbauer T, Jakowitsch J, Panzenböck A, Simon D, Laimer D, Bangert C, Kammerlander A, Mascherbauer J, Winter M-P, Distelmaier K, Adlbrecht C, Preissner KT, Lang IM. Coronary neutrophil extracellular trap burden and deoxyribonuclease activity in ST-elevation acute coronary syndrome are predictors of ST-segment resolution and infarct size. *Circ Res.* 2015;116(7):1182–92. doi:10.1161/circresaha.116.304944

34. Ducroux C, Di Meglio L, Loyau S, Delbosc S, Boisseau W, Deschildre C, Ben Maacha M, Blanc R, Redjem H, Ciccio G, Smajda S, Fahed R, Michel J-B, Piotin M, Salomon L, Mazighi M, Ho-Tin-Noe B, Desilles J-P. Thrombus Neutrophil Extracellular Traps Content Impair tPA-Induced Thrombolysis in Acute Ischemic Stroke. *Stroke*. 2018;49(3):754–7. doi:10.1161/strokeaha.117.019896
35. Carestia A, Kaufman T, Rivadeneyra L, Landoni VI, Pozner RG, Negrotto S, D'Atri LP, Gómez RM, Schattner M. Mediators and molecular pathways involved in the regulation of neutrophil extracellular trap formation mediated by activated platelets. *J Leukoc Biol*. 2016;99(1):153–62. doi:10.1189/jlb.3A0415-161R
36. Grässle S, Huck V, Pappelbaum KI, Gorzelanny C, Aponte-Santamaría C, Baldauf C, Gräter F, Schneppenheim R, Obser T, Schneider SW. von Willebrand factor directly interacts with DNA from neutrophil extracellular traps. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(7):1382–9. doi:10.1161/ATVBAHA.113.303016.
37. Bont CM de, Boelens WC, Pruijn GJM. NETosis, complement, and coagulation: a triangular relationship. *Cell Mol Immunol*. 2019;16(1):19–27. doi:10.1038/s41423-018-0024-0
38. Yu X, Diamond SL. Fibrin Modulates Shear-Induced NETosis in Sterile Occlusive Thrombi Formed under Haemodynamic Flow. *Thromb Haemost*. 2019;119(4):586–93. doi:10.1055/s-0039-1678529.
39. Kim S-J, Jenne CN. Role of platelets in neutrophil extracellular trap (NET) production and tissue injury. *Semin Immunol*. 2016;28(6):546–54. doi:10.1016/j.smim.2016.10.013
40. Maugeri N, Campana L, Gavina M, Covino C, Metrio M de, Panciroli C, Maiuri L, Maseri A, D'Angelo A, Bianchi ME, Rovere-Querini P, Manfredi AA. Activated platelets present high mobility group box 1 to neutrophils, inducing autophagy and promoting the extrusion of neutrophil extracellular traps. *J Thromb Haemost*. 2014;12(12):2074–88. doi:10.1111/jth.12710
41. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, Patel KD, Chakrabarti S, McAvoy E, Sinclair GD, Keys EM, Allen-Vercoe E, Devinney R, Doig CJ, Green FHY, Kubes P. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med*. 2007;13(4):463–9. doi:10.1038/nm1565

42. Sun W, Wang S, Zhang J, Arias K, Griffith BP, Wu ZJ. Neutrophil injury and function alterations induced by high mechanical shear stress with short exposure time. *Artif Organs*. 2021;45(6):577–86. doi:10.1111/aor.13874
43. Rimboeck J, Gruber M, Wittmann S. Is the In Vitro Observed NETosis the Favored Physiological Death of Neutrophils or Mainly Induced by an Isolation Bias? *Int J Mol Sci*. 2023;24(8). doi:10.3390/ijms24087368
44. Pehl S, Hundhammer T, Rimboeck J, Kraus R, Heckscher S, Kellermeier F, Gruber M, Wittmann S. Identification of the Centrifugation-Caused Paralytic Impact on Neutrophils. *Cells*. 2025;14(17). doi:10.3390/cells14171350
45. Doyle AJ, Hunt BJ. Current Understanding of How Extracorporeal Membrane Oxygenators Activate Haemostasis and Other Blood Components. *Front Med (Lausanne)*. 2018;5352. doi:10.3389/fmed.2018.00352
46. Lingel MP, Haus M, Paschke L, Foltan M, Lubnow M, Gruber M, Krenkel L, Lehle K. Clinical relevance of cell-free DNA during venovenous extracorporeal membrane oxygenation. *Artif Organs*. 2023;47(11):1720–31. doi:10.1111/aor.14616
47. Haus M, Foltan M, Philipp A, Mueller T, Gruber M, Lingel MP, Krenkel L, Lehle K. Neutrophil extracellular traps - a potential trigger for the development of thrombocytopenia during extracorporeal membrane oxygenation. *Front Immunol*. 2024;151339235. doi:10.3389/fimmu.2024.1339235
48. Steinkirchner F. Die Beteiligung von Neutrophil Extracellular Traps an der Thrombenentstehung im Membranoxygenator bei Extrakorporaler Membranoxygenierung (ECMO): Dissertation [Internet]: Fakultät für Medizin der Universität Regensburg. 2023.
49. Steiger T, Foltan M, Philipp A, Mueller T, Gruber M, Bredthauer A, Krenkel L, Birkenmaier C, Lehle K. Accumulations of von Willebrand factor within ECMO oxygenators: Potential indicator of coagulation abnormalities in critically ill patients? *Artif Organs*. 2019;43(11):1065–76. doi:10.1111/aor.13513
50. Fuchs G, Berg N, Broman LM, Prahl Wittberg L. Flow-induced platelet activation in components of the extracorporeal membrane oxygenation circuit. *Sci Rep*. 2018;8(1):13985. doi:10.1038/s41598-018-32247-y

51. Lehle K, Philipp A, Müller T, Schettler F, Bein T, Schmid C, Lubnow M. Flow dynamics of different adult ECMO systems: a clinical evaluation. *Artif Organs*. 2014;38(5):391–8. doi:10.1111/aor.12180.
52. Spychalski AME. Untersuchungen zur strömungsinduzierten Thrombusbildung an einer Polymethylpenten-Gasfaser in einem ex vivo-Perfusionsmodell: Universität Regensburg; 2023.
53. Doblinger N, Bredthauer A, Mohrez M, Hähnel V, Graf B, Gruber M, Ahrens N. Impact of hydroxyethyl starch and modified fluid gelatin on granulocyte phenotype and function. *Transfusion*. 2019;59(6):2121–30. doi:10.1111/trf.15279
54. Pluriselect: Density Gradient Media Flyer, https://www.pluriselect.com/de_de/leukospin-medium.html#size=61: (Zugriff April 2024) [Internet].
55. ibidi pump-system: <https://ibidi.com/perfusion-system/112-ibidi-pump-system.html>: (Zugriff April 2024) [Internet].
56. Sytox Green:(<https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/sytox-green-stain.html>) (Zugriff Dezember 2025) [Internet]. Available from: (<https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/sytox-green-stain.html>)
57. Warnatsch A, Ioannou M, Wang Q, Papayannopoulos V. Inflammation. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. *Science*. 2015;349(6245):316–20. doi:10.1126/science.aaa8064
58. Liu S, Su X, Pan P, Zhang L, Hu Y, Tan H, Wu D, Liu B, Li H, Li H, Li Y, Dai M, Li Y, Hu C, Tsung A. Neutrophil extracellular traps are indirectly triggered by lipopolysaccharide and contribute to acute lung injury. *Sci Rep*. 2016;637252. doi:10.1038/srep37252
59. Korabecna M, Tesar V. NETosis provides the link between activation of neutrophils on hemodialysis membrane and comorbidities in dialyzed patients. *Inflamm Res*. 2017;66(5):369–78. doi:10.1007/s00011-016-1010-6
60. Masuda S, Shimizu S, Matsuo J, Nishibata Y, Kusunoki Y, Hattanda F, Shida H, Nakazawa D, Tomaru U, Atsumi T, Ishizu A. Measurement of NET formation in vitro and in vivo by flow cytometry. *Cytometry A*. 2017;91(8):822–9. doi:10.1002/cyto.a.23169

61. Buhr N de, Köckritz-Blickwede M v. Detection, Visualization, and Quantification of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) and NET Markers. *Methods Mol Biol.* 2020;2087425–42. doi:10.1007/978-1-0716-0154-9_25
62. Hoffmann J, Roesner S, Neubauer A. Rituximab induces a flare-up of activated neutrophil extracellular traps under in vitro conditions. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2022;44(6):860–7. doi:10.1080/08923973.2022.2088386
63. Neubert E, Meyer D, Rocca F, Günay G, Kwaczala-Tessmann A, Grandke J, Senger-Sander S, Geisler C, Egner A, Schön MP, Erpenbeck L, Kruss S. Chromatin swelling drives neutrophil extracellular trap release. *Nat Commun.* 2018;9(1):3767. doi:10.1038/s41467-018-06263-5

9 Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Frau Prof. Dr. Karla Lehle und Herr Dr. rer. nat. Michael Gruber bedanken, die mir immer zur Seite standen und die mir diese Arbeit ermöglicht haben. Vielen Dank für die vielen Stunden Arbeit, die große Geduld und Unterstützung bei allen Anliegen.

Bedanken möchte mich auch bei den Teams der Labore der Anästhesie und der HTC für das stets wundervolle Verhältnis und die stets offenen Ohren bei Problemen und Anliegen. Besonders hervorheben möchte ich dabei Herr Simon Tümmeler und Frau Regina Lindner, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Herzlichen Dank hier auch an Herrn Maik Foltan für die interessanten Einblicke in das Fachgebiet der Kardiotechnik sowie die stete Unterstützung.

Herzlichen Dank auch an alle Probandinnen und Probanden, die bereit waren, für die Forschung ihr Blut zu spenden.

Abschließend möchte ich noch meiner Familie, besonders meinen Eltern, meinem Bruder, meiner Schwiegermutter und besonders meiner Freundin Janina danken, die durch ihre bedingungslose Unterstützung mein Studium immer vorangetrieben haben und mir die beste und größte Stütze waren, die ich mir nur hätte vorstellen können. Danke dafür von ganzem Herzen.

10 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Vor- und Zuname Leon Weidner

Geburtsdatum

Geburtsort

Familienstand

Staatsangehörigkeit

Anschrift

Schul- und ausbildung

09/2009-07/2017 Schubartgymnasium Aalen

Internationales Abitur Baden-Württemberg

08/2017-09/2018 BFD im Rettungsdienst des DRK KV Aalen e.V.

10/2018-10/2018 Hauptamtlicher Rettungssanitäter DRK KV Aalen e.V.

10/2018 - 03/24 Studium der Medizin an der Universität Regensburg

04/24 – 05/25 Studium der Medizin an der Universität des Saarlandes

09/25-laufend Tätigkeit als Assistenzarzt in der Klinik für Psychiatrie und

Psychotherapie des Universitätsklinikums des Saarlandes

11 Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation steht. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Leon Weidner

Homburg, Februar 2026