

**Untersuchungen zur Zellbesiedelung von Polymethylpenten-
Oxygenatormembranen nach extrakorporaler Membranoxygenierungs-Therapie**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Hoeren, Felix, geb. Hoeren
aus Koblenz

Gießen 2022

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Herzchirurgie Kerckhoff-Klinik - Bad Nauheim (Campus Kerckhoff)
in Kooperation mit dem
Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung - Bad Nauheim
(W.G. Kerckhoff-Institut)

Gutachter: Prof. Dr. med. Manfred Richter

Gutachter: Prof. Dr. med. Michael Sander

Tag der Disputation: 23.03.2023

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	1
1.1	TECHNIK DER ECMO	1
1.2	VERBREITUNG UND ANWENDUNG DER ECMO-THERAPIE	5
1.3	KOMPLIKATIONEN DER ECMO-THERAPIE	6
1.4	SYSTEMISCHE INFLAMMATORISCHE ANTWORT WÄHREND EXTRAKORPORALER ZIRKULATION	7
1.4.1	<i>Gerinnungsaktivierung während ECMO</i>	<i>8</i>
1.4.2	<i>Auslösung der Komplementkaskade durch ECMO.....</i>	<i>9</i>
1.4.3	<i>Einfluss der ECMO auf Thrombozyten</i>	<i>9</i>
1.4.4	<i>Endotheliale Dysfunktion während ECC.....</i>	<i>10</i>
1.4.5	<i>Stimulation von Immunzellen durch ECMO</i>	<i>11</i>
1.4.6	<i>Endstrecke - Zytokinsturm</i>	<i>12</i>
1.5	BIOMATERIALFORSCHUNG UND ECMO	14
1.6	ZELLADHÄSION AUF ECMO-MEMBRANEN	17
1.7	VOREXPERIMENT.....	21
1.8	ZIELSETZUNG	23
2.	MATERIAL UND METHODEN	24
2.1	MATERIAL	24
2.1.1	<i>Untersuchungsmaterial.....</i>	<i>24</i>
2.1.2	<i>Verbrauchsmaterial.....</i>	<i>25</i>
2.1.3	<i>Chemikalien</i>	<i>26</i>
2.1.4	<i>Puffer und Lösungen.....</i>	<i>27</i>
2.1.5	<i>Immunofluoreszenzfärbung.....</i>	<i>28</i>
2.1.6	<i>Geräte.....</i>	<i>29</i>
2.1.7	<i>Objektive.....</i>	<i>29</i>
2.1.8	<i>Softwares.....</i>	<i>29</i>
2.2	METHODEN	30
2.2.1	<i>Untersuchungsmaterial.....</i>	<i>30</i>
2.2.2	<i>Spülung und Fixierung der Oxygenatorproben</i>	<i>30</i>
2.2.3	<i>Probenentnahme</i>	<i>31</i>
2.2.4	<i>Zielantigene der Immunofluoreszenzfärbungen.....</i>	<i>32</i>
2.2.5	<i>Durchführung der Immunofluoreszenzfärbungen</i>	<i>34</i>
2.2.6	<i>Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie.....</i>	<i>38</i>
2.2.7	<i>Gesamtzellzahl-Quantifizierung</i>	<i>43</i>
2.2.8	<i>Immunofluoreszenz-Quantifizierung</i>	<i>48</i>
2.2.9	<i>Kriterien für die manuelle Auszählung.....</i>	<i>50</i>
2.2.10	<i>Statistische Methoden</i>	<i>53</i>

3.	ERGEBNISSE	55
3.1	LOKALISATION UND MORPHOLOGIE ZELLULÄRER ABLAGERUNGEN AUF PMP-MEMBRANEN	55
3.2	METHODENEVALUATION - GESAMTZELLZAHLQUANTIFIZIERUNG	56
3.2.1	<i>Max-Projektion: Image-J-particle-analyzer-Makro</i>	<i>57</i>
3.2.2	<i>Etablierung einer KI-gestützten Prozessierungslinie im OpSef</i>	<i>59</i>
3.2.3	<i>2-Z-Substack-Projektion: Prozessierungslinie und Image-J-particle-analyzer-Makro....</i>	<i>62</i>
3.2.4	<i>Vergleich der Verfahren: Max-Projektion und 2-Z-Substack-Projektion</i>	<i>64</i>
3.3	DATENAUSWERTUNG DER GESAMTZELLZAHLANALYSE	65
3.3.1	<i>Gesamtzellzahlanalyse – Maquet-PLS-i-Membranoxygenator.....</i>	<i>67</i>
3.3.1	<i>Gesamtzellzahlanalyse – Eurosets-adult-Membranoxygenator</i>	<i>68</i>
3.4	IDENTIFIKATION VON ZELLTYPEN AUF DER PMP-MEMBRAN	69
3.4.1	<i>Bildqualität</i>	<i>69</i>
3.4.2	<i>Evaluation des channel-analyzer-Makros zur Zelltypisierung</i>	<i>71</i>
3.5	DATENAUSWERTUNG DER ZELLTYPISIERUNG	73
3.5.1	<i>Zelltypisierung – Maquet-PLS-i-Membranoxygenator.....</i>	<i>73</i>
3.5.2	<i>Zelltypisierung – Eurosets-adult-Membranoxygenator.....</i>	<i>75</i>
3.5.3	<i>Zelltypisierung – Makrophagen-Polarisation</i>	<i>78</i>
4.	DISKUSSION	79
4.1	UNTERSUCHUNGSMETHODE	79
4.2	PROJEKTIONEN UND VERFAHREN DER GESAMTZELLZAHLQUANTIFIZIERUNG	79
4.3	GESAMTZELLZAHLANALYSE UND MORPHOLOGIE ZELLULÄRER ABLAGERUNGEN	82
4.4	ZELLTYPENIDENTIFIKATION	87
4.5	AUTOMATISCHE VERFAHREN ZUR ZELLTYPISIERUNG	89
4.6	ZELLTYPENZUSAMMENSETZUNG	90
4.7	SCHLUSSFOLGERUNG	93
4.8	AUSBlick	95
5.	ZUSAMMENFASSUNG	96
6.	SUMMARY	97
7.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	99
7.1	ABKÜRZUNGEN	99
7.2	EINHEITEN UND ZEICHEN	101
8.	ABBILDUNGS-, GRAPHEN- UND TABELLENVERZEICHNIS	102
8.1	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	102
8.2	GRAPHENVERZEICHNIS	104
8.3	TABELLENVERZEICHNIS	105

9.	REFERENZEN	107
10.	ANHANG	119
10.1	FÄRBUNGSPROTOKOLLE.....	119
10.1.1	<i>CD45, -CD31, CD68</i>	119
10.1.2	<i>Makrophagen-Polarisationsfärbung</i>	121
10.2	BILDPROZESSIERUNG.....	124
10.2.1	<i>Composite</i>	124
10.2.2	<i>Stacks und Hyperstacks</i>	124
10.2.3	<i>Max-Projektion</i>	124
10.2.4	<i>Substack-Projektion</i>	125
10.3	IMAGE-J PARTICLE ANALYZER MAKRO.....	125
10.4	CELLPOSE	126
10.5	DATENTABELLEN	127
10.6	GENEHMIGUNGEN FÜR ENTNOMMENE ABBILDUNGEN	142
11.	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	151
11.1	KONGRESSBEITRÄGE/VORTRÄGE:	151
12.	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	152
13.	DANKSAGUNG.....	153

1. Einleitung

Die extrakorporale Membranoxygenierung (ECMO) ist ein weit verbreitetes intensivmedizinisches Therapieverfahren, das bei Lungen- und/oder Herzversagen zum Einsatz kommt. Als eine Form des Organersatzes für Herz und/oder Lunge ermöglicht sie es, das Blut kritisch kranker Patienten über einen Oxygenator mit Sauerstoff anzureichern sowie die Durchblutung über eine Pumpe sicherzustellen. Im engeren Sinne werden Systeme, die die Lungenfunktion unterstützen, als ECMO und jene, die die Herzfunktion unterstützen, als *extracorporeal-life-support-systems* (ECLS) bezeichnet. In dieser Arbeit wird der Begriff ECMO stellvertretend für beide Verfahren verwendet.

1.1 Technik der ECMO

Bei allen ECMO-Verfahren wird Blut aus dem Körper des Patienten über ein Schlauchsystem in die Maschine abgeleitet. Diese besteht in der Regel aus einer Pumpe, um den Blutfluss sicherzustellen und einem Membranoxygenator (MO). Der MO verfügt über Gas durchflossene und von Patientenblut umspülte Hohlfaser-Kapillaren, an deren Membranen der Gasaustausch des Blutes stattfinden kann (Abbildung 1.1.1).

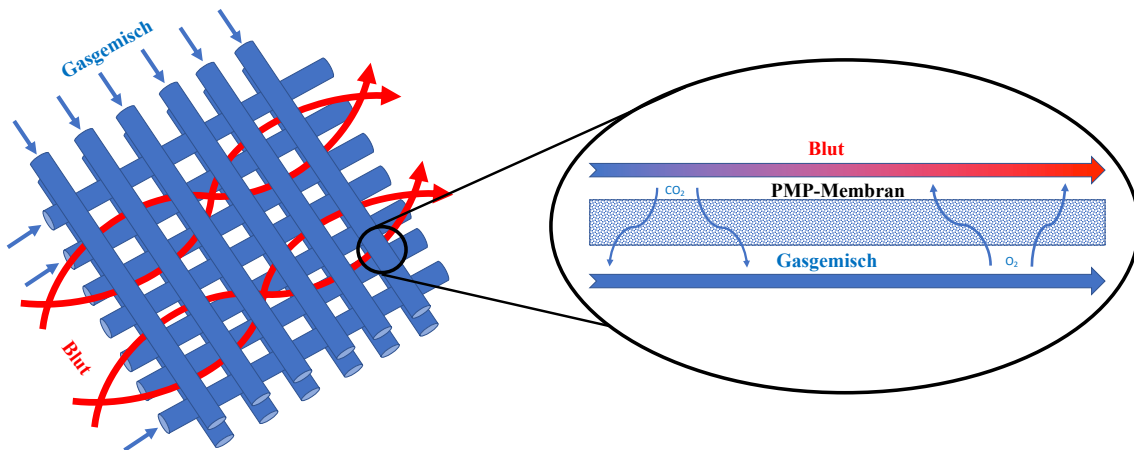


Abbildung 1.1.1 Funktionsprinzip des MOs. Die Hohlfaserkapillar-Matten werden von Patientenblut umspült, sodass an deren Oberfläche der Gasaustausch mit dem in den Kapillaren strömenden Gasgemisch stattfinden kann. Dabei diffundiert unter anderem Kohlenstoffdioxid (CO_2) aus dem Patientenblut ins Gasgemisch und Sauerstoff (O_2) vom Gasgemisch in das Patientenblut. Voraussetzung dafür ist ein Werkstoff, der mikroporöse Eigenschaften aufweist, um eine suffiziente Diffusion der Gase möglich zu machen. In den meisten Fällen wird dafür Polymethylpenten (PMP) verwendet.

Die einzelnen Hohlfaser-Kapillaren sind über Kettfäden, die meist aus Polyethylenterephthalat (PET) bestehen, parallel zu Matten verbunden ^[1]. Je nach Bauweise werden die Matten innerhalb des Oxygenators unterschiedlich zueinander angeordnet. Bei dem zylindrisch imponierenden Eurosets-*adult*-MO werden zwei Matten mit einem festgelegten Winkel der Hohlfasern zueinander um ein rohrförmiges Kernstück aufgerollt (Abbildung 1.1.2 [B]). Beim quadratischen Maquet-PLS-i-MO sind Hohlfasermatten im 90°-Winkel zueinander in Lagen angeordnet (Abbildung 1.1.2 [A]). Beide Anordnungsweisen dienen der Schaffung einer hohen Gasaustausch-Effizienz mit großer Gasaustauschfläche auf möglichst wenig Volumen.

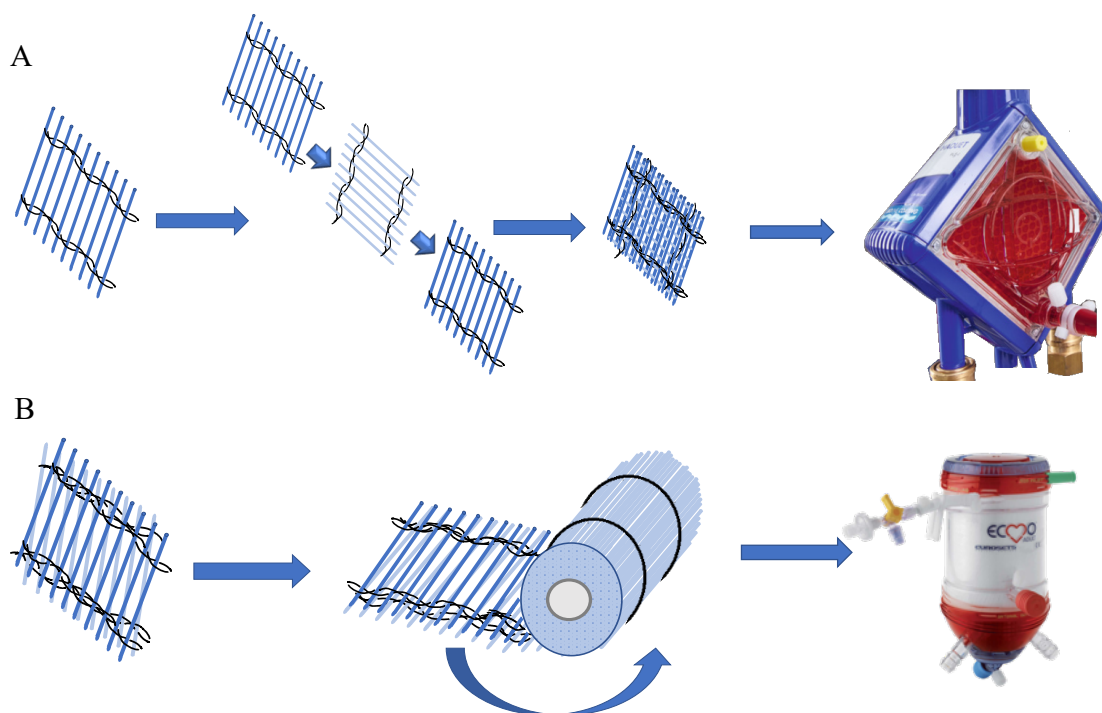


Abbildung 1.1.2 Schematische Anordnung der Hohlfaserkapillaren in MOs mit zwei exemplarisch dargestellten Kettfäden. [A] Links im Bild ist die Anordnung der Hohlfaserkapillaren in Matten zu erkennen. Die Matten werden durch hohlfaserverbindende Kettfäden gebildet. Die Hohlfaser-Matten werden geschichtet und in dem quadratischen MO-Gehäuse verbaut (Maquet-PLS-i). [B] Hier werden die Hohlfasern aufgerollt und in einem zylindrischen MO-Gehäuse verbaut (Eurosets-*adult*). Oxygenatorabbildungen (rechts) wurden mit Zustimmung der Firmen verwendet.

Je nach Ort der Kanülierung kann die ECMO-Therapie verschiedene Funktionen erfüllen und in weitere Subgruppen eingeteilt werden (Abbildung 1.1.3). Wird das Blut aus einem großen venösen Gefäß abgeleitet, über den MO mit O₂ angereichert und dem Patientenkreislauf wieder über ein venöses Gefäß zugeführt, spricht man von der venovenösen-ECMO (VV-ECMO). Wird das Blut hingegen oxygeniert und über eine große Arterie dem Hochdrucksystem des Patienten zugeführt, spricht man von einer

^[1] Schmidthöfer, M. (Geschäftsführung). Eurosets - GmbH Germany: E-Mail Korrespondenz (2021).

veno-arteriellen-ECMO (VA-ECMO). Aus dieser Definition leitet sich der Einsatzbereich der Subgruppen ab. Die VV-ECMO wird bei Patienten eingesetzt, die ein noch ausreichendes Herz-Zeit-Volumen (HZV) aufbringen, jedoch beispielsweise aufgrund eines Lungenschadens starke Einschränkungen in der Oxygenierung des Blutes aufweisen. Hauptindikation der VV-ECMO zur pulmonalen Unterstützung beim Erwachsenen ist das *acute respiratory distress syndrome* (ARDS)^{4,5}. Die VA-ECMO ist aufgrund ihrer arteriellen Kanülierung die einzige Variante zur direkten Unterstützung des HZV und wird beim Erwachsenen vornehmlich zur kardialen Unterstützung beispielsweise beim kardiogenen Schock eingesetzt^{28,77}. Ein selten verwendetes Verfahren ist die *pumpless extracorporeal lung assistance* (pECLA). Dabei wird dem MO ohne Einsatz eines Pumpensystems Patientenblut aus einer großen Arterie, beispielsweise der *Arteria femoralis*, zugeführt und über eine großlumige venöse Kanülierung in den Patienten zurückgeleitet. Diese Technik dient vornehmlich der CO₂-Elimination und Oxygenierung und kommt als Lungenunterstützungsverfahren bei Patienten mit ARDS zum Einsatz. Vorteile sind ein geringerer apparativer und personeller Aufwand⁷.

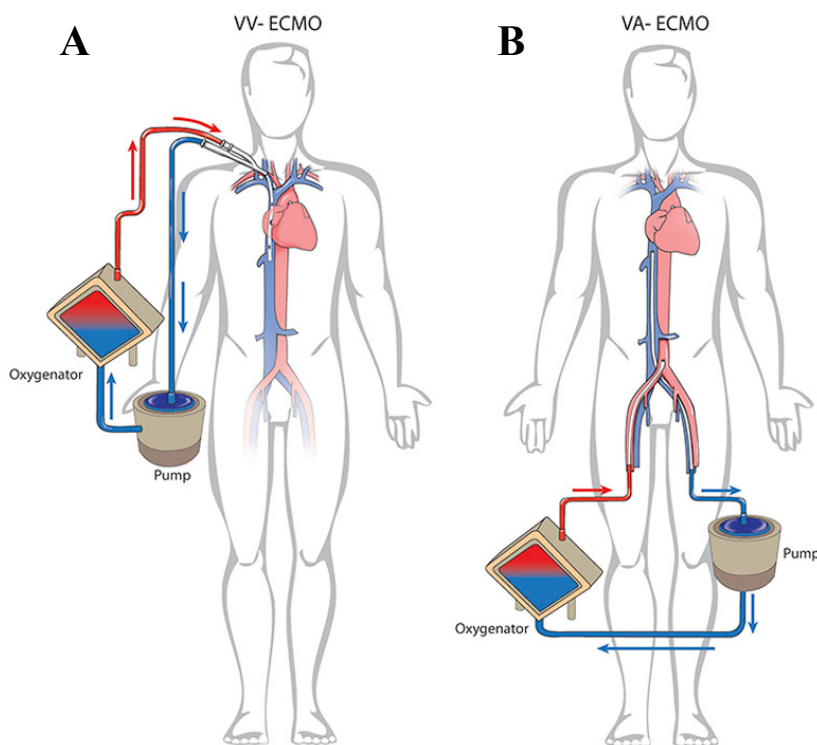


Abbildung 1.1.3 Illustration der Betriebsformen VV- und VA-ECMO. [A] Abgebildet ist eine ECMO im VV-Betriebsmodus mit kombinierter venöser Kanülierung in die *Vena jugularis interna*. [B] Abgebildet ist eine ECMO im VA-Betriebsmodus mit einer peripheren venösen Kanülierung in der *Vena femoralis* und einer arteriellen Kanülierung in der *Arteria femoralis*. In beiden Darstellungen drainiert die venöse Kanüle das Blut und führt es der Pumpe zu, die es in den MO pumpt. Hier findet die Oxygenierung des Blutes und die CO₂-Elimination statt. Das oxygenierte Blut wird dem Patienten wieder über die venöse [A] und arterielle [B] Kanülierung zugeführt. Entnommen von Squiers *et al.*, 2016¹¹⁷.

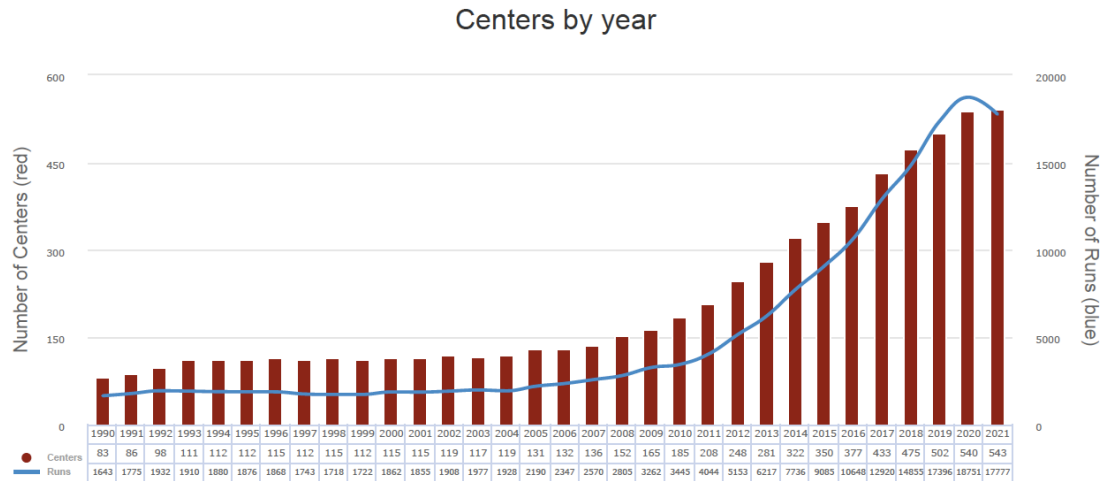
Die ECMO-Systeme sind von der funktionell verwandten Herz-Lungen-Maschine (HLM) abzugrenzen. Die Unterschiede beider Maschinen liegen vor allem im Einsatzbereich und der Anwendungsdauer. Während die HLM für chirurgische Eingriffe am blutleeren Herzen der Erzeugung eines vollständigen oder partiellen kardiopulmonalen Bypasses (CPB) mit der Möglichkeit einer Hypothermie dient, wird die ECMO als Minimalvariante der HLM zur *ultima-ratio* Therapie bei instabilen Patienten eingesetzt. Daher verfügt die HLM über eine weitergehende Ausstattung, unter anderem den Kardiotomiesauger zum Absaugen von Blut aus dem Operationsgebiet und mehreren Rollerpumpen zur differenzierten Steuerung von Blutströmen während der Operation. Um das abgesaugte Blut dem Patientenkreislauf wieder zuführen zu können, verfügt der Kardiotomiesauger über ein Blutreservoir. Darin besteht eine Blut-Luft-Kontaktfläche, womit die HLM im Gegensatz zur ECMO ein offenes System darstellt. ECMO-Einheiten verfügen meist lediglich über eine Zentrifugalpumpe und einen MO. Bei beiden Varianten wird baulich ein möglichst kleines Vorfüllvolumen angestrebt. Damit ist das Flüssigkeitsvolumen gemeint, mit dem die Maschine und das Schlauchsystem vor dem Betrieb gefüllt werden muss, um die Zufuhr von Luft in den Patientenkreislauf zu vermeiden. Nach Anschluss der Maschine verdünnt das Vorfüllvolumen das Patientenblut. Dieser Effekt wird als Hämodilution bezeichnet. Auch wenn die ECMO-Systeme i.d.R. kleinere Vorfüllvolumina aufweisen, tritt eine Hämodilution bei beiden Verfahren auf.

Aus den Einsatzbereichen lässt sich auch die unterschiedliche Betriebszeit der Systeme ableiten. Während die HLM nur Minuten bis wenige Stunden bei Operationen eingesetzt wird, ist der Einsatz der ECMO-Systeme oft Tage bis Wochen lang. Die maximale Anwendungsdauer ist bei den Oxygenator-Modellen Maquet-PLS-i und Eurosets-*adult* auf einen Dauereinsatz von bis zu 14 Tagen begrenzt^{79,[2]}. In einer retrospektiven Studie der durch die *Extracorporeal Life Support Organisation* (ELSO) im Zeitraum von 2002 bis 2012 gesammelten Daten von 2699 erwachsenen Patienten, die mittels VA-ECMO behandelt wurden, ergab sich eine mediane Verbleibdauer von 4 Tagen am Gerät¹¹⁴. Die durchschnittliche Unterstützungsdauer bei Patienten mit ARDS im VV-Modus beträgt hingegen 7-10 Tage mit Einzelfallberichten von bis zu 265 Tagen und mehrmaligem Wechsel des Oxygenators¹³⁶.

^[2] Schmidthöfer, M. (Geschäftsführung). Eurosets - GmbH Germany: E-Mail Korrespondenz (2021).

1.2 Verbreitung und Anwendung der ECMO-Therapie

Als intensivmedizinisch etabliertes Verfahren hat sich seit 1990 die Anzahl der ECMO-Anwendungen weltweit pro Jahr bei erwachsenen, pädiatrischen und neonatalen Patienten in etwa verzehnfacht. Die Anzahl der zertifizierten Behandlungszentren hat sich von 83 auf 543 mehr als versechsfacht (Graph 1.2.1) ²⁹.



Graph 1.2.1 Anzahl der ECMO-Zentren und Anwendungen im Zeitraum von 1990 bis 2021. Darstellung der absoluten Zahlen der bei der ELSO von 1990 bis 2021 registrierten ECMO-Zentren (rote Balken) und ECMO-Anwendungen (blaue Kurve) pro Jahr. Entnommen von ELSO-International ECLS Registry Report 2022 ²⁹.

Der Anstieg der Zahlen ist unter anderem durch die breiten Anwendungsmöglichkeiten der ECMO-Systeme zu erklären. Die Indikationen reichen heutzutage bis zum Einsatz bei der extrakorporalen kardiopulmonalen Reanimation (ECPR) sowie dem *bridging* bei Lungentransplantationen ¹¹⁰. Als äußerst invasives Verfahren, das bei schwer kranken Menschen zum Einsatz kommt, ergibt sich seit Beginn der Aufzeichnungen durch die ELSO im Jahr 1990 über alle Altersstufen und Anwendungsindikationen eine primäre Gesamtüberlebensrate von 68% ²⁹. Komplikationsträchtige Verläufe nach initial erfolgreicher ECMO-Therapie sind nicht selten, sodass insgesamt nur 54% der ECMO-Patienten bis zur Entlassung oder Verlegung überleben ²⁹. Das beste Therapieergebnis wird bei der respiratorischen Unterstützung des Neonaten mit 87% primärer Überlebensrate der ECMO-Therapie, respektive 73% Überlebensrate bis zur Entlassung oder Verlegung erreicht ²⁹.

Der Großteil der extrakorporalen Unterstützungsverfahren am Neonaten wird mit der Indikation der pulmonalen Unterstützung durchgeführt. Hingegen sind die Indikationen der ECMO-Einsätze bei pädiatrischen und adulten Patienten in etwa zu gleichen Anteilen auf die kardiale und pulmonale Unterstützung verteilt. Die Nutzung im Rahmen der ECPR findet in allen Altersgruppen die geringsten Anwendungen und zeigt mit einer

intrahospitalen Überlebensrate von nur 30% beim Erwachsenen das schlechteste Therapieergebnis²⁹.

Die insgesamt eingeschränkte Gesamtüberlebensrate während ECMO-Therapie ist zum einen durch das Vorliegen einer kritischen Grunderkrankung zu erklären und zum anderen durch Komplikationen während der Behandlung bedingt.

1.3 Komplikationen der ECMO-Therapie

Komplikationen während ECMO-Therapie sind häufig und während VA-ECMO im Vergleich zur VV-ECMO oft schwerwiegender^{17,77}. Sie können zwei Überkategorien zugeordnet werden. Es gibt mechanische und patientenbezogene Komplikationen. Die mechanischen Komplikationen kommen durch eine Dysfunktion einzelner Komponenten des künstlichen Kreislaufs zustande. Bei der pulmonalen und kardialen Unterstützung von Erwachsenen ist die häufigste Komplikation die Bildung von Thromben innerhalb des extrakorporalen Systems¹⁷. Als Folge der Gerinnsel treten weitere mechanische Dysfunktionen wie Kanülenprobleme, Einschränkungen der Gasaustauscheigenschaften des Oxygenators bis hin zur Oxygenatorthrombose auf. Dies kann dazu führen, dass ein Systemwechsel nötig wird.

Die patientenbezogenen Komplikationen wiederum sind solche, die primär das Kompartiment des Patienten betreffen und durch Wechselwirkung des extrakorporalen Kreislaufs mit dem Patienten zustande kommen. Die häufigsten Komplikationen sind unter anderem durch die notwendige Antikoagulation während ECMO-Therapie hervorgerufene Blutungen im Bereich von OP-Wunden, im GI-Trakt und an den peripheren Kanülierungsstellen sowie die Nierensuffizienz bis hin zur renalen Ersatztherapie¹⁷. Darüber hinaus können neurologische, pulmonale und metabolische Komplikationen, wie das *persistent inflammation, immunosuppression and catabolism syndrome (PICS)* auftreten⁴⁶. Durch die hämodynamischen Wechselwirkungen beider Kreisläufe kommen insbesondere im VA-Modus komplikationsträchtige Ischämien der Gliedmaßen oder des Hirns, bedingt durch Verlegung versorgender Gefäße oder differentielle Hypoxie (Harlekin-Phänomen) vor¹⁷.

1.4 Systemische inflammatorische Antwort während extrakorporaler Zirkulation

Ein essentieller pathophysiologischer Faktor der Komplikationen während ECMO-Therapie ist die Aktivierung der Gerinnung und des Immunsystems durch die Fremdoberfläche des extrakorporalen Kreislaufs. Diese Prozesse sind Teil einer systemischen inflammatorischen Antwort des kritisch kranken Intensivpatienten auf die extrakorporale Zirkulation (ECC) ^{1,17,83}. Da ECMO-Systeme mit einer Membranoxygenatoroberfläche von 0,8 - 2,5 m² und weiteren 0,05 - 0,15 m² Schlauchsystem von allen eingesetzten Medizinprodukten die größte Schnittfläche zwischen Patientenblut und Biomaterial bieten, geht von ihnen ein enormes Interaktionspotential aus, das Gegenstand aktueller Forschung ist ¹²⁸.

Die Patienten-Fremdoberflächen-Interaktion lässt sich in zwei Hauptachsen einteilen. Die humorale Achse, unter welche die Aktivierung des Komplementsystems und der plasmatischen Gerinnung fällt, sowie die zelluläre Achse, die unter anderem die Aktivierung von Thrombozyten und Leukozyten im extrakorporalen Kreislauf repräsentiert. Dadurch, dass die Reaktionen in einem zirkulierenden Kompartiment stattfinden, entwickeln sie einen systemischen Effekt und können in ihrer vollen Ausprägung in einem *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS) münden ⁶¹.

Die ersten Erkenntnisse über die systemische inflammatorische Antwort während extrakorporaler Zirkulation stammen aus der koronaren Bypasschirurgie und konnten durch eine Vielzahl moderner Forschungsergebnisse aus der ECMO-Anwendung untermauert werden. Im Folgenden sollen die einzelnen Komponenten der systemischen Antwort auf die ECC erläutert werden. Die Abbildung 1.4.1 verschafft einen Überblick über die wichtigsten Reaktionen.

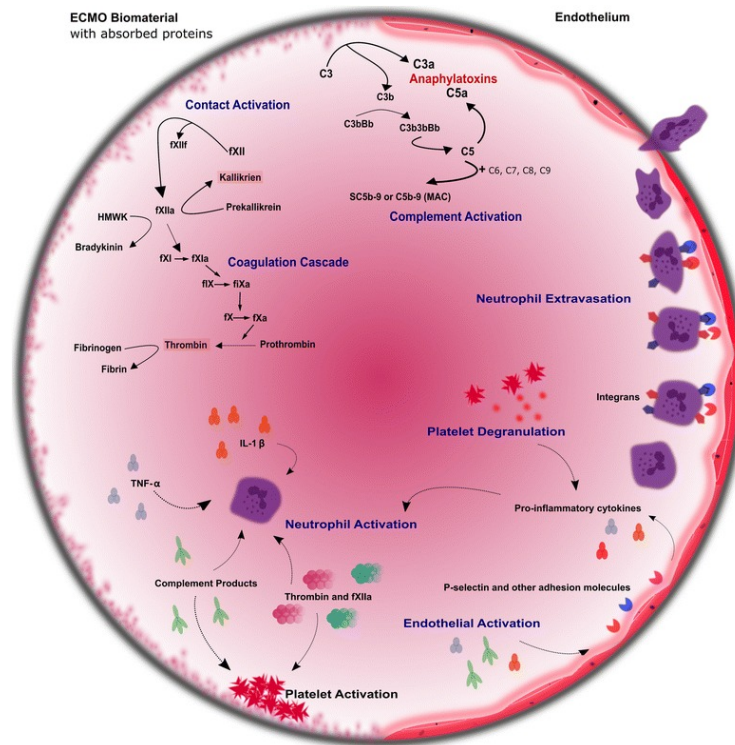


Abbildung 1.4.1 Zusammenfassung der humoralen und zellulären Reaktionen auf Seiten der Fremdoberfläche (links) und des Patienten-Endothels (rechts) während ECMO-Therapie. Die Fremdoberfläche aktiviert das Komplementsystem und das intrinsische Gerinnungssystem mittels Kontaktaktivierung. Durch die Endprodukte dieser Kaskaden kommt es zu einer konsekutiven Anregung von neutrophilen Granulozyten, Thrombozyten und Endothelzellen. Auf der Endothelseite ist die Leukodiapedese von neutrophilen Granulozyten zu sehen, die zum Endorganschaden führen kann. Entnommen von Millar *et al.*, 2016 ⁸³.

1.4.1 Gerinnungsaktivierung während ECMO

Eine Aktivierung der intrinsischen Gerinnungskaskade durch die Fremdoberfläche der ECMO erfolgt vermutlich über das Kontaktsystem (Faktor XIIa) ^{24,83}. Das extrinsische Gerinnungssystem kann durch die vermehrte Expression von Gewebethromboplastin (TF) auf aktivierten Monozyten und die Freisetzung von löslichem TF durch Endothel in Gang gesetzt werden ^{85,123}. Insgesamt konnte ein 30-facher Anstieg der Thrombin-Bildung während *in vitro* simulierter ECC gezeigt werden ⁸⁵. Die Bildung von Thrombin hat nicht nur einen Einfluss auf das Gerinnungssystem, sondern trägt ebenfalls zur systemischen inflammatorischen Reaktion während der ECMO bei. Thrombin induziert die Expression von P- und E-Selektinen auf Endothelzellen und regt diese direkt zur Expression und Freisetzung des *platelet activating factor* (PAF) an ⁹⁶. Beide Faktoren aktivieren im Rahmen der Leukozyten Transmigration neutrophile Granulozyten und fördern deren Zytokinproduktion sowie Adhärenz an die Endothelien ^{59,72,143}. Die Gerinnungsaktivierung während ECMO ist essentieller Teil komplikationsträchtiger thrombotischer Ereignisse und beinhaltet weitestgehende stimulierende Funktionen in proentzündlichen Prozessen.

1.4.2 Auslösung der Komplementkaskade durch ECMO

Als Teil der angeborenen Immunantwort beseitigt das Komplementsystem körperfremde Zellen und Substanzen. Dies geschieht durch die Bildung von Membranangriffskomplexen (MAC, C5b - C9), die Aktivierung von Leukozyten via Opsonisierung (C3b) und die chemotaktische Rekrutierung von Leukozyten zum Ort der Inflammation mittels Anaphylatoxinen (C3a - C5a) ²⁶.

Die Aktivierung des Komplementsystems durch den CPB ist breit erforscht ^{55,133}. Es wird angenommen, dass der initiale Blut-Biomaterial-Kontakt die Komplementkaskade über den alternativen Aktivierungsweg in Gang setzt ⁸⁸. Weitere *in vitro* und *in vivo* Studien zeigten, dass die Aktivierung des Komplementsystems auch während der ECMO-Therapie, analog zum CPB, rapide verläuft und innerhalb der ersten Stunde ihren Höhepunkt erreicht ^{40,131}. Durch ECC aktivierte Komplementfaktoren können wiederum Leukozyten und die Freisetzung weiterer Entzündungsmediatoren anregen ^{102,103}. Zusätzlich wird durch Komplementfaktoren die Expression von P-Selektin auf Endothelzellen gefördert, was zu einer vermehrten Adhäsion von Leukozyten beiträgt ³¹.

1.4.3 Einfluss der ECMO auf Thrombozyten

Die Thrombozyten sind als essentieller Bestandteil des Blutgerinnungssystems an koagulatorischen und inflammatorischen Reaktionen während der ECMO-Therapie beteiligt. Deren Aktivierung hängt im Wesentlichen vom Scherstress, der Expression von Thrombozyten-Integrinen und der Menge von adhäsionsfördernden Proteinen im Blut ab. Bei hohem Scherstress ist die Plättchenadhäsion vor allem von der Menge des Von-Willebrand-Faktors (vWF) und dem Integrin GPIIb abhängig ^{43,86,111}. Bei geringen Scherstress-Bedingungen sind die Faktoren Fibrinogen und GPIIb/IIIa entscheidende Faktoren für die Thrombozytenadhäsion.

Die Aktivierung von Thrombozyten im Rahmen der ECC wird dem hohen, durch die Pumpe induzierten Scherstress und der vermehrten Thrombin-Bildung zugeschrieben ^{35,83}. Eine Computersimulation der Thrombogenese während ECMO-Therapie postuliert, dass die Thrombozytenaktivierung bei Hohlfaseroxygenatoren von der Anzahl der Thrombozyten-Durchläufe, bzw. der Betriebszeit des ECMO-Systems abhängig ist und hauptsächlich im Einlassbereich des MOs stattfindet ⁹². Nach der Scherstress-Aktivierung kommt es dann auf der Oxygenatormembran zu vermehrter Bindung des Thrombozytenintegrins GPIIb an vWF ⁶. Eine übermäßige Aktivierung und

Adhäsion von Thrombozyten im MO wird als initiierender Faktor der komplikationsträchtigen Oxygenatorthrombose diskutiert ¹⁰⁷. Neben der Gerinnung scheinen die Thrombozyten auch Bestandteil der pro-inflammatorischen Reaktion während ECC zu sein. So beinhalten ihre α -Granula Gerinnungsfaktoren, Wachstumsfaktoren, Proteasen und pro-inflammatorische Zytokine ¹³⁵. Des Weiteren können aktivierte Thrombozyten über ihr *granule membrane protein-140* (GMP-140) mit myeloiden Leukozyten interagieren ⁶⁵. Die Hauptinteraktion findet hierbei zwischen Thrombozyten und Monozyten aber auch neutrophilen Granulozyten statt ³³. Diese Konjugatbildung stimuliert die Leukozyten zur Transkription und Sekretion der pro-inflammatorischen Interleukine (IL) -1 β , -8 und des *monocyte chemoattractant proteins-1* (MCP-1) ³³.

1.4.4 Endotheliale Dysfunktion während ECC

Obwohl es nur eine kleine direkte Kontaktfläche zwischen dem patienteneigenen Endothel und dem extrakorporalen Kreislauf gibt, spielt es während ECMO-Therapie eine wichtige Rolle. Die durch den Fremdoberflächenkontakt aktivierten humoralen Kaskaden und Immunzellen wirken systemisch auf das Endothel des Patienten. Die Endothelzellen verändern daraufhin ihre Genexpression hin zu einer verstärkten Produktion von E-Selektin, *intracellular adhesion molecule* (ICAM), *vascular cell adhesion molecule* (VCAM) und IL-8 ⁹. Die Hochregulation von E-Selektin ist ein wichtiger Mediator des Endorganschadens während der ECC. Es interagiert unter anderem mit Integrinen von neutrophilen Granulozyten und trägt so zu deren Leukodiapedese in die betroffenen Gewebe und Aktivierung mittels *outside-in signaling* bei ¹¹³. Auch das von Endothelzellen gebildete IL-8 ist ein bekannter Mediator für die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten ins Gewebe ⁴⁴. Die Degranulation dieser Zellen führt zu einer Freisetzung von Proteasen und freien Radikalen, die unter anderem Proteine der umliegenden extrazellulären Matrix (EZM) abbauen und zur Entstehung einer endothelialen Dysfunktion beitragen ⁹. Diese ist bei kritisch kranken Patienten mit einem schlechteren Therapieergebnis assoziiert ²⁵. Eine Folge der endothelialen Dysfunktion ist das *capillary leakage* ¹¹². Dabei kommt es im Bereich der Kapillaren zu einer mangelnden Abdichtung des Endothels zwischen intra- und extravasalem Raum, sodass Flüssigkeit frei in das Gewebe diffundieren kann. Der Patient entwickelt generalisierte Wassereinlagerungen.

1.4.5 Stimulation von Immunzellen durch ECMO

1.4.5.1 Aktivierung neutrophiler Granulozyten und Endorganschaden

Eine Reihe von Immunzellen wird direkt nach Beginn der ECC aktiviert. So werden neutrophile Granulozyten kurz nach Beginn der Zirkulation über ansteigende Spiegel des Anaphylatoxins C5a stimuliert¹⁰³. Während neonataler ECMO lassen sich innerhalb der ersten halben Stunde erhöhte neutrophile Aktivitätsmarker wie z.B. Neutrophilen-Elastase nachweisen, die innerhalb von 24 Stunden auf Prael-ECMO-Therapie-Werte abfallen³². Es zeigte sich außerdem ein Zusammenhang zwischen der Verschlechterung von radiologischen *lung-injury-scores* und dem Anstieg der neutrophilen Aktivitätsmarker³². Es ist bekannt, dass die Stimulation dieser Zellen mitverantwortlich für den Endorganschaden während ECC ist^{1,13,83}. Dies erklärt sich daraus, dass neutrophile Granulozyten als Teil der angeborenen Immunantwort in der Lage sind zu degranulieren und ihre zytotoxischen Enzyme wie Myeloperoxidase, Neutrophilen-Elastase und Lysozym freizusetzen. Diese besitzen beträchtliche gewebsschädigende Eigenschaften⁶³. Die Stimulation dieser Zellgattung wurde bereits früh als mitwirkender Teil des Postperfusionssyndroms nach CPB erkannt¹³⁴. Zum Postperfusionssyndrom gehören sowohl pulmonale und renale Dysfunktionen als auch Blutungsneigungen und Fieber nicht-infektiöser Genese. Bei der Erforschung der Komplikation fielen nach CPB-Beginn Neutropenien auf, die im Tiermodell auf einer Infiltration neutrophiler Granulozyten in der Lunge zurückzuführen waren^{20,48,97}. Die Aktivierungsorte neutrophiler Granulozyten während ECMO sind noch nicht abschließend geklärt. Dennoch konnte in einem etablierten ECC-Rattenmodell gezeigt werden, dass der Membranoxygenator eine zentrale Rolle bei der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten und der folgenden inflammatorischen Antwort mit Organschaden spielt¹⁰⁶. Wie beschrieben ist auch die Aktivierung des Endothels mit vermehrter Expression von E-Selektin zentraler Bestandteil dieses Prozesses⁹.

1.4.5.2 ECMO und Monozyten

Auch wenn die Reaktion von Monozyten auf verschiedenste Stoffe im Bereich der Biomaterialforschung gut erforscht wurde, ist ihre Reaktion auf die ECC weitestgehend unklar. Es gibt Hinweise, dass Monozyten durch den künstlichen Kreislauf gerinnungsfördernde Eigenschaften entwickeln. So konnte gezeigt werden, dass

Monozyten innerhalb eines Tages nach CPB vermehrt TF, einen essentiellen Gerinnungsaktivator des extrinsischen Systems, auf ihrer Membran exprimieren³⁰. Darüber hinaus wurde in einem *in vitro* Modell der ECC die nukleäre Translokation des monozytären Transkriptionsfaktors *nuclear factor- κ B* (NF- κ B) mit sukzessiver Hochregulation des membranständigen TF und Aktivierung der Gerinnung beobachtet⁸⁵. Als möglicher Induktor des Prozesses wird das Komplementsystem vermutet. *In vitro* konnte die Induktion der Adhäsionsproteine L-Selektin und *cluster of differentiation* (CD)18 auf Monozyten während ECC gezeigt werden⁴¹. Im Hinblick auf die ECMO-Therapie stellen Monozyten ein attraktives Forschungsfeld dar. So ist bekannt, dass gewebständige Makrophagen eine pro- oder anti-inflammatorische Polarisierung zur M1- oder M2-Makrophage aufweisen können. Die Polarisierung ist unter anderem vom vorherrschenden Zytokinmilieu abhängig⁷⁴. Ein Nachweis dieser Zellgattungen auf der Oxygenatormembran könnte Aufschlüsse über das auf der Membran vorherrschende Zytokinmilieu liefern und Hinweise zu der Beteiligung an der systemischen Reaktion während der ECMO-Therapie geben.

1.4.6 Endstrecke - Zytokinsturm

Die gemeinsame Endstrecke der oben genannten Prozesse ist die Sekretion von Zytokinen. Diese haben die unterschiedlichsten Effekte auf Zellen in Funktionsgeweben oder Immunzellen des Blutstroms. Das Zellprofil, das diese Stoffe freisetzt, ist genauso vielfältig wie die Wirkungen der Zytokine. Es reicht von Gewebsmakrophagen über im Blut zirkulierende Immunzellen bis zu Endothelzellen. Als biochemische Boten können sie pro- und anti-inflammatorische Signale über den Blutstrom in den gesamten Körper tragen. Das Gleichgewicht der Botenstoffe ist wichtig und kann durch die ECMO verschoben werden. Da es während ECMO nicht ein Leitzytokin gibt, sondern ein regelrechter Zytokinsturm aus verschiedensten Zytokinen ausgelöst werden kann, ist eine gezielte therapeutische Intervention schwierig^{34,80}. Daneben deuten Studien darauf hin, dass die Erhöhung spezifischer Zytokine bei bestimmten ECMO-Konfigurationen gute prädiktive Eigenschaften hinsichtlich des Therapieergebnisses hat⁴⁹. Die wichtigsten ECMO-assoziierten Zytokine sollen im Folgenden behandelt werden.

Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) wird zu einem frühen Zeitpunkt der ECMO-Therapie vermutlich aus präformierten Granula der Mastzellen des Darms nach Komplementaktivierung freigesetzt⁸⁰. Er wird außerdem bei entzündlichen Prozessen in

großen Mengen durch Makrophagen sezerniert und aktiviert neutrophile Granulozyten. Deren Leukodiapedese wird durch die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen stimuliert und weitere Makrophagen werden zu vermehrter Phagozytose angeregt¹⁰. Während neonataler ECMO gehen erhöhte TNF- α Spiegel mit einem schlechteren Therapieergebnis einher⁸².

Ein weiteres relevantes Zytokin während der ECMO-Therapie ist IL-6. Es hat sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Eigenschaften und entfaltet seine Wirkung an einer Vielzahl von Zellen über membrangebundene IL-6-Rezeptoren oder einer Wechselwirkung des löslichen IL-6-Rezeptors mit dem ubiquitär exprimierten Glykoprotein 130 (gp130)⁵⁸. IL-6 ist ein entscheidender Mediator der Akute-Phase-Reaktion und fördert die Reifung und Aktivierung von T- und B-Lymphozyten sowie die Regulation von anti- und pro-inflammatorischen Zytokinen. Während ECMO zeigt sich eine Erhöhung der IL-6 Werte im Blut⁸⁰. Persistierend erhöhte IL-6-Level innerhalb der ersten zwei Tage der ECMO-Therapie scheinen Prädiktor für ein schlechtes Therapieergebnis zu sein¹⁰⁴.

Bei der ECMO-assoziierten Leukodiapedese von neutrophilen Granulozyten und dem damit assoziierten Endorganschaden spielt das von Endothelzellen sezernierte IL-8 eine Schlüsselrolle^{44,80,130}. Dieses wirkt wie ein Lockmittel auf neutrophile Granulozyten, um sie an den Ort der Entzündung zu rekrutieren. Die Freisetzung des IL-8 beginnt sehr früh während der ECMO-Therapie und hat eine ähnliche Kinetik wie die bereits beschriebene Sekretion von TNF- α ⁸⁰.

Das anti-inflammatorische IL-10 ist ein möglicher Prädiktor für das Therapieergebnis während ECMO. Hong *et al.*, 2015 zeigten, dass bei Patienten, die aufgrund eines kardiogenen Schocks auf die Unterstützung mittels ECMO angewiesen waren, hohe initiale IL-10 Werte mit höherer Überlebenswahrscheinlichkeit einhergingen⁴⁹.

Die Freisetzung all dieser körpereigenen Stoffe in Form eines Zytokinsturms sowie die zelluläre Aktivierung während der ECMO-Therapie hat starke Ähnlichkeit zu den pathophysiologischen Vorgängen eines SIRS und ist damit nicht primär Infekt-getrieben, sondern als endogene sterile Überreaktion des Patientenorganismus zu begreifen^{83,101,124}. Die klinischen Folgen werden in Abbildung 1.4.2 zusammengefasst.

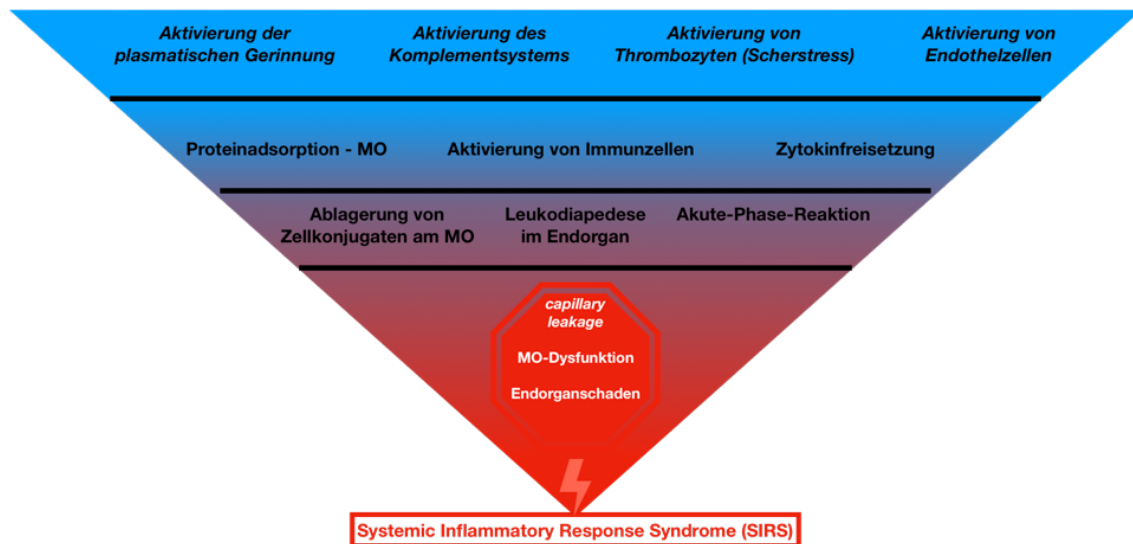


Abbildung 1.4.2 Darstellung der ablaufenden Pathomechanismen während ECMO-Therapie und deren klinische Bedeutung. Die Aktivierung humoraler und zellulärer Systeme kann zu einer Ablagerung von Zellkonjugaten und Thromben auf dem MO führen. Dies kann mit einer Kompromittierung des Gasaustausches und erhöhter Gefahr einer Oxygenatorthrombose einhergehen. Der Zytokinsturm provoziert eine *capillary leakage* und fördert zusammen mit der Infiltration neutrophiler Granulozyten in die Organe des Patienten die Entstehung eines Endorganschadens. Der betroffene Patient kann das klinische Bild eines SIRS präsentieren.

1.5 Biomaterialforschung und ECMO

Um die Interaktion zwischen Fremdoberfläche und Patienten besser verstehen zu können, wird in diesem Abschnitt ein Überblick über die Entwicklung der ECC und den aktuellen Kenntnisstand der Biomaterial-Blut-Interaktion gegeben.

Moderne Biomaterialien sind immunologisch inert, d.h. sie bieten kein direktes Interaktionspotential mit Immunzellen. Dennoch kommt es z.B. nach Implantation von Biomaterialien unausweichlich zu verschieden stark ablaufenden Fremdkörper-Reaktionen ⁴⁵. Dabei bildet sich auf der implantierten Fremdoberfläche eine initiale Vorläufermatrix, die durch das Vorhandensein verschiedener Plasmaproteine und pro-inflammatorischer Zytokine zur Mediation des Prozesses charakterisiert ist ². Die Proteinfilmbildung auf der Fremdoberfläche basiert auf dem Vroman-Effekt und ist ein dynamisches Wechselspiel aus Ad- und Desorptionsprozessen der Plasmaproteine, die abhängig von der Zeit, der Proteinkonzentration und der Affinität zur Fremdoberfläche sind. Dabei konkurrieren die Proteine um freie Bindungsstellen. Nach initialem Blutkontakt ist vor allem Fibrinogen früh in großen Mengen auf Biomaterialien vorhanden. Da Fibrinogen nach Adsorption an Biomaterialien seine Tertiärstruktur verändert und so Bindungsstellen innerhalb seiner D-Domäne freilegt, kann es mit dem Phagozyten-Integrin Mac-1 interagieren, was die Adhärenz von Makrophagen

ermöglicht⁵¹. Die Adsorption von Fibrinogen durch den extrakorporalen Kreislauf ist in mehreren Studien beschrieben^{83,87,95,128}. Neben Fibrinogen modulieren weitere abgelagerte Proteine wie Albumin, Fibronectin, Vitronectin und Gammaglobuline die Fremdkörperreaktion^{14,53,54}. Vitronectin ist ein besonderer Bestandteil des Proteinfilms auf Fremdmaterialien. Es interagiert ebenfalls mit Immunzell-Integrinen und fördert die Fremdkörper-Riesenzell(FRZ)-Bildung⁵³. FRZ gehen aus fusionierten Makrophagen hervor und werden durch die Interaktion von Integrinen mit Glykoproteinen der EZM über intrazelluläres *downstream signaling* zur Reorganisation ihres Zytoskelettes angeregt, was zu einer Ausbreitung dieser Zellen über das Fremdmaterial führt².

Letztlich ist die Proteinfilmbildung der im Blut gelösten Proteine auf dem Biomaterial die zentrale Voraussetzung für die Interaktion des zellulären Immunsystems mit der Fremdoberfläche. Die Wechselwirkung der auf Immunzellpopulationen vorhandenen Adhäsionsrezeptoren mit dem auf Fremdmaterialien gebildeten Proteinfilm bietet somit das wichtigste zelluläre Erkennungssystem für implantierbare synthetische Materialien und medizinische Geräte².

Die Entwicklung neuer Biomaterialien mit reduzierter inflammatorischer Antwort ist eines der Hauptziele moderner Biomaterialforschung und wird auch im Bereich der ECC durch neu entwickelte Kunststoffe und Beschichtungen der Kreislaufbauteile vorangetrieben. So entwickelte sich ausgehend von den ersten Blasen-Oxygenatoren der heute verwendete MO. Bei diesem findet der Gasaustausch über eine Membran zwischen Gas- und Blutseite statt, die aus verschiedenen Kunststoffen bestehen kann.

Ein eingesetzter Membrankunststoff ist Polypropylen (PP). Dieses ist mikroporös und bietet über seine Mikroporen einen direkten Kontakt zwischen Gasgemisch und Blut. Eine häufige Komplikation ist der Durchtritt des Patientenplasmas durch die Mikroporen, was die Gasaustauschkapazität des Oxygenators limitiert und zur Notwendigkeit eines Oxygenatorwechsels führen kann^{81,84,94}. Dieser Plasmadurchtritt begrenzt den Einsatz von PP-Membranen im Rahmen einer Langzeit ECMO-Therapie. In den 1980er und 1990er Jahren wurden in der Langzeitanwendung vermehrt Silikonmembranen, die eine geringere Durchlässigkeit für Plasma aufweisen, eingesetzt. Silikon wies jedoch eine geringere Gastransferleistung als eine PP-Membran auf, weshalb die Oxygenatoren baulich größer wurden. Dies ging mit einem höheren Vorfüllvolumen, größerem extrakorporalem Blutvolumen sowie verstärkter Hämodilution einher. Die

Silikonmembran bot außerdem einen hohen Blutfluss-Widerstand mit dem Risiko einer Thrombusbildung in Oxygenatorbereichen geringerer Fließgeschwindigkeiten ⁸¹.

Im Rahmen der ECMO-Anwendung erwies sich schließlich die Diffusionsmembran aus PMP als die praktikabelste. Sie ist ebenfalls mikroporös, weist aber im Bereich der Blutgrenzfläche eine kontinuierliche PMP-Schicht auf, die sie plasmadicht und daher ideal für den Langzeiteinsatz beim ECMO-Patienten macht ^{50,81,91}. Sie vereint die Langlebigkeit der Silikonmembran mit der überlegenen Gasaustauschleistung von mikroporösen Hohlfaseroxygenatoren ^{70,81}.

Neben der Kontrolle mechanischer Komplikationen durch Veränderung des Membran-Kunststoffs lässt sich durch Modifikation der Beschichtung die inflammatorische Antwort und die notwendige systemische Antikoagulation reduzieren. Das Ziel der Beschichtung ist es, die antithrombogenen Eigenschaften des Endothels nachzuahmen. Als biomimetische Beschichtungen werden daher solche bezeichnet, die aus Heparin- oder Stickstoffmonoxid (NO) bestehen. Obwohl die NO-Beschichtung der Bildung von Thrombozytenaggregaten und Thrombin hervorragend entgegenwirkt, ist ihr Einsatz durch Auswaschung des NOs während des Langzeiteinsatzes limitiert ⁸⁹. Auch die Herstellung ist sehr aufwendig, da übliche thermische Verfahren nicht zum Einsatz kommen können.

Die Heparin-Beschichtung ist die klinisch relevanteste biomimetischen Variante. Ihre Wirkung auf verschiedene humorale und zelluläre Systeme während ECC wurde bereits intensiv erforscht. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass Heparin beschichtete PP-Membranen unter Verwendung einer *low-dose*-Heparin Antikoagulation zu verminderter Thrombozyten Adhäsion und Aktivierung an der Membran führen ⁸⁷. Der Haupteffekt dieser Beschichtung liegt vermutlich in der Antithrombin 3 (AT III) gekoppelten Inhibition von Thrombin ⁸⁷. Dennoch führt die Heparin-Beschichtung zu keiner Verminderung der Proteinadsorption und erhöht sogar die Ablagerung des adhäsionsfördernden Glykoproteins Fibronectin. Dieses scheint jedoch mit dem Heparin ein Konjugat zu bilden, das die Thrombozytenadhäsion vermindert ⁸⁷.

Auch die anti-inflammatorische Wirkung der Heparin-Beschichtung konnte während CPB erforscht werden. Bei der Anwendung kommt es zu einer verminderten Komplement- und Granulozytenaktivierung ^{8,42}. Da die Rolle einer Heparin-Beschichtung in der Entwicklung einer Heparin-induzierten-Thrombozytopenie (HIT) noch nicht bekannt ist, wird auf weitere Beschichtungsarten zurückgegriffen.

Die Hauptalternative zur Heparin-Beschichtung ist die biopassive Phosphorylcholin (PC)-Beschichtung. PC ist eine hydrophile Kopfgruppe von Phospholipiden der äußeren Zellmembran und besitzt antithrombogene zwitterionische Eigenschaften¹⁴⁰. Es wird davon ausgegangen, dass es durch PC zu einer Ansammlung von Phospholipiden auf der Fremdoberfläche kommt und somit eine antithrombogene Zellmembran-Imitation entsteht¹¹⁵. Es wurde gezeigt, dass durch PC-Beschichtung im Vergleich zu keiner Beschichtung eine verminderte Fibrinogenadsorption stattfindet¹⁸. In der Folge werden weniger Thrombozyten aktiviert und binden an der Membran. Außerdem vermindert die PC-Beschichtung während CPB das Risiko für post-operative Blutungen und kann bei operativem Einsatz der ECMO mit *low-dose* Heparin-Antikoagulation angewendet werden^{98,99}. Hinsichtlich der Biokompatibilität von Heparin- oder PC-beschichteten Systemen scheint es keinen Unterschied zu geben¹²⁷. Andere biopassive Beschichtungsmaterialien wie das Poly-2-methoxycethyl-Acrylat oder flüssigkeitsabweisende (omniphobe) Werkstoffe spielen in dem klinischen Alltag noch keine Rolle und befinden sich weitestgehend noch in der Erforschung⁸⁹.

Zukunftsweisende Ansätze beschäftigen sich mit der Endothelialisierung der verwendeten Materialien, um eine biologische, antithrombogene Oberfläche auf dem Fremdmaterial zu schaffen. Im Bereich der Herz- und Gefäßchirurgie gibt es bereits experimentelle Ansätze mit endothelialisierten synthetischen vaskulären Prothesen^{38,60}. Die Stabilität einer Endothelzellbeschichtung des Oxygenators während ECC ist ebenfalls Gegenstand aktueller Forschung^{62,93}. Da die Herstellung sehr zeit- und kostenaufwändig ist, ist eine breite Anwendung des Verfahrens noch nicht möglich⁸⁹.

1.6 Zelladhäsion auf ECMO-Membranen

Aufgrund der langen Betriebszeit der ECMO und der großen Interaktionsfläche kommt es während der Therapie zu Zellablagerungen auf der Oberfläche des MO. Butler *et al.*, 1993 vermuteten, dass die initiale Leukopenie während CPB durch eine Leukozyteninfiltration in der Lunge, die Hämodilution sowie eine Adsorption von Immunzellen am künstlichen Kreislauf zurückzuführen ist¹⁵. Um die Interaktion der zellulären Blutbestandteile mit der Membran des Oxygenators als mögliche Ursache für pro-inflammatorische Effekte während der ECMO zu erforschen, sind MO in verschiedenen Studien auf eine Zellbesiedlung hin untersucht worden. Lehle *et al.*, 2008 wiesen kernhaltige Zellen auf MOs von erwachsenen ECMO-Patienten nach, welche in

einem fibrösen, die einzelnen Hohlfaser-Kapillaren überspannenden Netzwerk eingelagert waren (Abbildung 1.6.1 [B])⁶⁷. Diese Strukturen sind elektronen- und lichtmikroskopisch nachweisbar und werden als Pseudomembran (PM) bezeichnet. Sie können die Dicke einer PMP-Hohlfasermembran annehmen und über die Verlängerung der Diffusionsstrecke den Gasaustausch kompromittieren (Abbildung 1.6.1 [A]). Eine Erhöhung des Flusswiderstands innerhalb des Oxygenators war nicht nachweisbar. Die adhärenen Zelltypen konnten zunächst nicht identifiziert werden. Zu einem späteren Zeitpunkt bestätigte sich die Vermutung, dass sich unter anderem multipotente Progenitorzellen auf der Membran ablageren⁶⁸. Die Adhäsion der Zellen wurde mit der vermehrten Ablagerung von Adhäsionsproteinen in Zusammenhang gebracht.

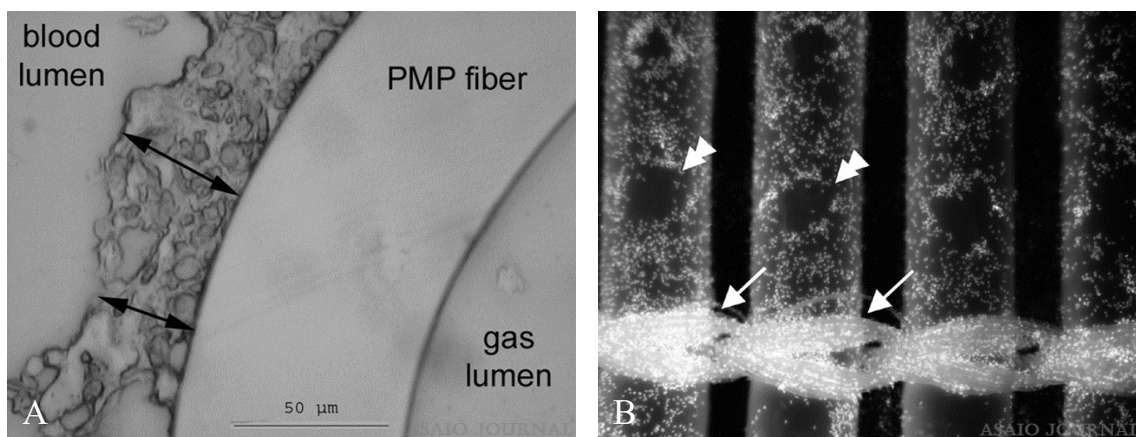


Abbildung 1.6.1 Mikroskopische Darstellungen der Zellablagerung auf Hohlfasermembranen eines MO nach ECMO. [A] Phasenkontrastmikroskopie einer PMP-Hohlfaser im Querschnitt mit einer 30-45µm dicken PM (schwarze Pfeile) [B] Fluoreszenzmikroskopische Übersichtsaufnahme (10x Vergrößerung) mehrerer quervernetzter PMP-Hohlfasern mit Kernfärbung (DAPI). Zu sehen sind Prädilektionsstellen zellulärer Ablagerungen (Pfeile: Verbindungskettffäden, Pfeilköpfe: Kontaktpunkte übereinanderliegender Hohlfasern). Entnommen von Lehle *et al.*, 2008⁶⁷.

Die Ablagerung thrombozytären Materials während ECMO wurde von Beely *et al.*, 2016 mithilfe elektronenmikroskopischer Analysen von MOs, die in einem traumaassoziierten ARDS-Schafmodell verwendet wurden, genauer untersucht⁶. Es wurde postuliert, dass die Elektronenmikroskopie mit nachfolgender Erfassung und Prüfung der Patientendaten in einem Datenbanksystem als Hilfsmittel zur Optimierung des systemischen Antikoagulationsmanagements während ECMO-Therapie dienen kann. Die generierten Daten bestätigten die vermehrte Thrombusbildung im Einlassbereich des Oxygenators⁹². Auch die von Lehle *et al.*, 2008 dargestellten Fibrinstränge mit eingelagerten Erythrozyten und Thrombozyten innerhalb der Thromben konnten nachgewiesen werden (Abbildung 1.6.2).

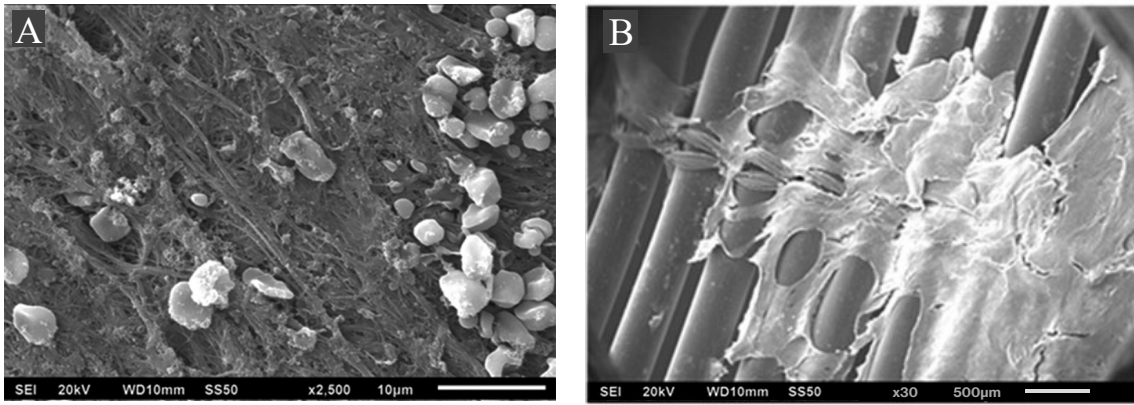


Abbildung 1.6.2 Elektronenmikroskopische Visualisierung thrombotischen Materials auf Hohlfasern von MO, die für 14 Stunden in einem traumassozierten ARDS-Schafmodell verwendet wurden. [A] Thrombozyten- und Erythrozyten-haltiger Thrombus im Einlassbereich des MO. [B] Thrombus auf PMP-Hohlfasern. Entnommen von Beely *et al.*, 2016 ⁶.

Lehle *et al.*, 2016 konnten bei erwachsenen Patienten mittels Trypsin-Verdau multipotente Progenitorzellen von PMP-Membranen nach ECMO-Therapie ablösen und kultivieren ⁶⁸. Diese Zellen hatten die Fähigkeit, sich zu endothelartigen und mesenchymartigen Zellen zu differenzieren. Die endothelartigen Zellen hatten Gemeinsamkeiten mit endothelialen Progenitorzellen (EPC). EPC stammen aus dem Knochenmark und sind nur in geringen Mengen im peripheren Blut vorhanden. Der Zelltypus konnte vermehrt bei Patienten mit ARDS und bakterieller Pneumonie im peripheren Blut nachgewiesen werden ¹³⁹. Es wird angenommen, dass die Rekrutierung von EPCs ins Blut zur Selbstheilung der Lunge während dieser Erkrankungen beiträgt und könnte auch während der ECMO-Therapie eine wichtige Rolle bei der Endothelialisierung des Fremdmaterials spielen ³⁹.

Um die adhärenierenden Zellen zu identifizieren und die klinische Relevanz des Auftretens von PMs während ECMO-Therapie zu prüfen, veröffentlichten Wilm *et al.*, 2018 eine Studie ¹³⁷. Zur Analyse der Zellbesiedlung erfolgte eine Kernfärbung und Immunofluoreszenzfärbungen zum Nachweis von Leukozyten, Endothelzellen und Thrombozyten. Es zeigte sich, dass eine adäquate Quantifizierung und Typisierung der adhärenierenden Zellen aufgrund der Hohlfaserform und einer starken Aggregation der Zellen in dicht besiedelten Bereichen mittels herkömmlicher Fluoreszenz-Mikroskopie nur erschwert möglich war. Die Zellablagerungen wurden hinsichtlich ihrer Zusammensetzung in Bereichen mit verstreuter Zellverteilung ausgewertet, um eine Differenzierung möglich zu machen. In den untersuchten Bereichen waren etwa 44% der Zellen CD45⁽⁺⁾ und somit Leukozyten. Eine von Lehle *et al.*, 2016 durchgeführte Studie zeigte sogar, dass annähernd 100% der vom MO abgelösten Zellen CD45⁽⁺⁾ waren ⁶⁸. Es

zeigte sich, dass <1% der dargestellten Zellpopulation Endothelzellen waren. Bei der Korrelation der Patientendaten mit den Erkenntnissen der mikroskopischen Untersuchung zeigte sich, dass PMs eher bei jüngeren Patienten mit höheren Prae-ECMO-Leukozytenzahlen auftraten. Das Vorhandensein von PMs hatte keinen negativen Effekt auf das Therapieergebnis der Patienten. Eine weitere Differenzierung der Leukozytenpopulation blieb aus.

Abschließend lässt sich zu dem bisherigen Forschungsstand der Adhäsion von kernhaltigen Zellen auf PMP-Oxygenatormembranen nach ECMO-Therapie zusammenfassen, dass die Zusammensetzung der abgelagerten Zellarten nicht abschließend geklärt ist. Den Effekt adhärierender Zellen auf den Behandlungsverlauf des Patienten gilt es ebenfalls zu erforschen. Eine Beteiligung an der systemischen inflammatorischen Reaktion während ECMO-Therapie ist denkbar.

1.7 Vorexperiment

Die im Vorexperiment verwendeten Immunofluoreszenzfarbstoffe und Antikörper sind in der verwendeten Verdünnung in Kapitel 2.1 gesondert aufgelistet.

Ein zunächst durchgeführtes Pilotexperiment sollte die Nachweisbarkeit von adhätierenden Zellen auf der PMP-ECMO-Membran durch die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie untersuchen. Dieses wurde durch die unterstützende Betreuerin Prof. Dr. Kerstin Troidl im Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung Bad Nauheim im Vorfeld dieser Arbeit durchgeführt. Hierfür konnte das MO-Modell Eurosets-*adult* aus einer anderweitig durchgeführten Zirkulationsstudie verwendet werden ¹²⁰. In dieser *ex vivo* Studie wurde ein ECMO-System mit 400 ml antikoaguliertem (15.000 IE Heparin) menschlichem Vollblut für 24 h mit einem Blutfluss von 3,65 l/min im geschlossenen Kreislauf betrieben. Nach Abschluss der Messung wurde das Set nicht mehr benötigt und stand für eine erste Untersuchung zur Verfügung.

Sofort nach Beendigung der Zirkulation wurde der Oxygenator nach dem Protokoll von Wilm *et al.*, 2018 gespült und fixiert (siehe 2.2.2) ¹³⁷. Als nächstes wurden 1 x 1 cm große Abschnitte der Membran aus dem Oxygenator gefärbt und anschließend mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop begutachtet. Um adhätierende kernhaltige Zellen auf der PMP-Membran nachzuweisen und einen Überblick über deren Lokalisation zu bekommen, wurde eine Kernfärbung (DAPI) sowie eine Aktinfilamentfärbung mittels Phalloidin durchgeführt. Zusätzlich wurde exemplarisch eine Immunofluoreszenzfärbung mit einem Antikörper gegen CD45 (Pan-Leukozytenmarker) durchgeführt, da aufgrund bisheriger Erkenntnisse vor allem Leukozyten auf der Membran zu erwarten waren.

Neben direkten Ablagerungen auf der PMP-Membran waren vermehrt Zellen auf den quervernetzenden Kettfäden zu erkennen. Die exemplarisch durchgeführte CD45-Färbung zeigte eine gut zu erkennende Membranfärbung adhätierender Leukozyten (Abbildung 1.7.1). Aufgrund der CD45-Negativität vieler Zellen lag die Vermutung nahe, dass weitere Zelltypen auf der ECMO-Membran adhätieren. Das Pilotexperiment zeigte, dass die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie zur Untersuchung der PMP-ECMO-Membranen einsetzbar ist und erbrachte Hinweise für eine vermehrte Ablagerung verschiedener Zelltypen an den quervernetzenden Kettfäden.

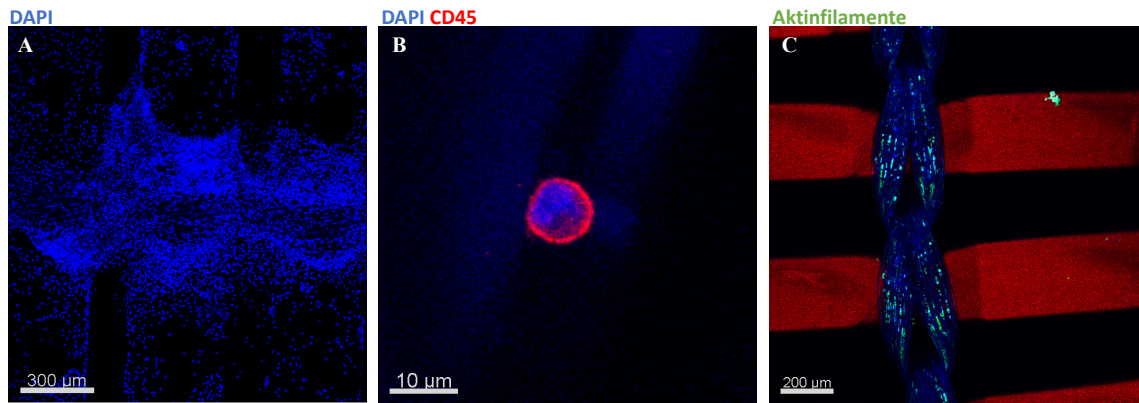


Abbildung 1.7.1 Konfokalmikroskopische Aufnahmen des Vorexperimentes. [A] In der Übersichtsaufnahme sind im Bereich der quervernetzenden Kettfäden massenhaft Zellkerne zu erkennen. [B] Darstellung eines CD45⁽⁺⁾ adhärierenden Leukozyten auf der PMP-ECMO-Membran. [C] Lokalisation von Zellen im Fadengewebe der Kettfäden mittels Aktinfilamentfärbung (Phalloidin-Tritic) mit roter Autofluoreszenz der Hohlfaserkapillaren.

1.8 Zielsetzung

Von allen bekannten Medizinprodukten bieten während der ECMO-Therapie verwendete MOs die größte Schnittfläche mit Patientenblut. Die Interaktion mit der MO-Oberfläche kann über die globale Aktivierung humoraler und zellulärer Immunsysteme zu einem komplikationsträchtigen SIRS führen.

Vor diesem Hintergrund ist die Erforschung der zellulären Interaktion mit der fremden PMP-Oxygenatormembran essentiell, um innovative Ansätze für die Aufklärung der systemischen inflammatorischen Antwort während der ECMO-Therapie aufzudecken.

Bisherige fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der Zellablagerungen auf PMP-ECMO-Membranen haben gezeigt, dass trotz gut etablierter Fixierungsprotokolle die Analyse adhätierender Zellverbände durch ihre Form und Verteilung erschwert ist. Hinzukommend mangelt es an zeitsparenden Analyseverfahren.

Ziel dieser Promotionsarbeit soll es daher sein, eine hochauflösende Methodik zur Analyse der adhätierenden kernhaltigen Zellen auf PMP-ECMO-Membranen mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie zu etablieren. Es soll der methodische Grundstein für einen schnellen, automatisierten und zuverlässigen Charakterisierungs- und Quantifizierungsprozess gelegt werden. Die so generierbaren Daten können in einer folgenden klinischen Studie durch die Korrelation mit klinischen Patientenparametern pathophysiologische Zusammenhänge aufdecken und wertvolle therapeutische Interventionsziele offenbaren.

Für die angefertigte Arbeit ergeben sich vier wesentliche Ziele:

1. Etablierung einer standardisierten Methode zur Untersuchung auf der Membran adhätierender Zellpopulationen mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie.
2. Etablierung automatisierter Verfahren zur Zellquantifizierung und -charakterisierung.
3. Nachweis von Prädilektionsstellen für erhöhte Zellablagerung in verschiedenen Oxygenatorbereichen.
4. Bestimmung der Anteile adhätierender Leukozyten, Makrophagen und endothelialer Zellen in Prädilektionsstellen verschiedener Oxygenatorbereiche.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Untersuchungsmaterial

Tabelle 2.1.1 Technische Daten verwendeter MOs (Herstellerangaben)

Oxygenator	Eurosets-<i>adult</i>	PLS-i (PLS-System)
Firma	Eurosets (Medolla, Italien)	Getinge (Göteborg, Schweden)
Vorfüllvolumen:	225 ml	585 ml (gesamtes System)
Blutflussrate	0,4-7,0 l/min	0,5-7,0 l/min
Gasaustauschfläche	1,81 m ²	1,8 m ²
Wärmeaustauschfläche	0,08 m ²	0,4 m ²
Gehäusematerial	Polycarbonate	Polycarbonate
Hohlfasermaterial	Polymethylpenten	Polymethylpenten
Beschichtung	Phosphorylcholin	Phosphorylcholin
Verwendete Pumpe	Revolution 5	Rotaflo
Firma	LivaNova (London, UK)	Getinge (s.o.)
Typ	Zentrifugalpumpe	Zentrifugalpumpe
Gehäusematerial	Polycarbonat	Polycarbonat
Verwendete Konsole	Stöckert SCPC	Rotaflo-Konsole
Firma	LivaNova (s.o.)	Getinge (s.o.)
Geschwindigkeit	0-3500 RPM	0-5000 RPM
Flussraten	0-10 l/min	0-9,9 l/min

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2.1.2 Liste von Verbrauchsmaterialien und ihren Herstellern

Modell	Firma
12 Well-Zellkultur-Platte	Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster, Österreich)
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One International GmbH (s.o.)
Objektträger-Menzelgläser /Superfrost plus	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Plastik-Einmalpipetten: 5 ml	Sarstedt (Nürnbrecht)
Zellstofftücher	Roth (Karlsruhe)
Petrischale 10 cm	Greiner Bio-One International GmbH (s.o.)
Einmalkalpelle Größe:10	B. Braun (Melsungen)
Pinzette Größe:7	Fine Science Tools GmbH (Heidelberg)
Reaktionsgefäße: 0,5 ml, 1,5 ml	Eppendorf Ag (Hamburg)
Handschuhe	B Braun (s.o.)
Abwurfgefäß	Sarstedt (Nürnbrecht)
Labor-Aluminiumfolie	Korff-AG (Oberbipp, Schweiz)
Flacon 50ml	Greiner Bio-One International GmbH (s.o.)
Glasbehälter für Spüllösung	Schott AG (Mainz)
Retransfusionsbeutel, 1000ml, steril	free life medical GmbH (Aachen)
Objektträger-Box	Heathrow Scientific (Vernon Hills, USA)
Schutzbrille	INFIELD Safety GmbH (Solingen)
FFP-2 Maske	3M (Saint Paul, USA)
Infektionsschutzkittel/Folitex® ISO 22612 /Klasse 3 / 3	B. Braun (s.o.)
Kopfhaut/Folitex® Astron	B. Braun (s.o.)
Type F Immersionliquid ISO 8036	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar)

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 2.1.3 Liste der verwendeten Chemikalien und ihrer Hersteller

Chemikalie	Hersteller
Paraformaldehyd (PFA)-Pulver	Merck KGaA (Darmstadt)
Mowiol-granuliert	Roth (Karlsruhe)
Sachcharose	Roth (s.o.)
BSA-Pulver	Roth (s.o.)
NaCl	Roth (s.o.)
Na₂HPO₄	Roth (s.o.)
K₂HPO₄	Roth (s.o.)
KH₂PO₄	Roth (s.o.)
KCl	Roth (s.o.)

2.1.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 2.1.4 Liste der verwendeten Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Komponenten
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	8,0 g NaCl 0,2 g KCl 1 l ddH ₂ O 1,42 g Na ₂ HPO ₄
Phosphatpuffer-(ECMO-Spüllösung)	16,36 g K ₂ HPO ₄ 23,10 g KH ₂ PO ₄ 1 l ddH ₂ O
4% PFA-Lösung PH:7,2	40 g PFA-Pulver 30 µl 10 m NaOH 1 l PBS
10% Saccharose- Lösung	100 g Saccharose 1 l Phosphatpuffer
20% Saccharose- Lösung	200 g Saccharose 1 l Phosphatpuffer
30% Saccharose- Lösung	300 g Saccharose 1 l Phosphatpuffer
2% Bovines-Serum-Albumin Lösung (BSA)	2 g BSA-Pulver 100 ml PBS-Puffer
0,9% Natriumchloridlösung	9 g NaCl 1 l ddH ₂ O

2.1.5 Immunofluoreszenzfärbung

Tabelle 2.1.5 Liste von Antikörpern, Fluoreszenzfarbstoffen und ihren Herstellern

Fluoreszenzfarbstoff	Firma	Verdünnung
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) <i>Art.Nr.: D1306</i>	Invitrogen (Carlsbad, USA)	1:1000
Phalloidin <i>Konjugation: Tritc</i> <i>Art.Nr.: P1951</i>	Sigma-Aldrich(St. Louis,USA)	1:333,33
Primärantikörper:	Firma	Verdünnung
Anti-CD68 Monoclonal Mouse - Antihuman <i>Clone: EBM11</i> <i>Art.Nr.: M0718</i>	Dako Products - Agilent (Santa Clara, USA)	1:100
Anti-CD31 Monoclonal Mouse - Antihuman <i>Clone: JC70A</i> <i>Art.Nr.: M0823</i>	Dako (s.o.)	1:100
Anti-CD45 Monoclonal Mouse – Antihuman <i>Clones: 2B11, PD7/26</i> <i>Art.Nr.: M0701</i>	Dako (s.o.)	1:100
Anti-MRC1 Polyclonal Rabbit - Antihuman <i>Clone: ab64693</i> <i>Art.Nr.: ab64693</i>	Abcam (Cambridge, UK)	1:100
Sekundärantikörper:	Firma	Verdünnung
Donkey–Anti-mouse IgG <i>Konjugation: Cy3</i> <i>Clone: AP 192C</i> <i>Art.Nr.: AP192C</i>	EMD Millipore Corp affiliate of Merck (Darmstadt)	1:300
Donkey–Anti-rabbit IgG <i>Konjugation: Cy3</i> <i>Clone: AP182C</i> <i>Art.Nr.: AP182C</i>	EMD Millipore Corp affiliate of Merck (s.o.)	1:300
Donkey–Anti-mouse IgG (H+L) <i>Konjugation: Biotin sp affini pure Polyclonal</i> <i>Art.Nr.: 715-065-151</i>	Jackson-Immuno-Research Laboratories, Inc.(West Grove, USA)	1:100
Labeling:	Firma	Verdünnung
Streptavidin Cy2 conjugated <i>Art.Nr.: S000-11</i>	Rockland Immunochemicals, Inc. (Gilbertsville, UK)	1:100

2.1.6 Geräte

Tabelle 2.1.6 Liste der verwendeten Geräte und deren Hersteller

Geräte	Firma
Pipetten	Eppendorf (Hamburg)
Vortex-Genie-1 Touch Mixer SI-0156	Scientific industries, Inc. (Bohemia, USA)
-80°C Kühltruhe	SKADI (Taichung, Taiwan)
Kühlschrank (GSV16 AW30)	Robert Bosch Hausgeräte GmbH (München)
SP5- konfokales Laser-Scanning-Mikroskop	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar)
Bechergläser	Schott AG (Mainz)
Glasbehälter für Spüllösungen	Schott AG (s.o.)
Metallsägebogen 300 mm	Toom (Köln)

2.1.7 Objektive

Tabelle 2.1.7 Liste der am Leica SP5 verwendeten Objektive

Objektiv	Vergrößerung/Apertur	Immersion	Firma
HCX PL APO	40x/1.25-0.75	Oil	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar)

2.1.8 Softwares

Tabelle 2.1.8 Liste der verwendeten Software und deren Hersteller

Software	Firma
Fiji	W.R. NIH (Maryland, USA)
Python 3.7	Python Software Foundation (Wilmington, USA)
Cellpose	Stringer <i>et al.</i> , 2020
OpSef	Rasse <i>et al.</i> , 2020
MS Office 365	Microsoft Deutschland GmbH (München)
GraphPad PRISM	GraphPad Software, Inc. (San Diego, USA)
LASAF	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar)

2.2 Methoden

2.2.1 Untersuchungsmaterial

Für die Untersuchungen wurden zwei Oxygenator-Modelle nach ihrem Einsatz am Patienten aufbereitet. Es handelt sich um den Maquet-PLS-i-Membranoxygenator (M-MO), der mit dem PLS-System (Getinge) verwendet wurde, und den Eurosets-*adult*-Membranoxygenator (E-MO) (Eurosets). Für weitere technische Informationen siehe Kapitel 2.1.1. Die beiden Modelle standen im Fokus, da sie die vornehmlich für die ECMO-Therapie beim Erwachsenen verwendeten MOs an der Kerckhoff-Klinik Bad Nauheim sind.

Die aufbereiteten MOs haben jeweils einen Patienten für mindestens 24 h im VA-Modus unterstützt. Die Antikoagulation während der Therapie erfolgte mit Heparin. Aus Gründen der Arbeitssicherheit wurde sichergestellt, dass bei den Patienten keine parenteral übertragbare Infektionskrankheit oder Sepsis vorlag. Für die Verwendung der Oxygenatoren war nach Rücksprache mit der Ethikkommission kein Ethikvotum notwendig, da es sich bei dem Untersuchungsmaterial um Ausschuss handelt, der entsorgt wird und keinem Patienten mehr zugeordnet werden kann. Über weitere Patientenparameter, den Behandlungsverlauf und das Therapieergebnis der Patienten lagen daher keine weiteren Kenntnisse vor.

2.2.2 Spülung und Fixierung der Oxygenatorproben

Um die an der Membran adhärierenden Zellen direkt nach Beendigung der ECMO-Therapie für die mikroskopische Untersuchung zu fixieren und nicht adhärierende Blutkomponenten aus dem System zu entfernen, wurden die untersuchten MOs nach ihrer Verwendung am Patienten entsprechend dem Fixierungsprotokoll von Wilm *et al.*, 2018 behandelt ¹³⁷.

Zuerst wurden die ECMO-Kanülen der zu- und abführenden Schläuche des ECMO-Systems abgetrennt. Danach wurde der ECMO-Aufbau mit 10 l physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) bei einem Fluss von 1 l/min durchgespült. Mit dieser Spülung wurden insbesondere Blutrückstände im Oxygenator entfernt, die nicht an der Membran adhären und die spätere Untersuchung erschweren würden. Die Lösung wurde nach dem Vorgang verworfen. Das System wurde mit 500 ml einer 4% PFA-Lösung gespült. Die Lösung wurde aufgrund ihrer Gesundheitsschädlichkeit

nach der Verwendung geschlossen in einem separaten Beutel aufgefangen. Dann erfolgte zur weiteren Zellfixierung eine Systemspülung für 30 min mit 500 ml 4% PFA-Lösung im *closed-loop-mode*. Dabei wurden die ehemals vom Patienten hin- und abführenden Schlauchteile miteinander verbunden, sodass die eingesetzte Lösung für die vorgegebene Zeit im System zirkulieren konnte. Nach Abschluss des Fixierungsvorgangs wurde die verwendete Lösung ebenfalls in erwähntem Beutel aufgefangen und im Sondermüll entsorgt.

Anschließend wurde das System mit 1,5 l Phosphatpuffer-Lösung gespült. Danach wurden abermals 1,5 l der Phosphatpuffer-Lösung für 30 min im System mittels *closed-loop-mode* zirkuliert, gefolgt von weiteren 30-minütigen Spülungen mit in ihrer Konzentration steigenden (500 ml, 10% / 20% / 30%) Saccharose-Lösungen.

2.2.3 Probenentnahme

Um die zu untersuchenden Hohlfaserkapillar-Matten aus ihrem Gehäuse entnehmen zu können, wurden die MOs nach dem Spül- und Fixierungsprozess in den Laborräumen mit einer Metallsäge zersägt. Je nach Oxygenator-Modell mussten unterschiedliche Herangehensweisen gewählt werden.

Der E-MO wurde entlang der Enden des Oxygenator-Mittelteils aufgesägt (Abbildung 2.2.1). Bei dem viereckigen M-MO wurde das Polycarbonat Gehäuse an vier Stellen entlang des Bereichs aufgesägt, in dem die Hohlfaserkapillaren in Harz befestigt sind. Aus den freigelegten Hohlfasermatten wurden für die spätere Untersuchung Proben entnommen. Hierzu wurden mit Skalpell und Pinzette jeweils drei etwa 4x4 cm große Präparate aus dem äußeren, dem mittleren und dem inneren Bereich der Oxygenatoren aserviert. Beim M-MO wurden die Proben des inneren Bereichs aus der vierten Lage des venösen Einstrombereichs des Membranstapels entnommen. Die Proben des mittleren Bereichs wurden aus der vorletzten Lage vor der gitterförmigen Plastikeinlage entnommen, die den gesamten Membranstapel in zwei gleich große Hälften teilt. Die äußeren Proben stammen aus der viertletzten Lage vor dem arteriellen Ausfluss des Oxygenators. Die Entnahme der E-MO-Proben geschah wie folgt: Die Proben der äußeren Seite wurden nach einmaligem Abwickeln der Hohlfasermatte entnommen. Die Proben aus dem mittleren Bereich wurden nach zehnmaligem Abwickeln entnommen. Proben des inneren Bereichs stammen aus der vorletzten Lage der Membranrolle.

Um das Ergebnis der Untersuchung nicht zu verfälschen, musste darauf geachtet werden, nicht den späteren Untersuchungsbereich zu manipulieren. Dafür wurden die viereckigen Membranstücke kurz hinter einem quervernetzenden Kettfaden abgeschnitten. Die überstehenden Hohlfasern wurden als Griffbereich verwendet. Die so gewonnenen Proben wurden vorsichtig in Alufolie verpackt und zur Lagerung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

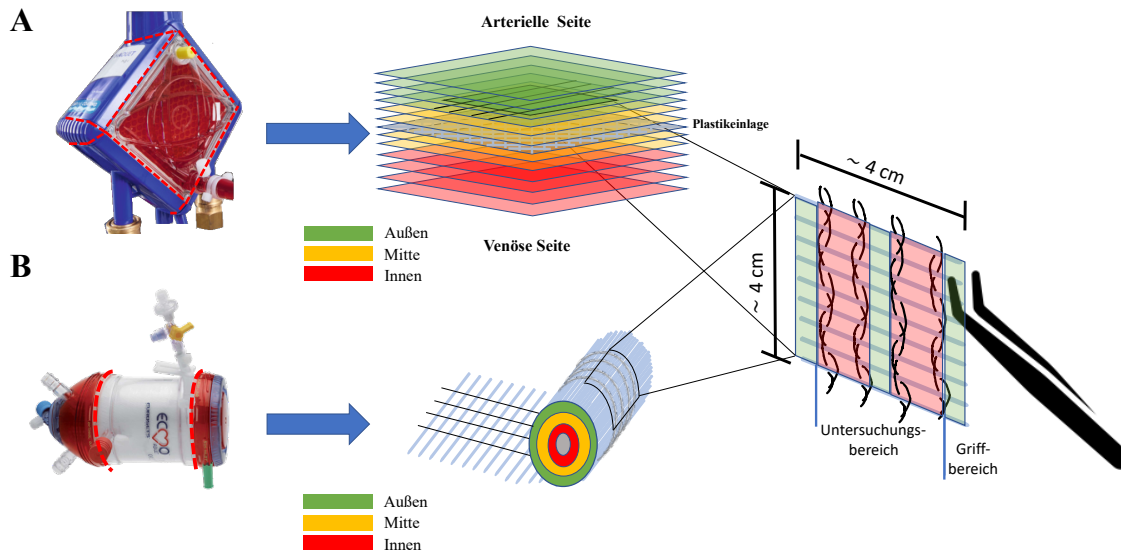


Abbildung 2.2.1 Schematische Darstellung der Probenentnahme aus dem äußeren Bereich der untersuchten Oxygenator-Modelle. [A] Der M-MO wurde an allen vier Seiten aufgesägt (rot gestrichelte Linie). [B] Der E-MO wurde an den Begrenzungen des Oxygenatormittelteils aufgesägt (rot gestrichelte Linie). Es wurden 4×4 cm große Membranstücke am Ende zweier Kettfäden (exemplarisch sind hier mehrere dargestellt) mit leichtem Überstand der Kapillaren abgeschnitten. Die überstehenden Kapillaren dienen als Griffbereich (grüne Fläche), um den Untersuchungsbereich (rote Fläche) zu schonen. Oxygenatorabbildungen (links) wurden mit Zustimmung der Firmen verwendet.

2.2.4 Zielantigene der Immunofluoreszenzfärbungen

Die Immunofluoreszenzfärbung wurde verwendet, um verschiedene auf der Membran adhärierende Zelltypen mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie zu identifizieren. An dieser Stelle sollen die Zielantigene der eingesetzten Primärantikörper und ihre Relevanz für die Untersuchungen kurz erläutert werden. Für genauere Informationen zu den verwendeten Primärantikörpern siehe Kapitel 2.1.5.

2.2.4.1 CD45 – Leukozyten

CD45 ist ein Transmembranprotein und wird auch als Protein-Tyrosin-Phosphatase Rezeptor Typ C oder *leukocyte common antigen* bezeichnet. Dieses Antigen besitzt fünf Isoformen (B, AB, BC, ABS, 0) und ist bis auf Plasmazellen und Erythrozyten auf allen Zellen hämatopoetischen Ursprungs zu finden ¹²⁹. Als Pan-Leukozytenmarker dient

CD45 dem Nachweis von Zellen der lymphoiden (naive-, aktivierte-, Gedächtnis-T-Zellen, B-Zellen) und myeloiden Reihe (Monozyten, Granulozyten), weshalb es in dieser Untersuchung als Membranmarker für abgelagerte Leukozyten genutzt wird. Die Expression des Antigens variiert zwischen den unterschiedlichen Leukozytentypen. Lymphozyten und Monozyten weisen eine starke Expression auf, Granulozyten und Vorläufer B-Zellen exprimieren das Antigen hingegen diffus ⁷⁵. Um das gesamte Isoformen-Spektrum abzudecken, wurde eine Primärantikörper-Kombination aus zwei Klonen verwendet, die mit allen bekannten Isoformen des CD45-Antigens interagieren.

2.2.4.2 CD68 - Makrophagen

Das als Macrosialin bezeichnete Antigen CD68 ist ein Zelltyp-Marker für Zellen der mononukleären phagozytotischen Zelllinie ²¹. Er wird somit klassischerweise auf Monozyten, Makrophagen, Mikroglia, Osteoklasten und dendritischen Zellen exprimiert. Macrosialin ist ein membranständiges Oberflächenprotein und stammt aus der Gruppe der *lysosomal associated membrane proteins* (LAMP). Auch wenn sich CD68 längst als ein wichtiger immunohistochemischer Marker etabliert hat, ist seine Funktion für Inflammation und Immunität noch unklar. Das Protein zeigte in einer Studie keine Beteiligung in der inflammatorischen Antwort gegen bakterielle und virale Pathogene ¹¹⁶. Aufgrund des enormen Interaktionspotentials zwischen PMP-ECMO-Membran und dem Patientenblut ist wie auf anderen implantierbaren Biomaterialien eine Ablagerung von mononukleären Zellen zu erwarten, weshalb CD68 in dieser Arbeit als Pan-Makrophagenmarker diente.

2.2.4.3 MRC-1 – M2-Makrophagen

Der Mannose-Rezeptor-C-Type-1 (MRC-1), oder CD206, ist ein Oberflächenprotein, das auf Makrophagen und unreifen dendritischen Zellen exprimiert wird ¹²². In seiner Funktion dient es diesen phagozytotischen Zelltypen als *pattern recognition receptor* (PRR). Des Weiteren ist MRC-1 ein nützlicher Marker, um die pro-inflammatorischen M1- von den anti-inflammatorischen M2-Makrophagen zu unterscheiden ⁷⁴. Letztere exprimieren MRC-1 weitaus stärker und sind an Gewebsumbauprozessen und Parasitenabwehr beteiligt. Die Markierung von MRC1⁽⁺⁾ und CD68⁽⁺⁾ Zellen wurde in dieser Untersuchung benutzt, um die Makrophagen-Polarisation (M1/M2-Makrophagen) auf der PMP-ECMO-Membran darzustellen.

2.2.4.4 CD31 – Endotheliale Zellen

Das Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül CD31 (PECAM-1) wird in hohem Maße im Bereich aneinander grenzender Endothelzellen exprimiert¹³⁸. Das Antigen findet sich neben diesem Zelltypus auch auf Thrombozyten und Leukozyten^{52,71}. Als Protein der Immunglobulin-Superfamilie vermittelt es die Leukozytentransmigration in entzündetes Gewebe und spielt eine kritische Rolle bei Prozessen der Gefäßthrombose und Angiogenese. In dieser Untersuchung wurde der Marker genutzt, um endotheliale Zellen nachzuweisen.

2.2.4.5 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) - Zellkernfärbung

Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI ist ein Zellkernmarker. DAPI interkaliert an AT-reichen Regionen der DNA in der kleinen Furche und ist in der Lage, intakte Zellmembranen zu durchdringen. Sein Absorptionsmaximum liegt im gebundenen Zustand bei 358 nm und sein Emissionsmaximum bei 461 nm. Der Farbstoff wurde bei allen Antikörperfärbungen zur Markierung der Zellkerne angewendet.

2.2.5 Durchführung der Immunfluoreszenzfärbungen

Im folgenden Abschnitt wird ein Überblick über die Durchführung der Immunfluoreszenzfärbungen gegeben. Für eine detaillierte Auflistung der Arbeitsschritte siehe Kapitel 10.1. Die Markierung der Antigene CD45, CD68 und CD31 wurde an Präparaten des äußeren, mittleren und inneren Bereichs beider Oxygenatoren durchgeführt. Die Färbung MRC-1⁽⁺⁾ u. CD68⁽⁺⁾ Zellen zur Darstellung der Makrophagen-Polarisation erfolgte exemplarisch an einem kleineren Probenanteil. Bei Arbeitsschritten, in denen direkte Fluoreszenzfarbstoffe oder Fluorophor-gekoppelte Sekundärantikörper zum Einsatz kamen, wurde lichtgeschützt gearbeitet, um ein Bleichen zu verhindern. Für genauere Informationen zu den verwendeten Primär- und Sekundärantikörpern siehe Kapitel 2.1.5.

2.2.5.1 Vorbereitung der Präparate

Zunächst wurden die 4x4 cm großen Hohlfasermatten-Proben aus der Tiefkühltruhe (-80 °C) entnommen. Im Labor wurden die Proben samt Alufolie in eine Petrischale verbracht, dort entpackt und bei Raumtemperatur (RT) für 30 min in 10 ml PFA 4% aufgetaut. Nach den 30 min wurden die Proben vorsichtig aus der Alufolie entnommen

und jeweils mit 20 ml PFA 4% für 20 min bei geschlossenem Deckel in beschrifteten Petrischalen nachfixiert. Beim Bewegen der Proben wurde auf die Griff- und Untersuchungsstellen der Kapillarmatten geachtet. Es folgte eine drei Mal zu wiederholende Spülung der Präparate mit jeweils 1 ml PBS für 5 min. Um keine Zellen abzuspülen, war darauf zu achten, die PBS-Lösung nicht direkt auf das Präparat zu pipettieren.

2.2.5.2 CD45, CD31, CD68 - Färbung

Nach dem Auftauen und Waschen der Proben wurde für jeden Oxygenator eine 12 Well-Platte mit 600 µl PBS pro Well befüllt. Die Präparate werden auf einem Schneidbrett mit einem Skalpell in etwa 1x1cm große Präparate zerschnitten und systematisch in der 12 Well-Platte platziert (Abbildung 2.2.2). Die so erzeugten Präparate bestehen aus dem begrenzenden Griffbereich, zwei Kettfäden und dem innerhalb liegenden Hohlfaserbereich. Aufgrund des unterschiedlichen Abstands zwischen den Kettfäden, der bei dem E-MO bei 1 cm liegt und bei dem M-MO 0,5 cm beträgt, haben die angefertigten Präparate differierende Größen.

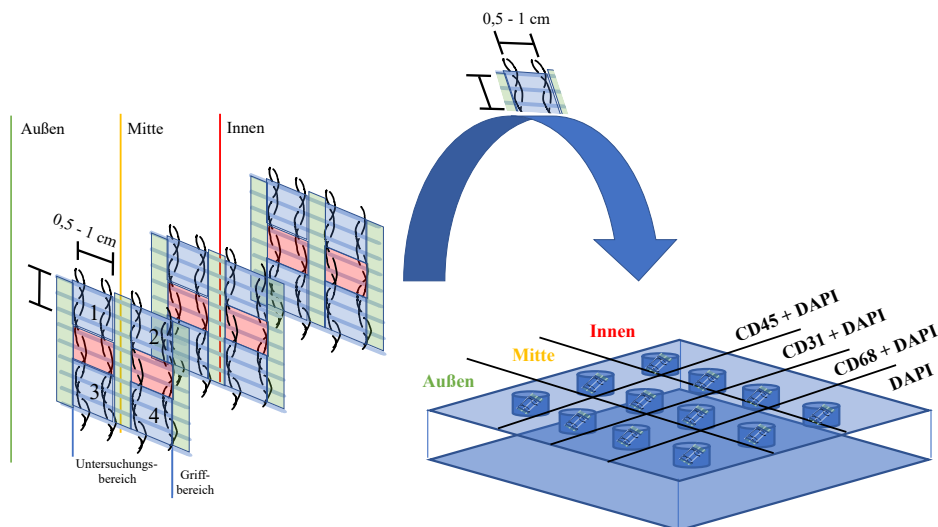


Abbildung 2.2.2 Verteilung der Proben auf die 12 Well-Platte. Die Hohlfasermatten aus den 3 Oxygenatorbereichen wurden in 4 etwa 1x1cm große Präparate zerschnitten. Jede Immunfluoreszenzfärbung wurde mit einer DAPI-Kernfärbung ergänzt. Als Negativkontrolle wurde pro Bereich zusätzlich eine einzelne DAPI-Färbung durchgeführt. Es werden für die drei Bereiche des Oxygenators bei je vier durchgeführten Färbungen insgesamt zwölf Präparate angefertigt.

Die folgenden Färbungsschritte wurden für jede Antikörperfärbung in dreifacher Ausführung entsprechend der drei untersuchten Bereiche (Innen, Mitte, Außen) durchgeführt. Zunächst wurden die verwendeten Primärantikörper mit PBS auf eine Konzentration von 1:100 verdünnt und mit dem Vortexer für 15 s vermischt. Pro Probe

wurden 600 µl der zugehörigen Primärantikörperlösung in das Well pipettiert und in einer feuchten Kammer im Kühlschrank bei 5 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde zunächst der Sekundärantikörper (*Esel anti Maus*, IgG, Cy3 konjugiert) mit PBS auf eine Konzentration von 1:300 verdünnt und mit dem Vortexer für 15 s vermischt. Nach dreimaliger schonender Waschung der Proben mit 1 ml PBS für jeweils 5 min wurden in jedes Well 600 µl der Sekundärantikörper-Lösung appliziert.

Die 12 Well-Platte wurde nun mit den applizierten Lösungen bei RT auf einer Rüttelplatte inkubiert. Die Inkubationszeit der Sekundärantikörper-Lösung betrug 2 h. Nach der Inkubationszeit wurden die Proben drei Mal für 5 min mit 1 ml PBS gewaschen, in eine feuchte Kammer gelegt und bei 5 °C über Nacht im Kühlschrank gelagert. Am folgenden Tag erfolgte zunächst die Zellkernfärbung aller Präparate mit DAPI. Dafür wurde der Fluoreszenzfarbstoff mit PBS auf eine Konzentration von 1:1000 verdünnt und 500 µl der Lösung in alle Wells pipettiert. Die Proben wurden mit der Färbung für 30 min bei RT inkubiert und danach drei Mal für 5 min mit 1 ml PBS gewaschen.

Im letzten Schritt wurden die Proben auf den Objektträger verbracht, um sie unter dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop untersuchen zu können. Hierfür wurden die Objektträger unter Zuhilfenahme einer Einmalpipette mit Moviol bestrichen und die Proben vorsichtig unter Berücksichtigung der Griff- und Untersuchungsbereiche auf den Moviolfilm in der Mitte des Objektträgers platziert. Die viereckigen Deckgläser wurden ebenfalls mit Moviol bestrichen und blasenfrei auf dem Präparat angebracht. Anschließend wurden die fertigen Proben zum Aushärten bei 5 °C im Kühlschrank gelagert.

2.2.5.3 Blockierung der Primärantikörperlösung

Bei diesem Versuch wurde exemplarisch der Einfluss einer Blockierung der Primärantikörperlösung mit bovinem Serumalbumin (BSA) getestet. Es wurde eine wie in Kapitel 2.2.5.2 beschriebene Immunfluoreszenzfärbung gegen das Antigen CD45 mit ergänzender Zellkernfärbung durch DAPI bei vier Präparaten aus dem inneren Bereich des M-MOs durchgeführt. Bei zwei Proben erfolgte die reguläre Färbung mit Primär- und Sekundärantikörper. Bei zwei weiteren Proben wurde die Verdünnung des Primärantikörpers anstatt mit PBS mit 2% BSA-Lösung durchgeführt.

2.2.5.4 Makrophagen-Polarisationsfärbung

Um die adhärierenden Makrophagen in ihrer Differenzierung als M1- oder M2-Makrophage darzustellen, wurde exemplarisch eine Makrophagen-Polarisationsfärbung angewendet.

Hierbei erfolgte an drei Präparaten des mittleren Bereiches des M-MOs eine simultane Markierung MRC-1⁽⁺⁾ und CD68⁽⁺⁾ Zellen. Die Färbungsschritte wurden lichtgeschützt in dreifacher Ausführung durchgeführt. Zusätzlich wurde eine Negativ-Kontrolle angefertigt, bei der lediglich die Sekundärantikörper appliziert wurden.

Zuerst wurde die Primärantikörperlösung gegen MRC-1 hergestellt. Hierfür wurde der Primärantikörper mit PBS auf eine Konzentration von 1:100 verdünnt und mittels Vortexer für 15 s gemischt. Danach wurden jeweils 600 µl die Primärantikörperlösung unter Aussparung der Negativ-Kontrolle zu den jeweiligen Proben pipettiert. Die Proben wurden mit der Lösung über Nacht (ca. 12 h) bei 5 °C in einer feuchten Kammer im Kühlschrank inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Sekundärantikörperlösung gegen den MRC-1 Primärantikörper vorbereitet. Der Sekundärantikörper (*Esel anti Kaninchen*, IgG, Cy3 konjugiert) wurde mit PBS auf eine Konzentration von 1:300 verdünnt. Nachdem die Proben drei Mal für 5 min mit 1 ml PBS gewaschen wurden, wurden jeweils 600 µl der Lösung in alle Wells einschließlich der Negativ-Kontrolle pipettiert. Nach zweistündiger Probeninkubation auf einer Rüttelplatte bei RT wurde der Waschvorgang mit PBS wiederholt. Anschließend wurde der Primärantikörper gegen CD68 mit PBS auf eine Konzentration von 1:100 verdünnt und für 15 s mit dem Vortexer vermischt. 600 µl der Primärantikörperlösung wurde auf alle Proben bis auf die Negativ-Kontrolle gegeben. Die Proben wurden über Nacht (ca. 12 h) bei 5 °C in der feuchten Kammer im Kühlschrank inkubiert.

Am nächsten Tag wurde ein Sekundärantikörper (*Esel anti Maus*, IgG, Biotin konjugiert) gegen den CD68 Primärantikörper vorbereitet (Verdünnung 1:100). Nach Wiederholung des PBS Waschvorgangs wurden jeweils 250 µl der Sekundärantikörperlösung auf alle Wells einschließlich der Negativ-Kontrolle gegeben. Nach erneuter zweistündiger Inkubation auf der Rüttelplatte bei RT wurden die Proben abermals gewaschen. Als Fluorophormarker für den Sekundärantikörper wurde Cy2 konjugiertes Streptavidin verwendet. Dieses wurde mit PBS auf 1:100 verdünnt und dann ebenfalls 250 µl der Lösung in jedes Well einschließlich der Negativ-Kontrolle pipettiert. Nach zweistündiger Inkubation bei RT erfolgte die Zellkernfärbung mittels DAPI und die Probeneinbettung.

2.2.6 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

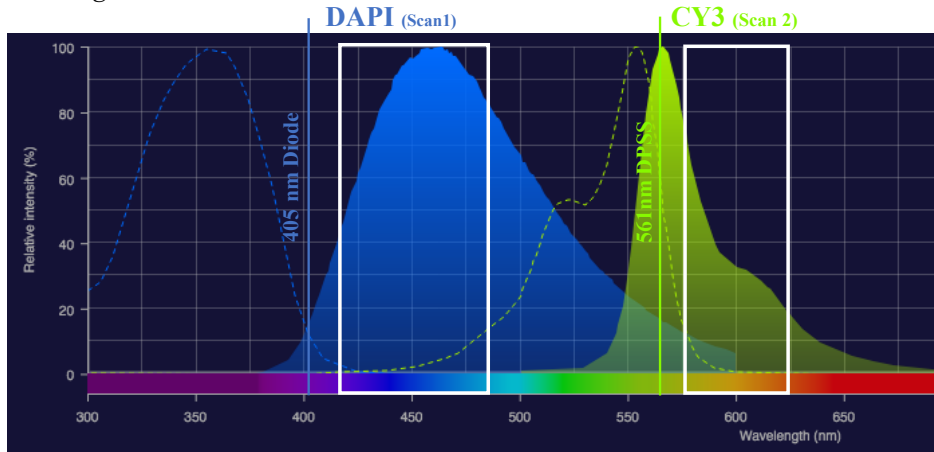
2.2.6.1 Technische Überlegungen

Zur Darstellung der Zellbesiedlung auf der PMP-ECMO-Membran wurde die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie verwendet. Das Vorexperiment ergab Hinweise auf Zellablagerungen an den quervernetzenden Kettfäden und auf den PMP-Gaskapillaren. Eine Untersuchung mit dem herkömmlichen Fluoreszenzmikroskop ist aufgrund der Hohlfaserkrümmung und der Einlagerung von Zellen im quervernetzenden Fadengewebe erschwert, weshalb Bedarf für eine höhere räumliche Auflösung bestand.

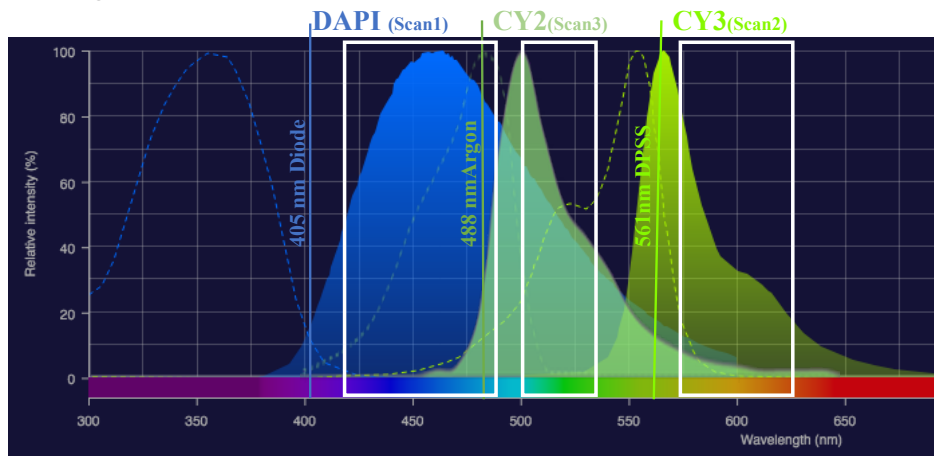
Bei dieser Arbeit wurde das invertierte konfokale Laser-Scanning-Mikroskop Leica SP5 verwendet. Die konfokale Technik hatte die folgenden Vorteile:

Durch die im Strahlengang eingebrachte Lochblende (*pinhole*) und den in der Z-Achse bewegbaren Objektiv-Kopf ließen sich einzelne Schnittebenen des Präparates definiert abbilden. Durch Abfahren mehrerer Ebenen im Präparat konnte ein vorgegebenes Scan-Volumen aufgenommen und somit räumlich verteilte Strukturen dargestellt werden. Bei der Aufnahme einer Ebene wird dabei der gesamte Bildausschnitt von einem punktförmigen Laserstrahl mit definierter Wellenlänge abgefahren. Während dieses Vorganges werden zu jedem Zeitpunkt immer nur die Fluorophore angeregt, deren Exzitationsspektren von der eingesetzten Laser-Wellenlänge abgedeckt werden (Abbildung 2.2.3). Ihre Emission wird nach Filterung im Detektor des Mikroskops gemessen. Die Bildpunktsignale der gesamten Ebene werden anschließend zu einem Bild rekonstruiert. Dies ermöglicht eine punktgenaue Auflösung des untersuchten Bildausschnitts. Des Weiteren kann bei gleichzeitiger Verwendung von mehreren Fluorophoren der Bildausschnitt sequentiell mit unterschiedlichen Lasern und Emissionsfiltern gescannt werden. Diese Technik reduziert unspezifische Signale, die bei gleichzeitigem Einsatz mehrerer Laser aufgrund des Überlappens von Emissions- und Exzitationsspektren verschiedener Fluorophore zustande kommen können. In Tabelle 2.2.1 sind die, für die einzelnen Experimente angewendeten technischen Parameter des Mikroskops aufgelistet und veranschaulicht.

Färbung CD45, CD31, CD68



Färbung: CD68, MRC1



--- Exzitatorspektrum Emissionsspektrum
||| Exzitatorlaser Emissionsfilter

Abbildung 2.2.3 Veranschaulichung der Fluorophore, ihrer Exzitator- und Emissionsspektren, der eingesetzten Lichtquellen und Emissionsfilter im jeweiligen Experiment. Die Fluorophore unterscheiden sich in ihren Exzitator- und Emissionsspektren. Sie können somit durch verschiedene Laser getrennt angeregt und durch korrekte Einstellung des Emissionsfilters einzeln registriert werden. Mit Genehmigung entnommen und modifiziert aus: Thermofisher – Fluorescence SpectraViewer ¹²⁶.

Tabelle 2.2.1 Auflistung der Fluorophore, ihrer Exzitator- und Emissionsspektren, der eingesetzten Lichtquellen und Emissionsfilter im jeweiligen Experiment.

Markierte Strukturen	Fluorophor	Ex.-Max.	Em.-Max.	Lichtquelle	Emissionsfilter	Detektor
<i>CD45, CD68, CD31-Färbung</i>						
CD45, CD31, CD68	Cy 3	554 nm	568 nm	DPSS 561nm	575 – 625 nm	PMT2
Zellkern	DAPI	358 nm	461 nm	Diode 405nm	420 – 485 nm	PMT1
<i>Makrophagen-Polarisation</i>						
CD68	Cy 2	489 nm	506 nm	Argon 488nm	500 - 530 nm	PMT2
MRC-1	Cy 3	554 nm	568 nm	DPSS 561nm	575 – 625 nm	PMT2
Zellkern	DAPI	358 nm	461 nm	Diode 405nm	420 – 485 nm	PMT1

* PMT=Photomultipliertube, Ex.-Max.= Exzitatormaximum, Em.-Max.= Emissionsmaximum, DPSS= Diode pumped solide state

2.2.6.2 Durchführung der Mikroskopie

Eine genauere Beschreibung der verwendeten Objektive und Materialien findet sich in Kapitel 2.1. Die ECMO-Membranen wurden mit dem Konfokal-Mikroskop nach einer standardisierten Vorgehensweise untersucht, um auf den Präparaten Stellen mit vermehrter Zellablagerung zu erfassen. Nach Auftragen der Immersionsflüssigkeit wurden die Präparate zunächst unter 40-facher Vergrößerung mittels Epifluoreszenz-Mikroskopie begutachtet. Bei dieser konnten einzelne Fluorophore nach Einstellen eines gewünschten Filtersets angeregt und dargestellt werden. Als Lichtquelle diente dabei eine Quecksilberlampe, deren Licht über eine Blende in den Strahlengang des Mikroskops eingespeist werden kann. Das Licht trifft hierbei zunächst auf einen Exzitationsfilter, der den für das jeweilige Fluorophor gewünschten Wellenlängenbereich zur Anregung passieren lässt. Über einen dichroitischen Spiegel wird das Anregungslicht durch das Objektiv auf das Präparat gelenkt. Das Emissionslicht des Fluorophors kann dann nach Fokussierung durch das Objektiv, Passage des dichroitischen Spiegels und eines weiteren Emissionsfilters über das Binokular sichtbar gemacht werden. Zu Beginn der Untersuchung eines jeden Präparates wurde ein Bereich mit Zellanhaftungen fokussiert und die Qualität der Immunfluoreszenzfärbung durch Wechsel zwischen den Filtersets geprüft (siehe Tabelle 2.2.2).

Tabelle 2.2.2 Auflistung der Filtersets, die bei der Epifluoreszenz-Mikroskopie verwendet wurden.

Fluorophor	Exzitationsfilter	Strahlenteiler	Emissionsfilter	Firma
Cy 2	BP 470/40 nm	500	BP 525/50	Leica
Cy 3	BP 545/30 nm	565	BP 610 /75	Leica
DAPI	BP360/40 nm	400	BP 470/40	Leica

*BP=Bandpass

Als nächstes wurde der Untersuchungsbereich des gesamten Präparates rasterförmig mit dem DAPI-Filterset abgefahren und nach vermehrten Zellablagerungen im Bereich der quervernetzenden Kettfäden und auf den Hohlfasern gesucht (Abbildung 2.2.4). Es wurden jeweils fünf für den gesamten Membranabschnitt repräsentative Stellen auf Kettfäden und Hohlfasern festgelegt. Die Auswahl erfolgte anhand wiederkehrender Morphologiemuster der Zellablagerungen und derer durchschnittlichen Zelldichte.

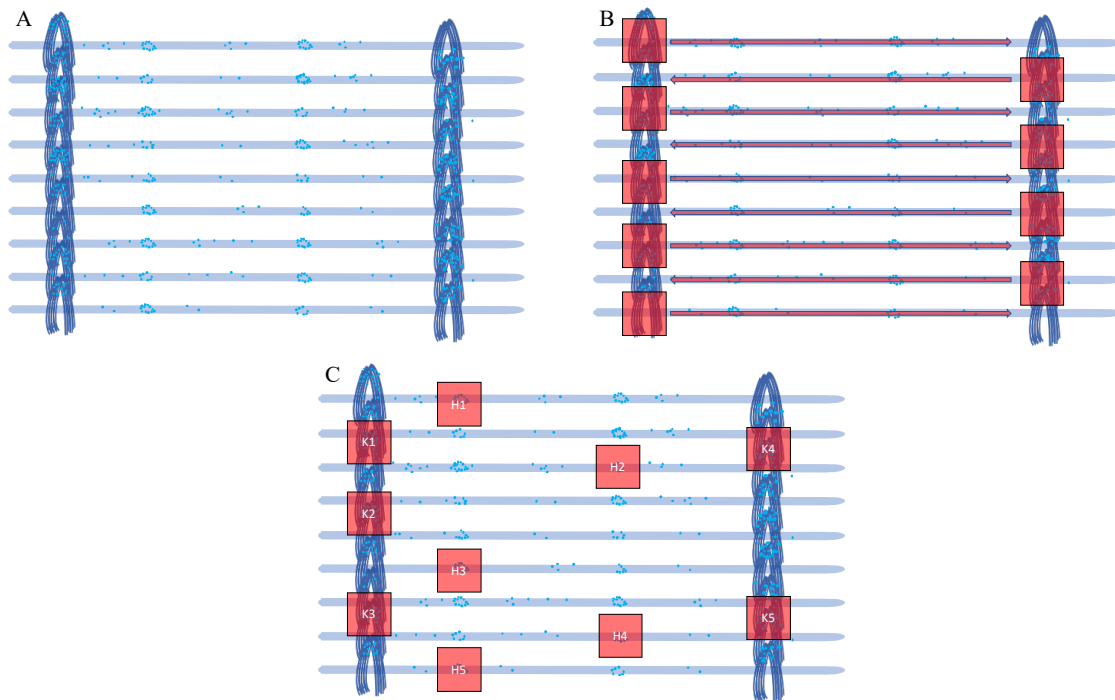


Abbildung 2.2.4 Vorgehensweise bei der Epifluoreszenz-Mikroskopie. [A] Die Abbildung zeigt eine präparierte Hohlfasermatte mit Zellhaftungen (blaue Punkte) in der Übersicht. [B] Die gesamte Hohlfasermatte wurde mit 40-facher Vergrößerung in der Epifluoreszenz-Mikroskopie abgerastert (rote Vierecke: Bildausschnitte / rote Pfeile: Rasterbewegung). [C] Es wurden jeweils fünf repräsentative Stellen auf den Kettfäden (K1-K5) und den Hohlfasern (H1-H5) mit vermehrter Zellablagerung zur weiteren konfokalen Mikroskopie festgelegt.

Die ausgesuchten Stellen wurden anschließend hochauflösend mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht. Dazu wurden die einzelnen Stellen erneut in der Epifluoreszenz-Ansicht aufgesucht und zentral im Bild fokussiert. Dann erfolgte der Wechsel auf das konfokale System. Zur Darstellung der abgelagerten Zellkerne wurde die Scan-Einstellung des DAPI-Kanals und der Live-Modus ausgewählt. Dann wurde jede Ablagerung in ihrer gesamten räumlichen Ausdehnung entlang der Z-Achse abgefahren, um die Ober- und Untergrenze des anschließenden Scans festzulegen. Beim Scan fuhr das konfokale System das abgesteckte Volumen automatisch in der Z-Achse ab und nahm zehn einzelne Z-Ebenen in gleichgroßen Abständen auf (siehe Abbildung 2.2.5).

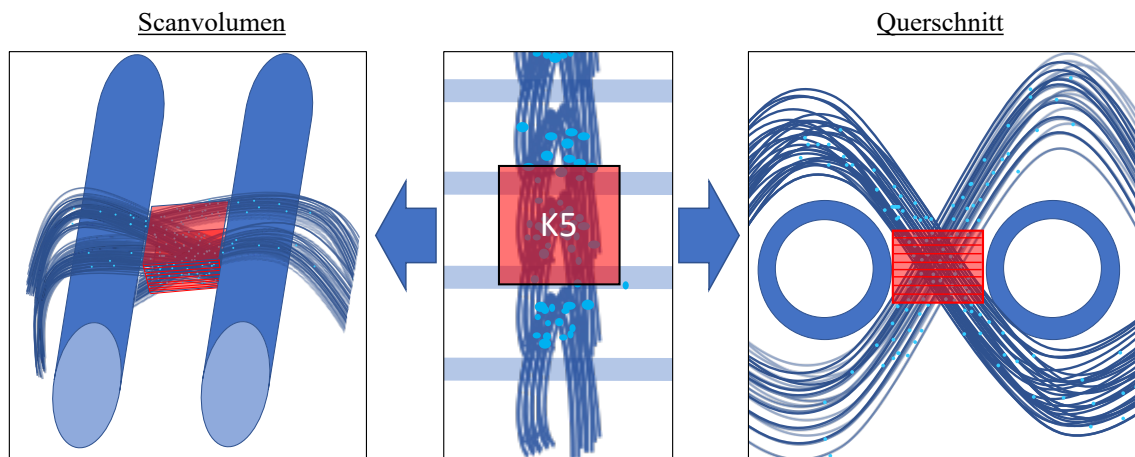


Abbildung 2.2.5 Schematische Darstellung des konfokalen Scans einer Prädilektionsstelle an den quervernetzenden Kettfäden. Links im Bild ist eine dreidimensionale Ansicht des festgelegten Scanvolumens für die zu untersuchende Stelle dargestellt. Rechts sind die einzelnen Scanebenen im Querschnitt zu erkennen. Es wurden jeweils 10 Z-Scans mit einer maximalen Gesamthöhe von 100 μm aufgenommen.

Für die Festlegung der Volumenhöhe war folgende Überlegung hinsichtlich der auf der Membran zu erwartenden Zellen und ihrer Zellkerngrößen entscheidend: Lymphozyten gehören mit einer durchschnittlichen Größe von 7-15 μm und einem Nukleus zu Zytoplasma-Verhältnis (N:C-Verhältnis) von 5:1 bis 2:1 zu den kleinsten im Blut zirkulierenden kernhaltigen Zellen¹²⁵. Mit einer durchschnittlichen Zellgröße von 12-20 μm (N:C-Verhältnis = 4:1-2:1) zählen Monozyten hingegen zu den größten kernhaltigen Zellen des peripheren Blutes. Hieraus ergibt sich auf der Membran ein zu erwartender Zellkerngrößenbereich von 5–16 μm mit einer durchschnittlichen Zellkerngröße von 10 μm . Unter der Annahme einer homogenen Zellverteilung innerhalb der Prädilektionsstellen wurde eine Scan-Höhen-Maximalgrenze von 100 μm und einem damit einhergehenden Maximalabstand von 10 μm zwischen den einzelnen Scanebenen angestrebt. Diese Grenze ist der Kompromiss zwischen einer repräsentativen Darstellung der Prädilektionsstellen, in der nicht zu viele Zellkerne außerhalb der zehn Scan-Ebenen liegen, und einer praktikablen Datenmenge. Bei der Aufnahme der Z-Ebenen wird wie in Kapitel 2.2.6.1 erwähnt jeder Bildausschnitt mit den verschiedenen Laser- und Detektoreinstellungen sequentiell abgescannt, um für jeden einzelnen Bildpunkt die Emission der eingesetzten Fluorophore nacheinander am Detektor registrieren zu können. Des Weiteren müssen bei der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie Verstärkungs(*gain*)- und Hintergrund-Verrechnungs(*offset*)-Werte eingestellt werden. Die Verstärkung wurde so gewählt, dass einerseits die einzelnen Bildpunkte nicht übersättigt sind und andererseits alle nötigen Strukturen abgebildet werden. Mit Einstellung des *offset*-Wertes wurde das Hintergrundrauschen reduziert, um ein

definiertes Bild zu erhalten. Um für jedes Präparat die optimale Darstellung zu erreichen, wurden die Werte nicht einheitlich festgelegt, sondern individuell über eine Übersicht (*look-up-table*) im Leica LAS AF Programm eingestellt. Die Bedienung des Mikroskops und die Darstellung der Bilder während der Scans wurden mit der Software Leica LAS AF bewerkstelligt. Die angefertigten Bildsequenzen wurden als *.lif*-Datei gespeichert. Weitere Informationen zu diesem Rohdatenformat finden sich unter Kapitel 10.2.

2.2.7 Gesamtzellzahl-Quantifizierung

Um die Anzahl adhärerender Zellen auf den Bildsequenzen zu quantifizieren, wurden die im DAPI-Kanal sichtbaren Zellkerne ausgezählt. Mit Blick auf klinische Studien in diesem Gebiet wurde eine zeitsparende, Algorithmen-gestützte Zellzahlquantifizierung angestrebt. Nachfolgend werden verschiedene Begriffe für die Projektionsformen der Bildsequenzen verwendet. Diese werden in Kapitel 10.2 gesondert erklärt.

2.2.7.1 Image-J-particle-analyzer-Makro

Um die Zellzahl automatisch quantifizieren zu können, wurde zunächst in dem Bildbearbeitungsprogramm Image-J eigenständig ein Makro programmiert. Dieses ist in der Image-J-Makro Skriptsprache verfasst und beinhaltet einen Befehlsablauf. Wird das Makro gestartet, werden die Befehle nacheinander an jedem Objekt des Eingabematerials durchgeführt. Das Makro ist in der Abbildung 2.2.6 als Pfeildiagramm dargestellt und in ihrer Originalform im Anhang einsehbar (siehe Kapitel 10.3).

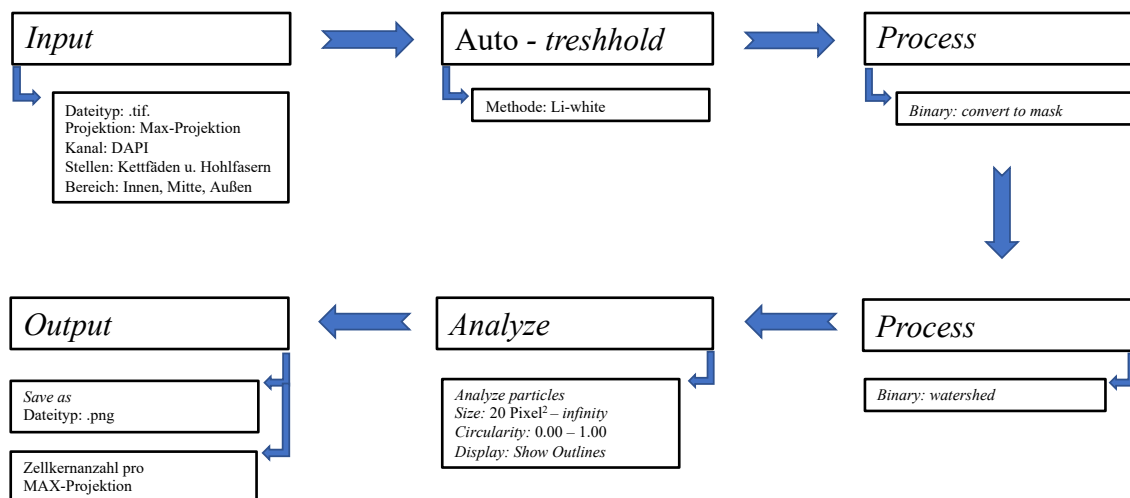


Abbildung 2.2.6 Befehlsfolge im Image-J-particle-analyzer-Makro. Nach Auswahl des Input-Ordners wird das automatische Schwellwertbestimmungsverfahren nach *Li-white* angewendet und das Bild binär konvertiert. Nach Anwenden der *watershed*-Methode werden die Zellkerne über die *analyze-particles*-Funktion ausgezählt. Die erstellten Auszählungsbilder werden im Output-Ordner gespeichert und die Zellkernzahlen pro Bild in einer Tabelle angezeigt.

Vor Starten des Makros wurden die Einzelebenen der auszuzählenden Bildsequenzen jeweils zur Max-Projektion addiert und im Input-Ordner abgespeichert. Dieser dient dem Makro als Ausgangspunkt. Das heißt jede in dem Ordner enthaltene Max-Projektion wurde entsprechend der nachfolgend beschriebenen Schritte bearbeitet.

In den ersten beiden Schritten wurde auf die Bilder eine automatische Schwellwertbestimmung nach der *Li-white*-Methode angewendet⁷³. Dabei wird über einen Algorithmus ein Schwellwert für die Pixelintensität festgelegt, um Hintergrundrauschen sowie Artefakte aus dem Bild zu entfernen und die eigentlichen Zellkernstrukturen hervorzuheben. So werden Pixel mit einem Intensitätswert unterhalb des Schwellwertes weiß und Pixel mit einem Wert oberhalb des Schwellwertes schwarz dargestellt. Das *Li-white*-Verfahren zeigte im Vergleich zu anderen in Image-J verfügbaren automatischen Schwellwertbestimmungsverfahren für die weitere Analyse das beste Ergebnis (Abbildung 2.2.7).

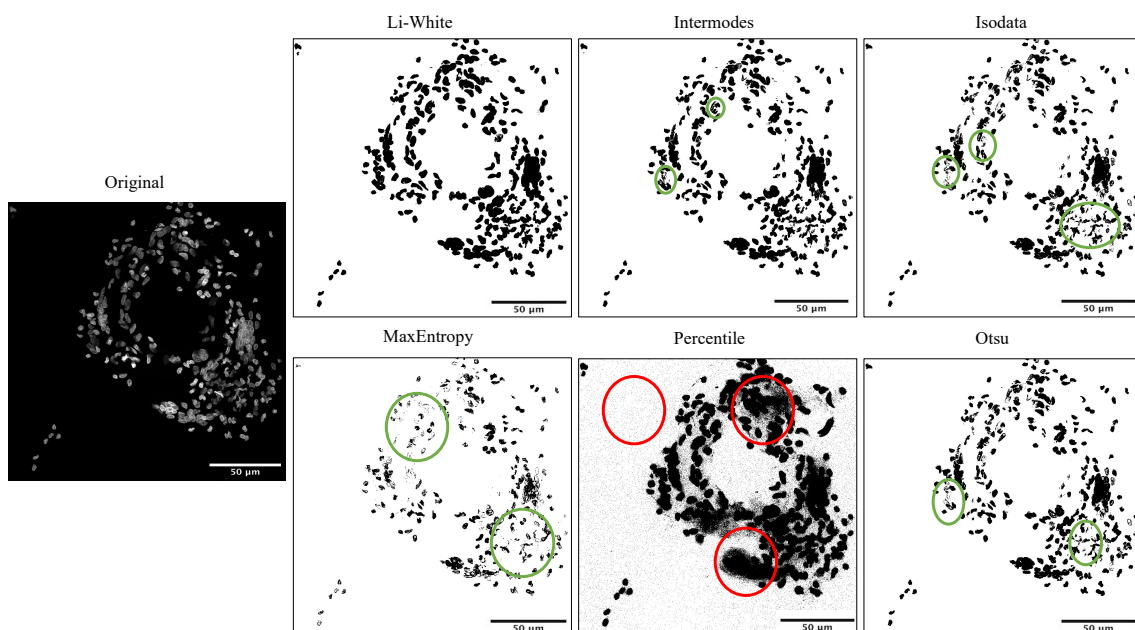


Abbildung 2.2.7 Vergleich verschiedener *Auto-threshold*-Verfahren in Image-J. Mit roten Kreisen sind Strukturen markiert, die zu stark zur Abbildung kommen, bzw. die Ergebnisse der Auszählung verfälschen können. Mit grünen Kreisen wurden unzureichend dargestellte Strukturen markiert.

Da Zellkerne in Bereichen erhöhter Zellkerndichte über die binäre Darstellung schwerer voneinander abzugrenzen sind, wurde im nächsten Schritt das *watershed*-Werkzeug eingesetzt (Abbildung 2.2.8). Dieses wird verwendet, um eine Grenze zwischen zwei sich berührenden Objekten zu ziehen. Hierbei werden über ein morphologisches Verfahren die Zentralpunkte der dargestellten Objekte ermittelt. Danach wird eine Punktentfernungskarte von den Zentralpunkten zu den Kanten der Objekte berechnet, die

auch als *euclidean distance map* (EDM) bezeichnet wird. Anschließend wird diese topografische Karte virtuell geflutet. Überall dort, wo sich zwei Wasserscheiden treffen, nimmt die Methode zwei aneinandergrenzende Zellkerne an und zieht eine Trennlinie.

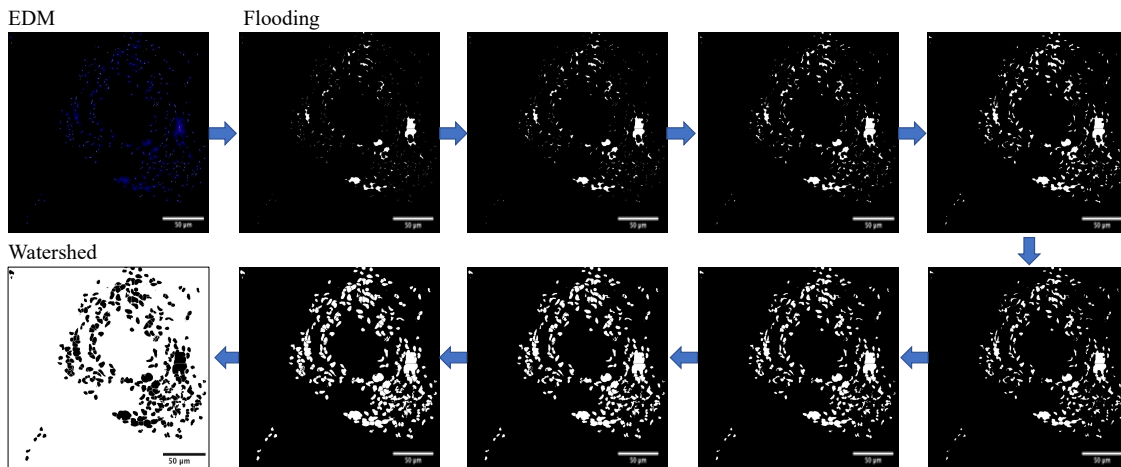


Abbildung 2.2.8 Darstellung der Verarbeitungsschritte bei Anwendung der *watershed*-Technik. Zunächst wird die EDM erstellt und virtuell geflutet. An Berührungspunkten von zwei Wasserscheiden wird eine Trennlinie gezogen, um angrenzende Zellkerne voneinander zu trennen.

Der entscheidende und letzte Schritt des Makros war die Auszählung der Zellkerne über die *analyze-particles*-Funktion. Diese Funktion kann Objekte in binären Bildern markieren und auszählen. Dabei scannt sie das Bild bis sie die Kante eines Objektes erkennt. Im nächsten Schritt wird die Objektgrenze umrissen und die Fläche gemessen. Die Schritte werden so lange wiederholt bis das gesamte Bild abgescannt ist. Zur gezielten Auszählung können in der Funktion einige Parameter der zu erkennenden Objekte voreingestellt werden. Die Mindestgröße der auszählenden Objekte wurde mit 20 Pixel^2 angegeben. Die Rundheit (*circularity*) der zu erkennenden Objekte wurde aufgrund der verschiedenen Zellkernformen mit 0 - 1 angegeben. Nach Ausführung der Funktion wird das Ergebnis als Ausgabe (Output) angezeigt. Dieses besteht aus einer Ergebnistabelle, in der die ausgezählten Zellkernzahlen für jedes Bild einsehbar sind, und einer Übersichtszeichnung mit Darstellung der Objektumrisse, die als *.png* im Ausgabe-Ordner gespeichert wird (Abbildung 2.2.9). Die Ausgabe des *Image-J-particle-analyzer*-Makros wurde anschließend visuell begutachtet und mit der manuellen Auszählung der Bilder als Referenz verglichen.

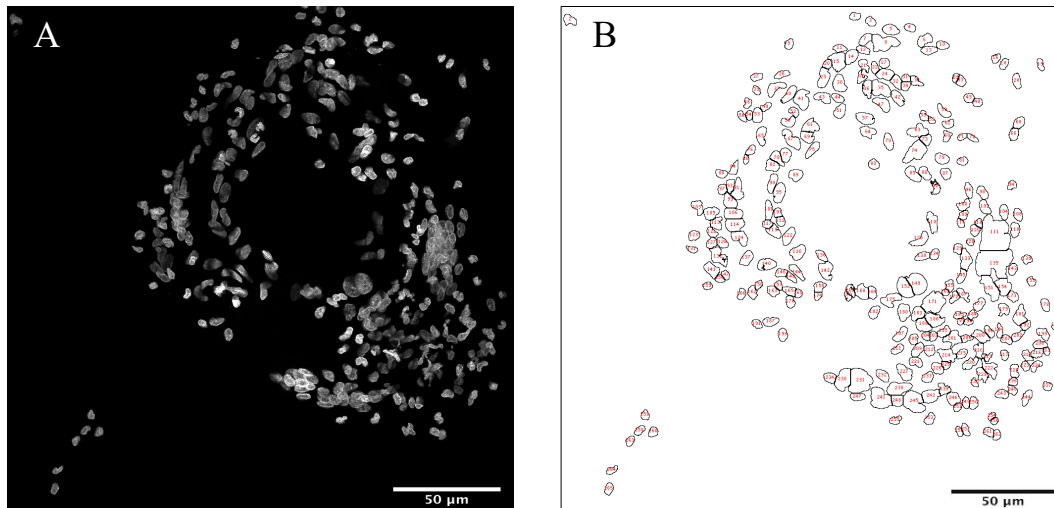


Abbildung 2.2.9 Darstellung des Outputs des Image-J-particle-analyzer-Makros. [A] Z-Scan einer Hohlfaser-Prädilektionsstelle in der Max-Projektion. [B] Darstellung der Umrisse erkannter Objekte mit fortlaufender Nummerierung nach Prozessierung durch das Image-J-particle-analyzer-Makro.

2.2.7.2 Quantifizierung über neuronale Netzwerke

Eine weitere Auswertungsmethode zur Quantifizierung der Gesamtzellzahl wurde über die Nutzung von neuronalen Netzwerken geschaffen. In diesem Rahmen erfolgte eine Zusammenarbeit mit der Servicegruppe für Mikroskopie im Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung in Bad-Nauheim (Dr. Tobias Rasse). Zur Etablierung einer Bild-Prozessierungslinie wurde das System *open source python framework for segmentation of biomedical images* (OpSef) genutzt¹⁰⁰. Das System geht ein häufiges Problem in der Nutzung neuronaler Netzwerke an. In der modernen Bildverarbeitung werden dem Endnutzer auf künstlicher Intelligenz (KI) basierende Systeme für die Segmentierung biologischer Bilder frei im Internet zur Verfügung gestellt. Viele Systeme sind mit *graphical user interfaces* (GUI) ausgestattet und können so auch Nutzern mit geringen Kenntnissen in Programmiersprachen wie Python zugänglich gemacht werden. Dabei kann es jedoch zu einer fehlerhaften, nicht standardisierten Anwendung kommen. Des Weiteren kann oft aufgrund mangelnder Expertise in der Modulation der Systeme keine Optimierung der angewendeten neuronaler Netzwerke stattfinden. OpSef schließt diese Lücke über ein *framework*, das es dem Endnutzer ermöglicht die Einzelschritte in der Prozessierungslinie mit einem erfahrenen, in Programmierung trainierten Bildanalysten abzustimmen, um das optimale Ergebnis zu erreichen. Konkret werden unter gegenseitiger Abstimmung der gewünschten Ausgabeergebnisse, verschiedene Vorbearbeitungsschritte in Kombination mit unterschiedlichen neuronalen Netzwerken an repräsentativem Bildmaterial getestet (Abbildung 2.2.10). Nach Ermittlung einer geeigneten Kombination kann diese zur weiteren Datenprozessierung verwendet werden.

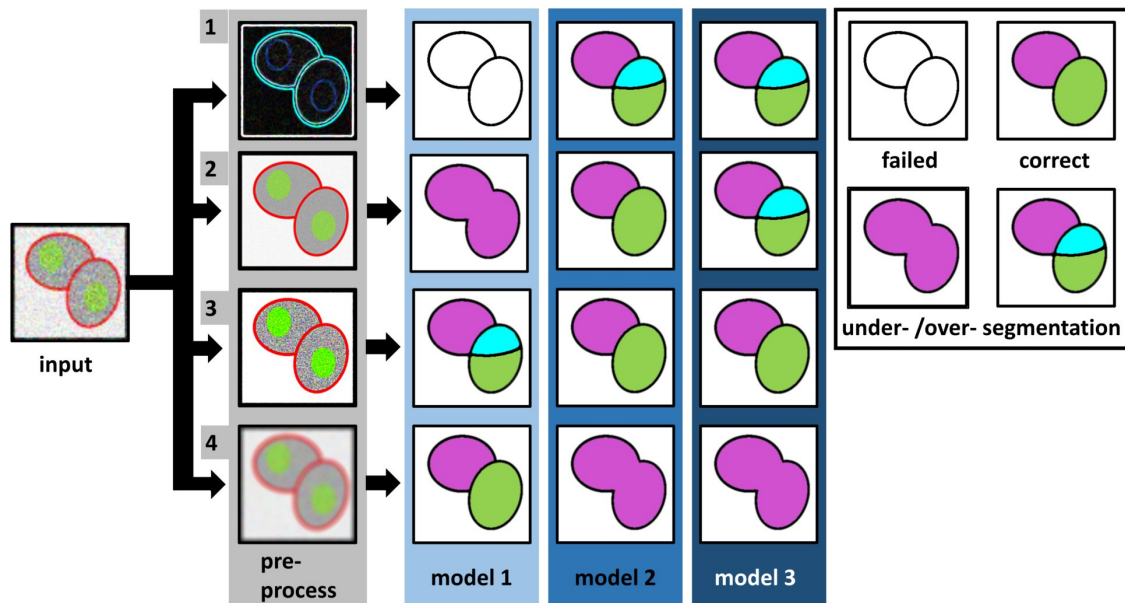


Abbildung 2.2.10 Beispielhafte Darstellung eines Etablierungsprozesses einer Prozessierungslinie im OpSef. Der Input wird auf verschiedene Arten vorprozessiert (*preprocess* 1-4). Im nächsten Schritt werden auf jedes Vorprozessierungsverfahren drei verschiedene neuronale Netzwerke zur Segmentierung der Zellen angewendet (*model* 1-3). Rechts ist die Klassifikation der Outputs verzeichnet. Das gewünschte Ergebnis ist mit *correct* betitelt. Entnommen aus Rasse *et al.*, 2020¹⁰⁰.

Für das in dieser Arbeit akquirierte Bildmaterial wurden standardmäßig Vorprozessierungs-Filter (Median u. Kernel 3) bei allen Modellen angewendet. Danach wurde das neuronale Netzwerk *Cellpose* in verschiedenen Modellen gegen das neuronale Netzwerk *Stardist-2D* getestet^{119,109}. Bei beiden Netzwerken handelt es sich um freizugängliche *open source* Programme. Es wurden die *Cellpose* Modelle *nuclei* und *cytoplasm* angewendet. Die Modelle haben ihren Namen von der Art der Bilder, an denen sie trainiert wurden. So wurde das *nuclei* Modell anhand von Bildern mit Zellkernfärbung auf die Segmentierung von Zellkernen spezialisiert und das *cytoplasm* Modell auf die Segmentierung zytoplasmatischer Färbungen trainiert. Es wurden zusätzlich verschiedene Skalierungsfaktoren angewendet. Diese definieren dem Netzwerk im Voraus den durchschnittlich zu erwartenden Zellkerndurchmesser im Bildmaterial. Weitere Informationen zur Installation des Netzwerks *Cellpose* finden sich unter Kapitel 10.4. Die Segmentierungen der einzelnen Netzwerke und Modelle wurden visuell evaluiert, und das mit den besten Segmentierungseigenschaften für die Prozessierungslinie ausgewählt.

2.2.8 Immunofluoreszenz-Quantifizierung

Für die Zuordnung von Zellen zu verschiedenen Zellpopulationen (Leukozyten, Makrophagen, endotheliale Zellen) wurde ein weiteres Makro im Programm Image-J angewendet, das von Nicolai Schmidt aus einer anderen Forschungsarbeit zur Verfügung gestellt wurde¹⁰⁸. Ziel dieses Makros sollte es sein, die Zellkerne adhärerender Zellen zu erkennen und zu bestimmen, ob die Membran, die um den erkannten Zellkern liegt, eine Markierung in der jeweils angewendeten Immunofluoreszenzfärbung aufweist. Über Erfüllung dieses Kriteriums kann die Zuordnung zu einer Zellpopulationen erfolgen. Die Befehlsabfolge ist in der Abbildung 2.2.11 als Pfeildiagramm dargestellt.

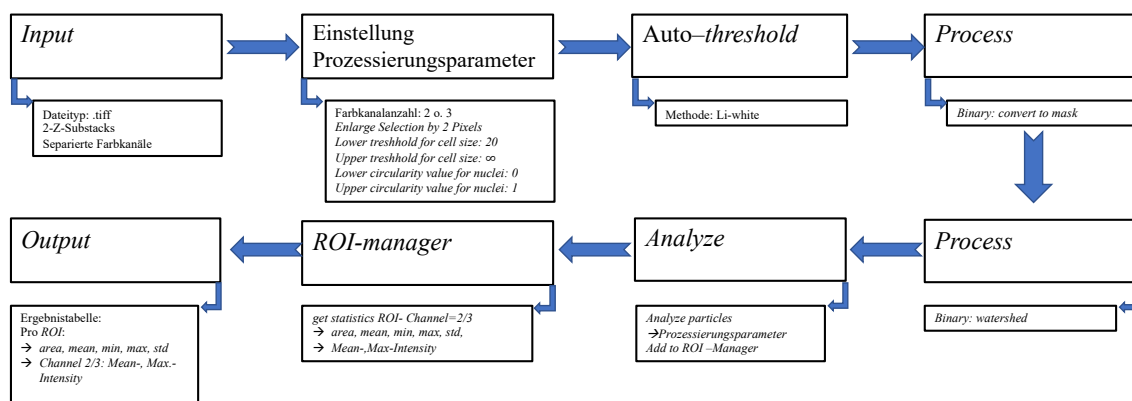


Abbildung 2.2.11 Schematische Darstellung des Befehlsablaufs des Image-J-channel-analyzer-Makros. Nach Einstellen der Prozessierungsparameter wird ein Auto-Threshold nach der *Li-white* Methode angewendet. Nach binärer Konvertierung des Bildes und der Anwendung des *watersheds* und der *analyze-particles*-Funktion werden die erkannten Zellkernstrukturen im ROI-manager gespeichert und die Messung des Fluoreszenzkanals durchgeführt. Die Ergebnisse werden als Tabelle ausgegeben.

Als Input des *channel-analyzer*-Makros diene ein Ordner in dem die auszuzählenden Bildsequenzen in ihrer 2-Z-Substack Projektion getrennt nach Farbkanälen vorlagen (siehe Kapitel 10.2). Bei dieser Projektionsform wurden jeweils zwei aufeinanderfolgende Ebenen miteinander addiert.

Nach Starten des Makros mussten verschiedene Parameter für die *analyze-particles*-Funktion zur Zellkernerkennung eingestellt werden. Danach wurde der Kanal mit der Zellkernfärbung vorprozessiert (*threshold=Li-white, convert to mask, watershed*) und die Zellkerne nach den voreingestellten Parametern über die *analyze-particles*-Funktion umrissen, gezählt und in den *region of interest* (ROI)-manager eingetragen. Im ROI-manager wurde somit jeder Zellkern mit einer Nummerierung und dem zugehörigen Umriss, der sogenannten Maske, hinterlegt. Um den Zellkern einer Zellpopulation zuzuordnen zu können, musste die

Intensität, der auf der Zellmembran gegen ein definiertes Antigen (CD45, CD31, CD68) angewendeten Immunofluoreszenzfärbung gemessen werden. Dafür wurde die abgespeicherte Maske um zwei Pixel vergrößert und als Messbereich verwendet. Die Maskenvergrößerung war notwendig, da die angefärbte Zellmembran dem Zellkern nicht direkt aufliegt. Bei der eigentlichen Messung wurde die erweiterte Maske jedes Zellkerns wie eine Schablone auf die Abbildungen der angewendeten Immunofluoreszenz-Kanäle gelegt und die durchschnittliche und maximale Intensität der Färbung innerhalb der Maske gemessen. Als Output wurde eine Tabelle mit der Nummerierung jeder Zellkernmaske und den dazugehörigen Intensitätsmesswerten ausgegeben. Die Einzelschritte des Makros sind in Abbildung 2.2.12 schematisch dargestellt.

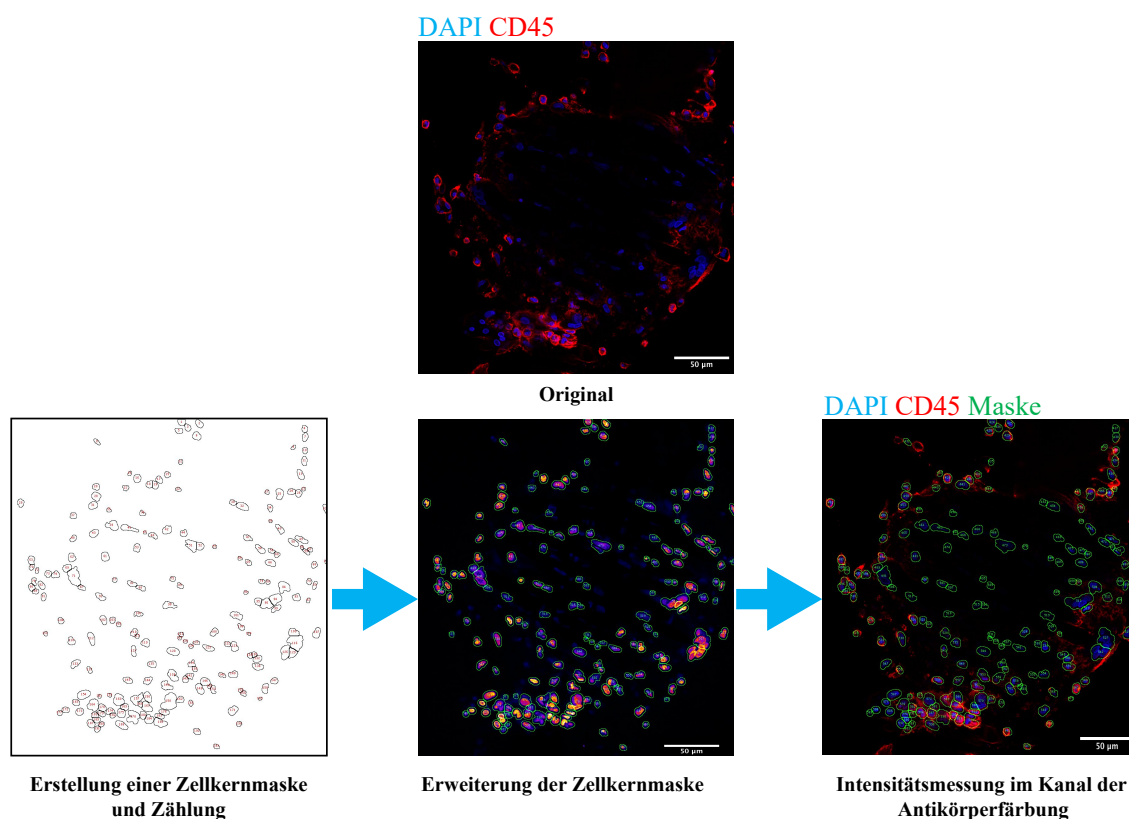


Abbildung 2.2.12 Illustration der Arbeitsschritte des *channel-analyzer*-Makros. Nach Erstellung einer Zellkernmaske im DAPI-Kanal wird diese um 2 Pixel erweitert. Innerhalb der erweiterten Zellkernmaske wird die Intensität der Zellkern-umgebenden Zellmembranfärbung gemessen. Liegt die gemessene maximale Intensität oberhalb eines festgelegten *cut-offs*, wird die Zelle als positiv erkannt.

Die gemessenen Werte wurden in eine Excel-Tabelle übernommen und dort mit einem *cutoff*-Wert für die maximale Intensität verglichen. Der *cutoff*-Wert wurde für jede Bildsequenz individuell festgelegt. Dabei wurde die maximale Intensität von Membranfärbungen gemessen, die gerade noch mit dem Auge zu erkennen waren. Dieser Wert entsprach der Intensitätswert-Untergrenze einer noch positiv-markierten Zelle. Lag die in der erweiterten Zellkernmaske gemessene maximale Intensität oberhalb des *cutoff*-

Wertes, wurde die Zelle als positiv ausgewiesen. Dieser Prozess wurde für alle erkannten Zellkerne durchgeführt, sodass sich daraus ein prozentualer Anteil der angefärbten Zellpopulation an der Gesamtzellzahl ableiten ließ. Die automatische Auszählung wurde im Vergleich mit der manuellen Auszählung evaluiert.

2.2.9 Kriterien für die manuelle Auszählung

Um die automatischen Quantifizierungstechniken zu validieren musste ein Vergleich zur manuellen Auszählung, die als Referenzzählung herangezogen wurde, erfolgen. Im Folgenden sollen die Kriterien für Auszählung und Zuordnung zu bestimmten Zellpopulationen erläutert werden.

Die Auszählung der Zellkerne im DAPI-Kanal bedarf erhöhter Aufmerksamkeit. Neben klassischen Zellkernformen waren Artefakte auf der Membran zu finden, die möglicherweise auf Zelldebris zurückzuführen waren und nicht ausgezählt werden sollten. Da die Zellkerne bei den Aufnahmen oft nicht genau in der Schnittebene lagen, kam ihre klassische Form nicht immer zu Abbildung. Um Zellkerne von eher eckig und desintegriert erscheinenden Artefakten zu unterscheiden, wurde unter anderem auf die Rundheit und Durchgängigkeit der Zellkernmembran geachtet. Des Weiteren erschwert das Vorhandensein von Zellkernclustern oft die Auszählung. Die Vorgehensweise der manuellen Zellkernauszählung ist in Abbildung 2.2.13 dargestellt.

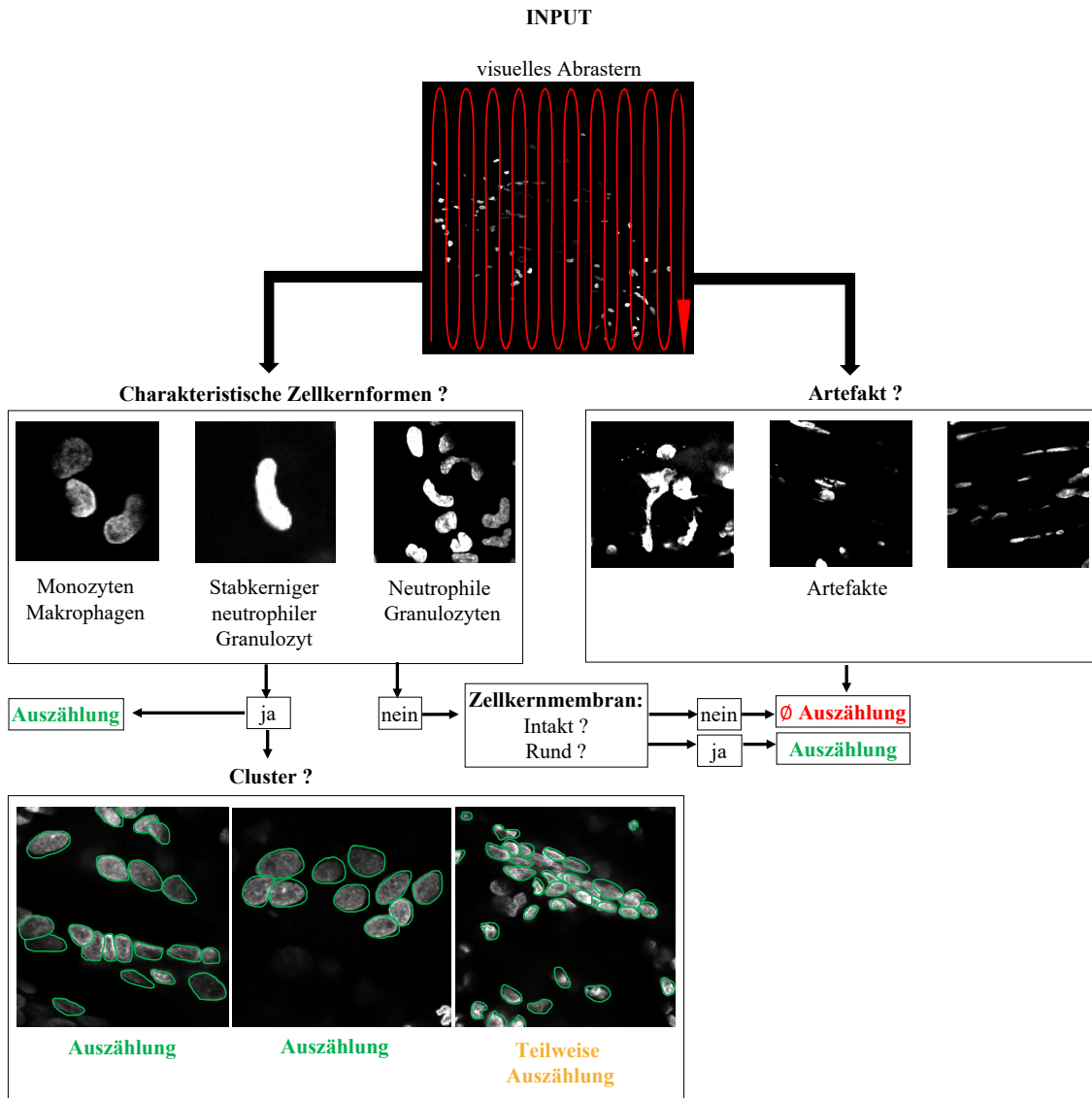


Abbildung 2.2.13 Vorgehensweise bei der manuellen Auszählung von Zellkernen. Bei der manuellen Auszählung werden die Bilder mäanderförmig durchgerastert. Atypische Signale gehen wahrscheinlich auf Zelldebris oder Artefakte zurück und werden nicht ausgezählt. Liegt eine klassische Zellkernform vor oder ist ein rundlicher intakter Zellkern zu erkennen, erfolgt eine Auszählung. Diese kann in aggregierten Bereichen erschwert sein.

Endotheliale Zellen wurden durch die Markierung von CD31 nachgewiesen. Bei der Auszählung dieser Zellsorte ist darauf zu achten, dass sich das CD31-Molekül auch auf den ebenfalls in großen Mengen an der ECMO-Membran vorhandenen Thrombozyten befindet. Letztere besitzen keinen Zellkern mehr, da sie aus Zytoplasmaabschnürungen der im Knochenmark ansässigen Megakaryozyten entstehen. Hauptunterscheidungskriterium von Endothelzellen und Thrombozyten ist daher die Kolokalisation der CD31⁽⁺⁾ Membranmarkierung mit Zellkernfärbung. Weitere Kriterien zur sicheren Auszählung sind in Abbildung 2.2.14 einsehbar.

DAPI CD31

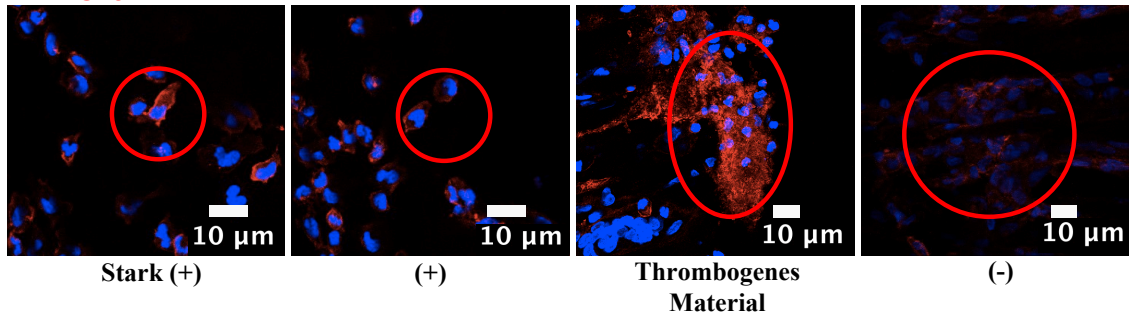


Abbildung 2.2.14 Darstellung der Kriterien für CD31⁽⁺⁾ und CD31⁽⁻⁾ Zellen. Stark positive Zellen (+) Die Zellmembran ist hochintensiv markiert und umgibt einen kolokalisierten Zellkern. **Positive Zellen (+)** Der Zellkern ist von einer dezenten, definierten Zellmembranfärbung umgeben. Endothelzellen zeigen meist keine perfekt runde Gestalt. **Thrombogenes Material** stellt sich verschmiert über viele Zellkerne verteilt, als Schleier dar. **Negative Zellen (-)** Die Färbung ist als negativ zu betrachten, wenn keine definierte oder sehr schwache Zellmembranfärbung vorliegt.

Leukozyten wurden über die Markierung des Oberflächenproteins CD45 markiert. Wie in Kapitel 2.2.4.1 erwähnt, wird dieser Marker auf den verschiedenen leukozytären Subpopulationen unterschiedlich exprimiert. Bei der Auszählung ist daher auf ein breiteres Intensitätsspektrum zu achten. Auch die Zellkernformen fallen bei diesen Zelltypen unterschiedlich aus. So weisen Lymphozyten kleine, runde, Makrophagen große, nierenförmige und neutrophile Granulozyten je nach Differenzierungsstadium längliche, stabförmige oder gelappte, segmentierte Zellkernformen auf. Die Kriterien für eine sichere Auszählung CD45⁽⁺⁾ Zellen sind in Abbildung 2.2.15 illustriert.

DAPI CD45

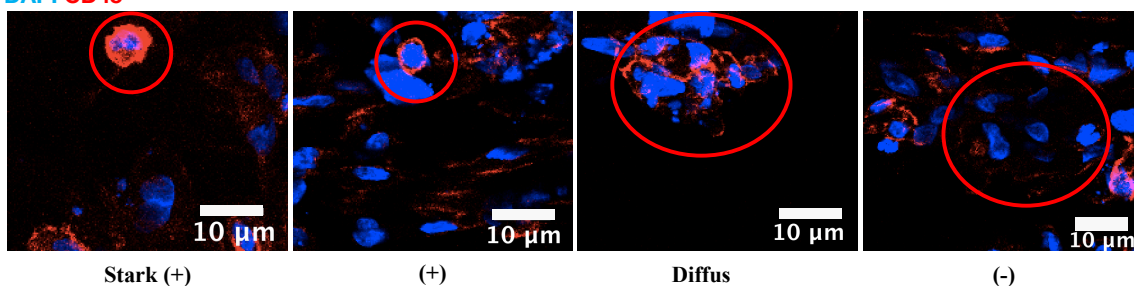


Abbildung 2.2.15 Darstellung der Kriterien für CD45⁽⁺⁾ und CD45⁽⁻⁾ Zellen. Stark positive Zellen (+) Die Zellmembran ist hochintensiv markiert und umgibt einen kolokalisierten Zellkern. **Positive Zellen (+)** Der Zellkern ist von einer oft annähernd kreisrunden Zellmembranfärbung umgeben. **Diffus** über mehrere Zellkerne verteilte Schleier lassen sich nicht sicher einer Zelle zuweisen und sind nicht als CD45⁽⁺⁾ Zelle auszuzählen. **Negative Zellen (-)** Die Färbung ist als negativ zu betrachten, wenn keine definierte oder eine sehr schwache Zellmembranfärbung vorliegt.

Bei einem Teil der Proben wurde CD68 als Pan-Makrophagenmarker verwendet. Zellen die einen großen, oft nierenförmigen Zellkern besitzen und auf der Zellmembran mit CD68 markiert sind, wurden als Makrophagen definiert (Abbildung 2.2.16 [A]). Neben der CD68-Färbung wurde exemplarisch eine zusätzliche MRC-1-Färbung durchgeführt. Bei dieser Färbung wurden ausschließlich CD68-markierte Zellen als M1-Makrophagen und zusätzliche mit MRC-1 markierte Zellen als M2-Makrophagen definiert. Die Auszählkriterien sind in Abbildung 2.2.16 [B] dargestellt.

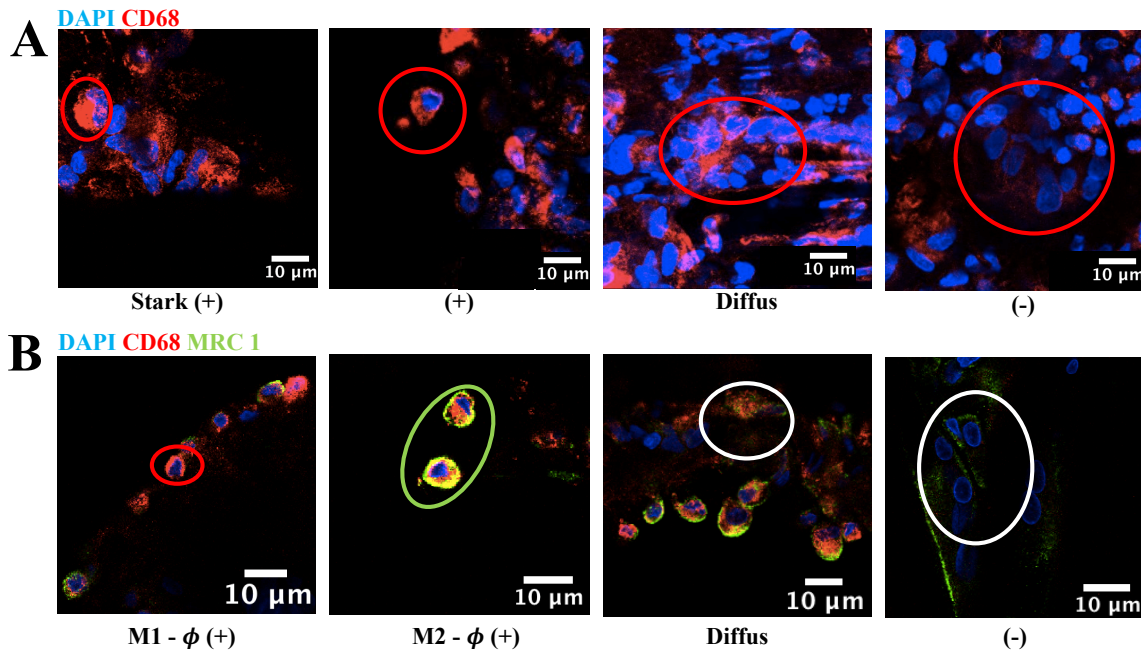


Abbildung 2.2.16 Darstellung der Kriterien zur Auszählung von Makrophagen mittels CD68-Färbung [A] und M1- und M2-Makrophagen über die Markierung CD68⁽⁺⁾/MRC-1⁽⁺⁾ Zellen [B]. [A] **Stark positive Zellen (+)** Die Zellmembran ist intensiv markiert und umgibt einen nierenförmigen Zellkern. **Positive Zellen (+)** Der Zellkern ist von einer polymorphen Zellmembranfärbung umgeben. **Diffus** über mehrere Zellkerne verteilte Schleier sind nicht als CD68⁽⁺⁾ Zelle auszählen. **Negative Zellen (-)** Die Färbung ist als negativ zu betrachten, wenn keine definierte oder eine sehr schwache Zellmembranfärbung vorliegt. [B] **M1-Makrophagen (+)** Die Zellmembran ist hochintensiv mit CD68 ohne MRC-1 markiert und umgibt einen kolokalisierten Zellkern. **M2-Makrophagen (+)** Die Membran weist deutliche Markierungen gegen CD68 (rot) und MRC-1 (grün) auf. **Diffus** Es besteht keine definierte Zellmembranfärbung und Kolokalisation mit einem Zellkern. **Negative Zellen (-)** Die Färbung ist als negativ zu betrachten, wenn keine definierte oder eine sehr schwache Zellmembranfärbung vorliegt.

2.2.10 Statistische Methoden

Um die Zellbesiedlung der untersuchten Prädilektionsstellen in verschiedenen Oxygenatorbereichen miteinander zu vergleichen und aus den generierten Daten Hypothesen für weitere Untersuchungen zu formulieren, wurde eine explorative statistische Analyse durchgeführt. Dafür erfolgte eine statistische Beratung durch Jonas Tschammer am Institut für Medizinische Informatik des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die zu vergleichenden Gruppen wurden mittels Shapiro-Wilk-Test auf eine Normalverteilung untersucht. Um Unterschiede zwischen der Zellbesiedlung von Prädilektionsstellen auf Hohlfasern und Knotenpunkte zu erkennen wurden die erhobenen Zellzahlen und Zelltypenanteile bereichsunabhängig zusammengefasst (gepoolt) und miteinander verglichen. Für diese Vergleiche zwischen zwei Gruppen (Hohlfasern vs. Knotenpunkte) wurde der nicht parametrische Mann-Whitney-U-Test verwendet ⁷⁸. Um Unterschiede zwischen der Zellbesiedlung mehrerer Oxygenatorbereiche aufzudecken, wurde der nicht parametrische Kruskal-Wallis Test angewandt ⁶⁴. Damit bei dieser Gruppenanalyse Unterschiede zwischen

einzelnen Gruppen erkannt werden konnten, wurde *post-hoc* ein multipler Vergleich der Gruppen mittels Dunn`s-Test durchgeführt ²⁷. Da es sich um eine explorative Untersuchung handelt, wurde der Begriff Signifikanz in dieser Arbeit nicht verwendet.

3. Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Testung der angewendeten Quantifizierungsverfahren und der Untersuchungen des in dieser Arbeit akquirierten Probenmaterials (M- und E-MO) beschrieben. Die Analyse der Zellbesiedlungsmenge in verschiedenen Bereichen der MO bezieht sich explizit auf die beiden hier untersuchten Oxygenatoren und dient der Hypothesenfindung.

3.1 Lokalisation und Morphologie zellulärer Ablagerungen auf PMP-Membranen

Zur Identifikation von Prädilektionsstellen für vermehrte Zellablagerung wurden ECMO-Membranpräparate des M- und E-MOs mittels Zellkernfärbung und konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht (Kapitel 2.2.5 u. 2.2.6).

Auf den Membranen des untersuchten M-MOs fanden sich im Wesentlichen zwei Lokalisationen vermehrter Zelladhäsion. Zum einen traten verstärkt Zellablagerungen auf den quervernetzenden Kettfäden, insbesondere im Bereich ihrer Knotenpunkte auf. Zum anderen fanden sich auf den PMP-Hohlfasern in regelmäßigen Abständen vermehrt Zellen an den Kontaktstellen zweier übereinanderliegender Hohlfasermatten. Die Membranpräparate des untersuchten E-MOs zeigten ebenfalls starke Ablagerungen an den Knotenpunkten. Zellablagerungen auf den Hohlfasern zeigten im Vergleich zum untersuchten M-MO keine Regelmäßigkeiten in ihrer Lokalisation. Morphologisch war bei den Knotenpunkten beider Oxygenatoren eine hohe Zelldichte mit räumlicher Anordnung entlang des Fadengewebes zu beobachten. Es traten unter anderem strangförmige Aggregate auf. Die Ablagerungen auf den Hohlfasern unterschieden sich zwischen den untersuchten Modellen neben der Lokalisation auch in ihrer Morphologie. Auf den Hohlfasern des M-MOs hatten sie eine runde strudelförmige Gestalt. Auf den Schnittbildern imponierten räumlich überlagerte Aggregate. Ablagerungen auf den Hohlfasern des E-MOs erschienen eher langgestreckt mit geringerer räumlicher Überlagerung. Abbildung 3.1.1 illustriert die Ausdehnung der Zellablagerungen über den *temporal-color-code*. Dabei werden die Zellen verschiedener Ebenen in der Max-Projektion entsprechend einer vorgegebenen Farbskala eingefärbt dargestellt.

Die Werte der durchschnittlichen Z-Scan-Höhen von Knotenpunkten und Hohlfasern beider Oxygenatoren sind in Tabelle 3.1.1 aufgelistet.

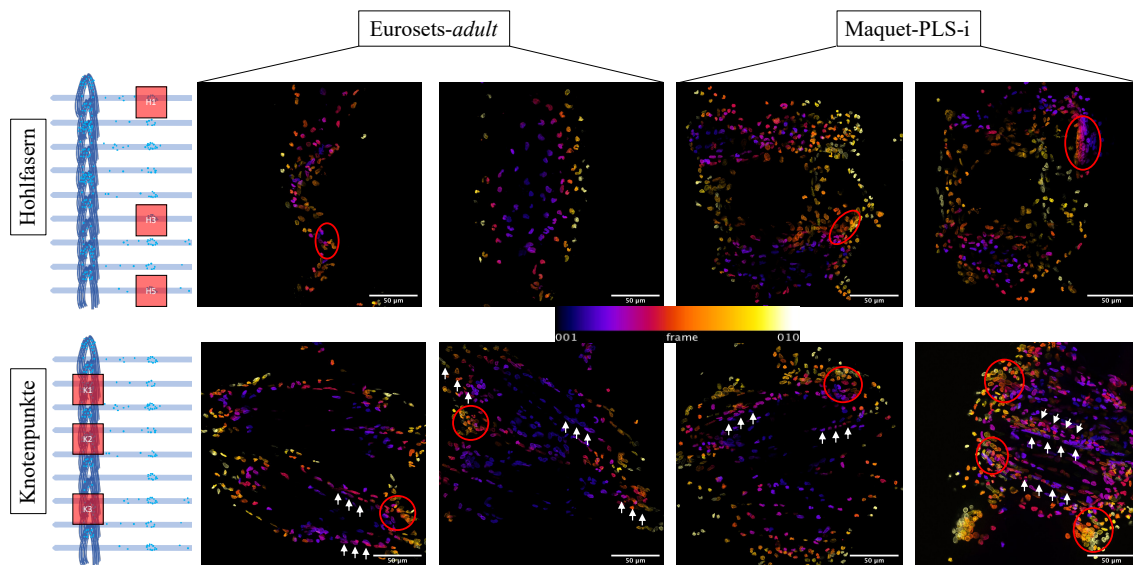


Abbildung 3.1.1 Darstellung der unterschiedlichen Morphologien von Zellablagerungen im Bereich der Hohlfasern und Knotenpunkte quervernetzender Kettfäden auf ECMO-Membranen. Die Darstellung erfolgt im *temporal-color-code*. Zellen aus tieferen Ebenen sind bläulich und Zellen aus höheren Ebenen gelblich markiert. Die zugehörige Farbskala befindet sich in der Mitte der Abbildung. Ablagerungen auf Knotenpunkten beider Oxygenatoren hatten eine räumlich überlagerte Gestalt mit Zellclustern (rote Kreise) und strangförmigen Aggregaten (weiße Pfeile). Die Ablagerungen auf den Hohlfasern des M-MOs verfügten ebenfalls über eine räumliche Überlagerung, während die Ablagerungen der Hohlfasern des E-MOs abgegrenzter imponierten.

Tabelle 3.1.1 Auflistung der Z-Scan-Höhen von Knotenpunkten und Hohlfasern beider MOs

	Eurosets-adult	Maquet-PLS-i
Knotenpunkte		
Anzahl	n = 60	n = 63
Mittelwert Z-Scan-Höhen	59,28 ± 38,10 µm	52,27 ± 25,51 µm
Hohlfasern		
Anzahl	n = 60	n = 58
Mittelwert Z-Scan-Höhen	44,60 ± 23,51 µm	50,74 ± 26,45 µm

3.2 Methodenevaluation - Gesamtzellzahlquantifizierung

Um eine adäquate Gesamtzellzahlquantifizierung von Prädilektionsstellen auf PMP-Membranen nach ECMO-Therapie durchführen zu können, wurden verschiedene automatisierte Verfahren etabliert und gegeneinander getestet. Neben der stichprobenartigen visuellen Prüfung der Zellkernererkennung wurden die Auszählungsergebnisse größerer Bilddatensätze mit der manuellen Auszählung (Referenzzählung) verglichen, um die Qualität der einzelnen Methoden zu prüfen.

3.2.1 Max-Projektion: Image-J-particle-analyzer-Makro

Der erste Ansatz bestand aus der Erstellung des Image-J-particle-analyzer-Makros, das die Anzahl adhärerender Zellen in der Max-Projektion quantifizierte (Kapitel 2.2.7.1). Um die Güte der Auszählung zu bestimmen, wurde das Makro an 116 Max-Projektion von 58 Knotenpunkten und 58 Hohlfasern des untersuchten M-MOs getestet. In Abbildung 3.2.1 ist die Zellkernererkennung des Makros exemplarisch illustriert. Es neigt in Bereichen mit starker Zellaggregation zu einer Untersegmentierung. Dies führt dazu, dass Bereiche, in denen mehrere Zellkerne gehäuft vorliegen, als ein zusammenhängendes Segment ausgezählt werden. In überwiegenden Teil der Fälle kommt es zu einer Übersegmentierung (siehe Tabelle 10.5.1), sodass fälschlicherweise mehr Zellkerne als tatsächlich vorliegen ausgezählt werden.

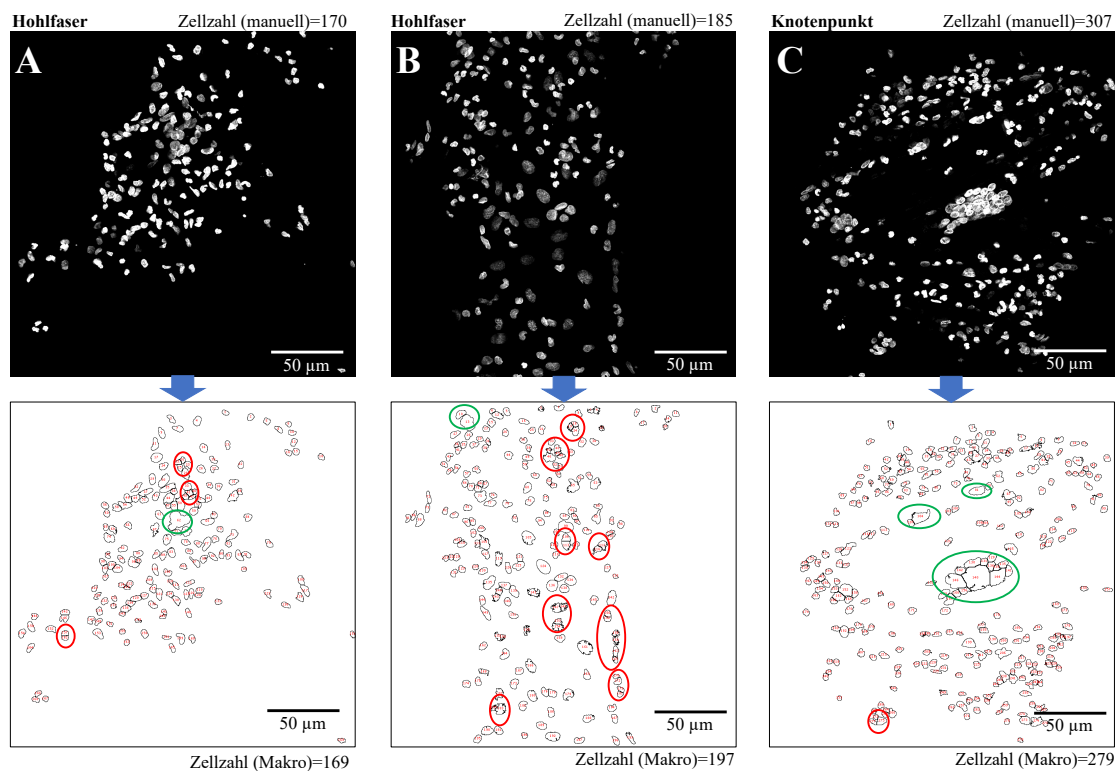
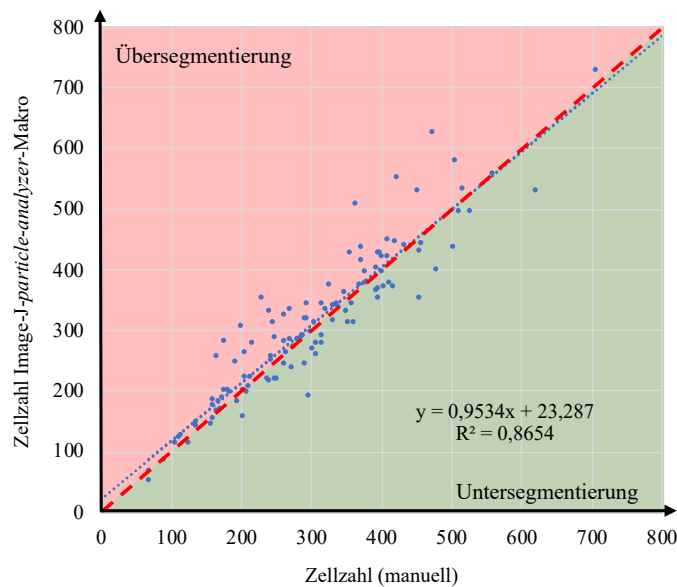


Abbildung 3.2.1 Illustration der Segmentierungsfunktion des Image-J-particle-analyzer-Makros an drei Beispielen. In der oberen Reihe sind die Originalbilder zu sehen, in der unteren die Auszählmasken des Makros. Grüne Kreise markieren Bereiche mit Untersegmentierung, rote Kreise markieren Bereiche mit Übersegmentierung. [A] Die Segmentierung ist nahezu ideal (170 vs. 169 Zellen). [B] Es kommt in diesem Bild vorwiegend zur Übersegmentierung (185 vs. 197 Zellen). [C] Es kommt in diesem Bild vorwiegend zur Untersegmentierung (307 vs. 279 Zellen).

Zur weiteren Testung wurde der Bilddatensatz manuell in der Max-Projektion als Referenz ausgezählt und mit der Auswertung über das Makro verglichen. Die Auswertungsdaten sind im Anhang einsehbar (siehe Tabelle 10.5.1). Im Streudiagramm (Graph 3.2.1) ist die Korrelation der beiden Gruppen dargestellt. Es zeigt sich ein Bestimmtheitsmaß (R^2) von 0,87. Die mittlere prozentuale Abweichung von der

Referenzzählung lag bei $11,72\% \pm 12,06\%$. Der Pearson Korrelationskoeffizient (R) lag bei 0,93. In 56% der Bilder wurden vom Makro zu viele Zellen ausgezählt, d.h. tendenziell übersegmentiert. 42% wiesen eine Unterzählung bzw. Untersegmentierung auf.

Zusammenfassend lässt sich anhand der gemessenen Korrelationswerte auf einen linearen Zusammenhang zwischen manueller Referenzzählung und Auszählung durch das Makro schließen. Die erfassten Abweichungen bzw. deren Streuung sowie die zum Teil unzureichend aufgelösten Zellaggregate ließen den Schluss zu, dass die automatisierte Zellzählung optimiert werden muss.



Graph 3.2.1 Streudiagramme zur Darstellung der Korrelation zwischen Auszählung der Max-Projektionen durch das Image-J-particle-analyzer-Makro und der manuellen Auszählung als Referenz. Die automatische Auszählung ist gegen die korrespondierende manuelle Auszählung aufgetragen. Die rot gestrichelte Linie repräsentiert die Idealgerade, die blau gepunktete Linie die Regressionsgerade der Messpunkte.

3.2.2 Etablierung einer KI-gestützten Prozessierungslinie im OpSef

Da die Gesamtzellzahlquantifizierung in der Max-Projektion durch die dreidimensionale Überlagerung von Zellen innerhalb der untersuchten Prädilektionsstellen erschwert war, wurde in Zusammenarbeit mit einem Bildanalytisten ein KI-gestütztes Verfahren mit höherer räumlicher Auflösung etabliert (siehe Kapitel 2.2.7.2).

Um eine möglichst genau Zellzählung zu erreichen, wurde zunächst eine geeignete Projektionsweise der Scans ausgesucht. Die Max-Projektion der Bilder bot den vermeintlichen Vorteil, alle Zellen einer aufgenommenen Prädilektionsstelle direkt erfassen zu können, führte jedoch zur Überlagerung übereinanderliegender Zellkernkonturen der einzelnen Ebenen. Die schwer differenzierbaren Zell-Cluster (Abbildung 3.2.2 [B]) lassen sich per Hand nur ungenau auszählen und beeinträchtigen somit auch die Auszählung durch ein neuronales Netzwerk.

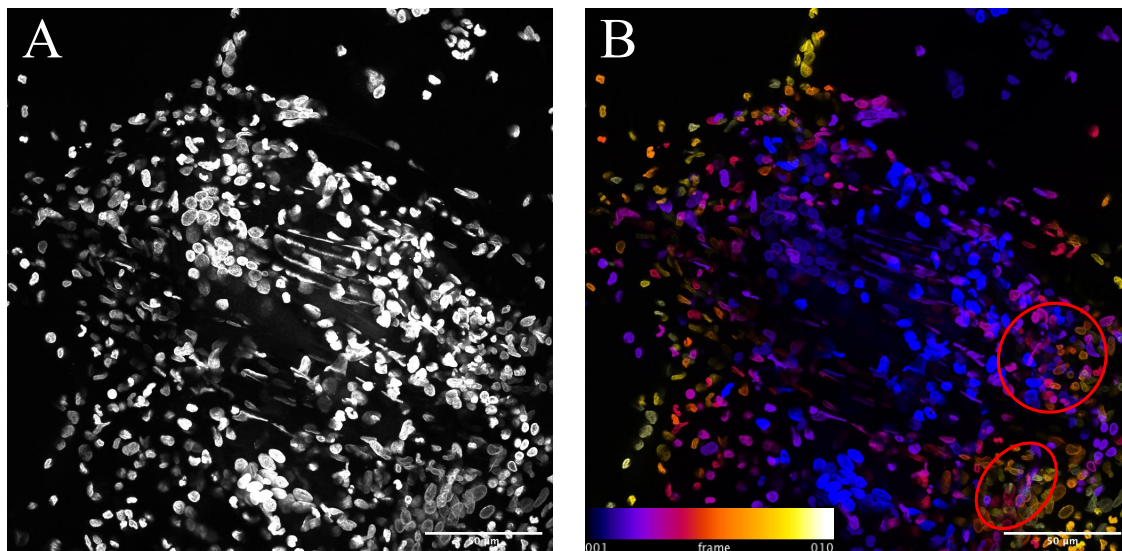


Abbildung 3.2.2 Darstellung eines Knotenpunktes in der Grauskala und im *temporal-color-code*.

[A] Übersichtsaufnahme eines Knotenpunktes in der Max-Projektion. Die Zellkerne sind mit DAPI gefärbt und in der Grauskala dargestellt. [B] Mit einem roten Kreis sind Zellkerne aus verschiedenen Ebenen markiert, deren Konturen durch die Überlagerung schlechter zu differenzieren sind. Dies erschwert die zuverlässige Zellzählung.

Daher wurden kleinere *Substack*-Projektionen für die weitere Auswertung verwendet. Hierbei wird der gesamte Scan in einzelne Stapel aufeinanderfolgender Ebenen aufgeteilt. Die Bilder eines Stapels werden miteinander zu einer *Substack*-Projektion addiert. Es zeigte sich, dass eine *Substack*-Addition von jeweils zwei aufeinander folgenden Z-Ebenen eine Separation der einzelnen Zellkerne mit weniger Clustern und folglich verbesserter automatisierter Auszählbarkeit lieferte. Zur Evaluation der Segmentierungsfunktion der neuronalen Netzwerke *Cellpose* und *Stardist-2D* wurden die 2-Z-Substack-Projektionen einer Hohlfaser-Prädilektionsstelle des äußeren Bereichs des

M-MOs vom Bildanalysten in OpSef prozessiert (n=5). Anschließend wurden die prozessierten Bilder visuell geprüft und festgestellt mit welcher Genauigkeit eine Zellkernererkennung durch die eingesetzten Netzwerke erfolgte. Die visuelle Prüfung ist essentiell, da nur so kontrolliert werden kann, ob das Auszählungsergebnis des eingesetzten Netzwerks auch auf einer korrekten Zellkernererkennung beruht. Eine reine Evaluation über den Vergleich der ausgegebenen Zellzahl mit der manuellen Auszählung als Referenz kann diese Information nicht liefern, da hier keine visuelle Begutachtung stattfindet. Bei der visuellen Prüfung wurde insbesondere auf die Erkennung separierter Zellkerne und die Differenzierung von Zellkernkonturen im Bereich aggregierter Zellen geachtet (Abbildung 3.2.3 [A]). Als Parameter für die Güte der Zellkernererkennung wurde für die untersuchten 2-Z-Substacks eine Zellkern-Erkennungsrate über folgende Formel bestimmt:

$$\text{Zellkern—Erkennungsrate}(E) = \frac{\text{richtig positive (RP)}}{\text{richtig positive (RP)} + \text{falsch negative (FN)}}$$

In dieser Beurteilung zeigte das neuronale Netzwerk *Cellpose* unter Verwendung des *scaling-factors 0.7* und dem Modell *nuclei* im Vergleich zu den anderen Kandidaten in aggregierten Bereichen das beste Segmentierungsergebnis. Auch freistehende Zellkerne wurden zuverlässig erkannt. Die Erkennungsrate des Modells war mit 0,89 am höchsten. Nach der Evaluation wurde das Modell samt der angewendeten Vorprozessierungsfiler (Median, Kernel 3) in die Prozessierungslinie aufgenommen (Abbildung 3.2.3 [B]).

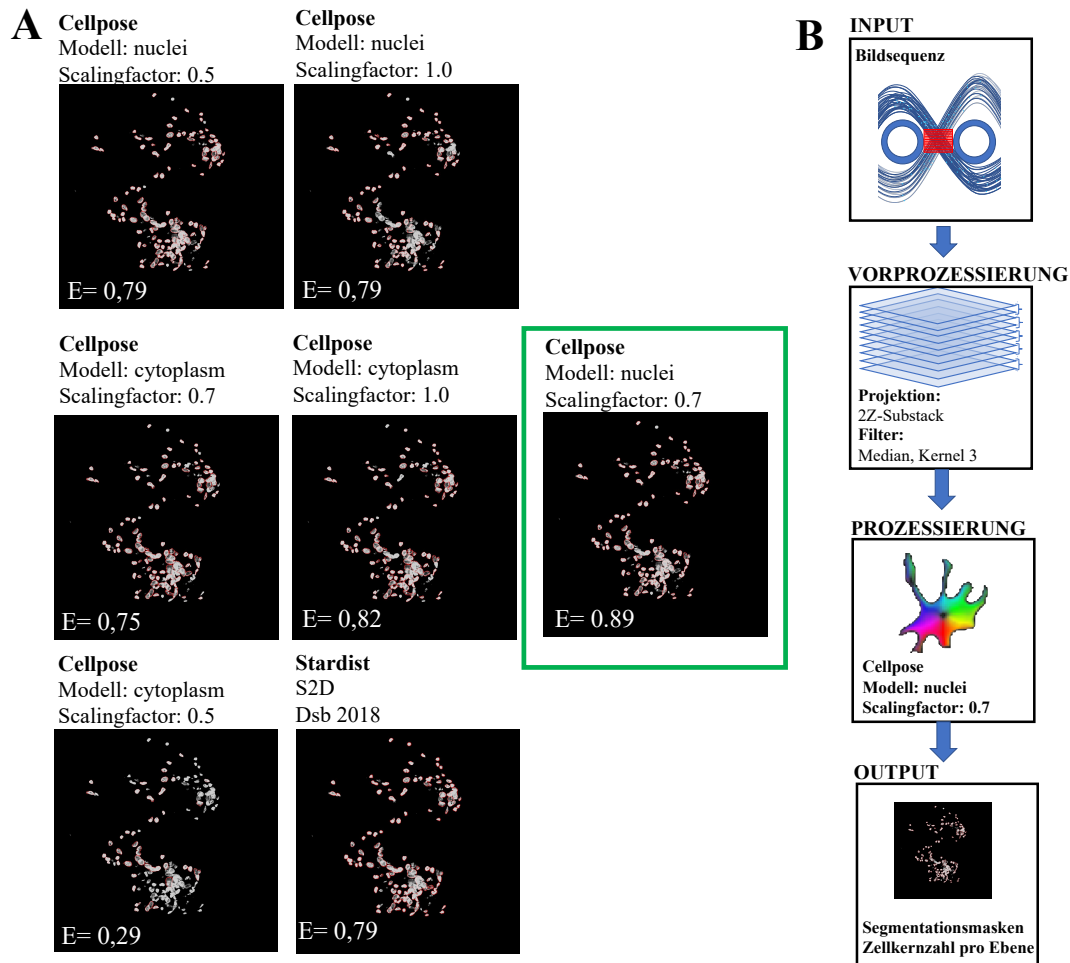
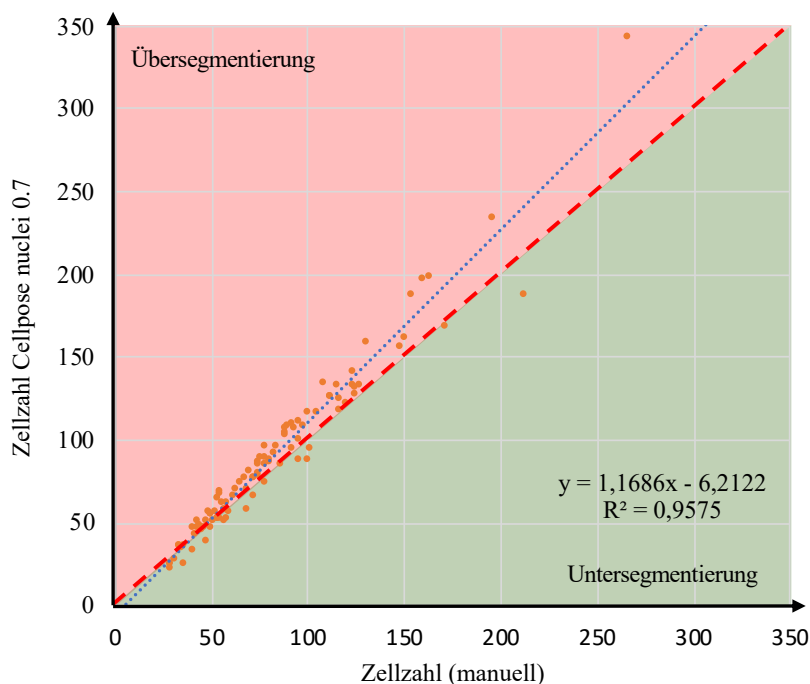


Abbildung 3.2.3 Testung der Segmentationseigenschaften verschiedener neuronaler Netzwerke an Bildmaterial im OpSef und Integration in die Prozessierungslinie. [A] Exemplarische Darstellung der Segmentierung eines 2-Z-Substacks durch die neuronalen Netzwerke *Cellpose* und *Stardist 2D*. *Cellpose* wurde mit verschiedenen Modellen und *scalingfactors* angewendet. Die von den Netzwerken erkannten Zellkernstrukturen sind rot umrandet. Das *Cellpose model nuclei scalingfactor 0.7* erzielte die besten Ergebnisse (grün umrandet). [B] Der Prozessierungslinie dienen die 2-Z-Substack-Projektionen der Prädelektionsstellen als Input. Im nächsten Schritt wird an den Bildern eine Vorprozessierung mit einem Median-Filter und Kernel 3 durchgeführt. Danach erfolgt die Prozessierung mittels *Cellpose (model: nuclei, scalingfactor: 0.7)*. Als Output werden die Segmentationsmasken und die Zellkernzahl pro Substack angegeben.

3.2.3 2-Z-Substack-Projektion: Prozessierungslinie und Image-J-*particle-analyzer*-Makro

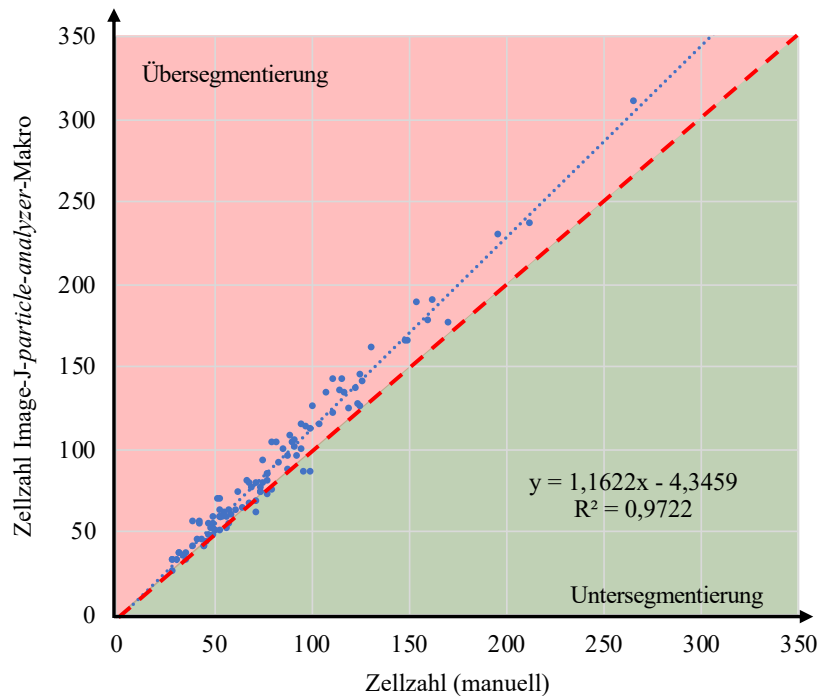
Analog zur Verfahrenstestung des Image-J-*particle-analyzer*-Makros in der Max-Projektion wurde die KI-gestützte Prozessierungslinie in der 2-Z-Substack-Projektion an Bildmaterial getestet. Die Zellkernerkennung wurde bereits in Kapitel 3.2.2 visuell beurteilt. Zur weiteren Prüfung wurden 100 2-Z-Substacks von 54 Knotenpunkten und 46 Hohlfasern durch diese ausgezählt und das Ergebnis mit der manuellen Auszählung der Projektionen (Referenz) verglichen. Die gleiche Prüfung wurde vergleichend mit dem Image-J-*particle-analyzer*-Makro in der 2-Z-Substack-Projektion durchgeführt. Die Prüfungsdaten sind im Anhang einsehbar (Kapitel 10.5).

Die Korrelation der Quantifizierungsdaten der Prozessierungslinie mit der manuellen Auszählung zeigte im Streudiagramm (Graph 3.2.2) ein Bestimmtheitsmaß (R^2) von 0,96 bei einer Pearson-Korrelation (R) von 0,98. Es zeigte sich eine mittlere prozentuale Abweichung gegenüber der Referenzzählung von $11,61\% \pm 7,27\%$. Das neuronale Netzwerk wies in 75% der Fälle eine Überzählung bzw. Übersegmentierung und in 21% der Fälle eine Unterzählung bzw. Untersegmentierung auf.



Graph 3.2.2 Streudiagramme zur Darstellung der Korrelation zwischen Auszählung der 2-Z-Substacks durch die Prozessierungslinie und der manuellen Auszählung als Referenz. Die automatische Auszählung ist gegen die korrespondierende manuelle Auszählung aufgetragen. Die rot gestrichelte Linie repräsentiert die Idealgerade, die blau gepunktete Linie die Regressionsgerade der Messpunkte.

Die Analyse der Auszählung der 2-Z-Substacks über das Image-J-*particle-analyzer*-Makro zeigte in der Korrelation mit der manuellen Auszählung (Referenz) ein Bestimmtheitsmaß (R^2) von 0,97 (Graph 3.2.3). Der Pearson-Korrelationskoeffizient (R) lag bei 0,99. Es ergab sich eine mittlere prozentuale Abweichung gegenüber der Referenz von $12,05\% \pm 8,84\%$. In 79% der Fälle wurde übersegmentiert, in 16% untersegmentiert.



Graph 3.2.3 Streudiagramme zur Darstellung der Korrelation zwischen Auszählung der 2-Z-Substacks durch das Image-J-*particle-analyzer*-Makro und der manuellen Auszählung als Referenz. Die automatische Auszählung ist gegen die korrespondierende manuelle Auszählung aufgetragen. Die rot gestrichelte Linie repräsentiert die Idealgerade, die blau gepunktete Linie die Regressionsgerade der Messpunkte.

Zusammengefasst zeigten beide Verfahren anhand der gemessenen Korrelationswerte einen starken linearen Zusammenhang mit der manuellen Auszählung. Die Abweichungen und Streuungen der Verfahren glichen sich und lagen im tolerablen Bereich.

3.2.3.1 Kolokalisationsanalyse der 2-Z-Substack-Projektionen

Bei der Auszählung der Zellen in der 2-Z-Substack Projektion kommt es vor, dass Zellen mit größeren Zellkernen in zwei aufeinanderfolgenden 2-Z-Substacks auftreten und somit doppelt gezählt werden. Um das Ausmaß eines potentiellen Fehlers durch Doppelzählung zu quantifizieren, wurden 44 aufeinanderfolgende 2-Z-Substacks von zehn Knotenpunkten und Hohlfasern beider MOs untersucht. Die Kolokalisation wurde als Fraktion der kolokalisierten Fläche an der Gesamtfläche der Zellkernstrukturen angegeben (KO-Fraktion). Des Weiteren wurden die Kolokalisationskarten

morphologisch auf Doppelzählungen untersucht (Abbildung 3.2.4). Um den Einfluss auf die Zellzahlquantifizierung zu bestimmen, wurden die Doppelzählungen ins Verhältnis mit der Zellsumme der benachbarten 2-Z-Substack-Projektionen gesetzt (DP-Fraktion).

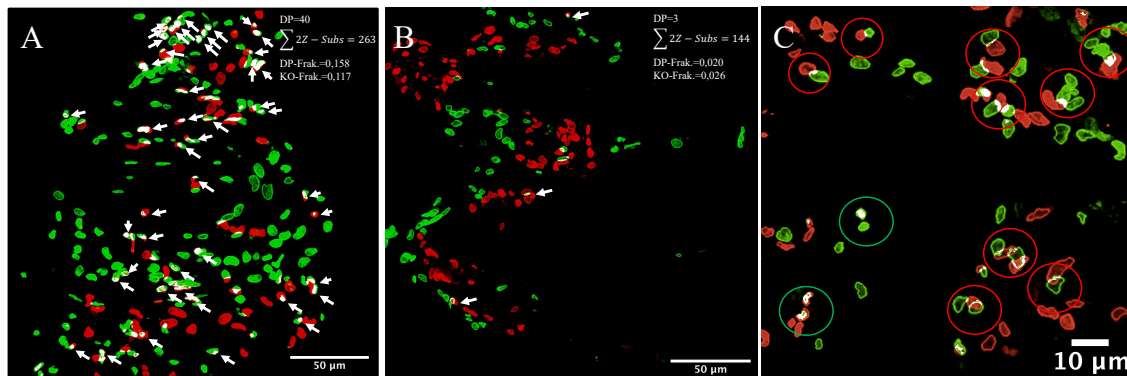


Abbildung 3.2.4 Darstellung der Kolokalisationskarten benachbarter 2-Z-Substacks. Zellkerne der unteren Ebene sind rot und die der oberen grün markiert sind. Kolokalisierte Zellkernstrukturen sind weiß markiert. [A] Abbildung eines Knotenpunktes mit verhältnismäßig hoher Kolokalisation und Markierung (weißer Pfeil) von Doppelzählungen (40). Angabe der Zellsumme der benachbarten 2-Z-Substacks ($\sum ZZ - Subs$), der Fraktion der Doppelzählungen (DP-Frak.) an der gesamten Zellsumme und Fraktion der kolokalisierten Fläche an der gesamten Zellkernfläche (KO-Frak.). [B] Abbildung einer Stelle mit vermehrter Zellablagerung auf einer Hohlfasel mit Markierung der Doppelzählungen (3). Angaben siehe [A]. [C] Kollage verschiedener Bereiche von Hohlfasern und Knotenpunkten mit kolokalisierten Flächen. Die mit roten Kreisen markierten Zellen sind aufgrund ihrer Morphologie nicht als Doppelzählung auszuwerten. Die Zellen in den grünen Kreisen sind aufgrund der Kongruenz der kolokalisierten Flächen (weiß) als Doppelzählung zu interpretieren.

Wie in Tabelle 3.2.1 einzusehen ist, zeigt sich bei den Knotenpunkten eine mittlere Fraktion kolokalisierte Fläche von $0,05 \pm 0,03$. Bei den Hohlfasern zeigte sich eine Fraktion von $0,02 \pm 0,02$. Eine Doppelzählung trat bei den Knotenpunkten zu einem Anteil von $0,05 \pm 0,03$ und bei den Hohlfasern zu einem Anteil von $0,04 \pm 0,03$ auf.

Tabelle 3.2.1 Auflistung der Kolokalisationsdaten

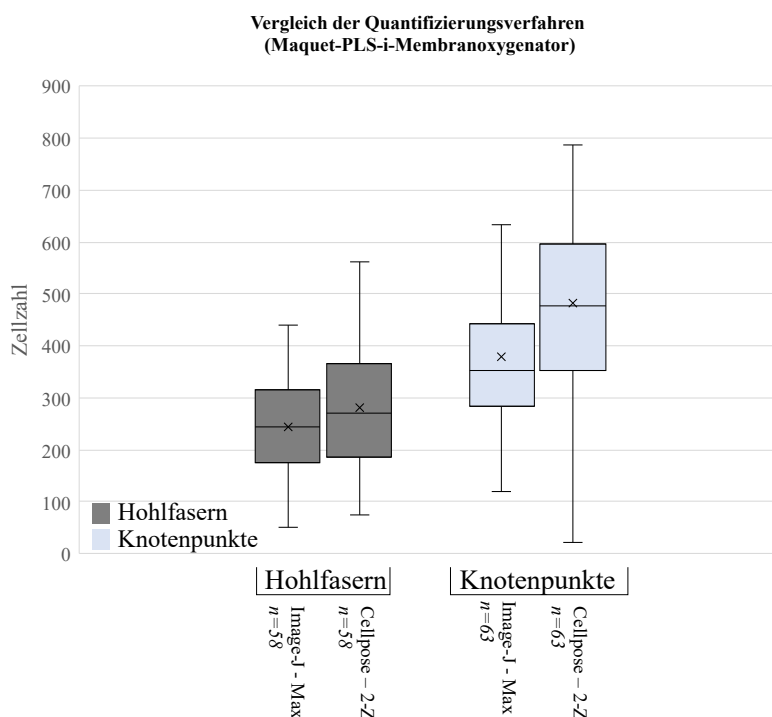
Stelle	Knotenpunkte (n=10)	Hohlfasern (n=10)
Untersuchte 2-Z-Substacks	n=44	n=44
Mittelwert-KO-Fraktion \pm SD	$0,05 \pm 0,03$	$0,02 \pm 0,02$
Mittelwert-DP-Fraktion \pm SD	$0,05 \pm 0,03$	$0,04 \pm 0,03$

*KO-Fraktion = $\frac{\text{kolokalisierte Zellkernfläche}}{\text{Gesamte-Zellkernfläche}}$, DP-Fraktion = $\frac{\text{Doppelzählungen}}{\text{Summe benachbarter 2Z-Substacks}}$, SD=Standardabweichung

3.2.4 Vergleich der Verfahren: Max-Projektion und 2-Z-Substack-Projektion

Um Unterschiede zwischen der zuerst angewendeten Gesamtzellzahlquantifizierung durch das Image-J-particle-analyser-Makro in der Max-Projektion und der optimierten Auszählung durch die Prozessierungslinie in der 2-Z-Substack-Projektion aufzudecken,

wurden die Auszählungsdaten von 58 Hohlfaserstellen und 63 Knotenpunkten des M-MOs nach Analyse durch beide Verfahren miteinander verglichen (Graph 3.2.4). Für die Prozessierungslinie wurden jeweils die Auszählungsergebnisse der 2-Z-Substack-Projektionen summiert und als Maß für die jeweilige Gesamtzellzahl der Prädilektionsstelle herangezogen. Die durchschnittliche, durch die Prozessierungslinie in der 2-Z-Substack-Projektion ausgezählte Gesamtzellzahl auf den Hohlfaserstellen ist im Vergleich zu der Auszählung durch das Makro in der Max-Projektion leicht erhöht. Die Spannweiten beider Verfahren ähneln sich. Die durchschnittliche Gesamtzellzahl der Knotenpunkte ist bei der Auszählung durch die Prozessierungslinie in der 2-Z-Substack-Projektion wesentlich höher und die Spannweite der Werte ist größer.



Graph 3.2.4 Kastendiagramme zur vergleichenden Darstellung der Gesamtzellzahlen von Knotenpunkten und Hohlfasern des untersuchten M-MOs bei Quantifizierung der Max-Projektionen durch die Image-J-*particle-analyzer*-Makro und Quantifizierung der 2-Z-Substacks durch die Prozessierungslinie. Strich=Median, X=Mittelwert, Box=Interquartilabstand (IQR), oberer/unterer Whisker (OW/UW) $\approx 1,5 \times \text{IQR}$. **Hohlfasern: Image-J-*particle-analyzer*-Makro Max-Projektion** Median=244, Mittelwert=244 **Cellpose 2-Z-Substacks** Median=270, Mittelwert=280. **Knotenpunkte: Image-J-*particle-analyzer*-Makro Max-Projektion** Median=352, Mittelwert=379. **Cellpose- 2-Z-Substacks** Median=477, Mittelwert=484.

3.3 Datenauswertung der Gesamtzellzahlanalyse

Nach dem Vergleich der Quantifizierungsverfahren wurde die KI-gestützte Prozessierungslinie in der 2-Z-Substack-Projektion aufgrund hoher Korrelation mit der Referenzzählung und adäquater Zellkernerkennungsrate für die weitere Gesamtzellzahlquantifizierung der untersuchten Prädilektionsstellen verwendet. Um das

Ausmaß der Zellbesiedlung auf Hohlfaser- und Knotenpunkt-Prädilektionsstellen zu erfassen, wurde das an beiden Oxygenatoren akquirierte Bildmaterial analysiert.

Als Maß für die Menge der jeweiligen Zellablagerungen an den Prädilektionsstellen wurden die Zellsummen ihrer 2-Z-Substacks herangezogen. Nach der Prozessierung wurden die segmentierten Bilder begutachtet und, wenn nötig, manuelle Optimierungen vorgenommen. Wie aus der Tabelle 3.3.1 zu entnehmen ist, wurden beim hier untersuchten M-MO 121 Scans von Prädilektionsstellen aufgenommen. Beim untersuchten E-MO waren es 120 Scans.

Tabelle 3.3.1 Auszählungsdaten der *Cellpose*-Prozessierungslinie

	Maquet-PLS-i	Eurosets- <i>adult</i>	Gesamt
Scans-Insgesamt	n=121	n=120	n=241
Knotenpunkte	n=63	n=60	n=123
Hohlfasern	n=58	n=60	n=118
KI-analyisierte Substacks	n=617	n=600	n=1217

Im Folgenden werden die Ergebnisse der KI-gestützten Gesamtzellzahlquantifizierung dargestellt. Es zeigten sich in den untersuchten Gruppen regellos normal- und nicht normalverteilte Daten (Kapitel 10.5). Zur Hypothesenfindung wurden statistische Vergleiche der Gruppen entsprechend der Methoden aus Kapitel 2.2.10 angewendet. Die p-Werte sind in den Abbildungen mit Kürzeln dargestellt und werden in Tabelle 3.3.2 aufgeschlüsselt. Die Datentabellen und Teststatistiken sind im Anhang einsehbar (Kapitel 10.5).

Tabelle 3.3.2 Kennzeichnung der p-Werte

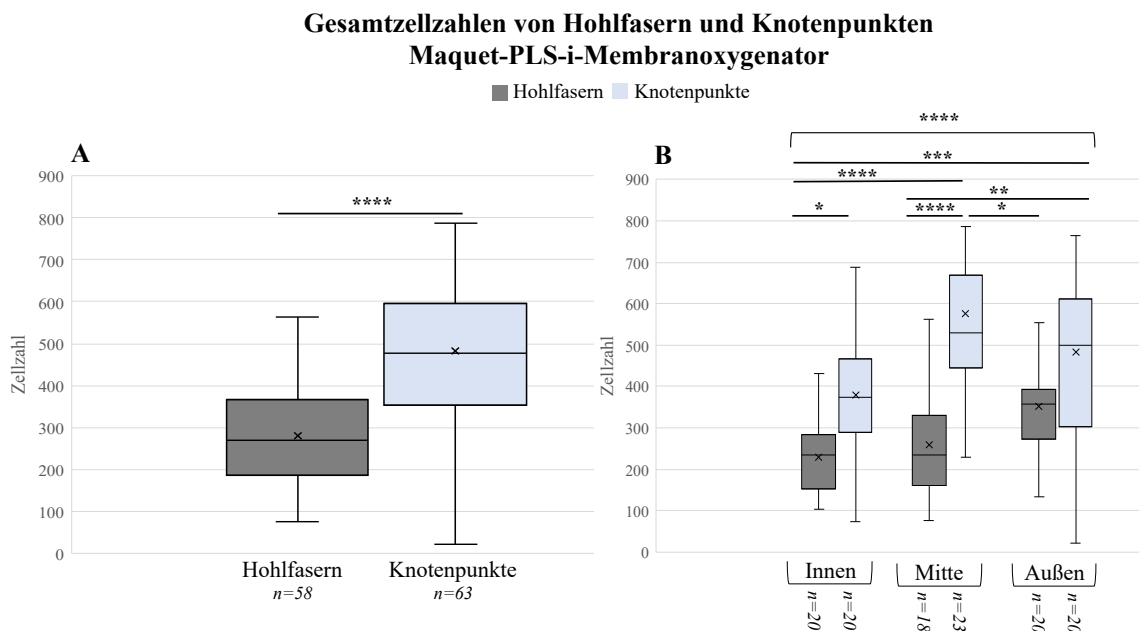
Kürzel	p-Wert
n	>0,05
*	<0,05
**	<0,01
***	<0,001
****	<0,0001

3.3.1 Gesamtzellzahlanalyse – Maquet-PLS-i-Membranoxygenator

Um herauszufinden, ob bei dem hier untersuchten M-MO Zellen vermehrt an Knotenpunkten oder Hohlfasern adhäreren, wurden die erhobenen Gesamtzellzahlen gepoolt und miteinander verglichen (Kapitel 2.2.10).

In der Analyse aller Hohlfaser- und Knotenpunkt-Scans befanden sich mit durchschnittlich 484 ± 218 ausgezählten Zellkernen die meisten Zellen im Bereich der Knotenpunkte. Auf den Hohlfasern waren es im Mittel 280 ± 121 Zellkerne (Graph 3.3.1 [A]). Um Unterschiede der Zellablagerung auf Hohlfasern und Knotenpunkten entlang des Oxygenator-Blutflusses zu untersuchen, wurden verschiedene Oxygenatorbereiche miteinander verglichen.

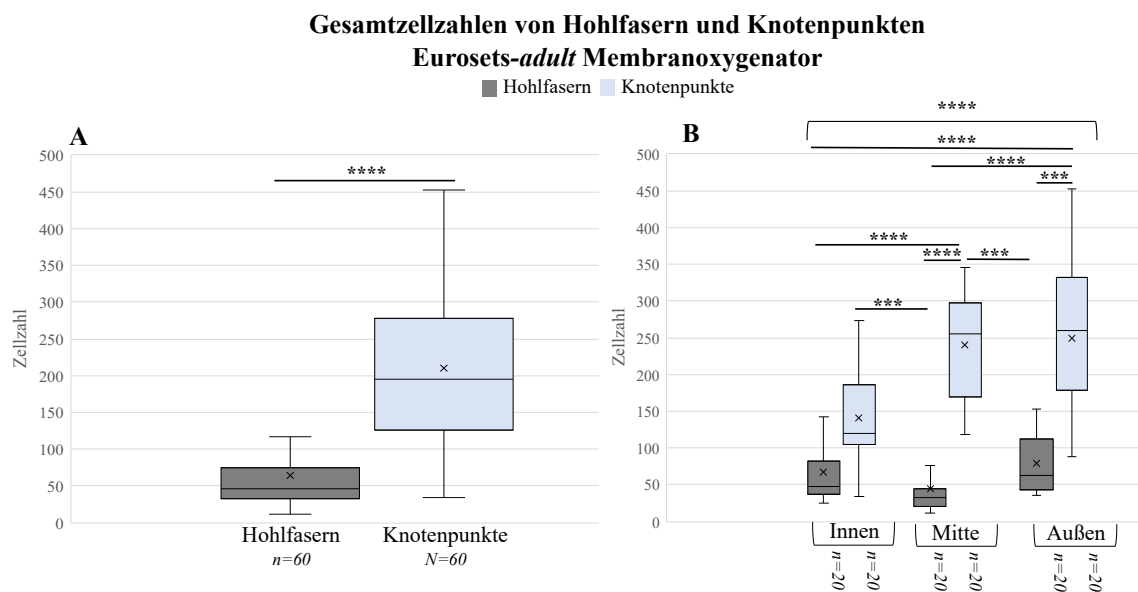
Im Graph 3.3.1 [B] sind die Ergebnisse der Gesamtzellzahlquantifizierung verschiedener Oxygenatorbereiche dargestellt. Die Knotenpunkte beinhalteten im Vergleich zu den korrespondierenden Hohlfasern in allen Oxygenatorbereichen höhere durchschnittliche Zellzahlen. Insgesamt zeigte sich ein Trend zu vermehrter Zellablagerung im mittleren bis äußeren Bereich des Oxygenators. Die höchste durchschnittliche Zellmenge fand sich mit 575 ± 204 Zellen in den Knotenpunkten des mittleren Oxygenatorbereichs. Auf Hohlfasern des inneren Bereichs wurde mit durchschnittlich 229 ± 97 Zellen die geringste Zellzahl ausgezählt. Knotenpunkte des äußeren Bereichs wiesen mit Zellzahlen von 22 bis 1182 die größte Spannweite auf.



Graph 3.3.1 Kastendiagramme zur Darstellung der durchschnittlichen Gesamtzellzahl von Prädelektionsstellen auf Hohlfasern und Knotenpunkten des untersuchten M-MOs. Strich=Median, X=Mittelwert, Box=Interquartilabstand (IQR), oberer/unterer Whisker (OW/UW) $\approx 1,5 \times IQR$. [A] gepoolte Analyse. Linie=Ergebnis Man-Whitney-U-Test [B] Gruppenanalyse der verschiedenen Oxygenatorbereiche. Eckige Klammer=Ergebnis Kruskal-Wallis-Test, Linien=Ergebnisse des multiplen Vergleichs. Die Lageparameter sind in Kapitel 10.5 einsehbar.

3.3.1 Gesamtzellzahlanalyse – Eurosets-*adult*-Membranoxygenator

Die Gesamtzellzahlquantifizierung des hier untersuchten E-MOs zeigte in der gepoolten Analyse ebenfalls eine höhere Zellmenge in den Knotenpunkten (210 ± 98 Zellen) im Vergleich zu den Hohlfasern (63 ± 46 Zellen) (Graph 3.3.2 [A]). Der Graph 3.3.2 [B] stellt die Ergebnisse der Gesamtzellzahlquantifizierung verschiedener Oxygenatorbereiche dar. In allen Bereichen fand sich eine höhere Zellzahl auf Knotenpunkten im Vergleich zu den Hohlfaserstellen. Bei beiden untersuchten Prädilektionsstellen zeigte sich ein Trend zur erhöhten Zellablagerung im äußeren Bereich des untersuchten E-MOs. Die höchste durchschnittliche Zellmenge fand sich mit 250 ± 103 Zellen in Knotenpunkten des äußeren Bereichs. Auf Hohlfasern des mittleren Bereichs wurde mit 44 ± 41 Zellen die geringste durchschnittliche Zellmenge ausgezählt. Die größte Spannweite präsentierten die ausgezählten Zellzahlen in Knotenpunkten des äußeren Bereichs (88–453 Zellen).



Graph 3.3.2 Kastendiagramm zur Darstellung der durchschnittlichen Gesamtzellzahl von Prädilektionsstellen auf Hohlfasern und Knotenpunkten des untersuchten E-MOs. Strich=Median, X=Mittelwert, Box=Interquartilabstand (IQR), oberer/unterer Whisker (OW/UW) $\approx 1,5 \times \text{IQR}$. [A] gepoolte Analyse. Linie=Ergebnis Man-Whitney-U-Test [B] Gruppenanalyse der verschiedenen Oxygenatorbereiche. Eckige Klammer=Ergebnis Kruskal-Wallis-Test, Linien=Ergebnisse des multiplen Vergleichs. Die Lageparameter sind in Kapitel 10.5 einsehbar.

3.4 Identifikation von Zelltypen auf der PMP-Membran

3.4.1 Bildqualität

Zur Darstellung von Leukozyten (CD45), Makrophagen (CD68) und endothelialen Zellen (CD31) auf Prädilektionsstellen der ECMO-Membranpräparate wurden Immunfluoreszenzfärbungen gegen zelltypenspezifische Membranproteine angewendet (Kapitel 2.2.4). Die eingesetzten Immunfluoreszenzfärbungen erreichten in der konfokalmikroskopischen Untersuchung eine adäquate Intensität und Spezifität. Wie in Abbildung 3.4.1 zu erkennen ist, lieferte die Max-Projektion analog zur Gesamtzellzahlquantifizierung aufgrund der hohen Zelldichte und der damit verbundenen schlechteren Differenzierbarkeit der markierten Zellmembranen keine auszählbare Auflösung. Die Auszählung der Zelltypen wurde daher ebenfalls in der 2-Z-Substack-Projektion durchgeführt.

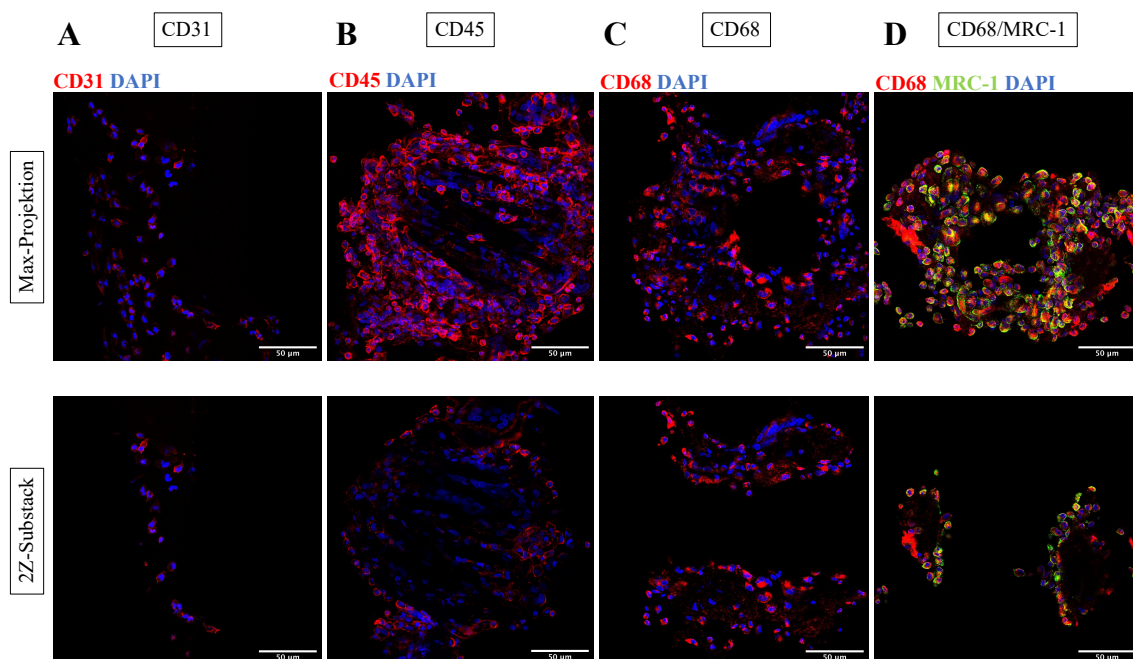


Abbildung 3.4.1 Darstellung der durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen in verschiedenen Projektionsformen. Die Färbungen zur Markierung CD31⁽⁺⁾[A], CD45⁽⁺⁾[B], CD68⁽⁺⁾[C] und CD68/MRC-1⁽⁺⁾[D] Zellen zeigte eine adäquate Intensität. Die Auszählung erfolgte aufgrund schlechter Differenzierbarkeit der Max-Projektion in der 2-Z-Substack-Projektion.

Bei jeder der vier angewendeten Färbungen (CD31-, CD45-, CD68-, CD68/MRC-1) fanden sich auf untersuchten Prädilektionsstellen zu einem geringen Anteil Bereiche mit unspezifischem Fluoreszenzsignal. Diese präsentierten sich als schleierartige, zum Teil Zellkern übergreifende Schlieren (Abbildung 3.4.2). Jede Zelle wurde nach den Kriterien aus Kapitel 2.2.9 geprüft und bei diffuser, uneindeutiger Membranmarkierung nicht

ausgezählt. Insbesondere zeigten sich bei der CD31-Färbung in den Bereichen mit diffuser Fluoreszenz rundliche Zellkern-lose Strukturen mit einem Durchmesser von etwa 1,92 - 3,32 μm (Abbildung 3.4.2 [C]). Diese bildeten zum Teil Konjugate mit ebenfalls CD31⁽⁺⁾ kernhaltigen Zellen (Abbildung 3.4.2 [F]), die typische leukozytäre Zellkernformen aufwiesen. Die Färbung CD68⁽⁺⁾ Zellen lieferte bei der Probe des äußeren Oxygenatorbereichs des E-MOs kein adäquates Fluoreszenzsignal und wurde daher nicht in die Daten aufgenommen.

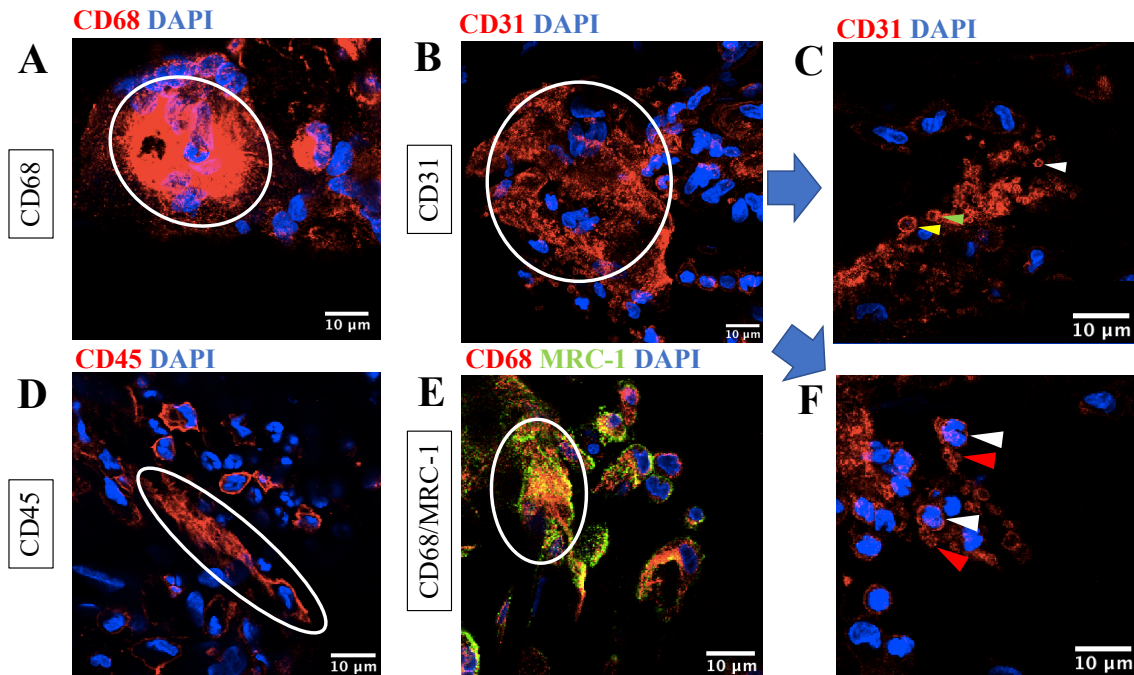


Abbildung 3.4.2 Abbildung unspezifischer Fluoreszenzsignale bei den Markierungen CD31⁽⁺⁾[B]/[C]/[F], CD45⁽⁺⁾[D], CD68⁽⁺⁾[A] und CD68/MRC-1⁽⁺⁾ [E] Strukturen. Bei jeder der durchgeführten Färbungen traten zu einem geringen Anteil schleierartige, Zellkern übergreifende Strukturen auf (weißer Kreis). [C] Bei unspezifischer Fluoreszenz der CD31-Färbung waren rundliche, Zellkern-lose Strukturen zu erkennen. Durchmesser der mit Pfeilspitzen markierten Strukturen: weiß=1,92 μm , grün=2,40 μm , gelb=3,32 μm . [F] Es fanden sich Konjugate aus membranständig CD31-markierten kernhaltigen Zellen (weiße Pfeilspitze, nierenförmiger Zellkern) und CD31⁽⁺⁾, Zellkern-losen rundlichen Strukturen (rote Pfeilspitze).

3.4.1.1 Blockierung unspezifischer Primärantikörperbindung

Um die diffusen Immunofluoreszenz-Signale zu minimieren, wurde die Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen mittels BSA erprobt. Dabei wurde die Primärantikörperlösung bei einer Färbung CD45⁽⁺⁾ Zellen des inneren Bereichs des M-MOs mit BSA versetzt. Es zeigte sich, dass in Präparaten mit und ohne BSA-Blockierung eine gleichwertige Bildqualität besteht (Abbildung 3.4.3). In beiden Präparaten waren vereinzelt Stellen mit diffusem Fluoreszenzsignal erkennbar. Die BSA-Blockierung eignet sich somit nicht zur Minimierung unspezifischer Fluoreszenzsignale.

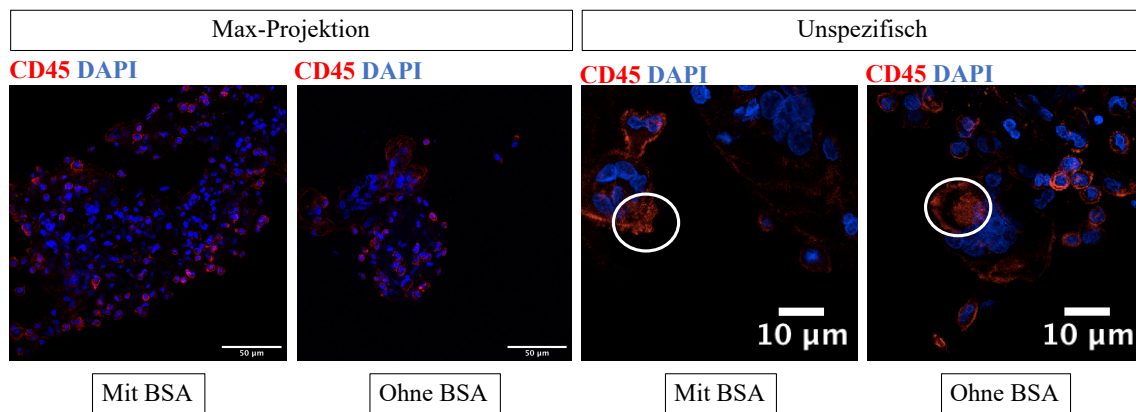


Abbildung 3.4.3 Darstellung der Immunfluoreszenzfärbung CD45⁽⁺⁾ Zellen im inneren Bereich des M-MOS unter Einsatz von BSA zur Minimierung unspezifischer Fluoreszenzsignale. Die Qualität der Färbung ist in Präparaten mit und ohne Einsatz von BSA gleichwertig. In den untersuchten Proben zeigten sich in beiden Gruppen Bereiche mit unspezifischer Fluoreszenz.

3.4.2 Evaluation des *channel-analyzer*-Makros zur Zelltypisierung

Um die Anteile der markierten Zelltypen automatisch zu bestimmen, wurde das *channel-analyzer*-Makro im Programm Image-J getestet. Zunächst wurde die Funktionsweise visuell beurteilt. Das Makro segmentiert die Zellkerne über die gleiche Funktion wie das *image-j-particle-analyzer*-Makro. Es identifiziert die Zellkernmasken über die *analyze-particles* Funktion und vergrößert diese in einem zweiten Schritt, um eine Intensitätsmessung der Membranfärbung durchführen zu können. Wie bereits in Kapitel 3.2.1 erläutert, führt eine Segmentierung über diese Funktion zu einer unzureichenden Differenzierung von Zellkernen in aggregierten Bereichen. Durch die Vergrößerung der Zellkernmaske kann es außerdem dazu kommen, dass benachbarte Zellkernmasken miteinander verbunden werden. So werden mehrere Zellkerne als einer ausgezählt und die Intensität ihrer Membranfärbung zusammen gemessen (Abbildung 3.4.4). Dennoch ist diese Vergrößerungsfunktion notwendig, da die angefärbte Zellmembran dem Zellkern nicht direkt anliegt.

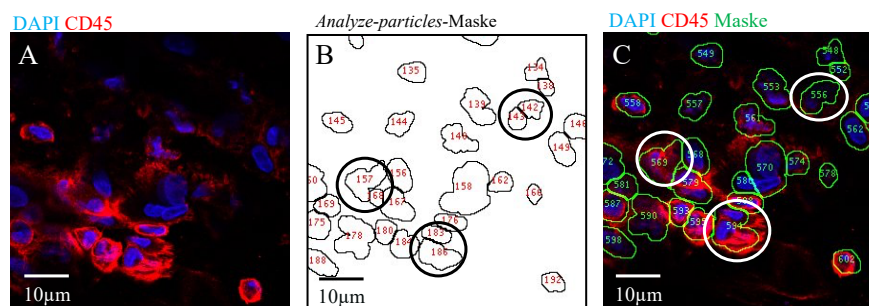
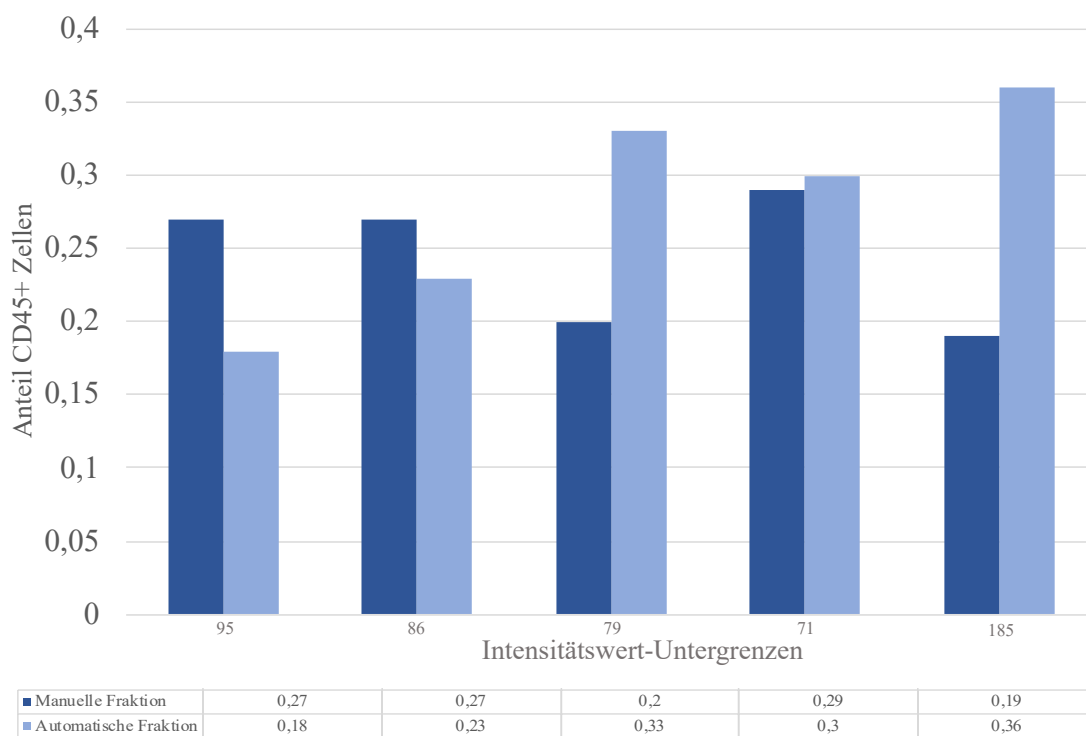


Abbildung 3.4.4 Exemplarische Darstellung der Zusammenführung von Zellkernmasken durch die Maskenerweiterung der *channel-analyzer*-Makro. [A] Originalbild mit membranständiger Markierung (CD45⁽⁺⁾). [B] Ermittlung der Zellkernmaske durch die *analyze-particles*-Funktion. Aggregierte Zellen werden zum Teil noch separiert (schwarze Kreise). [C] Nach Erweiterung der Zellkernmaske werden angrenzende Masken zu einer Maske vereinigt (weiße Kreise).

Des Weiteren gehen keine morphologischen Parameter in die Funktion ein, die zwischen dem tatsächlichen Vorliegen einer Membranfärbung und unspezifischer Fluoreszenz unterscheiden können. So können unspezifische Signale, die innerhalb der Messmaske liegen, aufgrund ihrer Intensität vom Makro als Membranmarkierung bewertet werden. Die weitere Testung des *channel-analyser*-Makros erfolgte an fünf 2-Z-Substack Projektionen mit Färbung CD45⁽⁺⁾ Zellen. Bei diesen Projektionen wurden vergleichend Auszählungen per Hand vorgenommen (Referenzzählung). Nach Messung individueller Intensitätswert-Untergrenzen (Cut-Off) und Anwendung dieser ergaben sich im Vergleich mit der manuellen Auszählung absolute Abweichungen von bis zu 17% (Graph 3.4.1). Die Pearson-Korrelation (R) von manueller mit automatisch ausgezählter Gruppe ergab einen Wert von 0,71. Aufgrund der unzureichenden Testergebnisse des Makros wurde die manuelle Auszählung als zuverlässigere Methode für die Bestimmung der Zelltypenanteile ausgewählt.



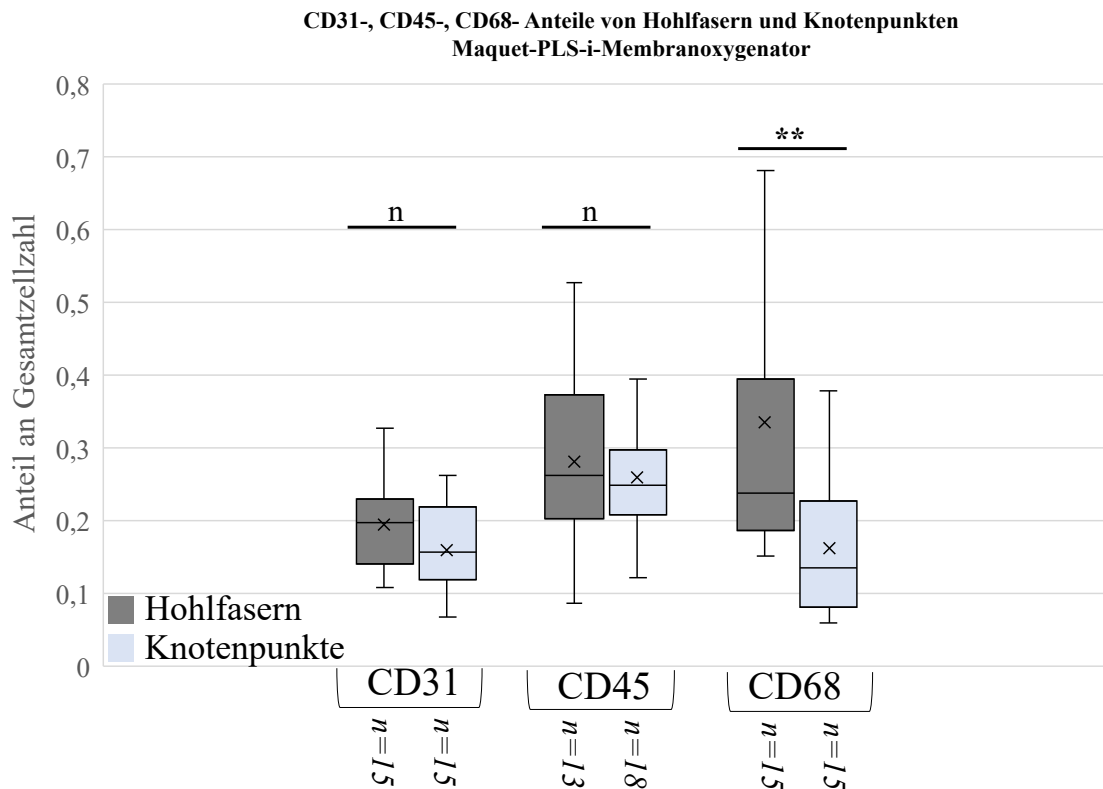
Graph 3.4.1 Säulendiagramm zur Darstellung der Anteilsbestimmung CD45⁽⁺⁾ Zellen an der Gesamtzellzahl durch manuelle und automatische Auszählung. Es sind 5 Messungen von 2-Z-Substacks nach Anwendung der vorher bestimmten Intensitäts-Untergrenze abgebildet. Es zeigen sich absolute Abweichungen des Messergebnisses von der manuellen Auszählung von bis zu 17%.

3.5 Datenauswertung der Zelltypisierung

Zur Bestimmung der Anteilsverteilung von Endothelzellen (CD31), Leukozyten (CD45) und Makrophagen (CD68) in den untersuchten Prädilektionsstellen der verschiedenen Oxygenatorbereiche wurde aufgrund mangelnder automatischer Verfahren bei beiden untersuchten Oxygenatoren eine manuelle Auszählung der markierten Zellen in den 2-Z-Substack-Projektionen durchgeführt. Die manuelle Auszählung erfolgte gemäß den Kriterien aus Kapitel 2.2.9. Anschließend wurden die positiven Zellen ins Verhältnis zur automatisch ausgezählten Gesamtzellzahl des jeweiligen Substacks gesetzt. Die Anteile aller Substacks wurden zu einem globalen Anteil positiver Zellen pro Prädilektionsstelle verrechnet. Die statistische Analyse wurde analog zu jener der Gesamtzellzahlauswertung nach den Methoden aus Kapitel 2.2.10 durchgeführt. Die Datentabellen sind im Anhang einsehbar (Kapitel 10.5).

3.5.1 Zelltypisierung – Maquet-PLS-i-Membranoxygenator

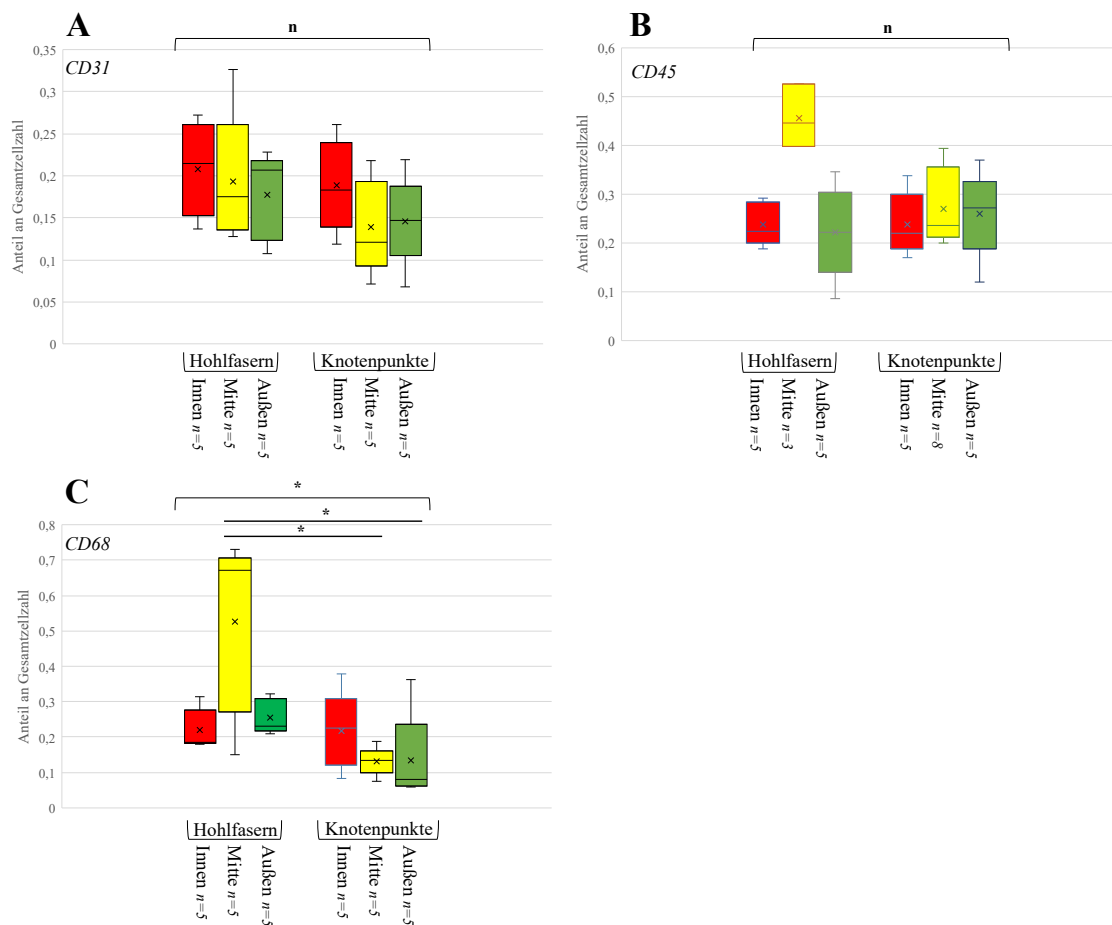
Der Graph 3.5.1 zeigt die gepoolten Anteile von CD31⁽⁺⁾, CD45⁽⁺⁾ und CD68⁽⁺⁾ Zellen auf Knotenpunkten und Hohlfasern des hier untersuchten M-MOs. Auf den Hohlfasern fanden sich mit einem Anteil von 33,38% ± 19,77% im Mittel am häufigsten CD68⁽⁺⁾ Zellen. Gefolgt von 28,17% ± 11,97% CD45⁽⁺⁾ Zellen. Den geringsten Anteil bildeten mit 19,33% ± 6% CD31⁽⁺⁾ Zellen. Bei den Knotenpunkten bildeten CD45⁽⁺⁾ Zellen mit im Mittel 25,82% ± 7,41% den größten Anteil. CD31⁽⁺⁾ und CD68⁽⁺⁾ Zellen waren mit durchschnittlich 15,78% ± 5,54% und 16,09% ± 10,18% zu etwa gleichen Anteilen zu finden. Die größte Spannweite wiesen die gemessenen Anteile CD68⁽⁺⁾ Zellen auf den Hohlfasern auf (14,91%-73,12%). Die durchschnittlichen Anteile markierter Zellen waren auf den Hohlfasern im Vergleich zu den Knotenpunkten bei allen angewendeten Färbungen höher. Insgesamt verbleiben große Anteile ungefärbter Zellen.



Graph 3.5.1 Kastendiagramme zur vergleichenden Darstellung der Anteile CD31⁽⁺⁾, CD45⁽⁺⁾ und CD68⁽⁺⁾ Zellen von Hohlfasern und Knotenpunkten des untersuchten M-MOs. Strich=Median, X=Mittelwert, Box=Interquartilabstand (IQR), oberer/unterer Whisker (OW/UW)≈1,5xIQR. Linien=Ergebnis Man-Whitney-U-Test. Die Lageparameter sind in Kapitel 10.5 einsehbar.

Der Graph 3.5.2 veranschaulicht die Anteile CD31⁽⁺⁾, CD45⁽⁺⁾ und CD68⁽⁺⁾ Zellen auf Knotenpunkten und Hohlfasern in verschiedenen Bereichen des untersuchten M-MOs. Der höchste durchschnittliche Anteil CD31⁽⁺⁾ Zellen fand sich mit 20,84% ± 5,59 auf den Hohlfasern des inneren Oxygenatorbereichs. Im Gegensatz dazu fand sich mit 13,89% ± 5,61% der geringste Anteil CD31⁽⁺⁾ Zellen auf Knotenpunkten des mittleren Bereichs. Die Verteilung der Anteile CD45⁽⁺⁾ Zellen auf Knotenpunkten und Hohlfasern ähneln sich stark. Die Mittelwerte schwanken in einem geringen Bereich von 22,11% ± 9,52% (Hohlfasern Außen) bis 26,99% ± 7,67 (Knotenpunkte Mitte). Eine Ausnahme bildet der CD45-Anteil auf Hohlfasern des mittleren Bereichs. Er liegt bei 45,61% ± 6,51%. Die Verteilung CD68⁽⁺⁾ Zellen auf Hohlfasern und Knotenpunkten der verschiedenen Oxygenatorbereiche reicht von 13,11% ± 4,02% (Knotenpunkte Mitte) bis 52,52% ± 24,83% (Hohlfasern Mitte). Die Verteilung der Werte auf Hohlfasern des mittleren Bereichs weist eine auffällig große Spannweite auf.

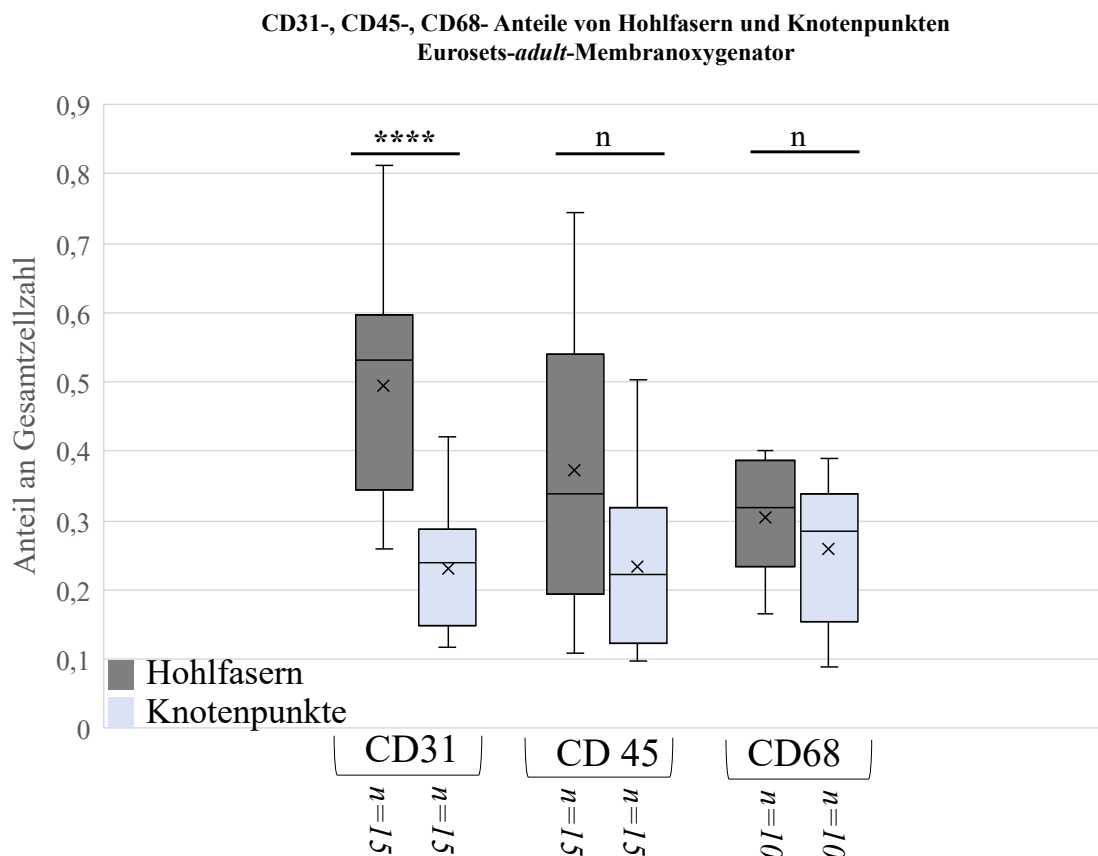
CD31-, CD45-, CD68- Anteile verschiedener Oxygenatorbereiche
Maquet-PLS-i-Membranoxygenator



Graph 3.5.2 Kastendiagramme zur vergleichenden Darstellung der Anteile CD31⁽⁺⁾[A], CD45⁽⁺⁾[B] und CD68⁽⁺⁾[C] Zellen bei Hohlfasern und Knotenpunkten verschiedener Oxygenatorbereiche des untersuchten M-MOs. Strich=Median, X=Mittelwert, Box=Interquartilabstand (IQR), oberer/unterer Whisker (OW/UW)≈1,5xIQR. Eckige Klammer=Ergebnis Kruskal-Wallis-Test, Linien=Ergebnisse des multiplen Vergleichs. Die Lageparameter sind in Kapitel 10.5 einsehbar.

3.5.2 Zelltypisierung – Eurosets-adult-Membranoxygenator

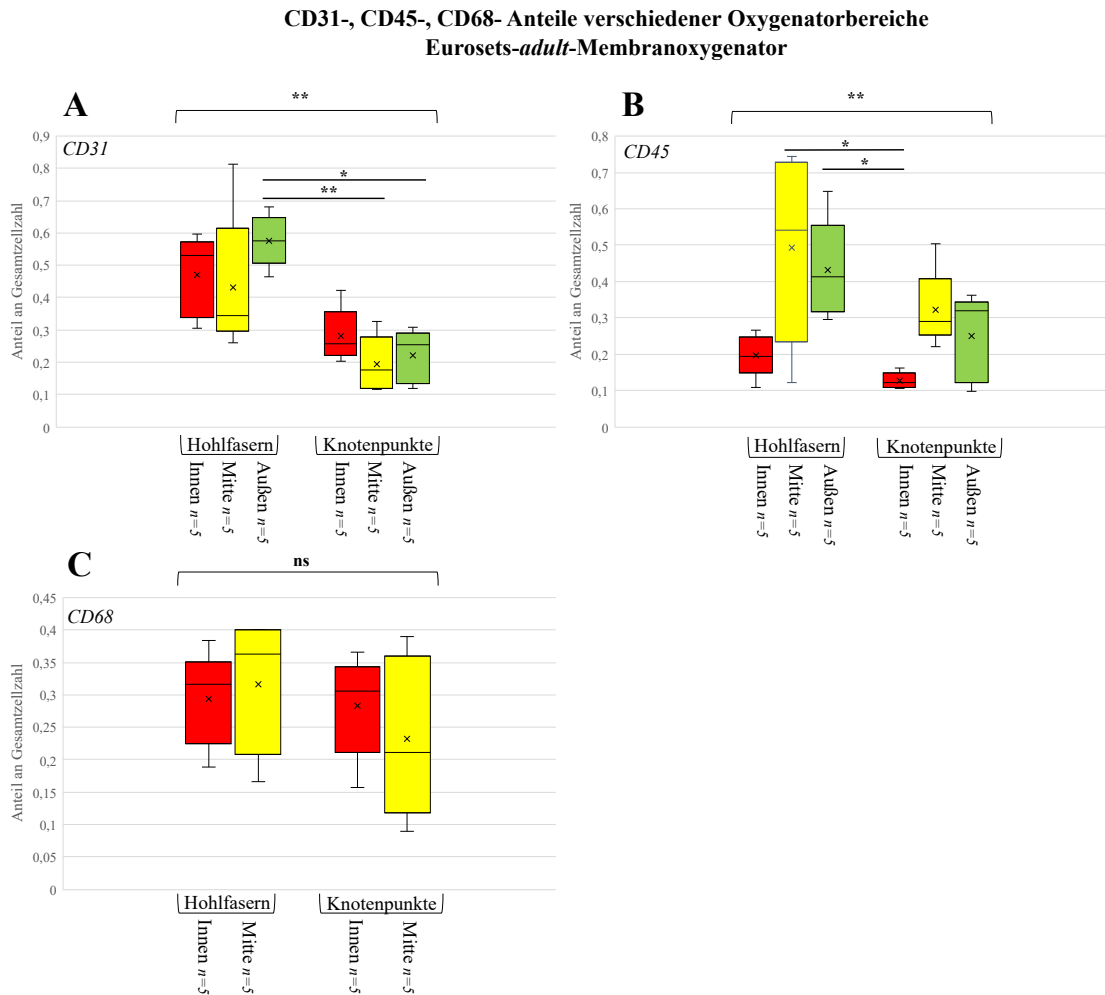
Die Anteile der markierten Zellpopulationen des untersuchten E-MOs sind in Graph 3.5.3 dargestellt. Auf Hohlfasern waren CD31⁽⁺⁾ Zellen mit einem durchschnittlichen Anteil von 49,34% ± 15,51% am häufigsten vertreten. Es zeigt sich ein starker Unterschied zum Anteil CD31⁽⁺⁾ Zellen in Knotenpunkten, der durchschnittlich bei 23,11% ± 8,62% lag. Auf den untersuchten Hohlfaserstellen waren 37,32% ± 20,80% CD45⁽⁺⁾ und 30,49% ± 8,54% CD68⁽⁺⁾ Zellen zu beobachten. Bei Knotenpunkten fanden sich 23,24% ± 11,95% CD45⁽⁺⁾ und 25,78% ± 10,22% CD68⁽⁺⁾ Zellen. Die Knotenpunkte wiesen im Durchschnitt geringere Anteile der markierten Zellpopulationen auf. Die gemessenen Anteile CD45⁽⁺⁾ Zellen auf Hohlfasern des mittleren Bereichs zeigten die größte Spannweite (10,91%-74,36%).



Graph 3.5.3 Kastendiagramme zur vergleichenden Darstellung der Anteile CD31⁽⁺⁾, CD45⁽⁺⁾ und CD68⁽⁺⁾ Zellen von Hohlfasern und Knotenpunkten des untersuchten E-MOs. Strich=Median, X=Mittelwert, Box=Interquartilabstand (IQR), oberer/unterer Whisker (OW/UW)≈1,5xIQR. Linien=Ergebnis Man-Whitney-U-Test. Die Lageparameter sind in Kapitel 10.5 einsehbar.

Im Graph 3.5.4 sind die Anteile CD31⁽⁺⁾, CD45⁽⁺⁾ und CD68⁽⁺⁾ Zellen in verschiedenen Bereichen des untersuchten E-MOs dargestellt. Die Anteile CD31⁽⁺⁾ Zellen reichen hier von 19,36% ± 8,71 (Knotenpunkte Mitte) bis 57,65% ± 8,01% (Hohlfasern außen). Die untersuchten Hohlfaserstellen der verschiedenen Bereiche weisen im Vergleich zu den korrespondierenden Knotenpunkten durchschnittlich einen höheren Anteil auf. Die Anteile CD45⁽⁺⁾ Zellen weisen auf Hohlfasern und Knotenpunkten der verschiedenen Bereiche gleiche Trends auf. Der geringste Anteil findet sich dabei im inneren Bereich, gefolgt vom äußeren und mittleren Bereich, der mit 49,22% ± 26,10% auf den Hohlfasern und 32,18% ± 10,70% auf den Knotenpunkten den höchsten Anteil repräsentiert. Bei der Markierung CD68⁽⁺⁾ Zellen fanden sich mit 31,61% ± 10,37% die meisten Zellen auf Hohlfasern des mittleren Bereichs. Der geringste Anteil fand sich mit 23,30% ± 12,51% auf Knotenpunkten des mittleren Bereichs. Wie im Kapitel 3.4.1 erwähnt wurden die Daten CD68⁽⁺⁾ Zellen des äußeren Oxygenatorbereichs aufgrund

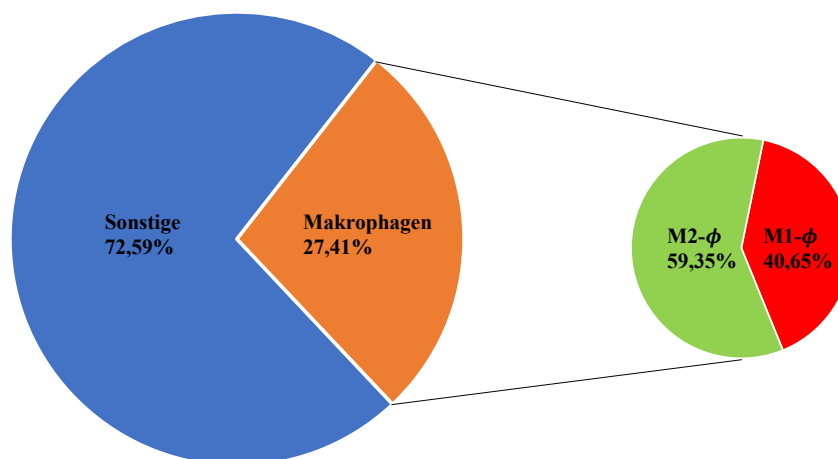
inadäquater Bildqualität von der Analyse ausgeschlossen. Insgesamt fand sich bei diesem Oxygenator im Vergleich zum untersuchten M-MO eine größere Schwankung zwischen den Anteilen markierter Zellen verschiedener Oxygenatorbereiche.



Graph 3.5.4 Kastendiagramme zur vergleichenden Darstellung der Anteile CD31⁽⁺⁾[A], CD45⁽⁺⁾[B] und CD68⁽⁺⁾[C] Zellen bei Hohlfasern und Knotenpunkten verschiedener Oxygenatorbereiche des untersuchten E-MOs. Strich=Median, X=Mittelwert, Box=Interquartilabstand (IQR), oberer/unterer Whisker (OW/UW)≈1,5xIQR. Eckige Klammer=Ergebnis Kruskal-Wallis-Test, Linien=Ergebnisse des multiplen Vergleichs. Die Lageparameter sind in Kapitel 10.5 einsehbar.

3.5.3 Zelltypisierung – Makrophagen-Polarisation

Makrophagen können sich je nach umgebendem Zytokinmilieu in eine pro (M1)- oder anti-inflammatorische (M2) Form polarisieren ⁷⁴. Diese Makrophagen-Polarisation könnte ein wertvoller Indikator für die Art der ablaufenden Entzündungsreaktion auf der PMP-Membran sein und über die Sekretion pro- oder anti-inflammatorischer Zytokine einen maßgeblichen Einfluss auf den Behandlungsverlauf des Patienten haben. In diesem Experiment wurden exemplarisch 15 Hohlfaser-Prädilektionsstellen aus dem mittleren Teil des M-MOs hinsichtlich der Polarisation adhärerender Makrophagen untersucht. Die Auszählung erfolgte in 2-Z-Substacks mit anschließender Summierung und Berechnung der Anteile markierter Zellen für die jeweiligen Prädilektionsstellen. Hierbei ergab sich der Gesamt-Makrophagenanteil als Anteil aller ausschließlich CD68⁽⁺⁾ und CD68⁻/MRC-1⁽⁺⁾ Zellen an der Anzahl aller gezählten Zellen pro 2-Z-Substack. Der Anteil der M1-Makrophagen ergab sich als Fraktion der ausschließlich CD68⁽⁺⁾ Zellen an dem Gesamt-Makrophagenanteil. Der M2-Makrophagenanteil ergab sich als Fraktion der CD68⁽⁺⁾ und MRC-1⁽⁺⁾ Zellen am Gesamt-Makrophagenanteil. Es fand sich im Mittel ein Gesamt-Makrophagenanteil von 27,41% ± 18,28%. Die Makrophagen teilten sich zu 40,65% ± 15,19% in M1- und zu 59,35 ± 15,19% in M2-Makrophagen auf (Graph 3.5.5).



Graph 3.5.5 Kreisdiagramm zur Veranschaulichung des Gesamt-Makrophagenanteils und seiner Aufteilung in M1- und M2-Makrophagen (φ). Dargestellt sind die Mittelwerte der Anteile. Im Mittel fanden sich auf den untersuchten Stellen 27,41% Makrophagen, die anteilig zu 59,35% eine Polarisation hin zur M2-Makrophage und zu 40,65% hin zur M1-Makrophage aufwiesen.

4. Diskussion

4.1 Untersuchungsmethode

Zur Untersuchung der Zellablagerung in verschiedenen Bereichen der MOs wurde zuerst eine Spülung und Fixierung mittels PFA durchgeführt. Nach dem Zersägen und Tieffrieren (- 80°C) des Probenmaterials wurden Immunofluoreszenzfärbungen durchgeführt. Die Proben wurden mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht. Dieses Verfahren fand in bisherigen Studien nur vereinzelt Anwendung¹⁶.

Es ließen sich intakte Zellkerne und spezifische Membranfärbungen der auf der PMP-Membran adhärierenden Zellen darstellen. Es war keine Autofluoreszenz der Hohlfaserkapillaren beobachtbar. Es konnten Z-Scans der identifizierten Prädilektionsstellen für vermehrte Zellablagerung aufgenommen werden, die deren räumliche Ausdehnung erfassten. Die durchschnittliche Höhe der aufgenommenen Z-Scans der Hohlfaserablagerungen des E-MOs ($44,60 \pm 23,51\mu\text{m}$) deckte sich mit jenen, die bereits in früheren Untersuchungen beobachtet wurden (30 - 45 μm)⁶⁷. Die Untersuchung mittels Konfokalmikroskop erwies sich somit als adäquates Mittel für die hochauflösende Darstellung von Zellablagerungen auf ECMO-Membranpräparaten. Insbesondere räumlich überlagerte Bereiche konnten über die Schichtaufnahmen angemessen dargestellt werden. Diese Technik ist im Vergleich zur bisher angewendeten Immunofluoreszenz-Mikroskopie als vorteilhafter in der Untersuchung dieser Präparate zu werten, da auch Bereiche höherer Zelldichte ausgewertet werden können¹³⁷. Eine weitere zeitliche Optimierung des Verfahrens ist über die Verwendung eines Slide-Scanners zur automatisierten Mikroskopie anzustreben. Dies ermöglicht es, in kürzerem Zeitraum eine größere Menge an Membranabschnitten zu scannen und erhöht damit die Repräsentativität der Untersuchung für den jeweiligen Oxygenator.

4.2 Projektionen und Verfahren der Gesamtzellzahlquantifizierung

Um die adhärierenden Zellen algorithmengestützt auszählen zu können, musste eine geeignete Projektionsweise der Bildsequenzen festgelegt werden. Die Max-Projektion führt zu einer Überlagerung von Zellkernen aus verschiedenen Ebenen (Kapitel 3.2.2). Es entstehen Zellkerncluster, in denen Zellkernkonturen verschiedener Ebenen nicht mehr

abgrenzbar sind und nicht zuverlässig ausgezählt werden können¹³⁷. Die 2-Z-Substack-Projektion führt im Vergleich zu einer Entzerrung des Bildmaterials mit weniger Aggregation. Sie ist damit besser für die algorithmengestützte Auswertung geeignet. Der Vergleich der Auszählung von Max-Projektionen durch die *Image-J-particle-analyzer-Makro* und der 2-Z-Substack-Quantifizierung durch die Prozessierungslinie macht dies deutlich (Kapitel 3.2.4). Letzteres Verfahren erzeugt aufgrund der besseren räumlichen Auflösung in Knotenpunkten und Hohlfasern ein höheres Auszählungsergebnis. Im Vergleich wies die durch beide Verfahren quantifizierte durchschnittliche Zellzahl auf Hohlfasern geringere Unterschiede als bei den Knotenpunkten auf.

Dieses Ergebnis lässt sich damit erklären, dass auf den Hohlfasern im Vergleich zu den Knotenpunkten durchschnittlich weniger Zellen adhärerten und eine geringere Kolokalisation, sprich weniger räumliche Überlagerung, vorlag (Kapitel 3.2.3.1). Bei geringerer Kolokalisation ist auch die Anzahl der Zellen, deren Zellkernkontur durch Überlagerung unkenntlich wird, kleiner. Knotenpunkte hingegen wiesen mehr Zellen und stärkere Überlagerungen auf, weshalb in diesem Fall ein höheres Auszählungsergebnis durch die 2-Z-Substack-Projektion erreicht wurde. Demnach wurde diese Projektionsform für die weitere Testung der Quantifizierungsverfahren ausgewählt. Dabei wurde die Segmentierung überprüft und Auszählungsergebnisse größerer Datensets mit der manuell ausgezählten Referenz verglichen. Das *Image-J-particle-analyzer-Makro* bot im Vergleich zur Prozessierungslinie keine adäquate Auflösung von aggregierten Zellen (Abbildung 4.2.1 [A],[B]). Auch wenn beide Verfahren beim Vergleich mit der manuellen Referenzzählung ähnliche mittlere Abweichungen und Korrelationen aufwiesen (Kapitel 3.2.3), ist die Prozessierungslinie durch die wirksamere Segmentierung dem *Image-J-particle-analyzer-Makro* überlegen. Das in der Prozessierungslinie verwendete neuronale Netzwerk *Cellpose* setzte in dieser Arbeit gegen das neuronale Netzwerk *Stardist-2D* durch. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Beobachtung anderer Studien^{100,119}.

Der durch potentielle Doppeltzählungen auftretende Fehler der Auszählung von 2-Z-Substack-Projektionen (Kapitel 3.2.3.1) wird als tolerabel eingeschätzt.

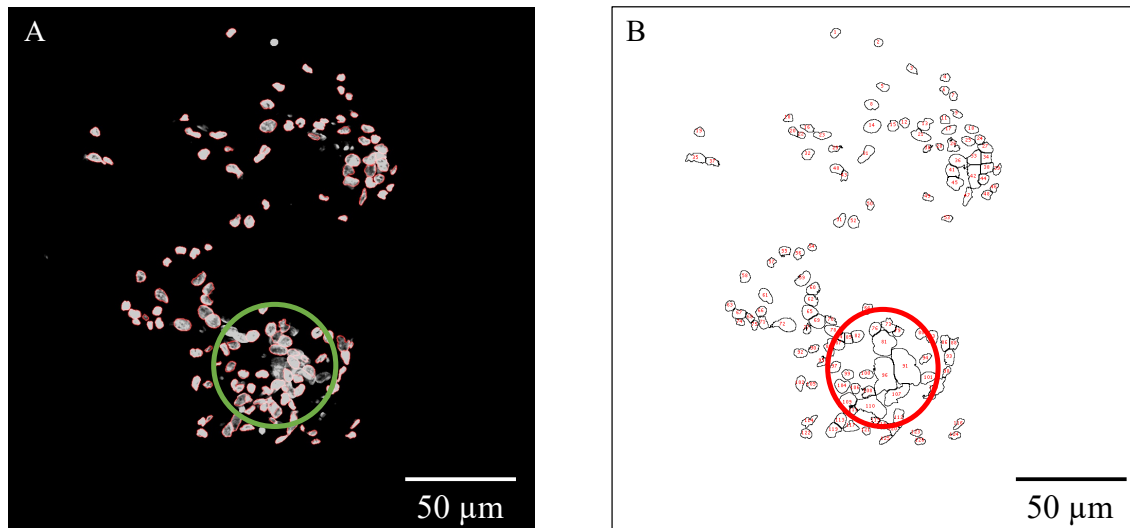


Abbildung 4.2.1 Darstellung einer 2-Z-Substack-Projektion und ihrer automatisierten Auszählung. [A] Segmentierungsmaske der Prozessierungslinie. Es wurden 132 Zellen ausgezählt. [B] Auszählmaske des Image-J-*particle-analyzer*-Makros. Es wurden 126 Zellen ausgezählt. Der rote und der grüne Kreis markieren einen problematischen Bereich für die Segmentierung mit Zellclustern. Im grünen Kreis ist eine höhere Zellkernkonturauflösung zu erkennen.

Abschließend zeigen die Prüfungsdaten, dass vor allem die Auszählung der Knotenpunkte aufgrund der vermehrt auftretenden räumlichen Überlagerung von der stückweisen Quantifizierung mittels KI-gestützter Prozessierungslinie in der 2-Z-Substack-Projektion profitiert. Im Hinblick auf die Akquise weiteren Bildmaterials ist die angewendete Prozessierungslinie ein geeigneter Kandidat zur schnellen und zuverlässigen Quantifizierung der Gesamtzellzahl von Prädilektionsstellen auf ECMO-Membran-Präparaten. Diese Arbeit zeigt, dass im Zusammenspiel mit der Konfokalmikroskopie eine direkte Quantifizierung der Zellen auch in dicht besiedelten Bereichen erreicht werden kann und stellt damit einen Fortschritt gegenüber den bisher angewendeten indirekten Quantifizierungsverfahren adhärerender Zellen auf PMP-Membranpräparaten nach ECMO-Therapie dar ¹³⁷. Eine Weiterentwicklung des Verfahrens wird über eine dreidimensionale Berechnung des Bildmaterials sowie die Verwendung weiterer Auszählungsregeln im Rahmen einer Postprozessierung angestrebt. Dies ist notwendig, da für ein optimales Ergebnis weiterhin in einigen Fällen eine manuelle Korrektur des Outputs erforderlich war. Aktuell wird in Kooperation mit der bioinformatischen Abteilung der TH-Bingen ein *tool*, das über *open-source* zugänglich gemacht wird, entwickelt.

4.3 Gesamtzellzahlanalyse und Morphologie zellulärer Ablagerungen

Um Unterschiede hinsichtlich der Menge abgelagerter Zellen zwischen den Prädilektionsstellen und verschiedenen Oxygenatorbereichen aufzudecken, wurde das Bildmaterial der untersuchten Oxygenatoren mit der KI-gestützten Prozessierungslinie ausgezählt und manuell optimiert. Die explorative statistische Testung der generierten Daten erfolgte nach den Methoden aus Kapitel 2.2.10.

Die gepoolten Analysen der beiden untersuchten Oxygenatoren wiesen starke Unterschiede zwischen Hohlfasern und Knotenpunkten auf ($p < 0,0001$). In den Gruppenanalysen verschiedener Bereiche der beiden Oxygenatoren waren ebenfalls relevante Unterschiede ($p < 0,0001$) zu beobachten. Dabei fand sich bei beiden Oxygenatoren in allen untersuchten Oxygenatorbereichen im Vergleich zu den korrespondierenden Hohlfaserstellen durchweg eine höhere durchschnittliche Zellzahl in Knotenpunkten. Bei dem untersuchten M-MO zeigte der multiple Vergleich mit p-Werten von 0,0476 und $<0,0001$ einen starken Unterschied zwischen den Hohlfasern und Knotenpunkten des inneren und mittleren Bereichs. Beim untersuchten E-MO waren zwischen Hohlfasern und Knotenpunkten des mittleren und äußeren Bereichs starke Unterschiede mit p-Werten von $<0,0001$ und 0,001 zu beobachten. Bei beiden Oxygenatoren waren vermehrt bereichsübergreifende Unterschiede mit kleinen p-Werten zu beobachten. Diese waren immer zwischen Hohlfasern und Knotenpunkten, aber nicht zwischen Prädilektionsstellen der gleichen Art vorhanden. Aufgrund dieser Daten kann vermutet werden, dass die Knotenpunkte im Vergleich zu den Hohlfaser-Stellen insgesamt zu einer stärkeren Zellablagerung neigen. Die polyfilen Kettfäden könnten aufgrund ihrer gewebsartigen Struktur eine Filterwirkung auf das Blut ausüben, sodass Zellen physikalisch im Fadengewebe festgehalten werden. Morphologisch spiegelte sich dies in Form von strangförmigen Zellaggregaten wider, die bei beiden untersuchten Oxygenatoren in den Knotenpunkten auftraten (Kapitel 3.1). Des Weiteren werden die Kettfäden im Vergleich zu den aus PMP bestehenden Hohlfasern meist aus PET hergestellt ^[3]. Aktuell existieren keine Studien, die einen direkten Vergleich der Hämokompatibilität von PMP und PET im Rahmen der ECC durchgeführt haben. Forschungsarbeiten, die sich mit der Hämokompatibilität von oberflächenmodifiziertem

^[3] Schmidthöfer, M. (Geschäftsführung). Eurosets - GmbH Germany: E-Mail Korrespondenz (2021).

PET im Bereich der Herzchirurgie beschäftigten, zeigen jedoch eine geringe Adhäsion von Thrombozyten und Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten auf dem Material^{23,36,37}. Ob chemische Eigenschaften des PETs und seiner Beschichtung neben der physikalischen Filterwirkung für die strangförmigen zellulären Adhäsionen am Fadengewebe mit verantwortlich sind ist unklar. Bei dieser Überlegung ist das Produktionsverfahren der Oxygenatoren zu berücksichtigen. Nach Zusammensetzung der einzelnen Membrankomponenten wird eine PC-Beschichtung aller mit Blut in Kontakt stehenden Bauteile durchgeführt^[4]. Ein direkter Kontakt von PET mit Blut soll durch die trennende PC-Beschichtung vermieden werden. Dennoch werden in den meisten ECMO-Systemen nicht quervernetzte PC-Beschichtungen verwendet, obwohl kommerziell stabilere quervernetzte Varianten zur Verfügung stehen. Aufgrund ihrer Instabilität ist eine Ablösung der Beschichtung im Langzeiteinsatz möglich, sodass eine direkte Interaktion von unbeschichtetem PET mit Blut denkbar ist^{89,132}.

Hinsichtlich der unterschiedlichen Zellmengen in verschiedenen Bereichen der untersuchten Oxygenatoren sind Trends zu erkennen. Die durchschnittliche Zellzahl adhärerender Zellen auf Hohlfasern des M-MOs steigt vom inneren (venösen) zum äußeren (arterialisierten) Bereich. Bei den Knotenpunkten findet sich die höchste durchschnittliche Ablagerung im mittleren Bereich. Für die Beobachtungen finden sich die folgenden Erklärungsansätze.

Die Proben des M-MOs wurden entlang des Blutstroms von der venösen hin zur arterialisierten Seite entnommen. Es ist zu vermuten, dass der beobachtete Trend mit der Strömungsdynamik innerhalb des Oxygenators zusammenhängt. MOs weisen aufgrund des dichten Hohlfasernetzes einen transmembranösen Widerstand auf. Dieser ist neben der Menge fibrinöser und zellulärer Ablagerungen vom Blutfluss abhängig und für einen Druckabfall zwischen venösem Einfluss- zum arterialisiertem Ausfluss-Bereich verantwortlich^{11,67,69}. Dieser Druckgradient ist Ausdruck des Gesamtenergie-Verlustes der Blutströmung innerhalb des Oxygenators. Eine Tendenz zu erhöhter Ablagerung Richtung arterialisierter Seite könnte daher auf eine Änderung des Blutflusses als Folge des Druckabfalls zurückzuführen sein. Zudem kommt es nach Eintritt des Blutes in den Oxygenator durch die Erweiterung der Querschnittsfläche zu einem Abfall der Fließgeschwindigkeit, die dann innerhalb des gesamten Gerätes nahezu konstant bleibt¹¹. Die im Vergleich zu den anderen Bereichen des extrakorporalen Kreislaufs niedrige

^[4] Schmidthöfer, M. (Geschäftsführung). Eurosets - GmbH Germany: E-Mail Korrespondenz (2021).

Fließgeschwindigkeit kann eine Proteinadsorption und Zelladhäsion begünstigen. Insgesamt hat das Blut auf der arterialisierten Seite die längste Kontaktzeit mit der Fremdoberfläche innerhalb des Oxygenators verbracht und könnte somit im Sinne der Ausbildung leukozytärer Haftstrukturen voraktiviert sein.

Neben der möglichen Einflussnahme des Druckabfalls gibt es Hinweise auf unterschiedlich lange Blut-Verweilzeiten in verschiedenen Oxygenatorabschnitten. In einer von Conway *et al.*, 2020 durchgeführten Studie zur Identifikation von Oxygenatorbereichen mit vermehrter Thrombuslast wurde der ebenfalls quadratische Quadrox-D-Oxygenator mittels computertomographischer Angiographie und rechnerischer Fluidynamik-Simulation (CFD) untersucht²². Es zeigte sich, dass in den gegenüberliegenden Ecken der zu- und abführenden Leitungen des Oxygenators eine erhöhte Thrombenlast auf den Hohlfasermatten auftrat. In der Flusssimulation war die Thrombenlast schwach mit einer erhöhten summierten Verweildauer des Blutes entlang seiner Flussrichtung korreliert. Dem Autor zur Folge könnte eine prolongierte Blutverweildauer eine Stase und Rezirkulation mit erhöhter Thrombozytenadhäsion begünstigen. Ein Zusammenhang zwischen unterschiedlicher Blutverweildauer verschiedener Oxgenatorbereiche und der Adhäsion kernhaltiger Zellen auf den PMP-Membranen ist noch nicht bekannt und gilt es zukünftig zu prüfen.

Auch beim untersuchten E-MO findet sich bei Knotenpunkten der verschiedenen Oxygenatorbereiche eine Steigerung der durchschnittlichen Zelladhäsion vom inneren(venösem) zum äußeren (arteriellen) Bereich. Die Hohlfasern weisen nur leichte Differenzen mit der höchsten Zellablagerung im äußeren Bereich auf. Zur Deutung dieser Ergebnisse ist eine Computersimulation des Blutflusses innerhalb des zylindrischen Medtronic Affinity NT MOs wegweisend¹⁴². Das Blut wird zunächst über den zentralen Wärmetauscher aufwärts gepumpt (Abbildung 4.3.1 [A]). Nach Verlassen des Kernstücks fließt es in eine innere Lücke zwischen Hohlfasermatten und Zentralummantelung. Von dort nimmt das Blut auf verschiedenen Höhen radial seinen Weg durch die Hohlfasermatten. Es ergibt sich korrespondierend ein konzentrisches Muster des Druckabfalls im Oxygenator (Abbildung 4.3.1 [C]). Nach Eintreten des Blutes in den Hohlfaserbereich fällt die Fließgeschwindigkeit auf etwa ein Fünftel ab und bleibt in allen Bereichen nahezu konstant (Abbildung 4.3.1 [B]). Unter der Annahme vergleichbarer Strömungsverhältnisse innerhalb des E-MOs lässt sich so analog zum M-MO ein Zusammenhang zwischen stärkere Ablagerung in den äußeren Bereichen und dem progredienten Druckabfall bedingt durch den Hohlfaserwiderstand vermuten.

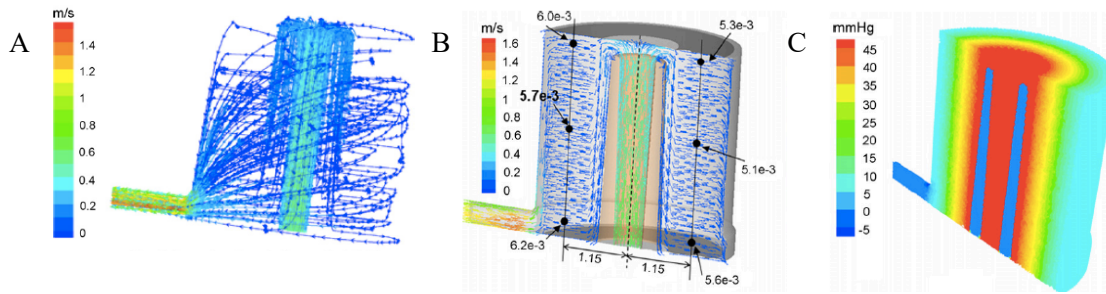


Abbildung 4.3.1 Darstellung der simulierten Flussprofile innerhalb des zylindrischen Medtronic Affinity NT-Oxygenators. [A] In der 3D-Darstellung ist zu erkennen, dass das Blut zunächst über das Kernstück aufwärts Richtung Hohlfaserraum fließt. Nach Ausfluss aus dem Kernstück fließt das Blut zwischen einer Kernumhüllung und der Hohlfaseroberfläche der Schwerkraft folgend in den unteren Oxygenatorbereich. Das Blut durchfließt auf verschiedenen Ebenen die Hohlfasermatten radiär. Die Fließgeschwindigkeiten sind mittels Farbskala codiert. [B] Im mittleren Querschnitt durch den Oxygenator ist anhand der Farbcodierung gut zu erkennen, dass die Fließgeschwindigkeit in den verschiedenen Oxygenatoranteilen nahezu konstant bleibt. [C] In dieser Darstellung ist der Druck innerhalb des Oxygenators farbcodiert dargestellt. Es ist zu erkennen, dass es entlang des radiären Blutflusses zu einem Druckabfall kommt. Millimeter Quecksilbersäule=mmHG. Entnommen aus Zhang *et al.*, 2007¹⁴².

Die beschriebenen Ergebnisse lassen aufgrund der geringen Stichprobenzahl und anderer nicht erfasster Begleitumstände der Patienten keinen validen Vergleich zwischen den Zellzahlen beider Oxygenator-Modelle zu. So könnten die Patienten beispielsweise aufgrund verschiedener Grunderkrankungen unterschiedlich hohe Prae-ECMO-Leukozytenzahlen aufgewiesen haben, die somit auch zu unterschiedlich starker Zelladhäsion an den Prädilektionsstellen geführt haben könnten. Trotzdem lassen sich morphologische Unterschiede zwischen den Ablagerungen auf Hohlfasern der beiden Oxygenatoren feststellen. Diese könnten aufgrund unterschiedlicher Membranwicklungen der Oxygenator-Modelle entstanden sein¹². Die 90° Anordnung der Hohlfasern beim M-MO könnte im Vergleich zur rollenartigen Wicklung der Hohlfasermatten beim E-MO eine Zelladhäsion in regelmäßigen Abständen begünstigen. Diese Vermutung deckt sich mit den beobachteten morphologischen Unterschieden. Hohlfaserstellen vermehrter Zelladhäsion bieten beim M-MO eine in regelmäßigen Abständen auftretende, strudelförmige Gestalt mit zentralen Stellen ohne Ablagerung (Kapitel 3.1). Diese Stellen entsprechen den Kontaktpunkten benachbarter Hohlfasern. Wie bereits von Lehle *et al.*, 2008 vermutet, können dies Lokalisationen geringeren Blutflusses sein und somit zur verstärkten Zelladhäsion beitragen⁶⁷. In einer Studie konnte in diesen Bereichen eine vermehrte Anwesenheit von vWF und aktivierten Thrombozyten nachgewiesen werden¹¹⁸. Beim E-MO zeigen sich hingegen längliche Zelladhäsionen mit Mikroaggregaten auf der gesamten PMP-Membran, die keinen relevanten lokalen Unterschied in der Blutflussdynamik vermuten lassen. Eine von Zhang *et al.*, 2013 durchgeführte rechnerische Fluidodynamik-Simulation (CFD) gibt Hinweise

zur Erklärung dieser Beobachtungen. Dabei wurden verschiedene Hohlfaseranordnungen auf eine Veränderung der Fließgeschwindigkeiten und der Scherbeanspruchung innerhalb eines simulierten Blutstroms untersucht ¹⁴¹. Es konnte gezeigt werden, dass Hohlfasern, die innerhalb eines Blutstroms in einem 20° Winkel zueinander angeordnet sind, unterschiedliche Fließgeschwindigkeiten und Scherraten entlang der Hohlfaserachse aufweisen. So lässt sich insbesondere in Kontaktregionen des dreidimensionalen Modells eine niedrige Scherbeanspruchung und eine vergleichsweise geringe Fließgeschwindigkeit erkennen. (Abbildung 4.3.2 [A],[B]).

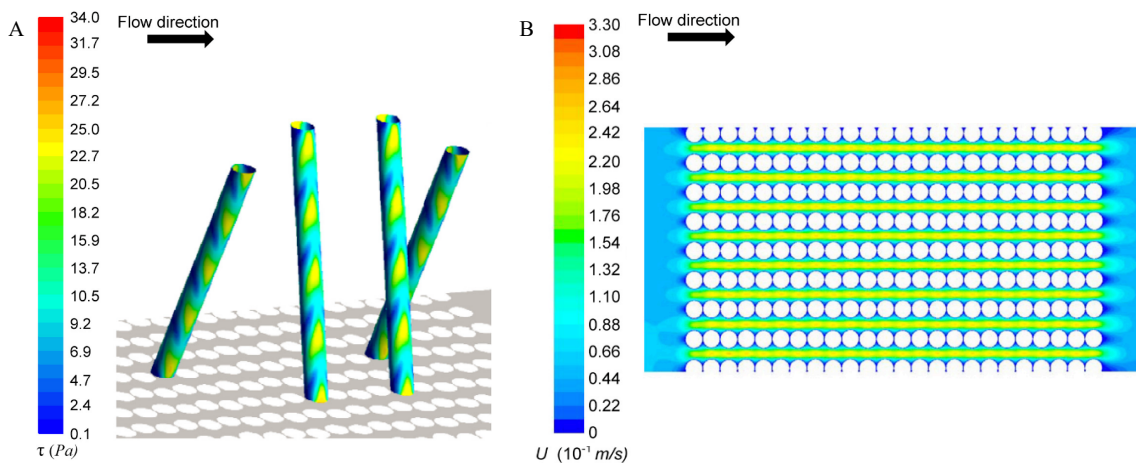


Abbildung 4.3.2 Farbcodierte Scherbeanspruchung und Fließgeschwindigkeiten von im 20°-Winkel angeordneten PP-Hohlfasern im CFD-Modell. [A] Exemplarische dreidimensionale Darstellung der farbcodierten Scherbeanspruchungs-Konturen von vier Hohlfasern innerhalb des CFD-Modells. Es ist zu erkennen, dass in den Bereichen um die Kontaktstellen benachbarter Hohlfasern eine niedrigere Scherbeanspruchung herrscht. Pa=Pascal [B] Farbcodierte Querschnittsdarstellung der Fließgeschwindigkeits-Konturen auf Höhe der Kontaktstellen benachbarter Hohlfasern. Es ist zu erkennen, dass um die Kontaktbereiche eine geringere Fließgeschwindigkeit vorherrscht. Entnommen aus Zhang *et al.*, 2013 ¹⁴¹.

Die in dieser Studie verwendete Hohlfaseranordnung ähnelt dem Winkel, den die Hohlfasermatten im E-MO zueinander einnehmen. Dennoch konnten bei der Untersuchung dieses Modells keine regelmäßig vorhandenen Kontaktstellen mit vermehrter Zelladhäsion nachgewiesen werden. Möglicherweise führt jedoch die 90° Anordnung der Hohlfasern, wie sie beim M-MO vorliegt, zu einer stärkeren Reduktion der Scherbeanspruchung und Fließgeschwindigkeit um die Kontaktstellen, sodass dort eine Zelladhäsion begünstigt wird. Insbesondere die Adhäsion neutrophiler Granulozyten ist im Rahmen der Leukozytenmigration von der vorherrschenden Scherbeanspruchung und Fließgeschwindigkeit abhängig. Insgesamt führt eine geringere Scherbeanspruchung zu erhöhter Adhäsion von Granulozyten an Endothelzellen ^{56,57,66}. Inwiefern sich eine orthogonale Hohlfaseranordnung auf die Strömungsdynamik auswirkt und die veränderten Gegebenheiten hinsichtlich Scherbeanspruchung und Fließgeschwindigkeit

einen Einfluss auf die leukozytäre Adhäsion an PMP-ECMO-Membranen hat, gilt es zukünftig zu prüfen.

Abschließend lässt sich aus der Gesamtzellzahl-Analyse ableiten, dass es bei beiden untersuchten Oxygenatoren Hinweise für eine stärkere Ablagerung von Zellen im Bereich der Knotenpunkte hohlfaserverbindender Kettfäden gibt. Hinsichtlich der Ablagerung von Zellen in verschiedenen Bereichen der untersuchten Oxygenatoren ist ein Trend zu vermehrter Zelladhäsion Richtung arterialisierter Bereiche zu erkennen. Ein Zusammenhang mit dem Druckabfall und dem Hohlfaserwiderstand innerhalb der Oxygenator-Modelle ist möglich. Ein Vergleich beider Oxygenatoren zeigt morphologische Unterschiede der Zelladhäsionen auf den Hohlfasern. Kontaktstellen benachbarter Hohlfasern des untersuchten M-MOs weisen in regelmäßigen Abständen isomorphe Zelladhäsionen auf. Eine geringere Scherbeanspruchung und eine reduzierte Fließgeschwindigkeit in diesen Regionen sind denkbare Einflussgrößen. Die Aussagekraft dieser explorativen Untersuchung ist hinsichtlich der geringen Stichprobenzahl und der anzunehmenden heterogenen Begleitumstände der Patienten limitiert, jedoch hinweisgebend für nachfolgende Untersuchungen. Insbesondere ein Vergleich beider Modelle hinsichtlich der Anzahl adhärrierender Zellen ist nicht valide und es kann anhand dieser Untersuchung keine Aussage über Vor- oder Nachteile der Oxygenator-Modelle getroffen werden. Um die formulierten Hypothesen zu überprüfen, sind unter anderem weitere *ex vivo* Zirkulationsstudien unter kontrollierten Umgebungsbedingungen notwendig.

4.4 Zelltypenidentifikation

Um die Zusammensetzung der Zellbesiedlung auf der PMP-Membran zu analysieren, wurden Immunofluoreszenzfärbungen zur Identifikation von Leukozyten, Makrophagen und endothelialen Zellen durchgeführt (Kapitel 2.2.5). Insgesamt ist die Färbungsqualität aller eingesetzter Marker als adäquat einzuschätzen. Auftretende Fluoreszenzschleier sind möglicherweise auf die während der ECMO-Therapie auftretende Bluttraumatisierung und die daraus resultierende Anfärbung von im Langzeiteinsatz abgelagertem Zelldebris zurückzuführen^{3,19,76,121}. Eine Blockierung unspezifischer Bindungen durch BSA erbrachte keine verbesserte Bildqualität (Kapitel 3.4.1.1). Morphologisch weisen die Fluoreszenzartefakte eine schlierenartige, vernetzte, Zellkern-übergreifende Struktur auf. Es ist davon auszugehen, dass es sich dabei um Bestandteile

der bereits von Lehle *et al.* 2008 beschriebenen PMs handelt⁶⁷. Die hier durchgeführte Untersuchung konnte die Anwesenheit adhärerender Thrombozyten und Leukozyten innerhalb dieser Strukturen bestätigen. Thrombozyten waren als rundliche CD31⁽⁺⁾ Strukturen ohne Zellkerne innerhalb unspezifisch angefärbter Bereiche zu erkennen (Kapitel 3.4.1). Daneben konnten Kontakte dieser Strukturen zu CD31⁽⁺⁾, kernhaltigen Zellen dargestellt werden. Diese Aggregate können als morphologisches Korrelat für Leukozyten-Thrombozyten-Konjugate gewertet werden, deren Entstehung als mitwirkender Mechanismus der Adhäsion von Leukozyten an die PMP-Membran und Oxygenatorthrombose diskutiert wird^{61,118}.

Die CD31-Färbung wurde als Marker für endotheliale Zellen verwendet. Das Antigen wird vereinzelt auf Leukozyten und EPCs exprimiert, weshalb in unserer Untersuchung keine eindeutige Zuordnung CD31⁽⁺⁾ Zellen möglich war. Trotzdem kann deren Anwesenheit als bestätigender Hinweis für das Vorhandensein von EPCs in den untersuchten MOs gewertet werden. Diese wurden erstmals durch Lehle *et al.*, 2016, mittels Trypsin-Verdau von verwendeten Oxygenatoren abgelöst und in Zellkultur nachgewiesen⁶⁸. Eine genauere Unterscheidung von Leukozyten und endothelartigen Zellen gilt es in Zukunft mittels weiterer Co-Färbungen von CD31, vWF und CD45 zu klären. Neben der bereits in mehreren Studien erfolgten Darstellung adhärerender Leukozyten über eine Färbung CD45⁽⁺⁾ Zellen gelang es in der aktuellen Untersuchung, Makrophagen in ihrer pro- und anti-inflammatorischen Polarisierung darzustellen (Kapitel 3.5.3)^{118,137}. Die erfolgreiche Darstellung der Makrophagen-Polarisierung auf der Membran war von Interesse, da sie ein Indikator für das Zytokin-Mikromilieu auf der PMP-Membran sein kann. Dieses könnte, wenn Richtung pro- oder anti-inflammatorischer Seite verschoben, einen Einfluss auf den Behandlungsverlauf des Patienten nehmen, indem die systemisch inflammatorische Antwort während ECMO-Therapie verstärkt oder gedämpft wird. Eine Adhäsion von Makrophagen war zu erwarten, da bei zirkulierenden Monozyten und neutrophilen Granulozyten als Reaktion auf den extrakorporalen Kreislauf eine Aktivierung mit vermehrter Expression der Integrine CD11b und CD18 erfolgt^{41,47,105}. Diese sind unter anderem als heterodimere Haftstrukturen in der Lage, das auf der Oxygenatoroberfläche adsorbierte Fibrinogen zu binden^{14,128}. Ein Einfluss von Menge und Art dieser abgelagerten Leukozytenarten auf die inflammatorische Antwort während der ECMO-Therapie und den daraus resultierenden Konsequenzen für die Morbidität und Mortalität des Patienten ist ungeklärt⁶¹. Ein negativer Effekt mit Entstehung eines SIRS wird in Form eines *two-hit-*

models diskutiert (Abbildung 4.4.1) ⁶¹. Die Abklärung der Zellviabilität adhärierender Zellen ist ebenfalls von Bedeutung, um Informationen über deren Funktionsfähigkeit zu erhalten.

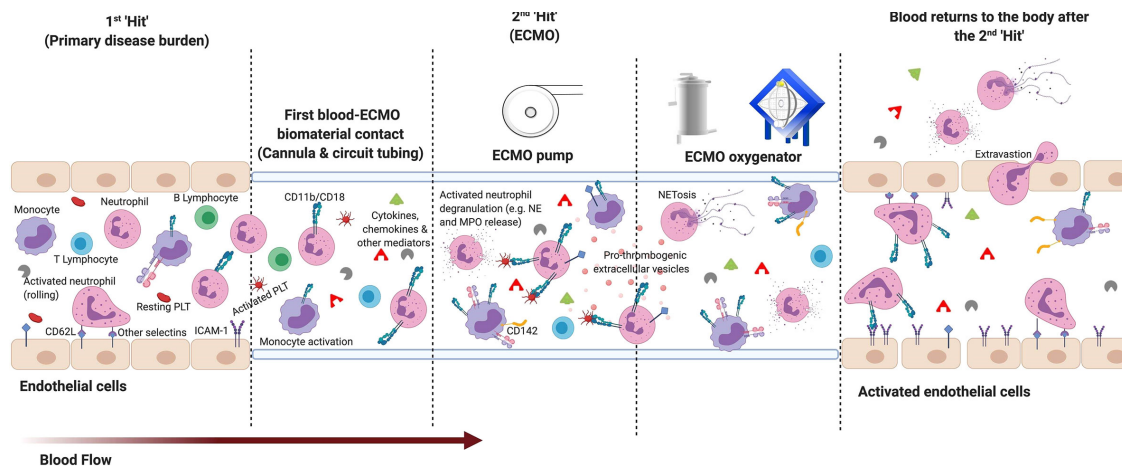


Abbildung 4.4.1 Darstellung der Pathophysiologie des *two-hit-models* während ECMO-Therapie. Der kritische Erkrankungszustand des Patienten führt zu einer Voraktivierung des Immunsystems (*first hit*). Nach Erstkontakt des Blutes mit der Fremdoberfläche im Bereich der Kanüle und der Schläuche des extrakorporalen Kreislaufs kommt es zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren durch neutrophile Granulozyten und Monozyten. Der *second-hit* wird durch die pumpenvermittelte Schubbeanspruchung mit Degranulation neutrophiler Granulozyten und Freisetzung zytotoxischer Stoffe wie Myeloperoxidase initiiert. Die verstärkte Expression von Haftstrukturen neutrophiler Granulozyten und Monozyten führt zur Konjugatbildung mit aktivierten Thrombozyten. Dies begünstigt die Adhäsion innerhalb des Oxygenators. Das aktivierte Blut wird dem Körper zurückgeführt. Es kommt zu einer Interaktion von Leukozyten mit dem Endothel des Patienten. Entnommen aus Ki *et al.*, 2021⁶¹.

4.5 Automatische Verfahren zur Zelltypisierung

Um die verschiedenen mittels Immunfluoreszenz dargestellten Zelltypen automatisch auszählen zu können, wurde an den Bildsequenzen ein Makro im Programm Image-J getestet (Kapitel 3.4.2). Das angewendete *channel-analyzer*-Makro zeigte Ungenauigkeiten auf. Die alleinige Nutzung einer individuellen Intensitätswert-Untergrenze für jedes Präparat ist kritisch zu beurteilen, da die Morphologie der Membranfärbung nicht berücksichtigt wird und so unspezifische Signale zu falsch positiven Auszählungen führen können. Die Zellkernerkennung des Makros, die auf der *analyze-particles*-Funktion beruht, kann in aggregierten Bereichen nicht ausreichend differenzieren. Hinzukommend kann es in gerade noch für das Makro differenzierbaren Aggregaten aufgrund der Masken-Vergrößerungsfunktion durch Maskenvereinigung zur Unterschlagung von Zellzählungen kommen. Die Zusammenschau aus unzureichender Segmentierung, geringer Korrelation mit der manuellen Auswertung und teilweise starker Abweichung lässt den Schluss zu, dass das Makro für den Einsatz als automatisierte Auswertungsmethode verbessert werden muss und für ein genaueres Ergebnis zunächst die manuelle Auszählung der Zelltypen zu bevorzugen ist.

4.6 Zelltypenzusammensetzung

Um die Anteile der angefärbten Zelltypen an der Gesamtzellzahl zu bestimmen, wurden die positiven Zellen ausgezählt und ins Verhältnis mit der in der Prädilektionsstelle ausgezählten Zellzahl gesetzt (Kapitel 3.5). Anschließend erfolgte die statistische Analyse (Kapitel 2.2.10).

Die Auswertung der Zelltypisierungsdaten ergab in der gepoolten Analyse Unterschiede bezüglich der vorherrschenden Zellmarkierung. Beim untersuchten E-MO bildeten CD31⁽⁺⁾ Zellen auf den Hohlfasern den größten Anteil an der Gesamtzellzahl. CD68⁽⁺⁾ Zellen waren hingegen auf Hohlfasern des untersuchten M-MOs anteilig am häufigsten zu finden. Aufgrund der nicht bekannten Begleitumstände der Patienten lassen sich keine konkreten Aussagen zu der Ätiologie dieser Unterschiede ziehen. Dennoch ist zu vermuten, dass Patienten individuell auf die Fremdoberfläche reagieren und es somit zu verschiedenartigen Zusammensetzungen der zellulären Besiedlungen auf der ECMO-Membran kommt. Im Verlauf könnte die Dominanz eines Zelltyps auf der Membran einen direkten Einfluss auf den Behandlungsverlauf des Patienten nehmen, indem vermehrt Zytokine freigesetzt werden oder eine schützende, endothelartige Besiedlung der Fremdoberfläche stattfindet. Die Anteile der verschiedenen Zellmarkierungen waren in Knotenpunkten beider untersuchter Oxygenatoren ungefähr zu gleichen Anteilen vorhanden. Bei beiden untersuchten Oxygenatoren sind die durchgängig höheren Anteile CD45⁽⁺⁾, CD31⁽⁺⁾ und CD68⁽⁺⁾ Zellen auf Hohlfasern im Vergleich zu Knotenpunkten auffällig. Die Unterschiede weisen in der gepoolten Analyse zum Teil niedrige p-Werte auf. Ursache kann unter anderem ein systematischer Fehler in der Auszählung sein. So weisen die Knotenpunkte insgesamt eine höhere Zellzahl und dichtere Aggregation auf, die vermehrt zu einer schwierigen Differenzierbarkeit positiver Zellen führen kann und nach den Kriterien aus Kapitel 2.2.9 die eindeutige Identifikation beeinträchtigt.

Eine weitere Erklärung wäre eine eingeschränkte Exposition von Zellen im Fadengewebe gegenüber der Immunofluoreszenzfärbung. So könnte der vorherrschende Proteinfilm in Verbindung mit dem Fadengewebe die komplette Anfärbung der dort adhärenen Zellen verhindern. Zuletzt ist auch das vermehrte Vorkommen einer durch die eingesetzten Färbungen nicht markierten Zellform möglich. So gelang bereits der Nachweis mesenchymartiger Zellen auf PMP-Membranen nach ECMO-Therapie, welche weder CD45⁽⁺⁾ noch CD31⁽⁺⁾ sind ⁶⁸.

Insgesamt wäre ein deutlich höherer Anteil CD45⁽⁺⁾ Zellen auf Hohlfasern und Knotenpunkten zu erwarten gewesen, da Leukozyten den Großteil der kernhaltigen Zellen im Blut ausmachen. Dieses Problem ist auch aus einer vorangegangenen fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung bekannt¹³⁷. Eine durchflusszytometrische Studie mit abgelöstem Zellmaterial aus eingesetzten Oxygenatoren ergab einen nahezu hundertprozentigen Anteil CD45⁽⁺⁾ Zellen⁶⁸. Eine mögliche Erklärung ist die unterschiedliche Expression von CD45 auf verschiedenen Leukozytenarten. Granulozyten neigen beispielsweise zu einer diffusen Expression, sodass eine nicht eindeutige Markierung dieses Zelltyps den geringen CD45-Anteil mit erklären könnte⁷⁵. Insgesamt könnte eine inkonsistente Anfärbung aller Zellen bedingt durch den Proteinfilm oder das Vorhandensein einer weiteren nicht CD45⁽⁺⁾ Zellart auf der Membran für die niedrigen Anteile CD45⁽⁺⁾ Zellen mit verantwortlich sein.

Bei beiden Oxygenatoren unterscheiden sich die durchschnittlichen Anteile CD45⁽⁺⁾ und CD68⁽⁺⁾ Zellen an der Gesamtzellzahl nur geringfügig. Es ist somit davon auszugehen, dass Makrophagen den größten Teil adhärerender CD45⁽⁺⁾ Leukozyten ausmachen. In der gepoolten Analyse übersteigt der durchschnittliche Anteil CD68⁽⁺⁾ Zellen zum Teil den CD45⁽⁺⁾ Zellen. Dies erscheint paradox, da Makrophagen als Leukozyten ebenfalls eine CD45-Färbung aufweisen müssten. Das Ergebnis ist aufgrund der kleinen Stichprobengröße und nicht angewendeter Co-Färbungen als Artefakt zu interpretieren. Zudem war die Anzahl CD31⁽⁺⁾ Zellen beim untersuchten E-MO unerwartet hoch. Es ist davon auszugehen, dass mit dieser Färbung nicht ausschließlich endotheliale Zellen markiert wurden. Wie bereits erwähnt, exprimieren Leukozyten dieses Antigen ebenfalls, sodass in zukünftigen Untersuchungen zur Identifikation von EPC Co-Färbungen mit spezifischen Zelltypmarkern wie vWF-Faktor eingesetzt werden müssen. Die Identifikation dieser Zellen ist vor allem in der Erforschung der *in vivo* Endothelialisierung des extrakorporalen Kreislaufs und der Herstellung biomimetischer Beschichtungen von herausragendem Interesse⁸⁹.

Ein multipler Vergleich der Zelltypen-Anteile in verschiedenen Abschnitten der untersuchten MOs ergab beim M-MO wenige relevante Unterschiede mit vereinzelt Ausreißern und daraus resultierenden niedrigen p-Werten im Vergleich von Hohlfasern und Knotenpunkten. Beim untersuchten E-MO ist im multiplen Vergleich eine deutlich heterogenere Verteilung mit niedrigen p-Werten zwischen den Anteilen CD31⁽⁺⁾ und CD45⁽⁺⁾ Zellen auf Hohlfasern und Knotenpunkten verschiedener Bereiche zu beobachten. Aus den generierten Daten lässt sich keine Aussage ableiten. Dennoch

erscheint es so, dass sich die Zellbesiedlung hinsichtlich der Zusammensetzung in verschiedenen Oxygenatorbereichen stark unterscheiden kann. Dies ist bei zukünftigen systematischen Studien zu berücksichtigen. Eine Veränderung des pH-Wertes innerhalb des MOs oder unterschiedliche Zusammensetzungen des adhäsionsbegünstigenden Proteinfilms könnten zentrale Einflussfaktoren sein ⁹⁰.

Insgesamt lässt sich aus den Ergebnissen der Zelltypisierung ableiten, dass der Organismus neben der Aktivierung humoraler und koagulatorischer Systeme mit einer leukozytären Ablagerung auf der ECMO-Membran reagiert. Die Untersuchung lässt vermuten, dass Makrophagen einen großen Anteil der membranadhärenten Leukozyten darstellen. Diese Hypothese gilt es in Abhängigkeit von den Begleitumständen des Patienten und seiner Grunderkrankung in zukünftigen Untersuchungen zu klären. Für das Vorhandensein von endothelialen Zellen auf PMP-ECMO-Membranen fanden sich bestätigende Hinweise. Eine weitere Analyse der adhärierenden Zellen mittels zellspezifischer Marker ist notwendig. Insbesondere die weitere Darstellung der Leukozytensubpopulationen ist anzustreben. Eine Einwirkung des Proteinfilms auf die Färbung gilt es zu prüfen. Zuletzt ist der Einfluss dieser Ablagerungen auf die inflammatorische Reaktion während ECMO-Therapie in Form eines *second-hit* ungeklärt und sollte Gegenstand zukünftiger klinischer Studien sein.

4.7 Schlussfolgerung

Die Fragestellungen dieser Arbeit können wie folgt beantwortet werden:

1. Etablierung einer standardisierten Methode zur Untersuchung auf der Membran adhärerender Zellpopulationen mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie.

Die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie ist ein adäquates Mittel, um die zellulären Ablagerungen auf PMP-Oxygenatormembranen nach dem Einsatz in der ECMO-Therapie zu untersuchen. Insbesondere die hohe räumliche Auflösung ist vorteilhaft, um dicht besiedelte Aggregate in den Knotenpunkten der hohlfaserverbindenden Kettfäden nachzuweisen.

2. Etablierung automatisierter Verfahren zur Zellquantifizierung und -charakterisierung.

In der Untersuchung wurden verschiedene Ansätze zur automatischen Gesamtzellzahlquantifizierung adhärerender Zellen auf ECMO-Membranpräparaten getestet. In Zusammenarbeit mit der Service-Gruppe für Mikroskopie des Max-Planck-Instituts für Herz- und Lungenforschung Bad-Nauheim konnte eine KI-gestützte Bild-Prozessierungslinie etabliert werden. Diese setzte sich gegen die Alternativverfahren aufgrund ihrer überlegenen Zellkernerkenntnis, geringen Abweichungen und hohen Korrelation mit der manuellen Auszählung (Referenzzählung) durch. Im Hinblick auf die weitere Erforschung der Zellbesiedlungen auf PMP-Membranen nach ECMO-Therapie steht nun ein probates Mittel zur direkten Auszählung der adhärerenden Zellen zur Verfügung. Eine weitere Optimierung des Verfahrens ist anzustreben. Die Etablierung eines automatischen Verfahrens zur zuverlässigen Zelltypisierung ist in dieser Untersuchung nicht geglückt. Die Zelltypisierung wurde manuell durchgeführt.

3. Nachweis von Prädilektionsstellen für erhöhte Zellablagerung in verschiedenen Oxygenatorbereichen.

In der Datenanalyse der untersuchten MOs fanden sich Hinweise auf eine verstärkte Zellablagerung in den Knotenpunkten der quervernetzenden Kettfäden im Vergleich zu

den Hohlfasern. Ablagerungen auf den im 90° Winkel zueinander angeordneten Hohlfasern des untersuchten M-MOs boten in regelmäßigen Abständen, um die Kontaktstellen herum strudelförmige Zelladhäsionen. Die Beobachtung ist möglicherweise auf die Hohlfaseranordnungen und daraus resultierende lokale Unterschiede in der Fließgeschwindigkeit des Blutes und der Scherbeanspruchung zurückzuführen. Bei beiden untersuchten Oxygenatoren zeigte sich ein Trend zu vermehrter Zellablagerung Richtung arterialisierter Seite des Gerätes. Hier könnte ein Zusammenhang mit dem Druckabfall innerhalb des Oxygenators bestehen.

4. Bestimmung der Anteile adhärrierender Leukozyten, Makrophagen und endothelialer Zellen in Prädilektionsstellen verschiedener Oxygenatorbereiche.

Es konnten auf den Membranen von beiden untersuchten Oxygenatoren adhärrierende Leukozyten und Makrophagen nachgewiesen werden. Die genaue Zuordnung CD31⁽⁺⁾ Zellen zu einer endothelialen Zellpopulation wurde in dieser Untersuchung nicht durchgeführt und ist zukünftig mittels Co-Färbung mit CD45 und vWF zu klären. In der Anteilsbestimmung der verschiedenen Zellpopulationen zeigten sich bei den untersuchten MOs unerwartet geringe Anteile adhärrierender Leukozyten auf Hohlfasern und Knotenpunkten. Ein Einfluss des Proteinfilms auf die Güte der Färbung und das Vorliegen einer bisher nicht markierten Zellpopulation gilt es zu prüfen. Die Anteile CD68⁽⁺⁾ und CD45⁽⁺⁾ Zellen lassen darauf schließen, dass die adhärrierenden Leukozyten der untersuchten MOs zu einem großen Anteil Makrophagen sind. Diese konnten exemplarisch in ihrer Polarisation zu M1- und M2-Makrophagen dargestellt werden. Es ergaben sich Hinweise auf unterschiedliche Zelltypenanteile in den untersuchten Oxygenatoren und in verschiedenen Oxygenatorbereichen. Wodurch die Zelltypenzusammensetzung beeinflusst wird und inwiefern sie einen Einfluss auf den Behandlungsverlauf der Patienten hat, ist in klinischen und *ex vivo* Zirkulationsstudien zu untersuchen.

4.8 Ausblick

Nach Schaffung der methodischen Grundlagen zur Untersuchung der PMP-ECMO-Membranen mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie soll eine weitere Verfahrensoptimierung stattfinden. Insbesondere die Anwendung KI-gestützter Verfahren zur Gesamtzellzahlquantifizierung hat sich als zeitsparend und zuverlässig erwiesen. Bei der Zelltypisierung hingegen stößt die Automatisierung noch an ihre Grenzen. Hinsichtlich der Untersuchung des systemischen Einflusses der Zellablagerungen auf inflammatorische Komplikationen während der ECMO-Therapie sind klinische Studien vonnöten. Dahingehend wurde bereits in Kooperation mit der Abteilung für experimentelle Kardiologie des Franz-Grödel-Instituts der Kerckhoff-Klinik in Bad Nauheim die Nutzung der Datenbank-Plattform *redcap* auf den Weg gebracht. Die Datenbank ermöglicht es, parallel zum Krankenhausaufenthalt des Patienten Daten über seinen Behandlungsverlauf zu sammeln. So können neben Laborparametern, wie Blut-Gerinnungswerten, Zytokinen und Entzündungsmarkern über die Zeit auch die Leistungsdaten der ECMO-Konsole aufgezeichnet werden. Nach Beendigung der Therapie können so über eine Korrelation mit der Menge und Art der Zellbesiedlung auf den PMP-ECMO-Membranen Zusammenhänge aufgedeckt werden. Für eine solche, weitergehende Untersuchung wurde bereits ein positives Ethikvotum eingeholt (AZ 157/19). Insbesondere im Hinblick auf die aktuelle Corona-Pandemie hat die ECMO als ultima-ratio-Therapie ihre zentrale Rolle in der Behandlung kritisch kranker Patienten mit Lungenversagen bewiesen. Mit dem vermehrten Einsatz der ECMO-Therapie weltweit steigt auch die Relevanz ihrer Erforschung hinsichtlich der Interaktionen mit dem menschlichen Organismus. Um mögliche Veränderungen der Zellbesiedlung auf ECMO-Membranpräparaten bei schwer an COVID erkrankten Menschen zu untersuchen, konnte mit dieser explorativen Arbeit die Grundlage für eine Kooperation mit der technischen Hochschule Bingen mit einer Förderung durch das Ministerium für Wissenschaft, Weiterbildung und Kultur von Rheinland-Pfalz gelegt werden. Im Rahmen des neuen Projektzweigs wird in Zusammenarbeit mit der bioinformatischen Abteilung der TH-Bingen die Bild-Prozessierungslinie optimiert und eine zuverlässige automatische Zelltypisierung der Bilder angestrebt, um zukünftig ECMO-Membranproben von schwer an COVID erkrankten Patienten zuverlässig analysieren zu können und mögliche Veränderungen in der Zellbesiedlung zu offenbaren.

5. Zusammenfassung

Von allen bekannten Medizinprodukten bieten während der extrakorporalen Membranoxygenierungs-Therapie verwendete Membranoxygenatoren die größte Schnittfläche mit Patientenblut. Die Interaktion mit der Oxygenator-Oberfläche kann über die globale Aktivierung humoraler und zellulärer Immunsysteme zu einem komplikationsträchtigen SIRS beitragen. Vor diesem Hintergrund ist die Erforschung der zellulären Interaktion mit der fremden Polymethylpenten-Oxygenatormembran essentiell, um innovative Ansätze für die Aufklärung der systemischen inflammatorischen Antwort aufzudecken. Ziel dieser Promotionsarbeit war es daher eine standardisierte Methode zur Darstellung sowie Algorithmen-gestützten Quantifizierung und Typisierung adhärierender Zellpopulationen auf Polymethylpenten-Oxygenatormembranen nach ECMO-Therapie zu etablieren.

Dafür wurde an Membranproben von zwei, am Patienten eingesetzten Oxygenatoren (Maquet-PLS-i u. Eurosets-adult), eine Immunofluoreszenzfärbung gegen Leukozyten (CD45⁽⁺⁾), Makrophagen (CD68⁽⁺⁾), endotheliale Zellen (CD31⁽⁺⁾) und eine Kernfärbung (DAPI) durchgeführt. Die Darstellung der Zellablagerungen erfolgte mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie. Das Mikroskopie-Verfahren war aufgrund seiner hohen räumlichen Auflösung vorteilhaft, um die zellulären Ablagerungen und insbesondere dicht besiedelte Aggregate zu untersuchen.

Zur Auszählung der Gesamtzellzahl wurde ein eigenständig im Programm Image-J geschriebenes Makro gegen das neuronale Netzwerk Cellpose getestet, das innerhalb des Programms OpSef in eine Prozessierungslinie integriert wurde^{100,119}. Die KI-gestützte Prozessierungslinie setzte sich gegen die Alternativverfahren aufgrund ihrer überlegenen Zellkernererkennung, geringen Abweichungen von der Referenz (11,61% ± 7,27%) und hohen Korrelation (R=0,98) mit der manuellen Auszählung (Referenz) durch. In der anschließenden explorativen Datenanalyse der untersuchten Membranoxygenatoren fand sich eine verstärkte Zellablagerung in hohlfaserverbindenden Knotenpunkten im Vergleich zu Adhäsionen auf Hohlfasern. Bei beiden untersuchten Oxygenatoren ergab sich ein Trend zu erhöhter Zelladhäsion Richtung arterialisierter Seite der Geräte. Die erhobenen Daten ließen darauf schließen, dass die adhärierenden Leukozyten der beiden untersuchten Membranoxygenatoren zu einem großen Anteil Makrophagen sind. Die genaue Zuordnung CD31⁽⁺⁾ Zellen zu einer endothelialen Zellpopulation war in dieser

Untersuchung nicht möglich und ist zukünftig mittels Co-Färbung von CD45 und von-Willebrand-Faktor zu klären.

Zusammengefasst konnte in dieser Arbeit eine standardisierte Untersuchung von Polymethylpenten-Oxygenatormembranen nach ECMO-Therapie mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie sowie ein algorithmengestütztes Quantifizierungsverfahren der erzeugten Bildsequenzen etabliert werden. In der explorativen Datenanalyse der untersuchten Oxygenatoren ergaben sich Hinweise auf Prädilektionsstellen für vermehrte Zellablagerungen in Knotenpunkten hohlfaserverbindender Kettfäden und auf Hohlfasern. Es konnte außerdem eine unterschiedlich starke Zellbesiedlung der Prädilektionsstellen in verschiedenen Oxygenatorbereichen nachgewiesen werden. Auch die Anteile adhärerender Leukozyten und Makrophagen variierten. Wodurch die Zellbesiedlung in Menge und Art beeinflusst wird und inwiefern sie einen Einfluss auf den Behandlungsverlauf der Patienten hat, ist in klinischen und *ex vivo* Zirkulationsstudien zu untersuchen.

6. Summary

Of all known medical devices, membrane oxygenators used during extracorporeal membrane oxygenation therapy provide the largest cut surface area with patient blood. Interaction with the oxygenator surface may contribute to complication-prone SIRS via global activation of humoral and cellular immune systems. Against this background, the study of cellular interaction with the foreign polymethylpentene oxygenator membrane is essential to uncover innovative approaches to elucidate the systemic inflammatory response. Therefore, the aim of this Dissertation was to establish a standardized method for imaging as well as algorithm-based quantification and typing of adherent cell populations on polymethylpentene oxygenator membranes after ECMO therapy.

For this purpose, immunofluorescence staining against leukocytes (CD45⁽⁺⁾), macrophages (CD68⁽⁺⁾), endothelial cells (CD31⁽⁺⁾) and nuclear staining (DAPI) was performed on membrane samples from two oxygenators used on patients (Maquet-PLS-i and Eurosets adult). Cellular deposits were visualized using confocal laser scanning microscopy. The microscopy technique was advantageous due to its high spatial resolution to study the cellular deposits and especially densely populated aggregates. To enumerate the total cell count, an independently written macro in the program Image-J was tested against the neural network Cellpose, which was integrated into a processing

line within the program OpSef^{100,119}. The AI-assisted processing line prevailed over the alternative methods due to its superior cell nucleus detection, low deviations from the manual reference count ($11.61\% \pm 7.27\%$), and high correlation ($R=0.98$) with manual enumeration (reference). In the subsequent exploratory data analysis of the studied membrane oxygenators, increased cell deposition was found in hollow fiber-connecting junctions compared to adhesions on hollow fibers. For both oxygenators studied, there was a trend of increased cell adhesion toward the arterialized side of the devices. The data collected suggested that the adherent leukocytes of both membrane oxygenators studied are to a large extent macrophages. The exact assignment of CD31⁽⁺⁾ cells to an endothelial cell population was not possible in this study and is to be clarified in the future by means of co staining of CD45 and von Willebrand factor. In summary, this work established a standardized examination of polymethylpentene oxygenator membranes after ECMO therapy using confocal laser scanning microscopy and an algorithm-based quantification method of the generated image sequences. Exploratory data analysis of the studied oxygenators revealed hints of predilection sites for increased cell deposition in nodes of hollow fiber-connecting warps and on hollow fibers. It was also possible to demonstrate varying degrees of cell colonization of the predilection sites in different oxygenator areas. The proportions of adherent leukocytes and macrophages also varied. What influences the quantity of cellular deposition and cell type composition and to what extent it has an impact on the outcome of the patients is to be investigated in clinical and ex vivo circulation studies.

7. Abkürzungsverzeichnis

7.1 Abkürzungen

ARDS	Acute respiratory distress syndrome
AT III	Antithrombin 3
BSA	Bovines Serumalbumin
BP	Bandpass
CFD	rechnerische Fluidynamik-Simulation
CD	Cluster of Differentiation
CO₂	Kohlenstoffdioxid
CPB	Kardiopulmonaler Bypass
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPSS	Diode pumped solide state
EDM	Euclidean distance map
E-MO	Eurosets-adult-Membranoxygenator
ECC	Extrakorporale Zirkulation
ECLS	Extracorporeal life support system
ECMO	Extrakorporale Membranoxygenierung
ECPR	Extrakorporale kardiopulmonale Reanimation
ELSO	Extracorporeal Life Support Organisation
EPC	Endotheliale Progenitorzelle
EZM	Extrazelluläre Matrix
FRZ	Fremdkörper-Riesenzellen
GUI	Graphical user interface
HIT	Heparin-induzierte-Thrombozytopenie
HLM	Herz-Lungen-Maschine
HZV	Herz-Zeit-Volumen
ICAM	Intracellular adhesion Molecule
IL	Interleukin
KI	Künstliche Intelligenz
LAMP	lysosomal associated membrane protein

M-MO	Maquet-PLS-i-Membranoxygenator
MAC	Membranangriffskomplex
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MO	Membranoxygenator
MRC-1	Mannose-Rezeptor-C-Type-1
MSC	Mesenchymale Stammzelle
N:C	Nukleus zu Zytoplasma
NF-κB	Nuclear factor-κB
NO	Stickstoffmonoxid
O₂	Sauerstoff
OPSEF	open source python framework for segmentation of biomedical images
PAF	Platelet activating factor
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PC	Phosphorylcholin
pECLA	Pumpless extracorporeal lung assistance
PET	Polyethylenterephthalat
PFA	Paraformaldehyd
PICS	Persistent inflammation, immunosuppression and catabolism syndrome
PM	Pseudomembran
PMP	Polymethylpenten
PMT	Photomultipliertube
PP	Polypropylen
PRR	pattern recognition receptor
ROI	region of interest
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
TF	Gewebethromboplastin
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
VA	Veno-arteriell
VCAM	Vascular cell adhesion molecule

VSD	Ventrikelseptumdefekt
VV	Veno-venös
vWF	Von-Willebrand-Faktor

7.2 Einheiten und Zeichen

(+)	positiv
%	Prozent
~	approximativ
±	plus/minus
<	größer
>	kleiner
=	gleich
°	Grad
°C	Grad Celsius
g	Gramm
h	Stunde
l	Liter
m	molar
m²	Quadratmeter
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHG	Millimeter Quecksilbersäule
nm	Nanometer
p	P-Wert
Pa	Pascal
R	Pearson-Korrelations-Koeffizient
R²	Bestimmtheitsmaß
s	Sekunde
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
φ	Makrophage

8. Abbildungs-, Graphen- und Tabellenverzeichnis

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1.1 Funktionsprinzip des MOs	1
Abbildung 1.1.2 Schematische Anordnung der Hohlfaserkapillaren in MOs mit zwei exemplarisch dargestellten Kettfäden.....	2
[Oxygenatorabbildungen nach Zustimmung durch die Firmen (E-Mail) entnommen aus: Eurosets: https://eurosets.com/products/ecls/ecmo/ Maquet: https://www.getinge.com/de/produktkatalog/pls-system/]	
Abbildung 1.1.3 Illustration der Betriebsformen VV- und VA-ECMO.....	3
[Nach Nutzungsgenehmigung durch Elsevier entnommen aus Squiers, J. J., Lima, B. & DiMaio, J. M. Contemporary extracorporeal membrane oxygenation therapy in adults: Fundamental principles and systematic review of the evidence. <i>J. Thorac. Cardiovasc. Surg.</i> 152 , 20–32 (2016). / siehe 10.610.6 Genehmigung übermittelt durch Copyright Clearance Center]	
Abbildung 1.4.1 Zusammenfassung der humoralen und zellulären Reaktionen auf Seiten der Fremdoberfläche (links) und des Patienten-Endothels (rechts) während ECMO-Therapie.....	8
[Nutzungsgenehmigung durch <i>Creative Commons Attribution 4.0 International License</i> siehe http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/]	
Abbildung 1.4.2 Darstellung der ablaufenden Pathomechanismen während ECMO-Therapie und deren klinische Bedeutung	14
Abbildung 1.6.1 Mikroskopische Darstellungen der Zellablagerung auf Hohlfasermembranen eines MO nach ECMO.....	18
[Nach Nutzungsgenehmigung durch Wolters Kluwer Health, Inc. entnommen aus Lehle, K. <i>et al.</i> Efficiency in extracorporeal membrane oxygenation-cellular deposits on polymethylpentene membranes increase resistance to blood flow and reduce gas exchange capacity. <i>ASAIO J.</i> 54 , 612–617 (2008). / siehe 10.6 Genehmigung übermittelt durch Copyright Clearance Center]	
Abbildung 1.6.2 Elektronenmikroskopische Visualisierung thrombotischen Materials auf Hohlfasern von MO, die für 14 Stunden in einem traumassozierten ARDS-Schafmodell verwendet wurden.....	19
[Nach Nutzungsgenehmigung durch Wolters Kluwer Health, Inc. entnommen aus Beely, B. M. <i>et al.</i> Electron Microscopy as a Tool for Assessment of Anticoagulation Strategies during Extracorporeal Life Support: The Proof Is on the Membrane. <i>ASAIO J.</i> 62 , 525–532 (2016). / siehe 10.6 Genehmigung übermittelt durch Copyright Clearance Center]	
Abbildung 1.7.1 Konfokalmikroskopische Aufnahmen des Vorexperimentes.....	22
Abbildung 2.2.1 Schematische Darstellung der Probenentnahme aus dem äußeren Bereich der untersuchten Oxygenator-Modelle	32
[Oxygenatorabbildungen nach Zustimmung durch die Firmen (E-Mail) entnommen aus: Eurosets: https://eurosets.com/products/ecls/ecmo/ Maquet: https://www.getinge.com/de/produktkatalog/pls-system/]	
Abbildung 2.2.2 Verteilung der Proben auf die 12 Well-Platte	35

Abbildung 2.2.3 Veranschaulichung der Fluorophore, ihrer Exzitations- und Emissionsspektren, der eingesetzten Lichtquellen und Emissionsfilter im jeweiligen Experiment	39
[Nach Zustimmung durch Thermofisher-Scientific (E-Mail) entnommen aus: https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html]	
Abbildung 2.2.4 Vorgehensweise bei der Epifluoreszenz-Mikroskopie.....	41
Abbildung 2.2.5 Schematische Darstellung des konfokalen Scans einer Prädilektionsstelle an den quervernetzenden Kettfäden.....	42
Abbildung 2.2.6 Befehlsfolge im Image-J- <i>particle-analyzer</i> -Makro	43
Abbildung 2.2.7 Vergleich verschiedener Auto- <i>threshold</i> -Verfahren in Image-J	44
Abbildung 2.2.8 Darstellung der Verarbeitungsschritte bei Anwendung der <i>watershed</i> -Technik	45
Abbildung 2.2.9 Darstellung des Outputs des Image-J- <i>particle-analyzer</i> -Makros.....	46
Abbildung 2.2.10 Beispielhafte Darstellung eines Etablierungsprozesses einer Prozessierungslinie im OpSef.....	47
[Nutzungsgenehmigung durch <i>Creative Commons Attribution 4.0 International License</i> siehe http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/]	
Abbildung 2.2.11 Schematische Darstellung des Befehlsablaufs des Image-J- <i>channel-analyzer</i> -Makros	48
Abbildung 2.2.12 Illustration der Arbeitsschritte des <i>channel-analyzer</i> -Makros	49
Abbildung 2.2.13 Vorgehensweise bei der manuellen Auszählung von Zellkernen	51
Abbildung 2.2.14 Darstellung der Kriterien für CD31 ⁽⁺⁾ und CD31 ⁽⁻⁾ Zellen.....	52
Abbildung 2.2.15 Darstellung der Kriterien für CD45 ⁽⁺⁾ und CD45 ⁽⁻⁾ Zellen.....	52
Abbildung 2.2.16 Darstellung der Kriterien zur Auszählung von Makrophagen mittels CD68-Färbung [A] und M1- und M2- Makrophagen über die Markierung CD68 ⁽⁺⁾ /MRC-1 ⁽⁺⁾ Zellen [B]	53
Abbildung 3.1.1 Darstellung der unterschiedlichen Morphologien von Zellablagerungen im Bereich der Hohlfasern und Knotenpunkte quervernetzender Kettfäden auf ECMO-Membranen.....	56
Abbildung 3.2.1 Illustration der Segmentierungsfunktion des Image-J- <i>particle-analyzer</i> -Makros an drei Beispielen	57
Abbildung 3.2.2 Darstellung eines Knotenpunktes in der Grauskala und im <i>temporal-color-code</i>	59
Abbildung 3.2.3 Testung der Segmentationseigenschaften verschiedener neuronaler Netzwerke an Bildmaterial im OpSef und Integration in die Prozessierungslinie	61
Abbildung 3.2.4 Darstellung der Kolokalisationskarten benachbarter 2-Z-Substacks.	64
Abbildung 3.4.1 Darstellung der durchgeführten Immunofluoreszenzfärbungen in verschiedenen Projektionsformen	69
Abbildung 3.4.2 Abbildung unspezifischer Fluoreszenzsignale bei den Markierungen CD31 ⁽⁺⁾ [B]/[C]/[F], CD45 ⁽⁺⁾ [D], CD68 ⁽⁺⁾ [A] und CD68/MRC-1 ⁽⁺⁾ [E] Strukturen	70

Abbildung 3.4.3 Darstellung der Immunofluoreszenzfärbung CD45⁽⁺⁾ Zellen im inneren Bereich des M-MOs unter Einsatz von BSA zur Minimierung unspezifischer Fluoreszenzsignale 71

Abbildung 3.4.4 Exemplarische Darstellung der Zusammenführung von Zellkernmasken durch die Maskenerweiterung der *channel-analyzer*-Makro 71

Abbildung 4.2.1 Darstellung einer 2-Z-Substack-Projektion und ihrer automatisierten Auszählung 81

Abbildung 4.3.1 Darstellung der simulierten Flussprofile innerhalb des zylindrischen Medtronic Affinity NT-Oxygenators 85
 [Nach Nutzungsgenehmigung durch Elsevier entnommen aus Zhang, J., Nolan, T., Zhang, T., Griffith, B. & Wu, Z. Characterization of membrane blood oxygenation devices using computational fluid dynamics. *J. Memb. Sci.* **288**, 268–279 (2007). / siehe 10.6 Genehmigung übermittelt durch Copyright Clearance Center]

Abbildung 4.3.2 Farbcodierte Scherbeanspruchung und Fließgeschwindigkeiten von im 20°-Winkel angeordneten PP-Hohlfasern im CFD-Modell 86
 [Nach Nutzungsgenehmigung durch American Society of Mechanical Engineers entnommen aus Zhang, J. *et al.* Computational study of the blood flow in three types of 3D hollow fiber membrane bundles. *ASME, J. Biomech. Eng.* **135**, (2013). / siehe 10.6 Genehmigung übermittelt durch Copyright Clearance Center]

Abbildung 4.4.1 Darstellung der Pathophysiologie des *two-hit-models* während ECMO-Therapie 89
 [Nutzungsgenehmigung durch *Creative Commons Attribution 4.0 International License* siehe <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>]

8.2 Graphenverzeichnis

Graph 1.2.1 Anzahl der ECMO-Zentren und Anwendungen im Zeitraum von 1990 bis 2021 5
 Nutzungsgenehmigung durch ELSO / siehe <https://www.elseo.org/Registry/DataRequest.aspx>

Graph 3.2.1 Streudiagramme zur Darstellung der Korrelation zwischen Auszählung der Max-Projektionen durch das *Image-J-particle-analyzer*-Makro und der manuellen Auszählung als Referenz 58

Graph 3.2.2 Streudiagramme zur Darstellung der Korrelation zwischen Auszählung der 2-Z-Substacks durch die Prozessierungslinie und der manuellen Auszählung als Referenz 62

Graph 3.2.3 Streudiagramme zur Darstellung der Korrelation zwischen Auszählung der 2-Z-Substacks durch das *Image-J-particle-analyzer*-Makro und der manuellen Auszählung als Referenz 63

Graph 3.2.4 Kastendiagramme zur vergleichenden Darstellung der Gesamtzellzahlen von Knotenpunkten und Hohlfasern des untersuchten M-MOs bei Quantifizierung der Max-Projektionen durch die *Image-J-particle-analyzer*-Makro und Quantifizierung der 2-Z-Substacks durch die Prozessierungslinie 65

Graph 3.3.1 Kastendiagramme zur Darstellung der durchschnittlichen Gesamtzellzahl von Prädilektionsstellen auf Hohlfasern und Knotenpunkten des untersuchten M-MOs 67

Graph 3.3.2 Kastendiagramm zur Darstellung der durchschnittlichen Gesamtzellzahl von Prädilektionsstellen auf Hohlfasern und Knotenpunkten des untersuchten E-MOs 68

Graph 3.4.1 Säulendiagramm zur Darstellung der Anteilsbestimmung CD45⁽⁺⁾ Zellen an der Gesamtzellzahl durch manuelle und automatische Auszählung 72

Graph 3.5.1 Kastendiagramme zur vergleichenden Darstellung der Anteile CD31 ⁽⁺⁾ , CD45 ⁽⁺⁾ und CD68 ⁽⁺⁾ Zellen von Hohlfasern und Knotenpunkten des untersuchten M-MOs.....	74
Graph 3.5.2 Kastendiagramme zur vergleichenden Darstellung der Anteile CD31 ⁽⁺⁾ [A], CD45 ⁽⁺⁾ [B] und CD68 ⁽⁺⁾ [C] Zellen bei Hohlfasern und Knotenpunkten verschiedener Oxygenatorbereiche des untersuchten M-MOs.....	75
Graph 3.5.3 Kastendiagramme zur vergleichenden Darstellung der Anteile CD31 ⁽⁺⁾ , CD45 ⁽⁺⁾ und CD68 ⁽⁺⁾ Zellen von Hohlfasern und Knotenpunkten des untersuchten E-MOs.....	76
Graph 3.5.4 Kastendiagramme zur vergleichenden Darstellung der Anteile CD31 ⁽⁺⁾ [A], CD45 ⁽⁺⁾ [B] und CD68 ⁽⁺⁾ [C] Zellen bei Hohlfasern und Knotenpunkten verschiedener Oxygenatorbereiche des untersuchten E-MOs.....	77
Graph 3.5.5 Kreisdiagramm zur Veranschaulichung des Gesamt-Makrophagenanteils und seiner Aufteilung in M1- und M2-Makrophagen (ϕ)	78

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1.1 Technische Daten verwendeter MOs (Herstellerangaben).....	24
Tabelle 2.1.2 Liste von Verbrauchsmaterialien und ihren Herstellern.....	25
Tabelle 2.1.3 Liste der verwendeten Chemikalien und ihrer Hersteller.....	26
Tabelle 2.1.4 Liste der verwendeten Puffer und Lösungen.....	27
Tabelle 2.1.5 Liste von Antikörpern, Fluoreszenzfarbstoffen und ihren Herstellern.....	28
Tabelle 2.1.6 Liste der verwendeten Geräte und deren Hersteller	29
Tabelle 2.1.7 Liste der am Leica SP5 verwendeten Objektive	29
Tabelle 2.1.8 Liste der verwendeten Software und deren Hersteller	29
Tabelle 2.2.1 Auflistung der Fluorophore, ihrer Exzitations- und Emissionsspektren, der eingesetzten Lichtquellen und Emissionsfilter im jeweiligen Experiment	39
Tabelle 2.2.2 Auflistung der Filtersets, die bei der Epifluoreszenz-Mikroskopie verwendet wurden.....	40
Tabelle 3.1.1 Auflistung der Z-Scan-Höhen von Knotenpunkten und Hohlfasern beider MOs.....	56
Tabelle 3.2.1 Auflistung der Kolokalisationsdaten.....	64
Tabelle 3.3.1 Auszählungsdaten der <i>Cellpose</i> -Prozessierungslinie	66
Tabelle 3.3.2 Kennzeichnung der p-Werte.....	66
Tabelle 10.5.1 Prüfungsdaten des Image-j- <i>particle-analyzer</i> -Makros in der Max-Projektion	127
Tabelle 10.5.2 Auflistung der Prüfungsdaten der Prozessierungslinie (<i>Cellpose nuclei 0.7</i>) und des Image-J- <i>particle-analyzer</i> -Makros in der 2-Z-Substack-Projektion.	127

Tabelle 10.5.3 Datentabelle für die Gesamtzellzahlquantifizierung der Membranabschnitte des M-MOs	128
Tabelle 10.5.4 Auflistung der statistischen Tests und p-Werte für die Daten der Gesamtzellzahlquantifizierung des M-MOs.....	129
Tabelle 10.5.5 Datentabelle für die Gesamtzellzahlquantifizierung der Membranabschnitte des E-MO	130
Tabelle 10.5.6 Auflistung der statistischen Tests und p-Werte für die Daten der Gesamtzellzahlquantifizierung des E-MOs.....	131
Tabelle 10.5.7 Datentabelle der Immunofluoreszenz-Gesamtauswertung des M-MOs aufgeteilt nach Knotenpunkten und Hohlfasern.....	132
Tabelle 10.5.8 Datentabelle der Immunofluoreszenz-Auswertung des M-MOs aufgeteilt nach Oxygenatorbereichen.....	133
Tabelle 10.5.9 Auflistung der statistischen Tests und p-Werte für die Daten der CD31-Färbung des M-MOs	134
Tabelle 10.5.10 Auflistung der statistischen Tests und p-Werte für die Daten der CD45-Färbung des M-MOs	135
Tabelle 10.5.11 Auflistung der statistischen Tests und p-Werte für die Daten der CD68-Färbung des M-MOs	136
Tabelle 10.5.12 Datentabelle der Immunofluoreszenz-Gesamtauswertung des E-MOs aufgeteilt nach Knotenpunkten und Hohlfasern.....	137
Tabelle 10.5.13 Datentabelle der Immunofluoreszenz-Auswertung des E-MOs aufgeteilt nach Oxygenatorbereichen.....	138
Tabelle 10.5.14 Auflistung der statistischen Tests und p-Werte für die Daten der CD31-Färbung des E-MOs.....	139
Tabelle 10.5.15 Auflistung der statistischen Tests und p-Werte für die Daten der CD45-Färbung des E-MOs.....	140
Tabelle 10.5.16 Auflistung der statistischen Tests und p-Werte für die Daten der CD68-Färbung des E-MOs.....	141
Tabelle 10.5.17 Datentabelle der Makrophagen-Polarisation	141

9. Referenzen

1. Al-Fares, A., Pettenuzzo, T. & Del Sorbo, L. Extracorporeal life support and systemic inflammation. *Intensive Care Med. Exp.* **7**, 46 (2019).
2. Anderson, J. M., Rodriguez, A. & Chang, D. T. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin. Immunol.* **20**, 86–100 (2008).
3. Appelt, H. *et al.* Factors associated with hemolysis during extracorporeal membrane oxygenation (ECMO)—Comparison of VA- versus VV ECMO. *PLoS One* **15**, 1–14 (2020).
4. Banfi, C. *et al.* Venovenous extracorporeal membrane oxygenation: Cannulation techniques. *J. Thorac. Dis.* **8**, 3762–3773 (2016).
5. Bartlett, R. H. & Deatrck, K. B. Current and future status of extracorporeal life support for respiratory failure in adults. *Curr. Opin. Crit. Care* **22**, 80–85 (2016).
6. Beely, B. M. *et al.* Electron Microscopy as a Tool for Assessment of Anticoagulation Strategies during Extracorporeal Life Support: The Proof Is on the Membrane. *ASAIO J.* **62**, 525–532 (2016).
7. Bein, T. *et al.* Pumpenfreie extrakorporale Lungenunterstützung mit arteriovenösem shunt beim schweren akuten lungenversagen des erwachsenen. Bericht über 30 einätze. *Anaesthesist* **53**, 813–819 (2004).
8. Borowiec, J. *et al.* Heparin-coated circuits reduce activation of granulocytes during cardiopulmonary bypass: A clinical study. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **104**, 642–647 (1992).
9. Boyle, E. M., Pohlman, T. H., Johnson, M. C. & Verrier, E. D. Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: The systemic inflammatory response. *Ann. Thorac. Surg.* **63**, 277–284 (1997).
10. Bradley, J. R. TNF-mediated inflammatory disease. *J. Pathol.* **214**, 149–160 (2008).
11. Brain, M. J., Butt, W. W. & MacLaren, G. Physiology of Extracorporeal Life Support. in *Extracorporeal Life Support for Adults* (ed. Schmidt, G. A.) 1–60 (Springer New York, 2016). doi:10.1007/978-1-4939-3005-0_1.

12. Bredthauer, A. *et al.* Oxygenator design might influence the adhesion of leukocytes and deposits of von Willebrand fibres on the surface of gas exchange membranes during ECMO Introduction. in (EuroELSO, 2017). doi:10.13140/RG.2.2.27610.95682.
13. Brix-Christensen, V. *et al.* Neutrophils and platelets accumulate in the heart, lungs, and kidneys after cardiopulmonary bypass in neonatal pigs. *Crit. Care Med.* **30**, 670–676 (2002).
14. Brodbeck, W. G., Colton, E. & Anderson, J. M. Effects of adsorbed heat labile serum proteins and fibrinogen on adhesion and apoptosis of monocytes/macrophages on biomaterials. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **14**, 671–675 (2003).
15. Butler, J., Rocker, G. M. & Westaby, S. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *Ann. Thorac. Surg.* **55**, 552–559 (1993).
16. Callaghan, S. *et al.* Adsorption of blood components to extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) surfaces in humans: A systematic review. *J. Clin. Med.* **9**, 1–15 (2020).
17. Camboni, D. & Schmid, C. Komplikationen der venoarteriellen ECMO-Therapie. in *Mechanische Unterstützung im akuten Kreislaufversagen* (eds. Boeken, U. *et al.*) 135–147 (Springer Berlin Heidelberg, 2020). doi:10.1007/978-3-662-59901-3_11.
18. Campbell, E. J. *et al.* Biocompatible surfaces using methacryloylphosphorylcholine laurylmethacrylate copolymer. *ASAIO J.* **40**, M853-7 (1994).
19. Chan, C. H. H. *et al.* Extracorporeal Membrane Oxygenation-Induced Hemolysis: An In Vitro Study to Appraise Causative Factors. *Membranes (Basel)*. **11**, 313 (2021).
20. Chenoweth, D. E. *et al.* Complement Activation during Cardiopulmonary Bypass. *N. Engl. J. Med.* **304**, 497–503 (1981).
21. Chistiakov, D. A., Killingsworth, M. C., Myasoedova, V. A., Orekhov, A. N. & Bobryshev, Y. V. CD68/macrosialin: Not just a histochemical marker. *Lab. Invest.* **97**, 4–13 (2017).
22. Conway, R. G. *et al.* Computed tomography angiography as an adjunct to computational fluid dynamics for prediction of oxygenator thrombus formation. *Perfus. (United Kingdom)* (2020) doi:10.1177/0267659120944105.

23. Dhahri, M. *et al.* In vitro and in vivo hemocompatibility evaluation of a new dermatan sulfate-modified PET patch for vascular repair surgery. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* **105**, 2001–2009 (2017).
24. Doyle, A. J. & Hunt, B. J. Current understanding of how extracorporeal membrane oxygenators activate haemostasis and other blood components. *Front. Med.* **5**, 1–9 (2018).
25. Duffy, M. J. *et al.* Impaired endothelium-dependent vasodilatation is a novel predictor of mortality in intensive care. *Crit. Care Med.* **39**, (2011).
26. Dunkelberger, J. R. & Song, W.-C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res.* **20**, 34–50 (2010).
27. Dunn, O. J. Multiple Comparisons Using Rank Sums. *Technometrics* **6**, 241–252 (1964).
28. Eckman, P. M. *et al.* Veno-Arterial Extracorporeal Membrane Oxygenation for Cardiogenic Shock: An Introduction for the Busy Clinician. *Circulation* **140**, 2019–2037 (2019).
29. ECMO Registry of the Extracorporeal Life Support Organization (ELSO), Ann Arbor, Michigan, April, 2022. *International ECLS Registry Report 2022*. <https://www.elseo.org/>.
30. Ernofsson, M., Thelin, S. & Siegbahn, A. Monocyte tissue factor expression, cell activation, and thrombin formation during cardiopulmonary bypass: A clinical study. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **113**, 576–584 (1997).
31. Fischetti, F. & Tedesco, F. Cross-talk between the complement system and endothelial cells in physiologic conditions and in vascular diseases. *Autoimmunity* **39**, 417–428 (2006).
32. Fortenberry, J. D. *et al.* Neutrophil and cytokine activation with neonatal extracorporeal membrane oxygenation. *J. Pediatr.* **128**, 670–678 (1996).
33. Franz-Josef, N. *et al.* Induction of Cytokine Expression in Leukocytes by Binding of Thrombin-Stimulated Platelets. *Circulation* **95**, 2387–2394 (1997).
34. Frerou, A. *et al.* Venoarterial extracorporeal membrane oxygenation induces early immune alterations. *Crit. Care* **25**, 9 (2021).
35. Fuchs, G., Berg, N., Broman, L. M. & Prahm Wittberg, L. Flow-induced platelet activation in components of the extracorporeal membrane oxygenation circuit. *Sci. Rep.* **8**, 1–9 (2018).

36. Gawlikowski, M., Fray, M. El, Janiczak, K., Zawidlak-Węgrzyńska, B. & Kustos, R. In-vitro biocompatibility and hemocompatibility study of new pet copolyesters intended for heart assist devices. *Polymers (Basel)*. **12**, 1–15 (2020).
37. Giol, E. D. *et al.* Endothelialization and Anticoagulation Potential of Surface-Modified PET Intended for Vascular Applications. *Macromol. Biosci.* **18**, e1800125 (2018).
38. Goh, E. T., Wong, E., Farhatnia, Y., Tan, A. & Seifalian, A. M. Accelerating in situ endothelialisation of cardiovascular bypass grafts. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 597–627 (2015).
39. González-López, A. & Albaiceta, G. M. Repair after acute lung injury: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Crit. Care* **16**, 209 (2012).
40. Graulich, J. *et al.* Complement activation by in vivo neonatal and in vitro extracorporeal membrane oxygenation. *Mediators Inflamm.* **11**, 69–73 (2002).
41. Graulich, J. *et al.* Leukocyte and endothelial activation in a laboratory model of extracorporeal membrane oxygenation (ECMO). *Pediatr. Res.* **48**, 679–684 (2000).
42. Gu, Y. J. *et al.* Heparin-coated circuits reduce the inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *Ann. Thorac. Surg.* **55**, 917–922 (1993).
43. Hantgan, R. R., Hindriks, G., Taylor, R. G., Sixma, J. J. & de Groot, P. G. Glycoprotein Ib, von Willebrand factor, and glycoprotein IIb:IIIa are all involved in platelet adhesion to fibrin in flowing whole blood. *Blood* **76**, 345–353 (1990).
44. Harada, A. *et al.* Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J. Leukoc. Biol.* **56**, 559–564 (1994).
45. Hartmann Hanna. Fremdkörper-Reaktionen auf Biomaterialien und Strategien zum Funktionserhalt von Implantaten. *BioNanoMaterials* **11**, 15–23 (2010).
46. Hawkins, R. B. *et al.* Chronic Critical Illness and the Persistent Inflammation, Immunosuppression, and Catabolism Syndrome. *Front. Immunol.* **9**, 1511 (2018).
47. Hocker, J. R., Wellhausen, S. R., Ward, R. A., Simpson, P. M. & Cook, L. N. Effect of Extracorporeal Membrane Oxygenation on Leukocyte Function in Neonates. *Artif. Organs* **15**, 23–28 (1991).
48. Hohn, D. C. *et al.* Production of acute pulmonary injury by leukocytes and activated complement. *Surgery* **88**, 48–58 (1980).

49. Hong, T. H. *et al.* Predicting outcome in patients under extracorporeal membrane oxygenation due to cardiogenic shock through dynamic change of lymphocytes and interleukins. *IJC Metab. Endocr.* **7**, 36–44 (2015).
50. Horton, S. *et al.* Experience with the Jostra Rotaflow and QuadroxD oxygenator for ECMO. *Perfusion* **19**, 17–23 (2004).
51. Hu, W.-J., Eaton, J. W., Ugarova, T. P. & Tang, L. Molecular basis of biomaterial-mediated foreign body reactions. *Blood* **98**, 1231–1238 (2001).
52. Imhof, B. A. & Dunon, D. Leukocyte Migration and Adhesion. in (ed. Dixon, F. J. B. T.-A. in I.) vol. 58 345–416 (Academic Press, 1995).
53. Jenney, C. R. & Anderson, J. M. Adsorbed serum proteins responsible for surface dependent human macrophage behavior. *J. Biomed. Mater. Res.* **49**, 435–447 (2000).
54. Jenney, C. R. & Anderson, J. M. Adsorbed IgG: A potent adhesive substrate for human macrophages. *J. Biomed. Mater. Res.* **50**, 281–290 (2000).
55. Johansson-Synnergren, M., Nilsson, F., Bengtsson, A., Jeppsson, A. & Wiklund, L. Off-pump CABG reduces complement activation but does not significantly affect peripheral endothelial function: a prospective randomized study. *Scand. Cardiovasc. J.* **38**, 53–58 (2004).
56. Jones, D. A., Abbassi, O., McIntire, L. V., McEver, R. P. & Smith, C. W. P-selectin mediates neutrophil rolling on histamine-stimulated endothelial cells. *Biophys. J.* **65**, 1560–1569 (1993).
57. Jones, D. A., Smith, C. W. & McIntire, L. V. Leucocyte adhesion under flow conditions: Principles important in tissue engineering. *Biomaterials* **17**, 337–347 (1996).
58. Jones, S., Horiuchi, S., Topley, N., Yamamoto, N. & Fuller, G. The soluble interleukin 6 receptor: Mechanisms of production and implications in disease. *FASEB J.* **15**, 43–58 (2001).
59. Kaplanski, G. *et al.* Thrombin induces endothelial type II activation in vitro: IL-1 and TNF-alpha-independent IL-8 secretion and E-selectin expression. *J. Immunol.* **158**, 5435 LP – 5441 (1997).
60. Keselowsky, B. G. & García, A. J. Surface chemistry modulates integrin binding to direct cell adhesion and function. *Trans. - 7th World Biomater. Congr.* 369 (2004).

61. Ki, K. K. *et al.* Current Understanding of Leukocyte Phenotypic and Functional Modulation During Extracorporeal Membrane Oxygenation: A Narrative Review. *Front. Immunol.* **11**, (2021).
62. Klein, S. *et al.* EndOxy: Dynamic Long-Term Evaluation of Endothelialized Gas Exchange Membranes for a Biohybrid Lung. *Ann. Biomed. Eng.* **48**, 747–756 (2020).
63. Kruger, P. *et al.* Neutrophils: Between host defence, immune modulation, and tissue injury. *PLoS Pathog.* **11**, e1004651–e1004651 (2015).
64. Kruskal, W. H. & Wallis, W. A. Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *J. Am. Stat. Assoc.* **47**, 583–621 (1952).
65. Larsen, E. *et al.* PADGEM protein: A receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes. *Cell* **59**, 305–312 (1989).
66. Lawrence, M. B. & Springer, T. A. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: Distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* **65**, 859–873 (1991).
67. Lehle, K. *et al.* Efficiency in extracorporeal membrane oxygenation-cellular deposits on polymethylpentene membranes increase resistance to blood flow and reduce gas exchange capacity. *ASAIO J.* **54**, 612–617 (2008).
68. Lehle, K. *et al.* Accumulation of Multipotent Progenitor Cells on Polymethylpentene Membranes During Extracorporeal Membrane Oxygenation. *Artif. Organs* **40**, 577–585 (2016).
69. Lehle, K. *et al.* Flow Dynamics of Different Adult ECMO Systems: A Clinical Evaluation. *Artif. Organs* **38**, 391–398 (2014).
70. Leonard, R. J. The transition from the bubble oxygenator to the microporous membrane oxygenator. *Perfusion* **18**, 179–183 (2003).
71. Lertkiatmongkol, P., Liao, D., Mei, H., Hu, Y. & Newman, P. J. Endothelial functions of PECAM-1 (CD31). *Curr. Opin. Hematol.* **23**, 253–259 (2016).
72. Levy, J. H. & Tanaka, K. A. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *Ann. Thorac. Surg.* **75**, (2003).
73. Li, C. H. & Tam, P. K. S. An iterative algorithm for minimum cross entropy thresholding. *Pattern Recognit. Lett.* **19**, 771–776 (1998).
74. Liu, Y. C., Zou, X. B., Chai, Y. F. & Yao, Y. M. Macrophage polarization in inflammatory diseases. *Int. J. Biol. Sci.* **10**, 520–529 (2014).

75. Van Lochem, E. G. *et al.* Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: Reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytom. Part B - Clin. Cytom.* **60**, 1–13 (2004).
76. Lou, S., MacLaren, G., Best, D., Delzoppo, C. & Butt, W. Hemolysis in Pediatric Patients Receiving Centrifugal-Pump Extracorporeal Membrane Oxygenation: Prevalence, Risk Factors, and Outcomes. *Crit. Care Med.* **42**, (2014).
77. Makdisi, G. & Wang, I. W. Extra Corporeal Membrane Oxygenation (ECMO) review of a lifesaving technology. *J. Thorac. Dis.* **7**, E166–E176 (2015).
78. Mann, H. B. & Whitney, D. R. On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other. *Ann. Math. Stat.* **18**, 50–60 (1947).
79. Maquet Getinge Group. Produktinformation: Extracorporeal life support PLS System. https://www.getinge.com/siteassets/products-a-z/pls-system/pls_system_mcp_br_10066_en_1_screen.pdf?disclaimerAccepted=yes (2020).
80. Mcilwain, B. *et al.* Plasma Concentrations of Inflammatory Cytokines Rise Rapidly during ECMO-related SIRS due to the Release of Pre-formed Stores in the Intestine. *Lab. Investig.* **90**, 128–139 (2010).
81. Meyns, B., Vercaemst, L., Vandezande, E., Bollen, H. & Vlasselaers, D. Plasma leakage of oxygenators in ECMO depends on the type of oxygenator and on patient variables. *Int. J. Artif. Organs* **28**, 30–34 (2005).
82. Mildner, R. J. *et al.* Cytokine imbalance in infants receiving extracorporeal membrane oxygenation for respiratory failure. *Biol. Neonate* **88**, 321–327 (2005).
83. Millar, J. E., Fanning, J. P., McDonald, C. I., McAuley, D. F. & Fraser, J. F. The inflammatory response to extracorporeal membrane oxygenation (ECMO): A review of the pathophysiology. *Crit. Care* **20**, 1–10 (2016).
84. MONTOYA, J. P., SHANLEY, C. J., MERZ, S. I. & BARTLETT, R. H. Plasma Leakage through Microporous Membranes: Role of Phospholipids. *ASAIO J.* **38**, (1992).
85. Morgan, E. N. *et al.* Nuclear factor κ B mediates a procoagulant response in monocytes during extracorporeal circulation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **125**, 165–171 (2003).

86. Nagai, H., Handa, M., Kawai, Y., Watanabe, K. & Ikeda, Y. Evidence that plasma fibrinogen and platelet membrane GPIIb-IIIa are involved in the adhesion of platelets to an artificial surface exposed to plasma. *Thromb. Res.* **71**, 467–477 (1993).
87. Niimi, Y. *et al.* The Effects of Heparin Coating of Oxygenator Fibers on Platelet Adhesion and Protein Adsorption. *Anesth. Analg.* **89**, (1999).
88. Nilsson, B., Ekdahl, K. N., Mollnes, T. E. & Lambris, J. D. The role of complement in biomaterial-induced inflammation. *Mol. Immunol.* **44**, 82–94 (2007).
89. Ontaneda, A. & Annich, G. M. Novel Surfaces in Extracorporeal Membrane Oxygenation Circuits . *Frontiers in Medicine* vol. 5 321 (2018).
90. Paradise, R. K., Lauffenburger, D. A. & van Vliet, K. J. Acidic extracellular pH promotes activation of integrin $\alpha\text{v}\beta\text{3}$. *PLoS One* **6**, (2011).
91. Peek, G., Killer, H., Reeves, R., Sosnowski, A. & Firmin, R. Early Experience with a Polymethyl Pentene Oxygenator for Adult Extracorporeal Life Support. *ASAIO J.* **48**, 480–482 (2002).
92. Pelosi, A. *et al.* Computational evaluation of the thrombogenic potential of a hollow-fiber oxygenator with integrated heat exchanger during extracorporeal circulation. *Biomech. Model. Mechanobiol.* **13**, 349–361 (2014).
93. Pflaum, M. *et al.* Endothelialization and characterization of titanium dioxide-coated gas-exchange membranes for application in the bioartificial lung. *Acta Biomater.* **50**, 510–521 (2017).
94. Philipp, A. *et al.* Langzeitfunktion von Oxygenatoren bei extrakorporaler Lungenunterstützung. *Kardiotechnik* **1**, (2009).
95. Pieri, M. *et al.* A new phosphorylcholine-coated polymethylpentene oxygenator for extracorporeal membrane oxygenation: a preliminary experience. *Perfusion* **28**, 132–137 (2012).
96. Prescott, S. M., Zimmerman, G. A. & McIntyre, T. M. Human endothelial cells in culture produce platelet-activating factor (1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine) when stimulated with thrombin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 3534–3538 (1984).
97. Quiroga, M. M. *et al.* The effect of body temperature on leukocyte kinetics during cardiopulmonary bypass. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **90**, 91–96 (1985).

98. Ranucci, M. *et al.* Closed, Phosphorylcholine-Coated Circuit and Reduction of Systemic Heparinization for Cardiopulmonary Bypass: The Intraoperative ECMO Concept. *Int. J. Artif. Organs* **25**, 875–881 (2002).
99. Ranucci, M. *et al.* Reduced Systemic Heparin Dose with Phosphorylcholine Coated Closed Circuit in Coronary Operations. *Int. J. Artif. Organs* **27**, 311–319 (2004).
100. Rasse, T. M., Hollandi, R. & Horvath, P. OpSeF: Open Source Python Framework for Collaborative Instance Segmentation of Bioimages. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **8**, 1–15 (2020).
101. Renz, H. & Herzum, I. Inflammatory Markers in SIRS, Sepsis and Septic Shock. *Curr. Med. Chem.* **15**, 581–587 (2008).
102. Ricklin, D. & Lambris, J. D. Complement in immune and inflammatory disorders: pathophysiological mechanisms. *J. Immunol.* **190**, 3831–3838 (2013).
103. Rinder, C. S. *et al.* Blockade of C5a and C5b-9 generation inhibits leukocyte and platelet activation during extracorporeal circulation. *J. Clin. Invest.* **96**, 1564–1572 (1995).
104. Risnes, I. *et al.* Interleukin-6 may predict survival in extracorporeal membrane oxygenation treatment. *Perfusion* **23**, 173–178 (2008).
105. Rudensky, B. *et al.* The cellular immunological responses of patients undergoing coronary artery bypass grafting compared with those of patients undergoing valve replacement. *Eur. J. Cardio-thoracic Surg.* **37**, 1056–1062 (2010).
106. Rungatscher, A. *et al.* Oxygenator Is the Main Responsible for Leukocyte Activation in Experimental Model of Extracorporeal Circulation: A Cautionary Tale. *Mediators Inflamm.* **2015**, (2015).
107. Schaadt, J. Oxygenator thrombosis: an international phenomenon. *Perfusion* **14**, 425–435 (1999).
108. Schmidt, N. CD47 as a marker of highly proliferative cell populations in the mouse lung epithelium -(Einreichung der Dissertation steht aus). (Justus-Liebig-Universität Gießen).
109. Schmidt, U., Weigert, M., Broaddus, C. & Myers, G. Cell detection with star-convex polygons. *Lect. Notes Comput. Sci. (including Subser. Lect. Notes Artif. Intell. Lect. Notes Bioinformatics)* **11071 LNCS**, 265–273 (2018).

110. Shekar, K. *et al.* Extracorporeal life support devices and strategies for management of acute cardiorespiratory failure in adult patients: a comprehensive review. *Crit. Care* **18**, 219 (2014).
111. Shepcke, R. *et al.* Examination of the roles of glycoprotein Ib and glycoprotein IIb/IIIa in platelet deposition on an artificial surface using clinical antiplatelet agents and monoclonal antibody blockade. *Blood* **78**, 673–680 (1991).
112. Siddall, E., Khatri, M. & Radhakrishnan, J. Capillary leak syndrome: etiologies, pathophysiology, and management. *Kidney Int.* **92**, 37–46 (2017).
113. Silva, M., Videira, P. A. & Sackstein, R. E-selectin ligands in the human mononuclear phagocyte system: Implications for infection, inflammation, and immunotherapy. *Front. Immunol.* **8**, (2018).
114. Smith, M. *et al.* Duration of veno-arterial extracorporeal life support (VA ECMO) and outcome: An analysis of the Extracorporeal Life Support Organization (ELSO) registry. *Crit. Care* **21**, 1–9 (2017).
115. De Somer, F. *et al.* Phosphorylcholine coating of extracorporeal circuits provides natural protection against blood activation by the material surface. *Eur. J. Cardio-thoracic Surg.* **18**, 602–606 (2000).
116. Song, L., Lee, C. & Schindler, C. Deletion of the murine scavenger receptor CD68. *J. Lipid Res.* **52**, 1542–1550 (2011).
117. Squiers, J. J., Lima, B. & DiMaio, J. M. Contemporary extracorporeal membrane oxygenation therapy in adults: Fundamental principles and systematic review of the evidence. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **152**, 20–32 (2016).
118. Steiger, T. *et al.* Accumulations of von Willebrand factor within ECMO oxygenators: Potential indicator of coagulation abnormalities in critically ill patients? *Artif. Organs* **43**, 1065–1076 (2019).
119. Stringer, C., Wang, T., Michaelos, M. & Pachitariu, M. Cellpose: a generalist algorithm for cellular segmentation. *Nat. Methods* **18**, 100–106 (2021).
120. Sturm, N. Wasserverlust durch extrakorporale Membranoxygenierung - Review. (Steinbeis-Hochschule, Berlin, 2019).
121. Sun, W. *et al.* Impact of high mechanical shear stress and oxygenator membrane surface on blood damage relevant to thrombosis and bleeding in a pediatric ECMO circuit. *Artif. Organs* **44**, 717–726 (2020).
122. Suzuki, Y. *et al.* Macrophage mannose receptor, CD206, predict prognosis in patients with pulmonary tuberculosis. *Sci. Rep.* **8**, 1–9 (2018).

123. Szotowski, B., Antoniak, S., Poller, W., Schultheiss, H. P. & Rauch, U. Procoagulant soluble tissue factor is released from endothelial cells in response to inflammatory cytokines. *Circ. Res.* **96**, 1233–1239 (2005).
124. Thangappan, K., Cavarocchi, N. C., Baram, M., Thoma, B. & Hirose, H. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS) after extracorporeal membrane oxygenation (ECMO): Incidence, risks and survivals. *Hear. Lung J. Acute Crit. Care* **45**, 449–453 (2016).
125. The College of American Pathologists. *2019 Hematology, Clinical Microscopy and body fluids Glossary*. <https://documents.cap.org/documents/2019-hematology-clinical-microscopy-glossary.pdf> (2019).
126. Thermofisher Scientific (Waltham USA). Fluorescence SpectraViewer. <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html> (abgerufen Januar,2021).
127. Thiara, A. S. *et al.* Comparable biocompatibility of Phisio- and Bioline-coated cardiopulmonary bypass circuits indicated by the inflammatory response. *Perfusion* **25**, 9–16 (2010).
128. Timothy M. Maul, M. P. M. and P. D. W. ECMO Biocompatibility: Surface Coatings, Anticoagulation, and Coagulation Monitoring, Extracorporeal Membrane Oxygenation - Advances in Therapy. *Intech* 13 (2016) doi:10.1016/j.colsurfa.2011.12.014.
129. Tong, A., Nguyen, J. & Lynch, K. W. Differential expression of CD45 isoforms is controlled by the combined activity of basal and inducible splicing-regulatory elements in each of the variable exons. *J. Biol. Chem.* **280**, 38297–38304 (2005).
130. Underwood, M. J. *et al.* Changes in ‘inflammatory’ mediators and total body water during extra-corporeal membrane oxygenation (ECMO). A preliminary study. *Int. J. Artif. Organs* **18**, 627–632 (1995).
131. Vallhonrat, H. *et al.* Rapid Activation of the Alternative Pathway of Complement by Extracorporeal Membrane Oxygenation. *ASAIO J.* **45**, (1999).
132. Wang, Y. B., Shi, K. H., Jiang, H. L. & Gong, Y. K. Significantly reduced adsorption and activation of blood components in a membrane oxygenator system coated with crosslinkable zwitterionic copolymer. *Acta Biomater.* **40**, 153–161 (2016).

133. Wehlin, L., Vedin, J., Vaage, J. & Lundahl, J. Activation of complement and leukocyte receptors during on- and off pump coronary artery bypass surgery. *Eur. J. Cardio-Thoracic Surg.* **25**, 35–42 (2004).
134. Westaby, S. Organ dysfunction after cardiopulmonary bypass. A systemic inflammatory reaction initiated by the extracorporeal circuit. *Intensive Care Med.* **13**, 89–95 (1987).
135. Whiteheart, S. W. Platelet granules: Surprise packages. *Blood* **118**, 1190–1191 (2011).
136. Wiktor, A. J. *et al.* Prolonged VV ECMO (265 Days) for ARDS without Technical Complications. *ASAIO J.* **61**, 205–206 (2015).
137. Wilm, J. *et al.* Leukocyte adhesion as an indicator of oxygenator thrombosis during extracorporeal membrane oxygenation therapy? *ASAIO J.* **64**, 24–30 (2018).
138. Woodfin, A., Voisin, M. B. & Nourshargh, S. PECAM-1: A multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 2514–2523 (2007).
139. Yamada, M. *et al.* Increased circulating endothelial progenitor cells in patients with bacterial pneumonia: Evidence that bone marrow derived cells contribute to lung repair. *Thorax* **60**, 410–413 (2005).
140. Ye, S.-H. *et al.* Hollow Fiber Membrane Modification with Functional Zwitterionic Macromolecules for Improved Thromboresistance in Artificial Lungs. *Langmuir* **31**, 2463–2471 (2015).
141. Zhang, J. *et al.* Computational study of the blood flow in three types of 3D hollow fiber membrane bundles. *ASME, J. Biomech. Eng.* **135**, (2013).
142. Zhang, J., Nolan, T., Zhang, T., Griffith, B. & Wu, Z. Characterization of membrane blood oxygenation devices using computational fluid dynamics. *J. Memb. Sci.* **288**, 268–279 (2007).
143. Zimmerman, G. A., McIntyre, T. M. & Prescott, S. M. Thrombin stimulates the adherence of neutrophils to human endothelial cells in vitro. *J. Clin. Invest.* **76**, 2235–2246 (1985).

10. Anhang

10.1 Färbungsprotokolle

10.1.1 CD45, -CD31, CD68

1. Herstellen der Primärantikörperlösungen in Eppendorf-*tubes* (1,5 ml):
 - a. Verdünnung der Primärantikörper mit PBS auf Konzentration von 1:100 auf ein Gesamtvolumen von 600 μ l
 - b. Beschriftung der Lösung
 - c. Vortexen für 15 Sekunden
 - d. Auf Eis lagern
2. Primärantikörperapplikation:
 - a. Absaugen der 600 μ l PBS-Vorfüllung aus der zum Primärantikörper gehörigen Spalte mittels Eppendorf-Pipette
 - b. Pipettieren der Primärantikörperlösung in die zugehörigen Wells
3. Inkubation in feuchter Kammer:
 - a. Anfeuchten von Zellstofftüchern und auslegen in einem verschließbaren Metallkästchen
 - b. Einbringen der 12 Well-Platte in die feuchte Kammer und Schließen des Deckels
 - c. Übernacht Inkubation (ca. 12 h) bei 5°C im Kühlschrank
4. Herstellen der Sekundärantikörperlösung in Eppendorf-*tubes* (1,5 ml):
 - a. Eingesetzter Sekundärantikörper: *Donkey anti Mouse*, IgG, Cy3 konjugiert. (siehe 0)
 - b. Verdünnung des Sekundärantikörpers mit PBS auf Konzentration von 1:300 auf ein Gesamtvolumen von 600 μ l
(Cave: Eppendorf-*tube* zwecks Lichtschutz mit Alufolie umwickeln)
 - c. Beschriftung der Lösung
 - d. Vortexen für 15 Sekunden
 - e. Auf Eis lagern

5. Sekundärantikörperapplikation:
 - a. Feuchte Kammer nach Übernachtinkubation aus dem Kühlschrank entnehmen
 - b. Proben 3 X für 5 Minuten mit 1 ml PBS mittels Eppendorfpipette waschen (Cave: Präparat schonen)
 - c. Absaugen der letzten PBS-Waschung mittels Eppendorf-Pipette
 - d. Applikation der 600 µl Sekundärantikörperlösung
6. Inkubation auf Rüttelplatte bei RT:
 - a. Inkubationsdauer des Sekundärantikörpers: 2 h
 - b. Jeweils nach Inkubation 3 X 5 min mit 1 ml PBS waschen
 - c. Letzte PBS-Waschung im Well belassen und Proben über Nacht in Feuchter Kammer im Kühlschrank bei 5°C lagern.
7. Durchführung der Zellkernfärbung:
 - a. Verdünnung des DAPI mit PBS auf Konzentration von 1:1000 auf ein Gesamtvolumen von 500 µl in Eppendorf-*tube* 1,5 ml
 - b. Absaugen der PBS-Lösung aus allen Wells mittels Eppendorf-Pipette
 - c. Applikation der 500 µl DAPI-Lösung in alle Wells
 - d. 30 min Inkubation bei Raumtemperatur in feuchter Kammer (Lichtschutz)
 - e. Jeweils nach Inkubation 3 X 5 min mit 1 ml PBS waschen
 - f. Proben nach letzter Waschung im PBS belassen
8. Proben-Einbettung auf Objektträger
 - a. Beschriftung der Objektträger: Oxygenatornummer, Bereich, Färbung, Datum
 - b. Moviol-Lösung mit Einmalpipette aus dem Flacon entnehmen
 - c. 2 ml Moviol-Lösung in der Mitte des Objektträgers platzieren und blasenfrei verstreichen
 - d. Probe vorsichtig mit Pinzette am Griffbereich greifen und auf den Moviolfilm in der Mitte des Objektträgers platzieren
 - e. Deckglas mit 1 ml Moviol mittels Einmalpipette Bestreichen
 - f. Deckglas luftblasenfrei auf dem Objektträger mit Präparat anbringen
 - g. Objektträger in Probenmatte platzieren
9. Probenmappe bis zur Benutzung bei 5°C im Kühlschrank lagern

10.1.2 Makrophagen-Polarisationsfärbung

1. Herstellen der Anti-MRC-1-Primärantikörperlösungen in Eppendorf-*tubes* (1,5 ml):
 - a. Verdünnung der Primärantikörper mit PBS auf Konzentration von 1:100 auf ein Gesamtvolumen von 600 μ l
 - b. Beschriftung der Lösung
 - c. Vortexen für 15 Sekunden
 - d. Auf Eis lagern
2. Anti-MRC-1-Primärantikörperapplikation:
 - a. Absaugen der 600 μ l PBS-Vorfüllung aus den Proben-Wells mittels Eppendorf-Pipette
 - b. Pipettieren der Anti-MRC-1- Primärantikörperlösung in die zugehörigen Wells (Cave: nicht in Negativ-Kontrolle)
3. Inkubation in feuchter Kammer:
 - a. Anfeuchten von Zellstofftüchern und auslegen in einem verschließbaren Metallkästchen
 - b. Einbringen der 12 Well-Platte in die feuchte Kammer und Schließen des Deckels
 - c. Übernacht Inkubation (ca. 12 h) bei 5°C im Kühlschrank
4. Herstellen der Sekundärantikörperlösung gegen MRC-1-Primärantikörper in Eppendorf-*tubes* (1,5 ml):
 - a. Eingesetzter Sekundärantikörper: *Donkey anti rabbit*, IgG, Cy3 konjugiert. (siehe 0)
 - b. Verdünnung des Sekundärantikörpers mit PBS auf Konzentration von 1:300 auf ein Gesamtvolumen von 600 μ l
(Cave: Eppendorf-*tube* zwecks Lichtschutz mit Alufolie umwickeln)
 - c. Beschriftung der Lösung
 - d. Vortexen für 15 Sekunden
 - e. Auf Eis lagern
5. Sekundärantikörperapplikation gegen MRC-1-Primärantikörper:
 - a. Feuchte Kammer nach Übernachtinkubation aus dem Kühlschrank entnehmen
 - b. Proben 3 X für 5 Minuten mit 1 ml PBS mittels Eppendorfpipette waschen
(Cave: Präparat schonen)

-
- c. Absaugen der letzten PBS-Waschung mittels Eppendorf-Pipette
 - d. Applikation der 600 μ l Sekundärantikörperlösung (auch in negativ-Kontrolle)
6. Inkubation auf Rüttelplatte bei RT:
 - a. Inkubationsdauer des Sekundärantikörpers: 2 h
 - b. Jeweils nach Inkubation 3 X 5 min mit 1 ml PBS waschen
 - c. Letzte PBS-Waschung im Well belassen
 7. Herstellen der Anti-CD68-Primärantikörperlösung in Eppendorf-*tubes* (1,5 ml):
 - a. Verdünnung der Primärantikörper mit PBS auf Konzentration von 1:100 auf ein Gesamtvolumen von 600 μ l
 - b. Beschriftung der Lösung
 - c. Vortexen für 15 Sekunden
 - d. Auf Eis lagern
 8. Anti-CD68-Primärantikörperapplikation:
 - a. Absaugen der 600 μ l PBS-Vorfüllung aus den Proben-Wells
 - b. Pipettieren der Anti-CD68-1- Primärantikörperlösung in die zugehörigen Wells (Cave: nicht in Negativ-Kontrolle)
 9. Inkubation in feuchter Kammer:
 - a. Einbringen der 12 Well-Platte in die feuchte Kammer und Schließen des Deckels
 - b. Übernacht Inkubation (ca. 12 h) bei 5°C im Kühlschrank
 10. Herstellen der Sekundärantikörperlösung gegen CD68-Primärantikörper in Eppendorf-*tubes* (1,5 ml):
 - a. Eingesetzter Sekundärantikörper: *Donkey anti mouse*, IgG, biotin konjugiert. (siehe 0)
 - b. Verdünnung des Sekundärantikörpers mit PBS auf Konzentration von 1:100 auf ein Gesamtvolumen von 1000 μ l
(Cave: Eppendorf-*tube* zwecks Lichtschutz mit Alufolie umwickeln)
 - c. Beschriftung der Lösung
 - d. Vortexen für 15 Sekunden
 - e. Auf Eis lagern
 11. Sekundärantikörperapplikation gegen CD68-Primärantikörper:
 - a. Feuchte Kammer nach Übernachtinkubation aus dem Kühlschrank entnehmen

-
- b. Proben 3 X für 5 Minuten mit 1 ml PBS mittels Eppendorfpipette waschen
(Cave: Präparat schonen)
 - c. Absaugen der letzten PBS-Waschung mittels Eppendorf-Pipette
 - d. Applikation pro Well 250 μ l Sekundärantikörperlösung aus der 1000 μ l Stammlösung (auch in negativ-Kontrolle)
12. Inkubation auf Rüttelplatte bei RT:
- a. Inkubationsdauer des Sekundärantikörpers: 2 h
 - b. Jeweils nach Inkubation 3 X 5 min mit 1 ml PBS waschen
 - c. Letzte PBS-Waschung im Well belassen
13. Herstellen der *Labeling*-Lösung für den Sekundärantikörper gegen CD68-Primärantikörper in Eppendorf-*tubes* (1,5 ml):
- a. Eingesetztes *Labeling*: Streptavidin, Cy 2 konjugiert (siehe 0)
 - b. Verdünnung des Sekundärantikörpers mit PBS auf Konzentration von 1:100 auf ein Gesamtvolumen von 1000 μ l
(Cave: Eppendorf-*tube* zwecks Lichtschutz mit Alufolie umwickeln)
 - c. Beschriftung der Lösung
 - d. Vortexen für 15 Sekunden
 - e. Auf Eis lagern
14. Applikation des Biotin-*Labels*:
- a. Absaugen der letzten PBS-Waschung mittels Eppendorf-Pipette
 - b. Applikation pro Well 250 μ l der *Labeling*- Lösung aus der 1000 μ l Stammlösung (auch in negativ-Kontrolle)
 - c. Inkubationsdauer: 2 h
15. Durchführung der Zellkernfärbung:
- a. Verdünnung des DAPI mit PBS auf Konzentration von 1:1000 auf ein Gesamtvolumen von 500 μ l in Eppendorf-*tube* 1,5 ml
 - b. Absaugen der PBS-Lösung aus allen Wells mittels Eppendorf-Pipette
 - c. Applikation von 500 μ l DAPI-Lösung in jedes Well
 - d. 30 min Inkubation bei Raumtemperatur in feuchter Kammer (Lichtschutz)
 - e. Jeweils nach Inkubation 3 X 5 min mit 1 ml PBS waschen
 - f. Proben nach letzter Waschung im PBS belassen
16. Proben-Einbettung auf Objektträger
17. Probenmappe bis zur Benutzung bei 5°C im Kühlschrank lagern

10.2 Bildprozessierung

In der *.lif*-Datei sind die Bilder der einzelnen Ebenen in ihren verschiedenen Fluoreszenzkanälen und den dazugehörigen Metadaten abgespeichert. Diese enthalten Informationen über die Mikroskop-Eigenschaften, die sequentiellen-Scan-Einstellungen und die Zeitstempel der Z-Ebenen. Die *.lif*-Datei kann im Programm Image-J über ein *bioformats-Plugin* geöffnet, und die Bildsequenzen je nach Auswertungsmethode unterschiedlich projiziert werden. Für die im nachfolgenden Teil verwendeten Projektionsformen soll an dieser Stelle zunächst eine Erklärung erfolgen.

10.2.1 Composite

Die Aufnahmen der Einzelebenen beinhalten mehrere Fluoreszenzkanäle, die den eingesetzten sequentiellen-Scans entsprechen. Je nach Wunsch können die Kanäle der einzelnen Ebenen gesplittet oder als *composite* dargestellt werden, sodass alle verwendeten Farbkanäle der Ebene in einem Bild vereinigt zu sehen sind.

10.2.2 Stacks und Hyperstacks

Die Bildsequenz kann in der Reihenfolge ihrer Akquise in einem durchblätterbaren Fenster dargestellt werden. Abbildungen mit diesem Informationsgehalt werden als Stapel (*stack*) bezeichnet. Beinhaltet die Datei neben den Bildinformationen über die Länge, Breite und Tiefe noch weitere Parameter, wie eingesetzte Farbkanäle und den Zeitpunkt der Einzelebenen-Aufnahme, spricht man auch von einem *hyperstack*. In der (*hyper*)-*stack*-Darstellung kann die Sequenz meist über einen *playbutton* wie ein Film abgespielt oder durchgeblättert werden.

10.2.3 Max-Projektion

In der Max-Projektion werden die Informationen aller Ebenen eines *stacks* zu einem Bild addiert. Es ist somit die gesamte Aufnahme der Zellansammlung in einem Überblick dargestellt. Die Max-Projektion kann nur einen Kanal enthalten oder als *composite* die ausgewählten Farbkanäle vereinigt abbilden.

10.2.4 Substack-Projektion

In dieser Projektion wird die vorliegende Bildsequenz in einzelne Ebenen-Gruppen aufgeteilt, welche miteinander addiert werden. So lassen sich beispielsweise immer zwei aufeinanderfolgende Ebenen zu einem Bild addieren, die anschließend zusammen ausgewertet werden können.

10.3 Image-J Particle Analyzer Makro

```

#@ File (label = "Input directory", style = "directory") input
#@ File (label = "Output directory", style = "directory") output
#@ String (label = "File suffix", value = ".tif") suffix
processFolder(input);
function processFolder(input) {
    list = getFileList(input);
    list = Array.sort(list);
    for (i = 0; i < list.length; i++) {
        if(File.isDirectory(input + File.separator + list[i]))
            processFolder(input + File.separator + list[i]);
        if(endsWith(list[i], suffix))
            processFile(input, output, list[i]);
    }
}
function processFile(input, output, file) {
    open(input + File.separator + file);
    run("Auto Threshold", "method=Li white");
    run("Convert to Mask");
    run("Watershed");
    run("Analyze Particles...", "size=20.00-Infinity show=Outlines display exclude clear summarize");
    saveAs("PNG", output + File.separator + file);
    close();
    close();
}

```

10.4 Cellpose

Das für diese Arbeit herangezogene neuronale Netzwerk Cellpose soll nachfolgend kurz erläutert werden. Cellpose ist ein Segmentationsalgorithmus der von Carsten Stringer und Marius Pachitariu in Python 3 geschrieben wurde und auf *deep learning* beruht ¹¹⁹. Der Algorithmus wurde an einem breiten Datenset von über 70.000 stark variierenden Zellabbildungen trainiert und ist dadurch in der Lage generalisiert Bilder ohne vorheriges Training zu segmentieren. Es handelt sich um einen freizugänglichen Algorithmus, der durch die Nutzer weiter optimiert werden kann, indem diese händisch vorsegmentierte Datensätze zum Training des Netzwerks in eine Datenbank einspeisen können.

Zusätzliche Informationen zur Installation und Bedienung des neuronalen Netzwerks finden sich unter dem folgenden Link: <https://cellpose.readthedocs.io/en/latest/>.

10.5 Datentabellen

Tabelle 10.5.1 Prüfungsdaten des Image-j-*particle-analyzer*-Makros in der Max-Projektion

	Image-J- <i>particle-analyzer</i> -Makro
Stichprobenanzahl (Max-Projektion)	n = 116
Knotenpunkte	n = 58
Hohlfasern	n = 58
Überzählte Bilder	65 (56,03%)
Unterzählte Bilder	49 (42,24%)
Bestimmtheitsmaß (R ²)	0,87
Pearson-Korrelation (R)	0,93
Mittlere prozentuale Abweichung±SD	11,72% ± 12,06%
Median (Quartile)	8,04% (3,86% - 14,41%)

Tabelle 10.5.2 Auflistung der Prüfungsdaten der Prozessierungslinie (*Cellpose nuclei 0.7*) und des Image-J-*particle-analyzer*-Makros in der 2-Z-Substack-Projektion.

	Image-J-Makro	<i>Cellpose nuclei 0.7</i>
Stichprobenanzahl (2-Z-Substacks)		n = 100
Knotenpunkte		n = 54
Hohlfasern		n = 46
Überzählte Bilder	79 (79%)	75 (75%)
Unterzählte Bilder	16 (16%)	21(21%)
Bestimmtheitsmaß (R ²)	0,97	0,96
Pearson-Korrelation (R)	0,99	0,98
Mittlere prozentuale Abweichung	12,05% ± 8,84% (SD)	11,61% ± 7,27% (SD)
Median (25% Quartil – 75% Quartil)	10,46% (5,04% - 17,26%)	11,27% (5,98% - 16,88%)

Tabelle 10.5.3 Datentabelle für die Gesamtzellzahlquantifizierung der Membranabschnitte des M-MOs

Maquet PLS-i	Mittelwert(\pm SD)	Median (Quartile)	Min.- Max.	Shapiro-Wilk-Test/NV
Gesamt				
Knotenpunkte(n=63)	484 \pm 218	477 (353-597)	22-1182	P=0,0071/Nein
Hohlfasern (n=58)	280 \pm 121	270 (185-366)	76-563	P=0,2116/Ja
Außen				
Knotenpunkte(n=20)	483 \pm 252	499 (304-611)	22-1182	P=0,2473/Ja
Hohlfasern (n=20)	351 \pm 102	358 (272-394)	134-555	P=0,8313/Ja
Mitte				
Knotenpunkte(n=23)	575 \pm 204	530 (446-670)	230-1148	P=0,0287/Nein
Hohlfasern (n=18)	258 \pm 132	234 (161-331)	76-563	P=0,5165/Ja
Innen				
Knotenpunkte(n=20)	379 \pm 147	374 (290-467)	74-689	P=0,5416/Ja
Hohlfasern (n=20)	229 \pm 97	235 (152-285)	103-431	P=0,2015/ja

Tabelle 10.5.4 Auflistung der statistischen Tests und p-Werte für die Daten der Gesamtzellzahlquantifizierung des M-MOs

Maquet-PLS-i			
Kruskal-Wallis Test (Gruppenanalyse)		Mann Whitney U-Test (gepoolt)	
Gruppen	Hohlfasern I/M/A, Knotenpunkte: I/M/A	Gruppen	KP vs. HF
P-Wert	<0,0001	P-Wert	<0,0001
Gruppenanzahl	6	Gruppenanzahl	2
Anzahl der Werte	121	Anzahl der Werte	121
Dunn's multipler Vergleichs Test (post-hoc)		Adjustierter P-Wert	
Hohlfasern Innen vs. Hohlfasern Mitte		>0,9999	
Hohlfasern Innen vs. Hohlfasern Außen		0,2115	
Hohlfasern Innen vs. Knotenpunkte Innen		0,0476	
Hohlfasern Innen vs. Knotenpunkte Mitte		<0,0001	
Hohlfasern Innen vs. Knotenpunkte Außen		0,0004	
Hohlfasern Mitte vs. Hohlfasern Außen		>0,9999	
Hohlfasern Mitte vs. Knotenpunkte Innen		0,3099	
Hohlfasern Mitte vs. Knotenpunkte Mitte		<0,0001	
Hohlfasern Mitte vs. Knotenpunkte Außen		0,0063	
Hohlfasern Außen vs. Knotenpunkte Innen		>0,9999	
Hohlfasern Außen vs. Knotenpunkte Mitte		0,0121	
Hohlfasern Außen vs. Knotenpunkte Außen		>0,9999	
Knotenpunkte Innen vs. Knotenpunkte Mitte		0,0681	
Knotenpunkte Innen vs. Knotenpunkte Außen		>0,9999	
Knotenpunkte Mitte vs. Knotenpunkte Außen		>0,9999	

*KP=Knotenpunkte, HF=Hohlfasern

Tabelle 10.5.5 Datentabelle für die Gesamtzellzahlquantifizierung der Membranabschnitte des E-MOs

Eurosets-adult	Mittelwert (\pm SD)	Median (Quartile)	Min.-Max.	Shapiro-Wilk-Test/NV
Gesamt				
Knotenpunkte(n = 60)	210 \pm 98	196 (127-278)	34-453	P=0,1930/Ja
Hohlfasern (n = 60)	63 \pm 46	46 (33-75)	11-232	P<0,0001/Nein
Außen				
Knotenpunkte (n = 20)	250 \pm 103	260 (178-333)	88-453	P=0,7252/Ja
Hohlfasern (n = 20)	79 \pm 50	62 (43-113)	36-232	P=0,0008/Nein
Mitte				
Knotenpunkte (n = 20)	240 \pm 73	255 (169-297)	118-346	P=0,2771/Ja
Hohlfasern (n = 20)	44 \pm 41	32 (21-44)	11-156	P<0,0001/Nein
Innen				
Knotenpunkte (n = 20)	141 \pm 79	120 (105-186)	34-323	P=0,1031/Ja
Hohlfasern (n = 20)	67 \pm 43	48 (37-82)	25-165	P=0,0010/Nein

Tabelle 10.5.6 Auflistung der statistischen Tests und p-Werte für die Daten der Gesamtzellzahlquantifizierung des E-MOs.

Eurosets-adult			
Kruskal-Wallis Test (Gruppenanalyse)		Mann Whitney U-Test (gepoolt)	
Gruppen	Hohlfasern I/M/A, Knotenpunkte: I/M/A	Gruppen	KP vs. HF
P-Wert	<0,0001	P-Wert	<0,0001
Gruppenanzahl	6	Gruppenanzahl	2
Anzahl der Werte	120	Anzahl der Werte	120
Dunn's multipler Vergleichs Test (post-hoc)		Adjustierter P-Wert	
Hohlfasern Innen vs. Hohlfasern Mitte		>0,9999	
Hohlfasern Innen vs. Hohlfasern Außen		>0,9999	
Hohlfasern Innen vs. Knotenpunkte Innen		0,1474	
Hohlfasern Innen vs. Knotenpunkte Mitte		<0,0001	
Hohlfasern Innen vs. Knotenpunkte Außen		<0,0001	
Hohlfasern Mitte vs. Hohlfasern Außen		0,5065	
Hohlfasern Mitte vs. Knotenpunkte Innen		0,0007	
Hohlfasern Mitte vs. Knotenpunkte Mitte		<0,0001	
Hohlfasern Mitte vs. Knotenpunkte Außen		<0,0001	
Hohlfasern Außen vs. Knotenpunkte Innen		0,7634	
Hohlfasern Außen vs. Knotenpunkte Mitte		0,0001	
Hohlfasern Außen vs. Knotenpunkte Außen		0,0001	
Knotenpunkte Innen vs. Knotenpunkte Mitte		0,1669	
Knotenpunkte Innen vs. Knotenpunkte Außen		0,1669	
Knotenpunkte Mitte vs. Knotenpunkte Außen		>0,9999	

*KP=Knotenpunkte, HF=Hohlfasern

Tabelle 10.5.7 Datentabelle der Immunofluoreszenz-Gesamtauswertung des M-MOs aufgeteilt nach Knotenpunkten und Hohlfasern

Maquet-PLS-i	Mittelwert (\pm SD)	Median (Quartile)	Min.-Max.	Shapiro-Wilk-Test/NV
Hohlfasern				
CD31-Anteil(%) (n = 15)	19,33 \pm 6	19,67 (13,87-22,87)	10,72-32,59	P=0,6841/Ja
CD45 Anteil(%) (n = 13)	28,17 \pm 11,97	26,06 (20,21-37,12)	8,51-52,59	P=0,6515/Ja
CD68 Anteil(%) (n = 15)	33,38 \pm 19,77	23,68 (18,61-39,39)	14,91-73,12	P=0,0018/Nein
Knotenpunkte				
CD31-Anteil(%) (n = 15)	15,78 \pm 5,54	15,59 (11,90-21,77)	6,76-26,04	P=0,8097/Ja
CD45 Anteil(%) (n = 18)	25,82 \pm 7,41	24,69 (20,63-29,70)	11,96-39,40	P=0,4949/Ja
CD68 Anteil(%) (n = 15)	16,09 \pm 10,18	13,33 (8,08-22,55)	5,89-37,84	P=0,0182/Nein

Tabelle 10.5.8 Datentabelle der Immunofluoreszenz-Auswertung des M-MOs aufgeteilt nach Oxygenatorbereichen

Maquet-PLS-i	Mittelwert (\pmSD)	Median (Quartile)	Min.-Max.	Shapiro-Wilk-Test/NV
CD31				
<i>Hohlfasern</i>				
Innen (n = 5)	20,84 \pm 5,59	21,46 (15,27-26,10)	13,69-27,19	P=0,7864/Ja
Mitte (n = 5)	19,37 \pm 7,87	17,55 (13,53-26,13)	12,73-32,59	P=0,1877/Ja
Außen (n = 5)	17,77 \pm 5,20	20,67 (12,3-21,80)	10,72-22,87	P=0,2928 /Ja
<i>Knotenpunkte</i>				
Innen (n = 5)	18,83 \pm 5,43	18,29 (13,94-23,99)	11,90-26,04	P=0,9926/Ja
Mitte (n = 5)	13,89 \pm 5,61	12,10 (9,30-19,36)	7,17-21,77	P=0,8591/Ja
Außen (n = 5)	14,63 \pm 5,37	14,66 (10,50-18,73)	7,17-21,88	P=0,6061/Ja
CD45				
<i>Hohlfasern</i>				
Innen (n = 5)	23,76 \pm 4,43	22,37 (19,88-28,33)	18,66-29,24	P=0,6176/Ja
Mitte (n = 3)	45,61 \pm 6,51	44,54 (39,69-52,59)	39,69-52,59	P=0,7280/Ja
Außen (n = 5)	22,11 \pm 9,52	22,13 (13,92-30,30)	8,51-34,54	P=0,9690/Ja
<i>Knotenpunkte</i>				
Innen (n = 5)	23,82 \pm 6,45	21,86 (18,66-29,96)	17,04-33,73	P=0,6886/Ja
Mitte (n = 8)	26,99 \pm 7,67	23,57 (21,14-35,61)	19,94-39,40	P=0,0426/Nein
Außen (n = 5)	25,96 \pm 9,02	27,23 (18,73-32,55)	11,96-37,06	P=0,5268/Ja
CD68				
<i>Hohlfasern</i>				
Innen (n = 5)	22,03 \pm 5,72	18,61 (18,23-27,53)	17,95-31,37	P=0,0687/Ja
Mitte (n = 5)	52,52 \pm 24,83	67,11 (27,15-70,59)	14,91-73,12	P=0,1753/Ja
Außen (n = 5)	25,59 \pm 4,97	22,98 (21,62-30,87)	20,98-32,26	P=0,2437/Ja
<i>Knotenpunkte</i>				
Innen (n = 5)	21,72 \pm 10,94	22,55 (12,18-30,84)	8,20-37,84	P=0,8773/Ja
Mitte (n = 5)	13,11 \pm 4,02	13,33 (9,96-16,16)	7,62-18,92	P=0,6254/Ja
Außen (n = 5)	13,47 \pm 12,94	8,08 (6,08-23,55)	5,89-36,36	P=0,0057/Nein

Tabelle 10.5.9 Auflistung der statistischen Tests und p-Werte für die Daten der CD31-Färbung des M-MOs

Maquet-PLS-i CD31			
Kruskal-Wallis Test (Gruppenanalyse)		Mann Whitney U-Test (gepoolt)	
Gruppen	Hohlfasern I/M/A, Knotenpunkte: I/M/A	Gruppen	KP* vs. HF*
P-Wert	0,4738	P-Wert	0,2017
Gruppenanzahl	6	Gruppenanzahl	2
Anzahl der Werte	30	Anzahl der Werte	30
Dunn's multipler Vergleichs Test (post-hoc)		Adjustierter P-Wert	
Hohlfasern Innen vs. Hohlfasern Mitte		>0,9999	
Hohlfasern Innen vs. Hohlfasern Außen		>0,9999	
Hohlfasern Innen vs. Knotenpunkte Innen		>0,9999	
Hohlfasern Innen vs. Knotenpunkte Mitte		>0,9999	
Hohlfasern Innen vs. Knotenpunkte Außen		>0,9999	
Hohlfasern Mitte vs. Hohlfasern Außen		>0,9999	
Hohlfasern Mitte vs. Knotenpunkte Innen		>0,9999	
Hohlfasern Mitte vs. Knotenpunkte Mitte		>0,9999	
Hohlfasern Mitte vs. Knotenpunkte Außen		>0,9999	
Hohlfasern Außen vs. Knotenpunkte Innen		>0,9999	
Hohlfasern Außen vs. Knotenpunkte Mitte		>0,9999	
Hohlfasern Außen vs. Knotenpunkte Außen		>0,9999	
Knotenpunkte Innen vs. Knotenpunkte Mitte		>0,9999	
Knotenpunkte Innen vs. Knotenpunkte Außen		>0,9999	
Knotenpunkte Mitte vs. Knotenpunkte Außen		>0,9999	

*KP=Knotenpunkte, HF=Hohlfasern

Tabelle 10.5.10 Auflistung der statistischen Tests und p-Werte für die Daten der CD45-Färbung des M-MOs

Maquet-PLS-i CD45			
Kruskal-Wallis Test (Gruppenanalyse)		Mann Whitney U-Test (gepoolt)	
Gruppen	Hohlfasern I/M/A, Knotenpunkte: I/M/A	Gruppen	KP vs. HF
P-Wert	0,097	P-Wert	0,7078
Gruppenanzahl	6	Gruppenanzahl	2
Anzahl der Werte	31	Anzahl der Werte	31
Dunn's multipler Vergleichs Test (post-hoc)		Adjustierter P-Wert	
Hohlfasern Innen vs. Hohlfasern Mitte		0,2204	
Hohlfasern Innen vs. Hohlfasern Außen		>0,9999	
Hohlfasern Innen vs. Knotenpunkte Innen		>0,9999	
Hohlfasern Innen vs. Knotenpunkte Mitte		>0,9999	
Hohlfasern Innen vs. Knotenpunkte Außen		>0,9999	
Hohlfasern Mitte vs. Hohlfasern Außen		0,0919	
Hohlfasern Mitte vs. Knotenpunkte Innen		0,1205	
Hohlfasern Mitte vs. Knotenpunkte Mitte		0,4244	
Hohlfasern Mitte vs. Knotenpunkte Außen		0,7022	
Hohlfasern Außen vs. Knotenpunkte Innen		>0,9999	
Hohlfasern Außen vs. Knotenpunkte Mitte		>0,9999	
Hohlfasern Außen vs. Knotenpunkte Außen		>0,9999	
Knotenpunkte Innen vs. Knotenpunkte Mitte		>0,9999	
Knotenpunkte Innen vs. Knotenpunkte Außen		>0,9999	
Knotenpunkte Mitte vs. Knotenpunkte Außen		>0,9999	

*KP=Knotenpunkte, HF=Hohlfasern

Tabelle 10.5.11 Auflistung der statistischen Tests und p-Werte für die Daten der CD68-Färbung des M-MOs

Maquet-PLS-i CD68			
Kruskal-Wallis Test (Gruppenanalyse)		Mann Whitney U-Test (gepoolt)	
Gruppen	Hohlfasern I/M/A, Knotenpunkte: I/M/A	Gruppen	KP vs. HF
P-Wert	0,0154	P-Wert	0,0023
Gruppenanzahl	6	Gruppenanzahl	2
Anzahl der Werte	30	Anzahl der Werte	30
Dunn's multipler Vergleichs Test (post-hoc)		Adjustierter P-Wert	
Hohlfasern Innen vs. Hohlfasern Mitte		>0,9999	
Hohlfasern Innen vs. Hohlfasern Außen		>0,9999	
Hohlfasern Innen vs. Knotenpunkte Innen		>0,9999	
Hohlfasern Innen vs. Knotenpunkte Mitte		>0,9999	
Hohlfasern Innen vs. Knotenpunkte Außen		>0,9999	
Hohlfasern Mitte vs. Hohlfasern Außen		>0,9999	
Hohlfasern Mitte vs. Knotenpunkte Innen		>0,9999	
Hohlfasern Mitte vs. Knotenpunkte Mitte		0,0484	
Hohlfasern Mitte vs. Knotenpunkte Außen		0,0301	
Hohlfasern Außen vs. Knotenpunkte Innen		>0,9999	
Hohlfasern Außen vs. Knotenpunkte Mitte		0,664	
Hohlfasern Außen vs. Knotenpunkte Außen		0,4671	
Knotenpunkte Innen vs. Knotenpunkte Mitte		>0,9999	
Knotenpunkte Innen vs. Knotenpunkte Außen		>0,9999	
Knotenpunkte Mitte vs. Knotenpunkte Außen		>0,9999	

*KP=Knotenpunkte, HF=Hohlfasern

Tabelle 10.5.12 Datentabelle der Immunofluoreszenz-Gesamtauswertung des E-MOs aufgeteilt nach Knotenpunkten und Hohlfasern

Eurosets-adult	Mittelwert (\pm SD)	Median (Quartile)	Min.-Max	Shapiro-Wilk-Test/NV
Hohlfasern				
CD31-Anteil% (n = 15)	49,34 \pm 15,51	53,19 (34,38-59,76)	25,93-81,25	P=0,7503/Ja
CD45 Anteil% (n = 15)	37,32 \pm 20,80	33,9 (19,44-54,05)	10,91-74,36	P=0,2344/Ja
CD68 Anteil% (n = 10)	30,49 \pm 8,55	31,83 (23,47-38,75)	16,67-40	P=0,2950/Ja
Knotenpunkte				
CD31-Anteil% (n = 15)	23,11 \pm 8,62	23,85 (14,77-28,81)	11,59-42,20	P=0,4583/Ja
CD45 Anteil% (n = 15)	23,24 \pm 11,95	22,09 (12,15-31,82)	9,74-50,37	P=0,0995/Ja
CD68 Anteil% (n = 10)	25,78 \pm 10,22	28,51 (15,42-33,83)	8,98-38,98	P=0,5450/Ja

Tabelle 10.5.13 Datentabelle der Immunofluoreszenz-Auswertung des E-MOs aufgeteilt nach Oxygenatorbereichen

Eurosets-adult	Mittelwert(SD)	Median(Quartile)	Min.-Max.	Shapiro-Wilk-Test/NV
CD31				
<i>Hohlfasern</i>				
Innen (n = 5)	47,09 ± 12,56	53,19 (33,82-57,32)	30,61-59,76	P=0,3498/Ja
Mitte (n = 5)	43,27 ± 21,93	34,38 (29,63-61,36)	25,93-81,25	P=0,0547/Ja
Außen (n = 5)	57,65 ± 8,01	57,50 (50,72-64,65)	46,38-68,18	P=0,9838/Ja
<i>Knotenpunkte</i>				
Innen (n = 5)	28,15 ± 8,44	25,64 (22,05-35,51)	20,25-42,20	P=0,2841/Ja
Mitte (n = 5)	19,36 ± 8,71	17,63 (11,84-27,75)	11,59-32,58	P=0,4283/Ja
Außen (n = 5)	22,07 ± 8,23	25,51 (13,38-29,03)	11,98-30,89	P=0,3799/Ja
CD45				
<i>Hohlfasern</i>				
Innen (n = 5)	19,63 ± 5,82	19,44 (14,74-24,62)	10,91-26,67	P=0,8522/Ja
Mitte (n = 5)	49,22 ± 26,10	54,05 (23,29-72,74)	12,20-74,36	P=0,5554/Ja
Außen (n = 5)	43,10 ± 13,77	41,18 (31,66-55,51)	29,41-64,86	P=0,5761/Ja
<i>Knotenpunkte</i>				
Innen (n = 5)	12,70 ± 2,18	12,15 (10,89-14,77)	10,58-16,09	P=0,5688/Ja
Mitte (n = 5)	32,18 ± 10,70	28,94 (25,28-40,71)	22,09-50,37	P=0,1228/Ja
Außen (n = 5)	25,06 ± 11,89	31,82 (12,31-34,43)	9,74-36,21	P=0,1824/Ja
CD68				
<i>Hohlfasern</i>				
Innen (n = 5)	29,37 ± 7,32	31,71 (22,42-35,15)	18,88-38,33	P=0,8434/Ja
Mitte (n = 5)	31,61 ± 10,37	36,36 (20,83-40,00)	16,67-40,00	P=0,1951/Ja
<i>Knotenpunkte</i>				
Innen (n = 5)	28,30 ± 7,87	30,53 (21,14-34,34)	15,79-36,54	P=0,5854/Ja
Mitte (n = 5)	23,30 ± 12,51	21,09 (11,74-35,95)	8,98-38,98	P=0,7380/Ja

Tabelle 10.5.14 Auflistung der statistischen Tests und p-Werte für die Daten der CD31-Färbung des E-MOs.

Eurosets-adult CD31			
Kruskal-Wallis Test (Gruppenanalyse)		Mann Whitney U-Test (gepoolt)	
Gruppen	Hohlfasern I/M/A, Knotenpunkte: I/M/A	Gruppen	KP vs. HF
P-Wert	0,0014	P-Wert	<0,0001
Gruppenanzahl	6	Gruppenanzahl	2
Anzahl der Werte	30	Anzahl der Werte	30
Dunn's multipler Vergleichs Test (post-hoc)		Adjustierter P-Wert	
Hohlfasern Innen vs. Hohlfasern Mitte		>0,9999	
Hohlfasern Innen vs. Hohlfasern Außen		>0,9999	
Hohlfasern Innen vs. Knotenpunkte Innen		>0,9999	
Hohlfasern Innen vs. Knotenpunkte Mitte		0,1059	
Hohlfasern Innen vs. Knotenpunkte Außen		0,2933	
Hohlfasern Mitte vs. Hohlfasern Außen		>0,9999	
Hohlfasern Mitte vs. Knotenpunkte Innen		>0,9999	
Hohlfasern Mitte vs. Knotenpunkte Mitte		0,3226	
Hohlfasern Mitte vs. Knotenpunkte Außen		0,7862	
Hohlfasern Außen vs. Knotenpunkte Innen		0,1455	
Hohlfasern Außen vs. Knotenpunkte Mitte		0,0065	
Hohlfasern Außen vs. Knotenpunkte Außen		0,0236	
Knotenpunkte Innen vs. Knotenpunkte Mitte		>0,9999	
Knotenpunkte Innen vs. Knotenpunkte Außen		>0,9999	
Knotenpunkte Mitte vs. Knotenpunkte Außen		>0,9999	

*KP=Knotenpunkte, HF=Hohlfasern

Tabelle 10.5.15 Auflistung der statistischen Tests und p-Werte für die Daten der CD45-Färbung des E-MOs.

Eurosets-adult CD45			
Kruskal-Wallis Test (Gruppenanalyse)		Mann Whitney U-Test (gepoolt)	
Gruppen	Hohlfasern I/M/A, Knotenpunkte: I/M/A	Gruppen	KP vs. HF
P-Wert	0,0074	P-Wert	0,0502
Gruppenanzahl	6	Gruppenanzahl	2
Anzahl der Werte	30	Anzahl der Werte	30
Dunn's multipler Vergleichs Test (post-hoc)		Adjustierter P-Wert	
Hohlfasern Innen vs. Hohlfasern Mitte		0,3545	
Hohlfasern Innen vs. Hohlfasern Außen		0,3226	
Hohlfasern Innen vs. Knotenpunkte Innen		>0,9999	
Hohlfasern Innen vs. Knotenpunkte Mitte		>0,9999	
Hohlfasern Innen vs. Knotenpunkte Außen		>0,9999	
Hohlfasern Mitte vs. Hohlfasern Außen		>0,9999	
Hohlfasern Mitte vs. Knotenpunkte Innen		0,0267	
Hohlfasern Mitte vs. Knotenpunkte Mitte		>0,9999	
Hohlfasern Mitte vs. Knotenpunkte Außen		>0,9999	
Hohlfasern Außen vs. Knotenpunkte Innen		0,0236	
Hohlfasern Außen vs. Knotenpunkte Mitte		>0,9999	
Hohlfasern Außen vs. Knotenpunkte Außen		>0,9999	
Knotenpunkte Innen vs. Knotenpunkte Mitte		0,4671	
Knotenpunkte Innen vs. Knotenpunkte Außen		>0,9999	
Knotenpunkte Mitte vs. Knotenpunkte Außen		>0,9999	

*KP=Knotenpunkte, HF=Hohlfasern

Tabelle 10.5.16 Auflistung der statistischen Tests und p-Werte für die Daten der CD68-Färbung des E-MOs.

Eurosets-adult CD68			
Kruskal-Wallis Test (Gruppenanalyse)		Mann Whitney U-Test (gepoolt)	
Gruppen	Hohlfasern I/M/A, Knotenpunkte: I/M/A	Gruppen	KP vs. HF
P-Wert	0,6449	P-Wert	0,3424
Gruppenanzahl	4	Gruppenanzahl	2
Anzahl der Werte	20	Anzahl der Werte	20
Dunn's multipler Vergleichs Test (post-hoc)		Adjustierter P-Wert	
Hohlfasern Innen vs. Hohlfasern Mitte		>0,9999	
Hohlfasern Innen vs. Knotenpunkte Innen		>0,9999	
Hohlfasern Innen vs. Knotenpunkte Mitte		>0,9999	
Hohlfasern Mitte vs. Knotenpunkte Innen		>0,9999	
Hohlfasern Mitte vs. Knotenpunkte Mitte		>0,9999	
Hohlfasern Innen vs. Knotenpunkte Mitte		>0,9999	

*KP=Knotenpunkte, HF=Hohlfasern

Tabelle 10.5.17 Datentabelle der Makrophagen-Polarisation

Maquet-PLS-i	Mittelwert (\pm SD)	Median (Quartile)	Min.-Max.	Shapiro-Wilk-Test/NV
Anteil M ϕ % (n = 15)	27,41 \pm 18,28	18,1 (14,16-42,55)	8,20-64,91	P=0,0216/Nein
Anteil M1 - M ϕ % (n = 15)	40,65 \pm 15,19	38,14 (28,71-49,23)	17,43-78,42	P=0,5464/Ja
Anteil M2 - M ϕ % (n = 15)	59,35 \pm 15,19	61,86 (50,77-71,29)	21,58-82,57	P=0,5464/Ja

M ϕ = Makrophagen

10.6 Genehmigungen für entnommene Abbildungen

Im Folgenden sind die Verlags-Genehmigungen für die Entnahme bereits publizierter Abbildungen einzusehen. Entnommene Abbildungen, deren Nutzung unter die *Creative Commons Attribution 4.0 International License* fallen sind im Abbildungsverzeichnis mit Verlinkung ausgewiesen. Genutzte Abbildungen von Firmenwebseiten wurden über Mail-Kontakt genehmigt und sind im Abbildungsverzeichnis ausgewiesen.

RightsLink Printable License

<https://s100.copyright.com/AppDispatchServlet>

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

May 04, 2021

This Agreement between Mr. Felix Hoeren ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	5061940579127
License date	May 04, 2021
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery
Licensed Content Title	Contemporary extracorporeal membrane oxygenation therapy in adults: Fundamental principles and systematic review of the evidence
Licensed Content Author	John J. Squiers, Brian Lima, J. Michael DiMaio
Licensed Content Date	Jul 1, 2016
Licensed Content Volume	152
Licensed Content Issue	1
Licensed Content Pages	13

WOLTERS KLUWER HEALTH, INC. LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

May 04, 2021

This Agreement between Mr. Felix Hoeren ("You") and Wolters Kluwer Health, Inc. ("Wolters Kluwer Health, Inc.") consists of your license details and the terms and conditions provided by Wolters Kluwer Health, Inc. and Copyright Clearance Center.

License Number 5061951375612

License date May 04, 2021

Licensed Content
Publisher Wolters Kluwer Health, Inc.

Licensed Content
Publication ASAIO Journal

Licensed Content Title Efficiency in Extracorporeal Membrane Oxygenation—Cellular
Deposits on Polymethylpentene Membranes Increase Resistance to
Blood Flow and Reduce Gas Exchange Capacity

Licensed Content
Author Karla Lehle, Alois Philipp, Otto Gleich, et al

Licensed Content Date Nov 1, 2008

Licensed Content
Volume 54

Licensed Content Issue 6

Type of Use Dissertation/Thesis

[Print This Page](#)

**WOLTERS KLUWER HEALTH, INC. LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

May 04, 2021

This Agreement between Mr. Felix Hoeren ("You") and Wolters Kluwer Health, Inc. ("Wolters Kluwer Health, Inc.") consists of your license details and the terms and conditions provided by Wolters Kluwer Health, Inc. and Copyright Clearance Center.

License Number 5061960523249

License date May 04, 2021

Licensed Content Publisher Wolters Kluwer Health, Inc.

Licensed Content Publication ASAIO Journal

Licensed Content Title Electron Microscopy as a Tool for Assessment of Anticoagulation Strategies During Extracorporeal Life Support: The Proof Is on the Membrane

Licensed Content Author Brendan M. Beely, James E. Campbell, Andrew Meyer, et al

Licensed Content Date Sep 1, 2016

Licensed Content Volume 62

Licensed Content Issue 5

Type of Use Dissertation/Thesis

[Print This Page](#)

**ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

May 04, 2021

This Agreement between Mr. Felix Hoeren ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	5061981232196
License date	May 04, 2021
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Journal of Membrane Science
Licensed Content Title	Characterization of membrane blood oxygenation devices using computational fluid dynamics
Licensed Content Author	Juntao Zhang, Timothy D.C. Nolan, Tao Zhang, Bartley P. Griffith, Zhongjun J. Wu
Licensed Content Date	Feb 1, 2007
Licensed Content Volume	288
Licensed Content Issue	1-2
Licensed Content Pages	12

[Print This Page](#)


Marketplace™

American Society of Mechanical Engineers ASME - License Terms and Conditions

This is a License Agreement between Felix Hoeren ("You") and American Society of Mechanical Engineers ASME ("Publisher") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by American Society of Mechanical Engineers ASME, and the CCC terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC.

Order Date	12-May-2021	Type of Use	Republish in a thesis/dissertation
Order license ID	1118398-1	Publisher Portion	A S M E INTERNATIONAL
ISSN	1528-8951		Chart/graph/table/figure

LICENSED CONTENT

Publication Title	Journal of biomechanical engineering	Country	United States of America
Author/Editor	American Society of Mechanical Engineers.	Rightsholder	American Society of Mechanical Engineers ASME
Date	01/01/1977	Publication Type	e-Journal
Language	English	URL	http://ojps.aip.org/ASMEjournals/Biomechanical

REQUEST DETAILS

Portion Type	Chart/graph/table/figure	Distribution	Worldwide
Number of charts / graphs / tables / figures requested	2	Translation	Other translation needs
Format (select all that apply)	Print, Electronic	Enter languages	german
Who will republish the content?	Academic institution	Copies for the disabled?	No
Duration of Use	Life of current and all future editions	Minor editing privileges?	Yes
Lifetime Unit Quantity	Up to 499	Incidental promotional use?	No
Rights Requested	Main product	Currency	EUR

NEW WORK DETAILS

Title	Untersuchungen zur Zellbesiedelung von Polymethylpenten-Oxygenatormembranen nach extrakorporaler Membranoxygenierungs-Therapie	Institution name	Justus-Liebig-Universität-Giessen
		Expected presentation date	2021-06-30

Instructor name PD Dr. Manfred Richter

ADDITIONAL DETAILS

Order reference number	N/A	The requesting person / organization to appear on the license	Felix Hoeren
------------------------	-----	---------------------------------------------------------------	--------------

REUSE CONTENT DETAILS

Title, description or numeric reference of the portion(s)	BIO-13-1014	Title of the article/chapter the portion is from	Computational study of the blood flow in three types of 3D hollow fiber membrane bundles
Editor of portion(s)	Jiafeng Zhang, Xiaobing Chen, Jun Ding, Katharine H Fraser, M Ertan Taskin, Bartley P Griffith, Zhongjun J Wu	Author of portion(s)	American Society of Mechanical Engineers.
Volume of serial or monograph	Volume 135	Issue, if republishing an article from a serial	N/A
Page or page range of portion	Unknown	Publication date of portion	2013-12-01

PUBLISHER SPECIAL TERMS AND CONDITIONS

Permission is granted for the specific use of the ASME Figures 3,6 only as stated herein and does not permit further use of the materials without proper authorization. As is customary, we request that you ensure proper acknowledgment of the exact sources of this material, the authors, and ASME as original publisher.

CCC Republication Terms and Conditions

1. Description of Service; Defined Terms. This Republication License enables the User to obtain licenses for republication of one or more copyrighted works as described in detail on the relevant Order Confirmation (the "Work(s)"). Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC") grants licenses through the Service on behalf of the rightsholder identified on the Order Confirmation (the "Rightsholder"). "Republishing", as used herein, generally means the inclusion of a Work, in whole or in part, in a new work or works, also as described on the Order Confirmation. "User", as used herein, means the person or entity making such republication.
2. The terms set forth in the relevant Order Confirmation, and any terms set by the Rightsholder with respect to a particular Work, govern the terms of use of Works in connection with the Service. By using the Service, the person transacting for a republication license on behalf of the User represents and warrants that he/she/it (a) has been duly authorized by the User to accept, and hereby does accept, all such terms and conditions on behalf of User, and (b) shall inform User of all such terms and conditions. In the event such person is a "freelancer" or other third party independent of User and CCC, such party shall be deemed jointly a "User" for purposes of these terms and conditions. In any event, User shall be deemed to have accepted and agreed to all such terms and conditions if User republishes the Work in any fashion.
3. Scope of License; Limitations and Obligations.
 - 3.1. All Works and all rights therein, including copyright rights, remain the sole and exclusive property of the Rightsholder. The license created by the exchange of an Order Confirmation (and/or any invoice) and payment by User of the full amount set forth on that document includes only those rights expressly set forth in the Order Confirmation and in these terms and conditions, and conveys no other rights in the Work(s) to User. All rights not expressly granted are hereby reserved.

- 3.2. General Payment Terms: You may pay by credit card or through an account with us payable at the end of the month. If you and we agree that you may establish a standing account with CCC, then the following terms apply: Remit Payment to: Copyright Clearance Center, 29118 Network Place, Chicago, IL 60673-1291. Payments Due: Invoices are payable upon their delivery to you (or upon our notice to you that they are available to you for downloading). After 30 days, outstanding amounts will be subject to a service charge of 1-1/2% per month or, if less, the maximum rate allowed by applicable law. Unless otherwise specifically set forth in the Order Confirmation or in a separate written agreement signed by CCC, invoices are due and payable on "net 30" terms. While User may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the Order Confirmation, the license is automatically revoked and is null and void, as if it had never been issued, if complete payment for the license is not received on a timely basis either from User directly or through a payment agent, such as a credit card company.
- 3.3. Unless otherwise provided in the Order Confirmation, any grant of rights to User (i) is "one-time" (including the editions and product family specified in the license), (ii) is non-exclusive and non-transferable and (iii) is subject to any and all limitations and restrictions (such as, but not limited to, limitations on duration of use or circulation) included in the Order Confirmation or invoice and/or in these terms and conditions. Upon completion of the licensed use, User shall either secure a new permission for further use of the Work(s) or immediately cease any new use of the Work(s) and shall render inaccessible (such as by deleting or by removing or severing links or other locators) any further copies of the Work (except for copies printed on paper in accordance with this license and still in User's stock at the end of such period).
- 3.4. In the event that the material for which a republication license is sought includes third party materials (such as photographs, illustrations, graphs, inserts and similar materials) which are identified in such material as having been used by permission, User is responsible for identifying, and seeking separate licenses (under this Service or otherwise) for, any of such third party materials; without a separate license, such third party materials may not be used.
- 3.5. Use of proper copyright notice for a Work is required as a condition of any license granted under the Service. Unless otherwise provided in the Order Confirmation, a proper copyright notice will read substantially as follows: "Republished with permission of [Rightsholder's name], from [Work's title, author, volume, edition number and year of copyright]; permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc. " Such notice must be provided in a reasonably legible font size and must be placed either immediately adjacent to the Work as used (for example, as part of a by-line or footnote but not as a separate electronic link) or in the place where substantially all other credits or notices for the new work containing the republished Work are located. Failure to include the required notice results in loss to the Rightsholder and CCC, and the User shall be liable to pay liquidated damages for each such failure equal to twice the use fee specified in the Order Confirmation, in addition to the use fee itself and any other fees and charges specified.
- 3.6. User may only make alterations to the Work if and as expressly set forth in the Order Confirmation. No Work may be used in any way that is defamatory, violates the rights of third parties (including such third parties' rights of copyright, privacy, publicity, or other tangible or intangible property), or is otherwise illegal, sexually explicit or obscene. In addition, User may not conjoin a Work with any other material that may result in damage to the reputation of the Rightsholder. User agrees to inform CCC if it becomes aware of any infringement of any rights in a Work and to cooperate with any reasonable request of CCC or the Rightsholder in connection therewith.
4. Indemnity. User hereby indemnifies and agrees to defend the Rightsholder and CCC, and their respective employees and directors, against all claims, liability, damages, costs and expenses, including legal fees and expenses, arising out of any use of a Work beyond the scope of the rights granted herein, or any use of a Work which has been altered in any unauthorized way by User, including claims of defamation or infringement of rights of copyright, publicity, privacy or other tangible or intangible property.
5. Limitation of Liability. UNDER NO CIRCUMSTANCES WILL CCC OR THE RIGHTSHOLDER BE LIABLE FOR ANY DIRECT, INDIRECT, CONSEQUENTIAL OR INCIDENTAL DAMAGES (INCLUDING WITHOUT LIMITATION DAMAGES FOR LOSS OF BUSINESS PROFITS OR INFORMATION, OR FOR BUSINESS INTERRUPTION) ARISING OUT OF THE USE OR INABILITY

TO USE A WORK, EVEN IF ONE OF THEM HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. In any event, the total liability of the Rightsholder and CCC (including their respective employees and directors) shall not exceed the total amount actually paid by User for this license. User assumes full liability for the actions and omissions of its principals, employees, agents, affiliates, successors and assigns.

6. Limited Warranties. THE WORK(S) AND RIGHT(S) ARE PROVIDED "AS IS". CCC HAS THE RIGHT TO GRANT TO USER THE RIGHTS GRANTED IN THE ORDER CONFIRMATION DOCUMENT. CCC AND THE RIGHTSHOLDER DISCLAIM ALL OTHER WARRANTIES RELATING TO THE WORK(S) AND RIGHT(S), EITHER EXPRESS OR IMPLIED, INCLUDING WITHOUT LIMITATION IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. ADDITIONAL RIGHTS MAY BE REQUIRED TO USE ILLUSTRATIONS, GRAPHS, PHOTOGRAPHS, ABSTRACTS, INSERTS OR OTHER PORTIONS OF THE WORK (AS OPPOSED TO THE ENTIRE WORK) IN A MANNER CONTEMPLATED BY USER; USER UNDERSTANDS AND AGREES THAT NEITHER CCC NOR THE RIGHTSHOLDER MAY HAVE SUCH ADDITIONAL RIGHTS TO GRANT.
7. Effect of Breach. Any failure by User to pay any amount when due, or any use by User of a Work beyond the scope of the license set forth in the Order Confirmation and/or these terms and conditions, shall be a material breach of the license created by the Order Confirmation and these terms and conditions. Any breach not cured within 30 days of written notice thereof shall result in immediate termination of such license without further notice. Any unauthorized (but licensable) use of a Work that is terminated immediately upon notice thereof may be liquidated by payment of the Rightsholder's ordinary license price therefor; any unauthorized (and unlicensable) use that is not terminated immediately for any reason (including, for example, because materials containing the Work cannot reasonably be recalled) will be subject to all remedies available at law or in equity, but in no event to a payment of less than three times the Rightsholder's ordinary license price for the most closely analogous licensable use plus Rightsholder's and/or CCC's costs and expenses incurred in collecting such payment.
8. Miscellaneous.
 - 8.1. User acknowledges that CCC may, from time to time, make changes or additions to the Service or to these terms and conditions, and CCC reserves the right to send notice to the User by electronic mail or otherwise for the purposes of notifying User of such changes or additions; provided that any such changes or additions shall not apply to permissions already secured and paid for.
 - 8.2. Use of User-related information collected through the Service is governed by CCC's privacy policy, available online here:<https://marketplace.copyright.com/rs-ui-web/mp/privacy-policy>
 - 8.3. The licensing transaction described in the Order Confirmation is personal to User. Therefore, User may not assign or transfer to any other person (whether a natural person or an organization of any kind) the license created by the Order Confirmation and these terms and conditions or any rights granted hereunder; provided, however, that User may assign such license in its entirety on written notice to CCC in the event of a transfer of all or substantially all of User's rights in the new material which includes the Work(s) licensed under this Service.
 - 8.4. No amendment or waiver of any terms is binding unless set forth in writing and signed by the parties. The Rightsholder and CCC hereby object to any terms contained in any writing prepared by the User or its principals, employees, agents or affiliates and purporting to govern or otherwise relate to the licensing transaction described in the Order Confirmation, which terms are in any way inconsistent with any terms set forth in the Order Confirmation and/or in these terms and conditions or CCC's standard operating procedures, whether such writing is prepared prior to, simultaneously with or subsequent to the Order Confirmation, and whether such writing appears on a copy of the Order Confirmation or in a separate instrument.
 - 8.5. The licensing transaction described in the Order Confirmation document shall be governed by and construed under the law of the State of New York, USA, without regard to the principles thereof of conflicts of law. Any case, controversy, suit, action, or proceeding arising out of, in connection with, or related to such licensing transaction shall be brought, at CCC's sole discretion, in any federal or state court located in the County of New York, State of New York, USA, or in any federal or state court whose geographical jurisdiction covers the location of the Rightsholder set forth in the Order Confirmation. The parties

Firefox

<https://marketplace.copyright.com/rs-ui-web/mp/license/99d37980-a235...>

expressly submit to the personal jurisdiction and venue of each such federal or state court. If you have any comments or questions about the Service or Copyright Clearance Center, please contact us at 978-750-8400 or send an e-mail to support@copyright.com.

11. Publikationsverzeichnis

11.1 Kongressbeiträge/Vorträge:

Zwischenergebnisse dieser Arbeit wurden als Vortrag auf den folgenden Konferenzen vorgestellt:

20.11.2020 – 22.11.2020:

49. Internationale Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiotechnik und 12. Fokustagung der Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie und der DGfK – Onlinekonferenzteilnahme

14.04.2021:

Vortragsreihe „Bits & Chips“ der TH Bingen - Rheinland-Pfälzischer BigBlueButton-Server - Covid-19 und Immunologie – Untersuchungen von der körpereigenen Immunabwehr bis zur Impfstoffentwicklung mit Methoden der KI“

06.09.2021 – 08.09.2021:

German Conference on Bioinformatics 2021 - Onlinekonferenzteilnahme

12. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

Ort/Datum

Unterschrift

13. Danksagung

Zum Abschluss dieser Arbeit möchte ich mich bei allen beteiligten Personen bedanken. Mein großer Dank geht an meinen Doktorvater PD Dr. Manfred Richter, der mir dieses Promotionsthema vermittelt und mich gefördert hat sowie für meine Rückfragen jederzeit zur Verfügung stand. Genau so großer Dank geht an meine unterstützende Betreuerin Prof. Dr. Kerstin Troidl, die mir für neue Ideen und die Besprechung der Daten zur Seite stand. Vor allem der kritische Diskurs hat mich motiviert neue Wege zu gehen und durchzuhalten.

Wenn man mit einer Promotionsarbeit beginnt sind die eigenen praktischen Fähigkeiten stark begrenzt und man ist auf eine helfende Hand im Umgang mit Pipette und Mikroskop angewiesen. Diese Hand war für mich Brigitte Matzke, die mir als MTA im Labor zeigte, wie ich mit Proben umzugehen habe, wie die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie funktioniert und mich weise auf die Wichtigkeit der Labordokumentation hinwies. Des Weiteren möchte ich Benedikt Berge für die gute Gesellschaft und die hilfreichen Tipps während meiner Labortätigkeiten sowie dem kritischen Zuhören in den Projektvorstellungsrunden danken. Um ein so aufwendiges und durchdachtes Medizinprodukt wie den Membranoxygenator untersuchen zu können braucht man Experten, die sich mit der Funktionsweise eines solchen Gerätes auskennen. Daher möchte ich mich bei den Kardiotechnikern Marc Wollenschläger und Sebastian Schmidt bedanken, die nicht nur Teil des ECMO-Projekts sind, sondern mir für jegliche technische und fachliche Rückfragen jederzeit zur Seite standen. Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. Tobias Rasse und Nicolai Schmidt für die unterstützenden Beiträge zu dieser Arbeit bedanken.

Eine aufwendige Arbeit erfordert im Privaten geduldige Menschen, die einen bei Rückschlägen wie ein Rettungsnetz auffangen. Daher möchte ich mich bei meiner Wohngemeinschaft und meinen Freunden für das gute Zuhören und die Unterstützung bedanken. Zuletzt möchte ich mich bei meiner Freundin, meinen Eltern und meinen Brüdern bedanken, die ich über alles liebe, die meine Vorbilder sind und mir fachlich beim Schreiben dieser Dissertation beigestanden haben.